



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

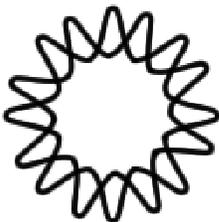
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRODUCCIÓN DE TOXOIDES DE SERPIENTES AFRICANAS MEDIANTE RADIACIÓN GAMMA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
P R E S E N T A:
GUILLERMO DE LA ROSA HERNÁNDEZ

TUTOR: ALEJANDRO ALAGÓN CANO



CUERNAVACA, MORELOS.

MARZO, 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ABREVIATURAS

ABTS	Di- amonio 2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenzoliazo-lino-6 sulfonato]
°C	Grados Celsius
Ci	Curies
CFA	Adyuvante completo de Freund
cm	Centímetro
Da	Daltones
E	<i>Elapidae</i>
ELISA	Enzyme Linked Immuno Assay (Inmunoensayo enzimático)
ED ₅₀	Dosis efectiva media
g	Gramos
Gy	Grays
IFA	Adyuvante incompleto de Freund
K	Kilo
KeVs	Kilo electrón voltio
LD ₅₀	Dosis letal media
l	Litro
μ	Micro
m	Mili
M	Molar
MeVs	Mega electrón voltio
ME	Mezcla de Elápidos (Mezcla de venenos de elápidos)
MV	Mezcla de Vipéridos (Mezcla de venenos de vipéridos)
Ma	Millones de años
n	Nano
PBS	Buffer de fosfatos
PLA2	Fosfolipasa A ₂
r	Coefficiente de correlación
r ²	Coefficiente de determinación
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
sp	Especies
SDS-PAGE	Sodium dodecil sulfate-poliacrylamide gel electroforesis (Electroforésis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio)
V	<i>Viperidae</i>

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1.-Estimación de la morbilidad por mordeduras de serpientes en el mundo.	3
2.- Velocidad con la que cada aminoácido reacciona con un radical OH [·] .	23
3.- Venenos utilizados en las mezclas inmunogénicas.	36
4.- Mezcla de Vipéridos usada para la producción del Antivipmyn® África.	39
5.- Mezcla de Elápidos usada para la producción del Antivipmyn® África.	40
6.- Dosis de radiación aplicadas a diferentes Mezclas de Vipéridos congeladas y liofilizadas.	41
7.- Dosis de radiación aplicadas a diferentes Mezclas de Vipéridos líquidas a 1.5 mg/ml.	42
8.- Dosis de radiación aplicadas a diferentes Mezclas de Vipéridos líquidas a 5 mg/ml.	42
9.- Dosis de radiación aplicadas a diferentes Mezclas de Elápidos congeladas y liofilizadas.	43
10.- Dosis de radiación aplicadas a diferentes Mezclas de Elápidos líquidas a 1.5 mg/ml.	44
11.- Dosis de radiación aplicadas a diferentes Mezclas de Elápidos líquidas a 5 mg/ml.	44
12.- Esquema de inmunización de conejos con la Mezcla de Vipéridos y Elápidos	47
13. Esquema de inmunización de caballos con la Mezcla de Vipéridos irradiada.	48
14.- Esquema de inmunización de caballos con la Mezcla de Elápidos irradiada	49
15.- Mortalidad y absorbancia de la Mezcla de Vipéridos irradiada liofilizada.	53
16.- Mortalidad y absorbancia de la Mezcla de Vipéridos irradiada congelada.	53
17. Mortalidad y absorbancia de la Mezcla de Vipéridos irradiada líquida a 1.5 mg/ml.	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
18. Mortalidad y absorbancia de la Mezcla de Vipéridos irradiada líquida a 5 mg/ml.	56
19.- Dosis efectivas contra <i>E. ocellatus</i> y <i>B. arietans</i> .	62
20.- Mortalidad y absorbancia de la Mezcla Elápidos irradiada liofilizada.	64
21.- Mortalidad y absorbancia de la Mezcla Elápidos irradiada congelada.	64
22. Mortalidad y absorbancia de la Mezcla Elápidos irradiada líquida a 1.5 mg/ml.	66
23. Mortalidad y absorbancia de la Mezcla Elápidos irradiada líquida a 5 mg/ml.	67
24.- Dosis efectiva contra <i>N. nigricollis</i> y <i>D. polylepsis</i> .	73

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	Página
1.- Línea del tiempo, del periodo Pérmico a la época actual; expresada en millones de años	2
2.- Distribución del género <i>Echis</i> y <i>Bitis</i> en el continente Africano	7
3.- Distribución de las cuatro especies del género <i>Naja</i> de importancia medica en África	10
4.- Distribución de las cuatro especies del género <i>Dendroaspis</i> en África	11
5.- Determinación de la Dosis letal de la mezcla de <i>Vipéridos</i> y <i>Elápidos</i>	52
6.- SDS-PAGE de la Mezcla de Vipéridos irradiada liofilizada.	54
7.- SDS-PAGE de la Mezcla de Vipéridos irradiada congelada.	54
8.- SDS-PAGE de la Mezcla de Vipéridos irradiada líquida a 1.5 mg/ml.	56
9.- SDS-PAGE de la Mezcla de Vipéridos irradiada líquida a 5 mg/ml.	57
10.- SDS-PAGE de la Mezcla de Vipéridos nativa e irradiada (toxoides obtenido).	58
11.- Evolución de los títulos de anticuerpos de conejo contra la Mezcla de Vipéridos nativa e irradiada.	59
12.- Determinación de la Dosis efectiva específica del antisuero obtenido contra la MV nativa e irradiada.	60
13.- Evolución de los títulos del antisuero de origen equino anti-Mezcla de Vipéridos irradiada.	61
14.- Determinación de la Dosis efectiva específica del suero anti-Mezcla de Vipéridos irradiada de origen equino.	62
15.- SDS-PAGE de la Mezcla de Elápidos irradiada liofilizada.	65

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	Página
16.- SDS-PAGE de la Mezcla de Elápidos irradiada congelada.	65
17.- SDS-PAGE de la Mezcla de Elápidos irradiada líquida a 1.5 mg/ml (sobrenadantes y precipitados).	67
18.- SDS-PAGE de la Mezcla de Elápidos irradiada líquida a 5 mg/ml.	68
19.- SDS-PAGE de la Mezcla de Elápidos nativa e irradiada (toxoides obtenido).	69
20.- Evolución de los títulos de anticuerpos de conejo contra la Mezcla de Elápidos nativa e irradiada.	70
21.- Determinación de la Dosis efectiva específica del antisuero obtenido contra la Mezcla de Elápidos nativa e irradiada	71
22.- Evolución de los títulos del antisuero de origen equino anti-Mezcla de Elápidos irradiada.	72
23.- Determinación de la Dosis efectiva específica del suero anti-ME irradiada de origen equino.	73

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA	Página
1.- Modificación de aminoácidos aromáticos por radicales hidroxilo	24
2.- Modificación de aminoácidos azufrados por radicales hidroxilo	25
3.- Modificación de aminoácidos alifáticos por radicales hidroxilo	26
4.- Modificación de aminoácidos cargados por radicales hidroxilo	27
5.- Modificación de aminoácidos alifáticos por radicales hidroxilo	28

ÍNDICE

	<i>Página</i>
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Historia evolutiva de las serpientes.	1
1.2 Ofidismo a nivel global.	3
1.2.1 Epidemiología del ofidismo en África.	4
1.3 Glándula venenosa y composición del veneno.	5
1.4 Vipéridos: Géneros <i>Echis</i> y <i>Bitis</i> .	6
1.4.1 Veneno de Vipéridos.	8
1.5 Elápidos: Géneros <i>Naja</i> y <i>Dendroaspis</i> .	8
1.5.1 Veneno de Elápidos.	11
1.6 Los antivenenos.	13
1.6.1 El papel de la respuesta inmune adaptativa en la producción de antivenenos.	14
1.6.2 Uso de toxoides en la producción de antivenenos.	15
1.7 Origen de la química de radiación.	16
1.8 Radiación gamma.	19
1.8.1 Sensibilidad de los aminoácidos a los radicales OH [·] .	21
1.8.2 Productos de la oxidación de aminoácidos aromáticos.	23
1.8.3 Productos de la oxidación de aminoácidos azufrados.	24
1.8.4 Productos de la oxidación de aminoácidos alifáticos.	25
1.8.5 Productos de la oxidación de aminoácidos cargados.	26
1.8.6 Productos de la oxidación de aminoácidos con hetero átomos neutros.	27
2. ANTECEDENTES.	29
3. JUSTIFICACIÓN.	32
4. HIPÓTESIS.	33
5. OBJETIVOS.	34
5.1 Objetivo general.	34
5.2 Objetivos particulares.	34
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	35
7. MATERIAL Y MÉTODOS.	36
7.1 Materiales.	36
7.1.1 Reactivos.	36
7.1.2 Venenos.	36

ÍNDICE

	<i>Página</i>
7.1.3 Animales experimentales.	37
7.1.4 Adyuvantes.	37
7.1.5 Ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzima (ELISA).	38
7.1.6 Electroforesis.	38
7.1.7 Irradiador.	38
7.2 Metodología.	39
7.2.1 Preparación de las mezclas de veneno.	39
7.2.1.1 Preparación de la mezcla de Vipéridos (MV).	39
7.2.1.2 Preparación de la mezcla de Elápidos (ME).	40
7.2.2 Irradiación de las mezclas.	40
7.2.2.1 Irradiación de la mezcla de Vipéridos.	41
7.2.2.1.1 Irradiación de la mezcla de Vipéridos congelada y liofilizada.	41
7.2.2.1.2 Irradiación de la mezcla de Vipéridos líquida.	41
7.2.2.2 Irradiación de la mezcla de Elápidos.	43
7.2.2.2.1 Irradiación de la mezcla de Elápidos congelada y liofilizada.	43
7.2.2.2.2 Irradiación de la mezcla de Elápidos líquida.	43
7.2.3 Electroforesis de proteínas.	45
7.2.4 Espectrofotometría (Absorbancia a 280 nm).	45
7.2.5 Determinación de la toxicidad de las mezclas (DL ₅₀)	45
7.2.6 Inmunización de conejos con las mezclas de veneno irradiadas y nativas.	46
7.2.7 Inmunización de caballos con las mezclas de veneno irradiadas.	47
7.2.7.1 Inmunización de caballos con la mezcla de Vipéridos irradiada.	48
7.2.7.1 Inmunización de caballos con la mezcla de Elápidos irradiada.	48
7.2.8 Medición de títulos por ELISA (Enzyme Linked Immuno Assay).	49
7.2.9 Determinación de la potencia neutralizante de los antisueros.	51
7.2.10 Análisis estadístico.	51
8. RESULTADOS.	52
8.1 Dosis letal media de las mezclas de Vipéridos y Elápidos no irradiadas.	52
8.2 Irradiación de las mezclas de Vipéridos congelada y liofilizada.	53
8.3 Irradiación de las mezclas de Vipéridos líquida.	55
8.4 Obtención del toxoide de Vipéridos.	57
8.5 Generación de anticuerpos en conejos contra el toxoide de Vipéridos.	58
8.6 Determinación de la potencia neutralizante de los antisueros de conejo.	59
8.7 Generación de anticuerpos en caballos contra la mezcla de vipéridos irradiada.	61
8.8 Determinación de la potencia neutralizante del suero antitoxoide de origen equino.	62

8.9 Irradiación de las mezclas de Elápidos congelada y liofilizada.	65
8.10 Irradiación de las mezclas de Elápidos líquida.	67
8.11 Obtención del toxoide de Elápidos.	69
8.12 Generación de anticuerpos en conejos contra el toxoide de Elápidos.	70
8.13 Determinación de la potencia neutralizante de los antisueros de conejo.	71
8.14 Generación de anticuerpos en caballos contra la mezcla de vipéridos irradiada.	72
8.15 Determinación de la potencia neutralizante del suero antitoxoide de origen equino.	73
9. DISCUSIÓN.	75
9.1 Determinación de la toxicidad de las mezclas inmunogénicas.	75
9.2 Irradiación de las mezclas congeladas, liofilizadas y líquidas.	76
9.3 Inmunogenicidad neutralizante de los toxoides en conejos.	80
9.4 Inmunogenicidad de los toxoides en caballos.	82
10. CONCLUSIONES.	86
11. BIBLIOGRAFÍA.	90
12. ANEXO	87

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Historia evolutiva de las serpientes

Los reptiles se originaron al final del período Pérmico y se extendieron durante todo el período Triásico (Figura 1). La capacidad de adaptación de estos animales, les permitió dominar un remoto período de la historia (Chippaux, 2006).

El orden *Squamata* pertenece a los reptiles. Sus miembros se caracterizan por tener la piel escamosa; los lagartos, anfisbénidos y serpientes, forman parte de este orden. Los ancestros de estos reptiles se remontan al Triásico inferior, hace 250 millones de años (Ma) (Figura 1). En ese período se separaron de los archosaurios (dinosaurios, cocodrilos y pterosaurios) y se consolidaron como lo que actualmente son.

Durante el Jurásico y principios de Cretácico (200 – 150 Ma), se presentó una fuerte radiación de especies; que respondió a la necesidad de adaptarse a una variedad de hábitats. Este proceso de especiación fue producto de la necesidad de adaptación a ciertos hábitos alimenticios, los que requirieron de modificaciones físicas apropiadas como: estructura ósea, talla y en su caso, fuerza física adecuada para someter a sus presas (Chippaux, 2006).

Los registros fósiles indican, que las primeras serpientes surgieron en la serie inferior del Cretácico hace 130 Ma (Figura 1). Estas pertenecen a la familia de los Boidos, las llamadas serpientes constrictoras. En los registros del Mioceno aparecen las primeras serpientes venenosas, pertenecen a la familia *Viperidae* y *Atractaspididae*. Cinco millones de años después surgió la familia *Elapidae*.

Las serpientes representan al grupo más extenso de los reptiles. Todas son depredadoras. Hasta la fecha, se han descrito 18 familias, 400 géneros y 3070 especies. La mayoría de ellas (~2700 sp.) se alimentan de otros vertebrados (Vidal y Hedges, 2009). Se distribuyen por todo el mundo; están presentes en los cinco continentes, en altitudes que van desde el nivel del mar hasta los cinco mil metros de altitud; por ser organismos ectotérmicos, la mayor densidad de población de estos ofidios se localiza en las regiones tropicales cercanas al Ecuador. Se han podido adaptar a diferentes hábitats, como los terrestres, marinos y dulceacuícolas (Jackson, 2003).

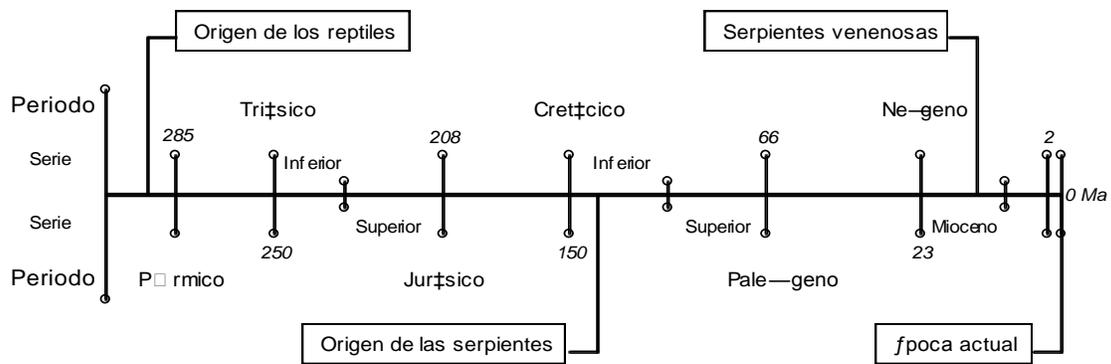


Figura 1. Línea del tiempo, del periodo Pérmico a la época actual; expresada en millones de años (Ma).

1.2 Ofidismo a nivel global

El envenenamiento por mordeduras de serpientes venenosas es un importante problema de salud pública a nivel mundial. Particularmente las zonas rurales de los países tropicales y subtropicales de África, Asia, América y Oceanía son las más afectadas (Tabla 1). Se estima que la tasa de mortalidad mundial ocasionada por este fenómeno asciende a las 120,000 muertes por año (Chippaux, 1998).

Tabla 1. Estimación de la morbilidad por mordeduras de serpientes en el mundo

Región	Población (x 10 ⁶)	Mordeduras	Envenenamientos	Muertes
Europa	750	25,000	8,000	30
Medio Oriente	160	20,000	15,000	100
Usa/Canadá	270	45,000	6,500	15
Latinoamérica	400	300,00	150,000	5,000
África	800	1,000,000	500,000	20,000
Asia	3500	4,000,000	2,000,000	100,000
Oceanía	20	10,000	3,000	200
Total	5900	5,400,000	2,682,500	125,345

Fuente: (Stock *et al.*, 2007).

Los accidentes ofídicos son de mayor relevancia en países tropicales y en vías de desarrollo, en donde se reportan una alta tasa de mortalidad. La amplia distribución geográfica de las serpientes venenosas en estas regiones coincide con los asentamientos humanos. Para determinados sectores de estas poblaciones la insuficiencia de servicios médicos, la lejanía de centros de salud y la escasez o ineficacia de ciertos antivenenos, los posiciona como sectores altamente vulnerables (Gutiérrez *et al.*, 2006).

La mayoría de los envenenamientos de importancia médica son producto de la mordedura de serpientes de la familia *Elapidae* y *Viperidae*. Entre las serpientes responsables de los accidentes ofídicos que causan alta mortalidad a nivel mundial, se encuentran las serpientes del género *Echis*, *Bungarus*, *Naja*, y *Bothrops*. Existen otros géneros cuya mortalidad no es significativa a nivel mundial, sin embargo, representan un serio problema de salud en regiones específicas del mundo; por ejemplo, las serpientes del género *Crotalus* en América y *Bitis* en África (Gutiérrez *et al.*, 2006).

1.2.1 Epidemiología del ofidismo en África.

En África el ofidismo es un problema principalmente al sur del Sahara. El norte del continente es una región árida en donde se localiza el desierto más grande del mundo (desierto del Sahara). En esta región la probabilidad de un encuentro entre un humano y una serpiente es baja. La zona sur de este desierto, es conocida como el África subsahariana, en donde la agricultura es la actividad principal (Stock *et al.*, 2007).

Para este continente se estiman 20,000 muertes anualmente y 100,000 envenenamientos severos, que, provocan daños permanentes en las personas afectadas. Éstos incluyen úlceras crónicas provocadas por síndromes necróticos, disfunciones renales, secuelas neurológicas y amputaciones (Stock *et al.*, 2007).

Al norte del continente, la tasa de morbilidad anual es de 15 envenenamientos por cada 100,000 habitantes. A pesar de que esto representa un problema de salud pública en dicha región, resulta de menor importancia comparado con lo que pasa en otras regiones del continente. Por ejemplo; las zonas ubicadas al sur del Sahara reportan de 10 a 1000 envenenamientos por cada 100,000 habitantes. Tanto la incidencia de las mordeduras, como el número de envenenamientos y muertes, dependen de la región, factores estacionales, tipos de terreno, distribución de las serpientes y hábitos locales de la población humana afectada (Stock *et al.*, 2007)

En África, la mayor parte de los envenenamientos son causados por Vipéridos (*Echis* y *Bitis*). Otros géneros relevantes en términos epidemiológicos, que no forman parte de esta familia son *Dendroaspis* y *Naja*. De acuerdo a los estudios epidemiológicos y a los reportes clínicos, se sabe que la especie *Echis ocellatus* es la responsable del 70% de los envenenamientos por accidentes ofídicos, mientras que el 10% se atribuye a las mordeduras por serpientes del

genero *Naja*, y el resto son asociados a la mordedura de serpientes pertenecientes a otros géneros.

Las especies más importantes en términos de mortalidad para el continente africano son *Echis ocellatus*, *E. pyramidum*, *E. leucogaster*, *Bitis gabonica*, *B. arietans*, y los Elápidos *Naja nigricollis*, *N. haje*, *N. melanoleuca*, *N. nivea*, *N. pallida*, *N. mossambica*, *Dendroaspis polylepis*, *D. viridis*, *D. angusticeps* y *D. jamesoni* (Warrel, 1995). A pesar de que existen otras especies implicadas en el accidente ofídico, está registrado que representan menor riesgo para la población africana, en comparación con las especies antes mencionadas.

1.3 Glándula venenosa y composición del veneno.

El órgano venenoso ha experimentado múltiples modificaciones evolutivas. Se ha especializado en producir toxinas altamente afines a un blanco. Comúnmente, los cuadros de envenenamiento hemorrágicos y necróticos, son atribuidos a los Vipéridos y los neurotóxicos a los Elápidos.

No todas las serpientes producen veneno. Éste es producido por glándulas exocrinas modificadas, que tienen como origen evolutivo las glándulas salivales, que con el paso del tiempo se modificaron y adaptaron para producirlo (Markland y Perdon, 1998). El aparato de inyección, comprende un par de dientes modificados (colmillos) con una serie de adaptaciones, que cada grupo de serpientes ha adquirido a lo largo de su evolución.

El veneno es una compleja mezcla de moléculas de diferente peso molecular, de las cuales, cada una es potencialmente tóxica. Los componentes principales son péptidos y proteínas, que representan entre el 90 y 95% del peso seco del veneno. Otros componentes del mismo son carbohidratos, ácidos nucleicos, iones, aminoácidos y lípidos (Kochva, 1987; Mebs, 1989).

Los venenos de las serpientes también contienen una gran cantidad de enzimas, dentro de las que se incluyen fosfolipasas, fosfodiesterasas, acetilcolinesterasas, metaloproteasas, serin-proteasas, hialuronidasas, y endonucleasas, principalmente. La mayoría de los componentes antes mencionados se encuentran asociados en forma de metaloproteínas y glicoproteínas (Kochva, 1987; Mebs, 1989). Los venenos de las serpientes también contienen toxinas; ejemplos de éstas tenemos a las llamadas neurotoxinas post-sinápticas y pre-sinápticas, toxinas que se unen a canales iónicos y receptores colinérgicos, miotoxinas y cardiotoxinas (Theakston y Reid, 1983). La composición química del veneno puede variar a nivel de familias y géneros de serpientes, también, se sabe con certeza que existen variaciones a nivel inter e intraespecífica, que se consideran deben estar regulados por factores ambientales, geográficos y alimentarios (Chippaux *et al.*, 1991; Theakston y Reid, 1983).

Los venenos de las familias *Viperidae* (V) y *Elapidae* (E) son los más estudiados debido a su importancia epidemiológica (Chippaux, 2002).

1.4 Vipéridos: Géneros *Echis* y *Bitis*.

Estos géneros pertenecen a la subfamilia *Viperinae*. Son conocidas como víboras verdaderas. A diferencia de los crotálicos, estas serpientes carecen de fosetas termorreceptoras. Las serpientes del género *Echis* están distribuidas en África, Medio Oriente, Pakistán, India y Sri Lanka (Figura 2A). Son de cuerpo corto, de no más de 90 cm de longitud en estado adulto. La cabeza es corta y ancha, los ojos son grandes y muy ubicados hacia la parte frontal. Las serpientes distribuidas en África son ovíparas, tanto de hábitos diurnos como nocturnos, se alimentan de insectos, reptiles (incluidas otras serpientes), pequeños mamíferos y aves.

Los envenenamientos por este género representan más del 80% de los accidentes en África y más del 90% de las defunciones reportadas para ese continente (Chippaux, 2002). Se les describe como serpientes que se mimetizan con el medio, silenciosas y agresivas. Los mordidos por estas serpientes presentan severas coagulopatias y desfibrinación que puede durar días y hasta semanas. Las hemorragias se presentan en todo el cuerpo, y pueden llevar a hemorragias intracraneales. La toxicidad de estas serpientes varía según la especie, edad, distribución geográfica, sexo, cantidad de veneno y ruta de administración (intravenosa, subcutánea, etc.). Las especies con mayor importancia epidemiológica en África son *Echis ocellatus*, *E. pyramidum* y *E. leucogaster* (Chippaux, 1998).

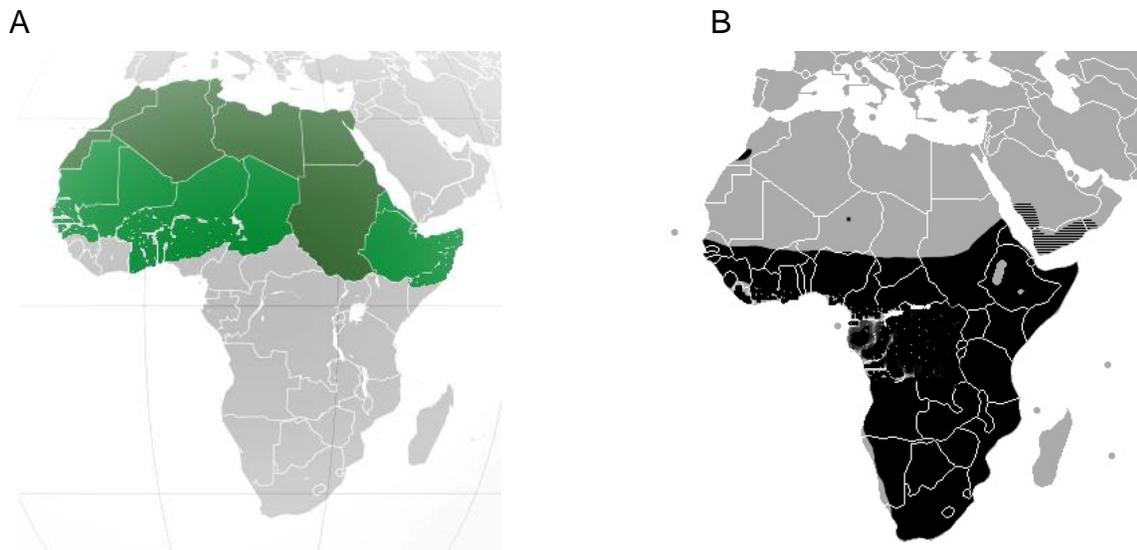


Figura 2. Distribución del género *Echis* (A; verde) y *Bitis* (B; negro) en el continente Africano.

El género *Bitis* se distribuye en África y al suroeste de la península arábiga (Figura 2B). Contiene 14 especies y son serpientes de rasgos robustos y agresivos. El tamaño varía desde los 20 cm hasta los 2 m de longitud; sus ojos son relativamente pequeños pero bien adaptados para detectar mínimos movimientos de sus presas. Son serpientes vivíparas con una tasa de reproducción alta comparada con otras especies. Los envenenamientos por este tipo de serpientes, provocan cuadros parecidos a los causados por el género

Echis, en donde las cuagulopatías y las hemorragias intensas son el factor común.

1.4.1 Veneno de Vipéridos

El veneno de las serpientes pertenecientes a la familia de los Vipéridos, está compuesto por una alta concentración de componentes de mediano y alto peso molecular y presentan una alta actividad enzimática (fosfolipasas, proteasas de serina, hemorraginas, fosfatasas, L-amino oxidasas, péptidos y proteasas dependientes de metales). Generalmente provoca alteraciones en el sistema de coagulación y la destrucción de tejidos. A nivel celular, la actividad catalítica de algunas de éstas enzimas resulta en la liberación de ácido araquidónico, el cual es un precursor de leucotrienos, tromboxanos, prostaglandinas y eicosanoides, lo cual, implica su relación con los procesos inflamatorios (van Deenen y de Haas, 1963). Los cuadros de envenenamiento por serpientes de esta familia son altamente hemorrágicos (Ward, 1996).

En el caso de las fosfolipasas, los productos de la hidrólisis de su sustrato, pueden alterar la permeabilidad de la membrana de las células, y en algunos casos, la unión de ésta enzima a la superficie de las membranas puede tener efectos farmacológicos, funcionando como agonista o antagonista, o alterando la unión de un receptor o ligando a su blanco original (Kerns *et al.*, 1999).

1.5 Elápidos: Géneros *Naja* y *Dendroaspis*.

El género *Naja* contiene 20 especies que se distribuyen en regiones áridas y templadas de África y sur de Asia; todas son conocidas como cobras. Los elápidos llegan a medir hasta 4 metros de longitud, son de hábitos diurnos y nocturnos. El envenenamiento por estas serpientes incluyen inflamación, dolor local y ampulación. Sin embargo, los efectos mas importantes son la

neurotoxicidad y la necrosis del tejido (Warrel, 1995). Estos síntomas se manifiestan en las personas afectadas dependiendo del grado de envenenamiento, de la composición química del veneno y de la cantidad inoculada (Chippaux, 2006).

Los síndromes neurotóxicos son causados por componentes proteicos de los venenos, como las neurotoxinas y cardiotoxinas. Se manifiestan como disfunciones neurológicas que resultan en la parálisis muscular. Por otro lado, las fosfolipasas descritas para este género, provocan daño tisular en el lugar de la mordedura y en algunas ocasiones, en otros sitios. Un cuadro de envenenamiento común, viene acompañado de ptosis palpebral, vértigos, parálisis muscular que comprometa a los músculos intercostales y al diafragma, para finalmente provocar un paro respiratorio (Warrel, 1995).

Existen dentro de este género, las llamadas cobras escupidoras (*N. nigricollis* y *N. pallida*). La mordedura por estas especies causa envenenamientos severos con daños titulares asociados. No se ha reportado cuadros de neurotoxicidad por estas serpientes. Por otro lado, se ha reportado que las cobras no escupidoras (*N. melanoleuca* y *N. haje*) si presentan neurotoxicidad asociada a un daño local y sistémico (Warrel, 1995).

Las especies de importancia médica para el continente africano son *Naja haje*, *N. nigricollis*, *N. melanoleuca* y *N. pallida* (Chippaux, 2002), y su distribución se da en la figura 3.

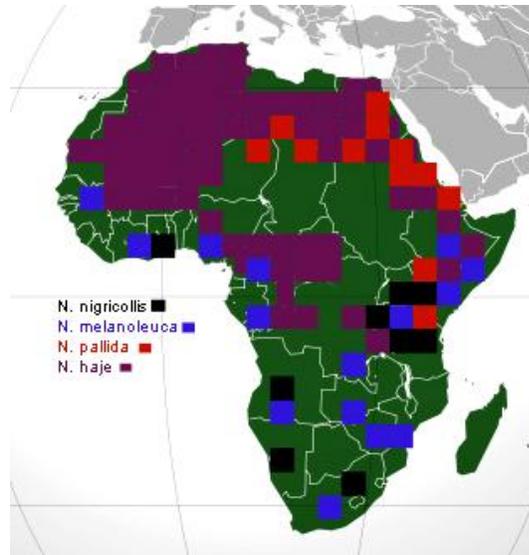


Figura 3. Distribución de las cuatro especies del género *Naja* de importancia médica en África.

El género *Dedroaspis* comprende cuatro especies de serpientes venenosas en África. Son los únicos Elápidos en este continente que llegan a medir hasta 4.2 m de longitud y alcanzar velocidades de 5.4 m/s. Son comúnmente conocidas como mambas.

La distribución de las mambas aparece en la figura 4. Habitan preferentemente en sabanas pero se pueden encontrar en bosques, cañadas, incluso, en pantanos. Debido a la alteración de su habitat, estas serpientes son comúnmente encontradas en sembradíos, en donde la cercanía con los humanos y la alta toxicidad de su veneno, las convierte en animales de gran importancia médica. Su veneno es altamente neurotóxico.

Las llamadas dendrotoxinas, son neurotoxinas descritas para este género, que tienen la característica de tener una alta afinidad por ciertos receptores de acetil colina muscarínicos y canales de potasio dependientes de voltaje (Harvey, 2001). Estas dendrotoxinas, de alrededor de 57-60 aminoácidos (~7kDa), en algunos casos, se han encontrado asociados al poro de los canales de potasio y en algunos otros, unidos a un sitio deferente del mismo canal, impidiendo el

paso de los iones a través de ellos. También, se ha observado que provocan la rápida liberación de neurotransmisores en las sinapsis periféricas y despolarizaciones repentinas, que llevan a una actividad tipo epiléptica. Además, impiden el flujo de calcio en las células musculares, lo que pueden llevar a una parálisis de los músculos respiratorios (Harvey, 2001).



Figura 4. En negro se muestra la distribución de las cuatro especies del género *Dendroaspis* en África.

1.5.1 Veneno de Elápidos

El veneno de las serpientes pertenecientes a la familia *Elapidae*, presenta una alta concentración de componentes de bajo peso molecular, actividad neurotóxica y baja actividad enzimática. Existen tres grupos principales de polipéptidos implicados en la toxicología y farmacología del veneno de esta familia: las fosfolipasas, neurotoxinas y cardiotoxinas.

Las neurotoxinas alteran la liberación de neurotransmisores, el mecanismo de acción de canales iónicos y del receptor de acetil colina tanto nicotínico como muscarínico. Son clasificadas de acuerdo a su mecanismo de

acción, al nivel en donde actúan y la conformación que presentan. Existen α -neurotoxinas las cuales actúan a nivel postsináptico, inhibiendo la transmisión de los estímulos nerviosos al bloquear los receptores colinérgicos (Tu y Miller, 1989). Éstas han sido clasificadas como neurotoxinas pequeñas (60–62 aminoácidos) y grandes (66-74 aminoácidos). Exhiben homología estructural, sin embargo difieren en la composición de aminoácidos, lo que se refleja en algunas diferencias en sus propiedades tóxicas (Chippaux, 2006).

Las cardiotoxinas son pequeños polipéptidos relacionados con las α -neurotoxinas; bloquean los receptores de acetilcolina del músculo del corazón impidiendo su contracción y alterando su fisiología (Hung *et al.*, 1998). Dentro de las toxinas con actividad presináptica (las beta neurotoxinas), están aquellas que afectan la liberación del neurotransmisor, las que tienen actividad inhibitoria de colinesterasas (fasciculinas) o aquellas que bloquean canales de K^+ voltaje dependientes (dendrotoxinas), como las que se encuentran en el veneno de las mambas (Harvey, 2001). Algunas tienen asociadas la actividad de fosfolipasa A_2 (Hawgood, 1990).

Las fosfolipasas A_2 (PLA_2), son unas proteínas que catalizan la hidrólisis dependiente de Ca^{2+} de la unión éster en la posición *sn*-2 de los fosfoglicéridos. La actividad de la PLA_2 está muy relacionada en la actividad tóxica de muchos venenos, tanto en lesiones a células musculares y cuadros de envenenamiento típicos de Vipéridos, como en cardiotoxicidad y en actividades neurotóxicas; tal es el caso de la crotoxina (Hawgood, 1990), que se ha visto *in vitro*, que tiene alta afinidad por receptores de acetil colina muscarínicos en sistema nervioso central de mamíferos (de Sousa *et al.*, 2008).

1.6 Los antivenenos

Esencialmente, los antivenenos están compuestos de inmunoglobulinas provenientes del suero de animales previamente expuestos a un antígeno determinado. Están basados en los resultados de von Behring y Kitasato que aplicaban suero de animales previamente inmunizados a enfermos de tétanos para atacar esta enfermedad (von Behring y Kitasato, 1890).

Contemporáneos a los trabajos de von Behring y Kitasato son los realizados por Sewall (Sewall, 1887) y Calmette (Calmette, 1894), quienes establecieron el uso de los antivenenos para tratar los casos de mordeduras de serpientes. Calmette por su parte fue el primero en proponer y establecer el uso de antivenenos terapéuticos en humanos (Calmette, 1984).

La aplicación del antiveneno específico es la única terapia comprobada como eficaz para tratar los casos de envenenamiento por animales ponzoñosos. Han existido diferentes generaciones de antivenenos; los que se producen actualmente siguen siendo obtenidos a partir del suero de animales hiperinmunizados –generalmente equinos- del cual se obtienen las inmunoglobulinas; además de eliminar cualquier otra proteína contaminante como la albúmina, estos anticuerpos son digeridos con pepsina para obtener los fragmentos F(ab')₂, los cuales tienen la capacidad de reconocer y neutralizar a los componentes principales de los venenos (López de Silanes *et al.*, 2004).

No todos los países producen antivenenos y, muchos de ellos, tienen grandes problemas de intoxicación por serpientes venenosas. Este problema ha llevado al uso de antivenenos heterólogos, los cuales se producen con el veneno de serpientes no relacionadas con aquellas que se encuentran en la región en donde se utilizan (Chippaux, 2002).

Si bien los antivenenos heterólogos pueden funcionar para neutralizar la intoxicación contra otras especies, la potencia de neutralización del antiveneno no siempre es la óptima. El hecho de que se haya demostrado ciertas relaciones antigénicas entre los venenos de especies del mismo género o incluso familia, no garantiza su efectividad (Bogarín *et al.*, 1995 y 1999). Además, debe considerarse que los antivenenos deben de producirse, idealmente, con el veneno de las especies de la región en donde se aplicará (Chippaux, 2002).

Una vez producido el antiveneno con el veneno de las especies de interés, se debe probar su potencia neutralizante; para ello se determina la dosis efectiva media (la ED₅₀ es la cantidad de antiveneno necesario para rescatar a la mitad de la población) retándolos con al menos tres dosis letales medias (la LD₅₀ es la cantidad de veneno necesaria para matar a la mitad de la población) (WHO, 1981).

1.6.1 El papel de la repuesta inmune adaptativa en la producción de antivenenos.

Los antivenenos están compuestos por proteínas plasmáticas llamadas anticuerpos o inmunoglobulinas que son producidas por células altamente diferenciadas del sistema inmune (linfocitos B plasmáticos). Existe un repertorio amplio de células B que tienen la habilidad de reconocer diversos antígenos. Estas células permanecen quiescentes en un organismo hasta que se presenta un reto antigénico (por ejemplo, la presencia de un patógeno o patrones moleculares asociados a ellos como proteínas, lipopolisacaridos y ácidos nucleicos).

Los linfocitos B activados, se diferencian para formar poblaciones de células de memoria y plasmáticas que responden con mayor rapidez y eficacia, respectivamente, a retos subsecuentes. Los linfocitos B plasmáticos son las células responsables de la producción de anticuerpos (respuesta humoral) y los

linfocitos B de memoria los involucrados en la maduración de la afinidad (Klein *et al.*, 2003).

Cuando una población de linfocitos B es estimulada, aquéllos que tengan receptores de mayor afinidad se seleccionan positivamente y aumenta la población de linfocitos que producen los anticuerpos más afines. En términos de producción de antivenenos, la memoria inmunitaria se produce como resultado de la inmunización inicial que desencadena la respuesta primaria. La respuesta humoral a cada inmunización, es cada vez mas intensa, de modo que las respuestas secundarias, terciarias y las subsiguientes son de magnitud cada vez mayor. La exposición repetida a un antígeno para lograr un estado aumentado de inmunidad, se conoce como hiperinmunización.

Está reportado que a mayor tamaño y cuanto más compleja sea una proteína, y más distante sea su relación con proteínas propias, mas probable será que desencadene una respuesta inmune (Klein *et al.*, 2003).

1.6.2 Uso de toxoides en la producción de antivenenos.

Androctonus australis hector es la especie de alacrán mas importante en términos epidemiológicos en Argelia, donde se registran más de 50,000 picaduras a humanos anualmente. El antiveneno correspondiente es producido en caballos; se ha reportado que el veneno es débil inmunógeno, altamente tóxico y provoca problemas de salud en los animales (Abib y Laraba-Djebari, 2003). Ambos hechos dificultan la obtención de una buena respuesta humoral necesaria para la producción de antivenenos. Lo anterior es un ejemplo por el cual – en la producción de antivenenos- se ha tratado de modificar a los inmunógenos de tal manera que pierdan su toxicidad (detoxifiquen) con el fin de optimizar la producción, sin afectar la salud de los animales. El término toxoide, es utilizado para referirse a un veneno detoxificado.

Los venenos detoxificados o toxoides, mantienen su inmunogenicidad y permiten utilizarlos en un esquema de inmunización (Hati *et al.*, 1990). Sin embargo, no todos los anticuerpos que se obtienen, son capaces de neutralizar al veneno, lo que depende de que los determinantes inmunogénicos importantes para la neutralización de sus efectos tóxicos (epítopes neutralizantes) se mantengan en el proceso de detoxificación. Se han reportado una variedad de métodos químicos para disminuir la toxicidad de venenos completos o fracciones de ellos con resultados poco favorables (pérdida de epítopes neutralizantes).

La radiación gamma es un método que se ha demostrado puede detoxificar y preservar determinantes antigénicos importantes para la producción de antivenenos. Los toxoides obtenidos por esta vía han sido inmunogénicos, y han permitido la producción de anticuerpos neutralizantes en ratones y conejos (Abib y Laraba-Djebari, 2003).

1.7 Origen de la química de radiación

El estudio de la química de radiación se remonta a los experimentos realizados por Roentgen, que en el año de 1895 describió por primera vez los rayos X. Sus experimentos le permitieron elucidar algunas de las propiedades de ese tipo de radiación. Encontró, por ejemplo, que era muy penetrante y que tenía la capacidad de atravesar sustancias opacas a la luz ordinaria, que atravesaba láminas, incluso metales con menor densidad que el plomo (Denaro y Jayson, 1972).

Para el año de 1896 los rayos X y el fenómeno de fluorescencia llamaron la atención de Becquerel, que por algún tiempo, trabajando con sustancias como el uranil sulfato de sodio, aplicándole luz ultravioleta, describió el fenómeno de fluorescencia. Cuando Becquerel usó por primera vez sales de uranil sulfato de potasio observó un fenómeno parecido a la fluorescencia: la diferencia con sus experimentos anteriores, era que para observar este fenómeno no era necesario

exponerlas previamente a una fuente de luz, es decir, estas sales emitían fluorescencia sin ser excitadas. Posteriormente determinó que la radiación podía ser obtenida de otras sales de uranio, incluyendo aquellas no fluorescentes, y que la intensidad de la radiación medida por el oscurecimiento de placas fotográficas, era proporcional a la cantidad de uranio en la muestra.

En 1898 Pierre y Marie Curie mostraron que la radiación emitida por el uranio utilizado por Becquerel, era un fenómeno atómico, el cual no dependía del estado químico o físico del elemento activo. Este fenómeno fué bautizado con el termino *radiactividad*. Además, en paralelo a esta definición, se establecieron varias unidades de medida que hasta la fecha son utilizadas. Por ejemplo: La *actividad*, es la emisión de partículas de una fuente que provoca un cierto número de desintegraciones por unidad de tiempo. La unidad de actividad más usada es el *Curie* (Ci), el cual equivale a 3.7×10^{10} desintegraciones por segundo (1 desintegración = 1 becquerel). La *actividad específica*, es la actividad por unidad de masa (Denaro y Jayson, 1972). En el año de 1899, Ernest Rutherford trabajando con uranio y torio, determinó dos tipos de radiaciones diferenciadas, que tenían poder de penetración distinto y diferentes cargas. Llamó a la radiación menos penetrante y que tenía carga positiva, radiación alfa, y a la más penetrante (y que producía necesariamente una menor ionización puesto que atravesaba el aire) radiación beta, que además tenía carga negativa. Paul Villard, en ese tiempo, mostró que existía un tercer tipo de radiación mucho más penetrante que la radiación beta, que no poseía carga y que podía obtenerse de algunos elementos radiactivos; fue llamada radiación gamma (Denaro y Jayson, 1972).

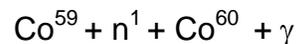
Las dos fuentes principales de las cuales se puede obtener radiación ionizante son: Las fuentes externas; que utilizan materiales radiactivos, tanto naturales como artificiales, y maquinas que aceleran átomos o moléculas a muy altas velocidades. El producto de la exposición de cualquier material a una fuente de radiación, es la transferencia de energía al sistema, que resulta en la

ionización y excitación de algunos de sus átomos o moléculas que lo constituyen, lo que permite que se lleven a cabo reacciones químicas que son independientes de la fuente de radiación.

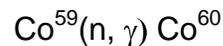
Las reacciones químicas producidas en un medio determinado al cual se le aplica radiación ionizante, dependen del tipo de radiación empleada (alfa, beta o gamma). Es por ello que, es importante conocer algunas de sus propiedades para obtener una serie de reacciones químicas esperadas (Draganic y Draganic, 1971).

Los rayos gamma a diferencia de los alfa y beta, tienen alta energía, por lo que un medio sin densidad alta (por ejemplo, el aire) no puede detenerla, así que una fuente externa de este tipo de radiación resulta técnicamente óptima para su uso en experimentos con medios acuosos.

El cobalto 60 (^{60}Co) representa una fuente externa de radiación gamma muy útil; se obtiene en reactores nucleares por medio de la activación del cobalto 59 (^{59}Co) con un flujo determinado de neutrones. La reacción puede ser descrita de la siguiente manera:



Las reacciones nucleares se escriben frecuentemente de manera abreviada y la reacción anterior, entonces puede escribirse como :



Los irradiadores en forma de laberinto y blindajes de concreto, son los mas usados en la industria. Su mecanismo consiste en levantar las fuentes de radiación de blindaje con alberca profunda en una cámara de irradiación en donde se encuentran las muestras que se desean irradiar. A esta cámara se accede por un laberinto prolongado formado con paredes dobles de concreto de al menos 80 cm de grosor que no permiten fugas de radiación al exterior. Las ventajas de estos irradiadores radica en que se puede exponer diversos

materiales a la radiación, permite manejar grandes volúmenes y, además, controlar las dosis de radiación según se requiera (Cruz, 1997).

1.8 Radiación gamma

La radiación gamma es un tipo de onda electromagnética que es emitida del núcleo de átomos inestables con estados de alta energía como el de algunos elementos radiactivos. Esta emisión de paquetes de energía (fotones) es precedida por el decaimiento nuclear alfa o beta (+ y/o -), para poder alcanzar, primeramente, un estado meta estable y posteriormente un estado basal o estable de energía y materia de los átomos emisores (Draganic y Draganic, 1971).

Los rayos gama tienen longitudes de onda inferiores a los 10^{-11} m; se diferencian de los rayos X por su origen. Los rayos gama se originan de los núcleos atómicos, mientras que los rayos X son emitidos de los orbitales electrónicos. Contienen un rango de energía que va de entre 10 KeVs y 100 MeVs; la diferencia de energía depende de la longitud de onda de los fotones, la cual a su vez, depende de la fuente emisora.

Las fuentes externas de radiación gama más comunes utilizan elementos radiactivos como el cobalto 60 y el Cesio 137; los fotones que emiten, interactúan con los electrones que se encuentran en los orbitales externos de los átomos y moléculas, aportando la suficiente energía para excitarlos y llevarlos a un nivel de energía superior, que culmina con su escisión.

Éste mecanismo de interacción de la energía con la materia es conocido como efecto Compton, el cual, es el más común para fotones con energías del orden de 1 a 100 MeVs (Kellerer y Roos, 2005) como los emitidos por el Co^{60} .

Los fotones que interactúan con los orbitales electrónicos de los átomos o moléculas tienen suficiente energía para ionizarlos, es decir, aportan suficiente energía a los electrones como para desprenderlos de sus orbitales. Finalmente, la transferencia de energía provoca que las moléculas o átomos queden radicalizados; es por ello que este tipo de radiación es también conocida como radiación ionizante o energía ionizante (Kempner, 2001).

En cada evento, independientemente del mecanismo de interacción, los rayos gamma provocan la ruptura de enlaces químicos, que deja como producto radicales que difunden a cierta velocidad y distancia dependiendo del *medio* en el que se encuentren (temperatura, densidad, molaridad, etc). Los radicales ya generados, pueden reaccionar ahora con otras moléculas o iones, tanto de manera unimolecular como bimolecular.

Dentro de las reacciones unimoleculares se encuentran; 1) El *rearrreglo*, que ocurre cuando la radicalización de una molécula permite cambiar su conformación y situar al electrón no apareado en una posición diferente a la inicial, y situarse así en un estado de baja energía; 2) La *disociación*, que llega a existir cuando una molécula al radicalizarse se disocia en dos componentes, de los cuales, uno queda con un electrón desapareado y el otro en un estado estable de energía; 3) La *combinación*, que es una reacción bi-molecular; se lleva a cabo cuando un radical forma un enlace covalente con otra molécula para formar un compuesto estable. Por ejemplo: la formación de radicales libres en los sistemas biológicos provoca la adición covalente de grupos químicos determinados a moléculas estables como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. El mayor número de átomos presentes en una solución acuosa con macromoléculas corresponde a los del agua. Los productos de la radiólisis de esta molécula son: H^{\cdot} y OH^{\cdot} . El radical hidroxilo, al tener un electrón desapareado, forma muy fácilmente enlaces covalentes con otras moléculas; esta acción indirecta de la radiación es el causante del 99% del daño a cualquier macromolécula en solución (Kempner, 2001). De igual manera, el radical

hidrógeno se une covalentemente a otras moléculas, sin embargo, debido a sus propiedades químicas (tiempo de vida media) sus efectos sobre moléculas orgánicas son mínimas.

La sensibilidad de las proteínas a la radiación depende de una serie de factores tales como: las moléculas de solvatación (solvente), la energía cinética del sistema irradiado, los grupos químicos de los aminoácidos que se encuentren expuestos al solvente, de su estructura tanto terciaria como cuaternaria (exposición de zonas hidrofóbicas), además, de las condiciones de irradiación (pH, temperatura, solvente, concentración). Aunque poco probable, la interacción directa de la radiación sobre la proteína, resulta en la ruptura de enlaces covalentes, tales como puentes disulfuro o enlaces peptídicos. Cualquiera de estas alteraciones, resulta en la pérdida de la actividad biológica de la proteína y, en algunos casos, en su destrucción (Kempner, 2001).

1.8.1 Sensibilidad de los aminoácidos a los radicales OH[·].

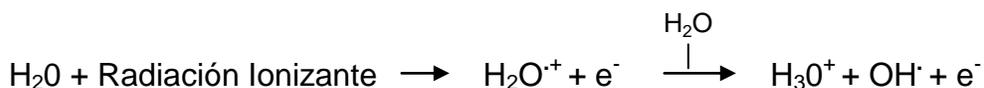
Todos los aminoácidos libres y los que forman parte de las proteínas son susceptibles a oxidarse en presencia de especies reactivas de oxígeno, como las presentes en contaminantes atmosféricos, los que se generan como productos de procesos metabólicos y los que se producen durante la exposición a rayos X, UV y gama (radiación ionizante) (Stadtman y Levine, 2003).

La reacción de péptidos y proteínas con radicales libres, es un proceso que se ha estudiado ampliamente debido a la importancia de los efectos biológicos que producen. La oxidación de las proteínas, por ejemplo, está asociado a problemas de envejecimiento, enfermedades crónicas degenerativas y a la exposición a la radiación.

Las modificaciones más comunes de las proteínas por radicales libres son la adición de grupos carbonilos, grupos hidroxiperoxilos, grupos oxidrilos,

entrecruzamientos de cadenas laterales vía tirosinas y escisiones de cadenas laterales. A nivel celular, la oxidación de proteínas es un proceso irreversible ya que las proteínas modificadas no pueden ser reparadas, pero si eliminadas; para ello, existen proteasas y complejos intracelulares (proteosomas) que reconocen a las proteínas dañadas, mal plegadas y oxidadas, y las eliminan; sin embargo, estos complejos proteolíticos también son susceptibles a la inactivación oxidativa. Es por ello que, con la edad, se van acumulando proteínas dañadas: proceso común del envejecimiento (Joshi *et al.*, 2005).

Existen diferentes métodos para producir radicales libres, como aquéllos catalizados por iones (reacción de Fenton) o mediante radiación ionizante. Los radicales que se producen en mayor concentración y los que protagonizan el mayor daño a las proteínas en solución acuosa son los radicales OH[·] (Kempner, 2001). Cuando se somete una solución acuosa a radiación gama, el agua se ioniza a causa de su interacción con los fotones de alta energía. Una vez ionizada reacciona en el orden de pico segundos con otras moléculas de agua para producir radicales OH[·] y iones hidronio (Maleknia *et al.*, 1999).



Los radicales hidroxilo (OH[·]) provocan modificaciones covalentes en las proteínas. Ocurren, en la mayoría de los casos, en los aminoácidos que se encuentran en las cadenas laterales ya que representan un impedimento estérico para que los radicales puedan reaccionar con la cadena polipeptídica. La reactividad o susceptibilidad de los amino ácidos para ser oxidados por los radicales OH[·] depende de la accesibilidad al solvente, el área de exposición hacia los radicales y la naturaleza química de cada aminoácido (Stadtman y Levine, 2003). Todos los aminoácidos reaccionan con los radicales OH[·], sin embargo se ha observado que la velocidad de reacción no es la misma, y se ha determinado el tiempo de reacción para algunos aminoácidos (Tabla 2).

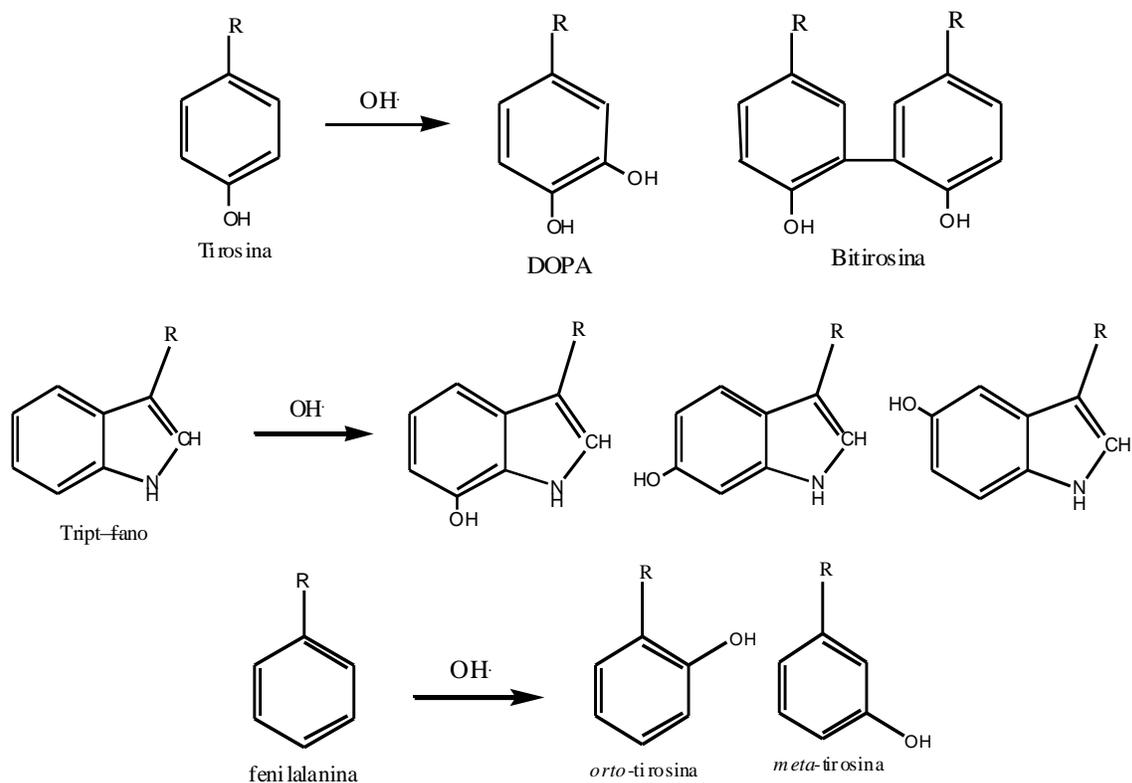
Tomando en cuenta la velocidad de reacción de cada aminoácido (Tabla 2), su accesibilidad al solvente y tamaño, se reportó el siguiente orden de reactividad: Cys mas reactivo que Met > Trp > Tyr > Phe > Cystina > His > Leu, Ile > Arg, Lys, Val > Ser, Thr, Pro > Gln, Glu > Asp, Asn > Ala > Gly (Xu *et al.*, 2005).

Tabla 2. Velocidad con la que cada aminoácido reacciona con un radical OH[·]. Fuente: (Xu *et al.*, 2005).

Aminoácido	Tiempo de reacción
Cys	$3.4 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$
Tyr	$1.3 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$
His	$1.3 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$
Met	$8.3 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$
Phe	$6.5 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$
Arg	$3.5 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$
Leu	$1.7 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$
Trp	$1.3 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$
Val	$7.6 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$
Thr	$5.8 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$
Ser	$3.2 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$
Glu	$2.3 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$
Ala	$7.7 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$
Asp	$7.5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$
Asn	$4.9 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$
Lys	$3.5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$
Gly	$1.7 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$

1.8.2 Productos de la oxidación de aminoácidos aromáticos.

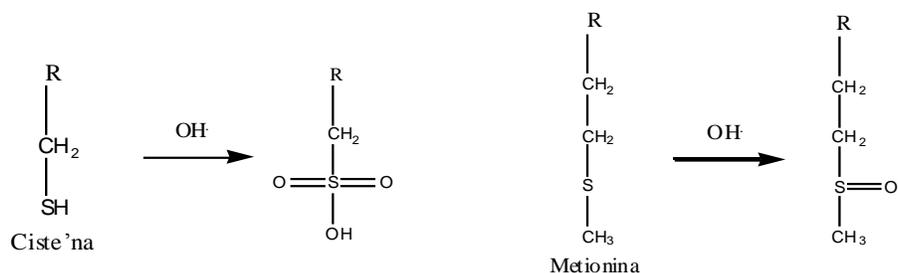
La modificación via radicales OH[·] de las cadenas laterales de las proteínas que contienen aminoácidos aromáticos se da principalmente por el ataque de los radicales hidroxilo al anillo aromático, el cual provoca la incorporación de uno o más grupos hidroxilo a esta estructura. Se obtienen cambios de masa de +16 Da que da como productos principales hidroxitriptofano para el caso del triptófano, y cambio de fenilalanina a tirosina (esquema 1). En el caso de la tirosina la adición de un grupo hidroxilo en posición meta es la modificación mas común (Stadtman y Levine 2003).



Esquema 1. Modificación de aminoácidos aromáticos por radicales hidroxilo.

1.8.3 Productos de la oxidación de aminoácidos azufrados.

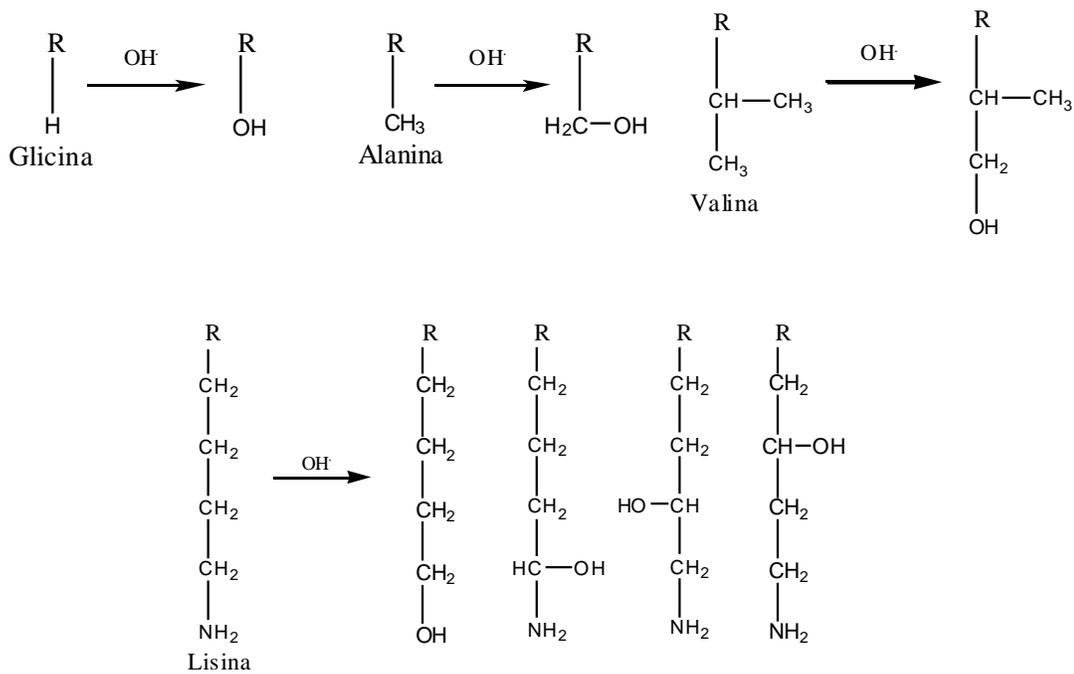
La cisteína y metionina son dos de los aminoácidos más reactivos. La modificación por radicales OH^\cdot de la cisteína resulta en ácido sulfónico de cisteína (aumento de 48 Da en masa). En el caso de la cistina el radical OH^\cdot produce la ruptura de los puentes disulfuro, produciendo ácido sulfónico de cisteína y serina (-16 Da) como productos. En el caso de la metionina su oxidación da lugar a sulfóxido de metionina, el cual representa un aumento de 16 Da en su masa (Xu *et al.*, 2005).

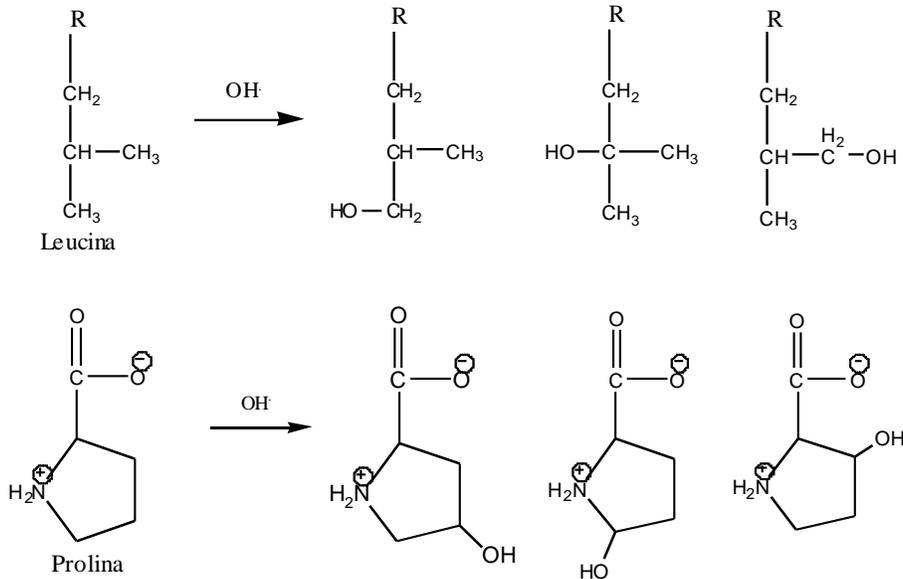


Esquema 2. Modificación de aminoácidos azufrados por radicales hidroxilo.

1.8.4 Productos de la oxidación de aminoácidos alifáticos.

En el caso de los aminoácidos como glicina, leucina, isoleucina, valina, prolina y alanina, se ha observado que son muy poco reactivos y además, en la mayoría de las proteínas no se encuentran expuestos al solvente. Sin embargo, se ha determinado que para estos aminoácidos, hay una adición de un hidroxilo en cualquier parte de la molécula, resultando en un aumento de 16 Da en su masa (Xu *et al.*, 2005).

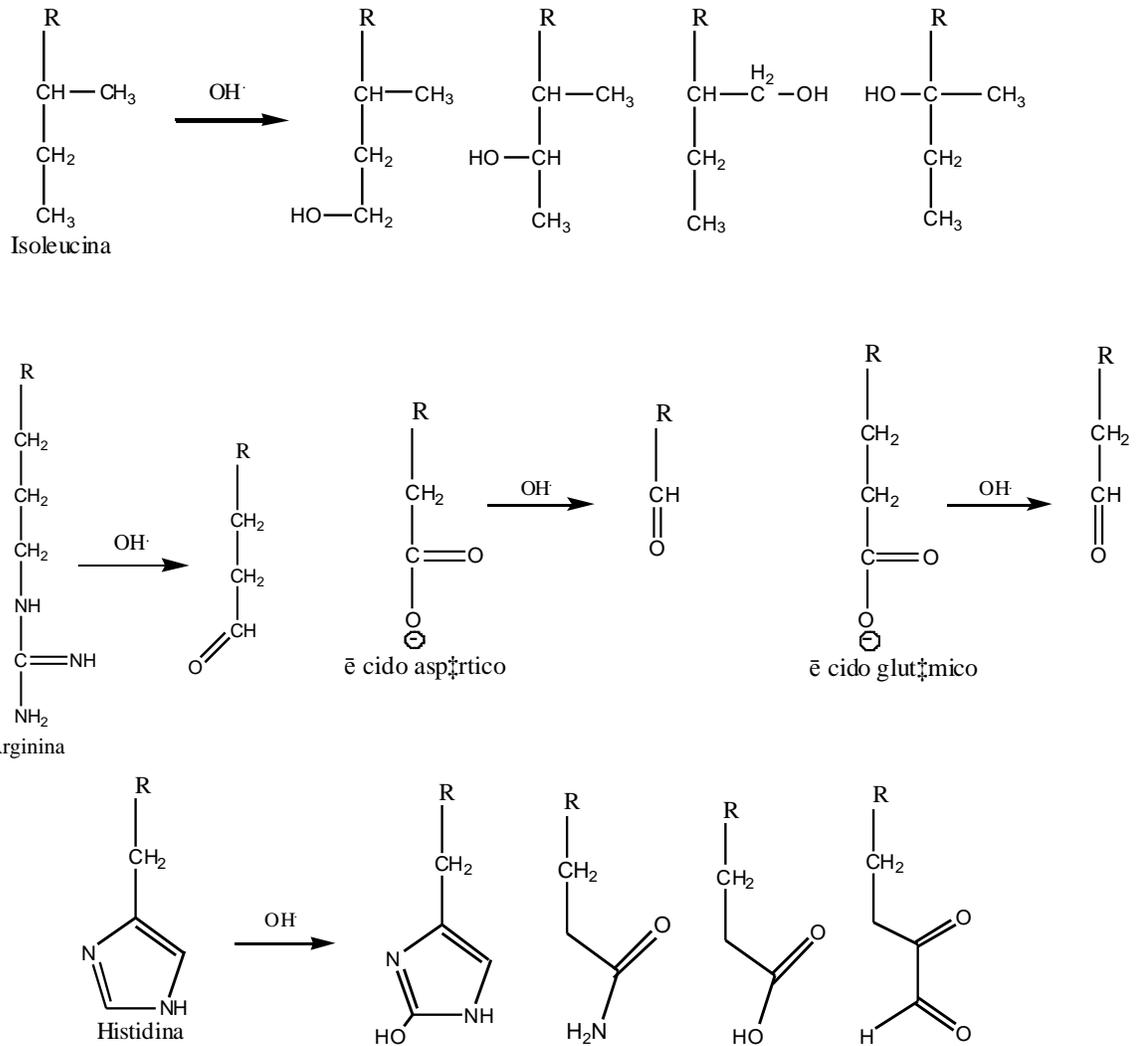




Esquema 3. Modificación de aminoácidos alifáticos por radicales hidroxilo.

1.8.5 Productos de la oxidación de aminoácidos cargados.

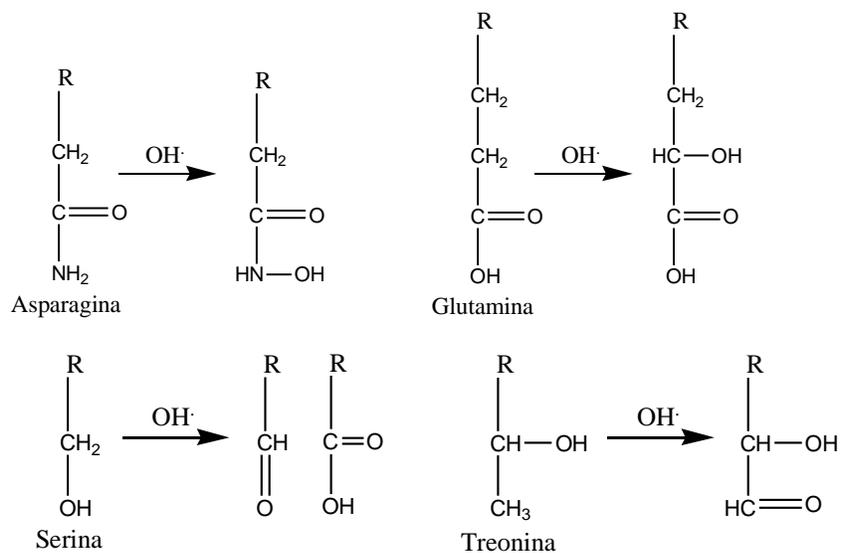
Los aminoácidos básicos y ácidos son especialmente susceptibles a oxidarse, debido a que están preferentemente en las superficies de las proteínas. La oxidación de la arginina le provoca una pérdida de masa de 43 Da, como resultado de la pérdida de un grupo guanidinio y la conversión a gamma-glutamil semialdehído. Para el caso de la lisina, hay un aumento de masa de 16 Da debido a la formación de hidroxilisina. La histidina por su parte es oxidada para dar múltiples productos con pérdidas en masa correspondientes a 22 y 10 Da, y aumentos de 16 Da; éstos productos están relacionados con la ruptura del anillo imidazol (Xu *et al.*, 2003). En el caso de los aminoácidos ácidos como el glutamato o aspartato, su oxidación resulta en descarboxilación, dando como resultado una pérdida en masa de 32 Da (Xu *et al.*, 2004).



Esquema 4. Modificación de aminoácidos cargados por radicales hidroxilo.

1.8.6 Productos de la oxidación de aminoácidos con hetero átomos neutros.

Los aminoácidos como la asparagina, serina, treonina, glutamina y prolina, dan productos de oxidación con un aumento de masa de 16 Da, correspondientes a la adición de un grupo hidroxilo (Xu *et al.*, 2005).



Esquema 5. Modificación de aminoácidos alifáticos por radicales hidroxilo.

Dado que la radiación gama es absorbida por la materia en la que incide, en el sistema internacional de medida se usan los Rads o Grays como unidades de absorción de la radiación (1 Gray = 100 Rads, 1 Gray= 1 joule /kg).

2. ANTECEDENTES.

El envenenamiento por serpientes venenosas es un problema global. Se estima que anualmente se presentan alrededor de cinco millones y medio de mordeduras a humanos, de los cuales dos millones y medio presentan síntomas de envenenamiento, siendo los lugares con climas cálidos en donde se presenta el mayor número de accidentes. Se calculan que medio millón de estos envenenamientos se presentan en el continente africano, de los cuales alrededor del 50 al 75% requieren el uso de antivenenos específicos para evitar decesos, amputaciones severas o trastornos neurológicos (Chippaux, 2002). Además, se estima que solo el 40% de los que requieren el antiveneno son hospitalizados. (Chippaux, 1998). Los sectores poblacionales más afectados son aquéllos que están en contacto con las zonas rurales (plantaciones); en algunas regiones, en temporadas de lluvias los envenenamientos por serpientes ocupan aproximadamente el 10% de las hospitalizaciones. En Nigeria se estiman 600 mordeduras por cada 100,000 habitantes; en su mayoría son causadas por serpientes del genero *Echis*, con una tasa de mortalidad del 12.5%. En Senegal y Benin, las tasas de mortalidad son 11.7% y 5.9%, respectivamente (Chippaux, 1998). En el África subsahariana, los datos epidemiológicos sobre la incidencia de las mordeduras de serpiente -incluido el grado de mortalidad y morbilidad- proceden mayoritariamente de los hospitales, por lo que se cree, se esta subestimando la verdadera magnitud del problema, ya que la mayoría de las victimas de mordeduras de serpiente recurren a tratamientos tradicionales, y posiblemente fallecen en sus hogares sin que quede constancia de ello (Chippaux, 1998).

En África la incidencia de mordeduras de serpientes varia enormemente; se calculan de 300 a 600 mordeduras por cada 100,000 habitantes en las regiones boscosas, y de 50 a 100 en las regiones áridas como las sabanas o desiertos. No todas las mordeduras de serpientes son mortales, pero debe considerarse que existe una probabilidad grande de sufrir daños irreversibles,

como daño renal crónico, pérdida de miembros debido a amputaciones, ulceraciones crónicas, daños neuronales y distrofia muscular, entre otros (Chippaux, 2002).

Las serpientes en el África subsahariana están representadas por diferentes individuos tanto de la familia Elapidae como de la Viperidae. Algunas especies de los géneros *Naja*, *Dendroaspis*, *Bitis* y *Echis* son los que causan la mayoría de las mordeduras por serpientes venenosas en ese continente; producen alrededor de veinte mil muertes y, al menos, cien mil casos de personas que quedan con daños permanentes debido a envenenamientos severos (Chippaux, 1998).

Se estima que el requerimiento mundial de viales de antiveneno es del orden de diez millones de viales al año; dos millones son requeridos en África (Chippaux, 2002). El gran número de envenenados por serpientes y la escasa producción, distribución e ineficacia de ciertos antivenenos mostró la necesidad de proveer de antivenenos al África subsahariana, por lo que, el Dr. Roberto Stock y el Dr. Alejandro Alagón del Instituto de Biotecnología de la UNAM en colaboración con el Institut de Recherche pour le Développement (IRD, Francia) y el instituto Bioclon (México), desarrollaron un antiveneno polivalente contra once especies de serpientes venenosas de las familias *Elapidae* (*Naja haje*, *N. melanoleuca*, *N. nigricollis*, *N. pallida*, *Dendroaspis polylepis* y *D. viridis*) y *Viperidae* (*Bitis arietans*, *B. gabonica*, *Echis ocellatus*, *E. pyramidum* y *E. leucogaster*) (Stock *et al.*, 2007). El antiveneno está compuesto de fragmentos $F(ab')^2$ liofilizados y no contienen proteínas contaminantes (albúmina o inmunoglobulinas completas), y se ha demostrado que es seguro, estable (en condiciones ambientales) y útil para tratar los envenenamientos de las serpientes africanas para los cuales fue producido, así como eficaz para la neutralización de la necrosis que produce el veneno de *E. ocellatus* (Ramos-Cerrillo *et al.*, 2008).

La gran mayoría de los venenos de serpientes son débiles inmunógenos (Souza *et al.*, 2002) y aunado a esto, se ha observado que la alta toxicidad de sus componentes alteran de manera crónica la salud de los animales utilizados para la producción de los antivenenos correspondientes. Este problema se ha atacado tratando de implementar métodos para disminuir la toxicidad de los venenos sin afectar su inmunogenicidad. Entre los procedimientos que se han usado para detoxificar venenos se encuentran: el pegado a carboximetil-celulosa (Moroz *et al.*, 1963), exposición a luz ultravioleta (Tejason y Ottolle, 1970), iodación (Heneine *et al.*, 1986), modificación con glutaraldehído (Guidolin *et al.*, 1989) y encapsulado en liposomas (Freitas y Frézard, 1997). Muchos de estos tratamientos inducen cambios importantes en los epítopes (determinantes antigénicos) relevantes para la producción de anticuerpos neutralizantes hacia los venenos nativos (Freitas y Frézard, 1997), ya que provocan modificaciones químicas y/o entrecruzamientos (iodación y glutaraldehído). En otros casos, existe una liberación gradual del veneno atrapado (liposomas y carboximetil-celulosa) y no una modificación real. Otro método utilizado para detoxificar venenos completos o algunas toxinas importantes de éstos es la radiación gamma, la cual se ha visto que atenúa los efectos tóxicos del veneno (Souza *et al.*, 2002) y mantiene sus capacidades inmunogénicas permitiendo la producción elevada de anticuerpos neutralizantes (Oussedik y Laraba, 2008).

3. JUSTIFICACIÓN.

La demanda de antivenenos que se requiere en África para tratar las intoxicaciones por elápidos y vipéridos (dos millones y medio de viales por año) llevó al desarrollo del antiveneno polivalente llamado Antivipmyn® África, el que se produce a partir de la inmunización de caballos con mezclas complejas de venenos. Dichos inmunógenos son altamente tóxicos: se han registrado problemas de salud crónicos en los animales inmunizados; esto representa un problema técnico, ya que los esquemas de inmunización se deben de alargar, lo que redundo por un lado en problemas de producción y por el otro en la disminución de la vida útil de los animales.

Como se mencionó anteriormente, la aplicación de veneno detoxificado promete ser una alternativa para atacar ese problema. Por una parte, se sabe que las modificaciones por sustancias químicas (glutaraldehído y iodación) provocan en algunos casos, modificaciones en grupos específicos de las proteínas, y en otros la formación de agregados insolubles, que resultan en la destrucción del veneno, provocando la pérdida o alteración de epítopes importantes para la producción de anticuerpos que neutralizan a los venenos nativos y que son los componentes fundamentales en un antiveneno (Freitas y Frézard,1997). Por otro parte, un método que ha mostrado ser efectivo para detoxificar venenos es la radiación gamma, la cual al interaccionar con las moléculas del solvente produce radicales libres como los OH^\cdot , estos radicales, a su vez, modifican a la proteína. Esta modificación indirecta vía la radiolisis del agua, altera a los aminoácidos que se encuentran expuestos al solvente; el tipo de modificación depende, tanto de la accesibilidad de los radicales a las cadenas laterales de las proteínas, como de la reactividad intrínseca de cada aminoácido (Xu *et al.*, 2005). El resultado son mezclas de proteínas que pierden su acción bioquímica debido a la modificación por radicales OH^\cdot (Souza *et al.*, 2002), pero que tienen una alta probabilidad de mantener su capacidad inmunogénica neutralizante (Oussedik y Laraba, 2008).

4. HIPÓTESIS

La aplicación de dosis controladas de radiación gamma sobre las mezclas de veneno que se utilizan para producir el Antivipmyn® África puede reducir su toxicidad sin alterar su capacidad inmunogénica neutralizante.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Producir toxoides a partir de las mezclas de veneno de las serpientes africanas utilizadas para la generación del Antivipmyn® África mediante radiación gamma.

5.2 Objetivos particulares.

Determinar la toxicidad de las mezclas de veneno correspondientes a Elápidos y Vipéridos, mediante ensayos de dosis letal media (DL_{50}).

Determinar las condiciones de irradiación, además, de la dosis de radiación que disminuya la toxicidad de los venenos sin que se produzcan alteraciones en su solubilidad.

Determinar la detoxificación las mezclas irradiadas mediante ensayos de dosis letal media (DL_{50})

Probar la capacidad inmunogénica de las mezclas irradiadas en animales experimentales (conejos) y de producción (caballos).

Determinar la capacidad neutralizante de los antisueros obtenidos de la inmunización con las mezclas irradiadas mediante ensayos de dosis efectiva media (DE_{50}).

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

- Se determinará la toxicidad de las mezclas de veneno de elápidos y vipéridos mediante ensayos de dosis letal media (DL₅₀).

-Las mezclas de veneno de elápidos y vipéridos se expondrán a radiación gama, para ello se utilizará un irradiador tipo industrial que emite radiación gamma proveniente de una fuente de ⁶⁰Co.

-Se probarán diferentes condiciones de irradiación: muestras congeladas, liofilizadas y líquidas.

-Se compararán los perfiles electroforeticos (SDS-PAGE) de la mezcla irradiada versus la nativa para determinar en que dosis de radiación el veneno sufre menor daño.

-Se compararán las dosis letales medias de las muestras irradiadas con respecto a las nativas.

- Mediante ensayos de dosis efectivas medias de sueros de conejos y caballos inmunizados se probará la capacidad de las muestras irradiadas para inducir una respuesta inmune neutralizante.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Materiales

7.1.1 Reactivos

Los reactivos que se utilizaron fueron de los siguientes laboratorios comerciales: *BIO-RAD* (California, E.U.), *SIGMA* (St. Louis, E.U.), *ZYMED* (California, E.U.), *PIERCE* (Illinois, E.U) y *ROCHE* (Indianápolis, E.U.).

7.1.2 Venenos

Se utilizaron venenos liofilizados de *LATOXAN* (Valence, Francia). En la siguiente tabla se muestra la lista de los venenos utilizados para las mezclas de inmunógenos (Tabla 3).

Tabla 3. Venenos utilizados en las mezcla de inmunógenos

VENENO	No. LOTE
<i>Bitis arietans</i>	320.130
<i>Bitis gabonica gabonica</i>	401.100
<i>Echis ocellatus</i>	032.130
<i>Echis pyramidum</i>	922.130
<i>Echis leucogaster</i>	415.030
<i>Naja nigricollis</i>	105.030
<i>Naja haje haje</i>	805.010
<i>Naja pallida</i>	316.000
<i>Naja melanoleuca</i>	715.030
<i>Dendroaspis viridis</i>	815.050
<i>Dendroaspis polylepis</i>	218.020

7.1.3 Animales experimentales

Para determinar las dosis letales y dosis efectivas medias se utilizaron ratones machos y hembras de la cepa CD-1, con una edad de entre 4 y 6 semanas y un rango de peso entre 18 y 20 gramos, adquiridos de Harlan de México. Para probar la inmunogenicidad de las mezclas se utilizaron conejos hembra Nueva Zelanda blancos con un peso entre 3.2 y 4.1 Kg y caballos criollos machos con más de 450 Kg de peso. Los conejos se mantuvieron en el Bioterio del Instituto de Biotecnología y los caballos en el rancho “ Ojo de Agua”, en Agua Fría, municipio de Venustiano Carranza, Puebla.

7.1.4 Adyuvantes

Un adyuvante es una sustancia que estimula la respuesta inmune celular y humoral hacia algún inmunógeno. Los adyuvantes más utilizados en la producción de antivenenos son el adyuvante de Freund en sus dos versiones: el que contiene solo aceite mineral y el completo (*Mycobacterium tuberculosis* inactivado) y la Alúmina o Alum.

Con el adyuvante diseñado por Jules Freund se realizan emulsiones de agua en aceite, en donde el inmunógeno forma la fase dispersa, que al ser inoculado parenteralmente crea un almacén en el sitio de la inoculación de donde se va liberando antígeno paulatinamente durante un periodo de tiempo. El muramil dipéptido, presente en las micobacterias, se une a los receptores tipo toll 2 y 4 y actúa sobre NOD2 en células dendríticas. Ambas vías inducen la síntesis de citocinas que promueven la migración y activación de otras células del sistema inmune y es usado comúnmente en la primera inmunización; en algunos animales provoca agregación celular que va acompañado de formación de granulomas y abscesos en el sitio de la inoculación, por lo que no se recomienda su reutilización.

Por otra parte, la alúmina (hidróxido de aluminio) es un adyuvante que adsorbe al inmunógeno y crea pequeños depósitos; también actúa despertando la respuesta celular vía el inflamosoma, favorece la maduración de la células dendríticas y fortalece la presentación del antígeno a la células T (sinapsis inmunológica) (Aimanianda *et al.*, 2009).

Para la producción de anticuerpos en conejos y caballos se utilizaron de manera alternada adyuvante completo (solo en la primera inmunización) e incompleto de Freud (ROCKLAND) y Alúmina (PIERCE).

7.1.5 Ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzima (ELISA)

- Los anticuerpos fueron de ZYMED; se utilizó un cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Goat anti-Rabbit HRP) y un cabra anti-caballo conjugado a la misma enzima (Goat anti-Horse HRP).

- El sustrato ABTS 10X y su solución de reacción fueron de ROCHE.

7.1.6 Electroforesis

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) es una técnica para la separación de moléculas según su tamaño molecular. Dado que el SDS le confiere una carga negativa a las moléculas, la trayectoria de estas hacia el ánodo se verá limitada al peso molecular de las proteínas. Así, las proteínas se moverán mas lentamente cuando mayor sea su peso molecular.

7.1.7 Irradiador

Se utilizó un irradiador de laberinto semi-industrial Gammabeam 651-PT, instalado en el Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM, el cual utiliza

fuentes radiactivas selladas de Cobalto-60. En el momento de las irradiaciones se alcanzaban 67,000 Ci (Curies de actividad).

7.2 Metodología

7.2.1 Preparación de las mezclas de veneno

Se utilizaron venenos liofilizados de LATOXAN. Estos fueron pesados por separado y resuspendidos en solución salina isotónica (150 mM NaCl); posteriormente, se mezclaron respetando la proporción de veneno por especie establecido en el esquema de inmunización del Antivipmyn® África hasta obtener una concentración final de proteína de 1.5 y 5 mg/mL.

7.2.1.1 Preparación de la mezcla de Vipéridos (MV)

Para esta mezcla se utilizó el veneno de las siguientes especies: *Bitis arietans*, *Bitis gabonica gabonica*, *Echis ocellatus*, *Echis pyramidum* y *Echis leucogaster* con las siguientes proporciones (Tabla 4):

Tabla 4. Mezcla de Vipéridos usada para la producción del Antivipmyn® África.

MEZCLA INMUNOGÉNICA	Género (% por género)	Especie	% por especie	Veneno (mg)
Vipéridos	<i>Echis (60)</i>	<i>ocellatus</i>	50	18
		<i>pyramidum</i>	25	9
		<i>leucogaster</i>	25	9
	<i>Bitis (40)</i>	<i>arietans</i>	50	12
		<i>gabonica</i>	50	12
		Total		60

7.2.1.2 Preparación de la mezcla de Elápidos (ME)

Para esta mezcla se utilizó el veneno de las siguientes especies: *Naja haje*, *Naja nigricollis*, *Naja melanoleuca*, *Naja pallida*, *Dendroaspis polylepis* y *Dendroaspis viridis* con las siguientes proporciones (Tabla 5):

Tabla 5. Mezcla de Elápidos usada para la producción del Antivipmyn® África.

MEZCLA INMUNOGÉNICA	Género (% por género)	Especie	% por especie	Veneno (mg)
Elápidos	<i>Naja</i> (60)	<i>melanoleuca</i>	25	9
		<i>nigricollis</i>	25	9
		<i>haje</i>	25	9
		<i>pallida</i>	25	9
	<i>Dendroaspis</i> (40)	<i>viridis</i>	50	12
		<i>polylepis</i>	50	12
		Total		60

7.2.2 Irradiación de las mezclas

Las mezclas inmunogénicas se expusieron a radiación gamma. Las muestras expuestas a esta radiación ionizante se encontraban en tres condiciones diferentes: congeladas, liofilizadas y líquidas.

Hasta la cuarta irradiación, la concentración de proteína fue de 1.5 mg/ml. Las siguientes irradiaciones fueron hechas a una concentración de proteína de 5 mg/ml. Todas las muestras estaban contenidas en tubos de polipropileno de 1.5 ml (Eppendorf). Para la séptima irradiación las muestras estaban contenidas en tubos de polipropileno de 15 ml (Falcon) en un volumen de 12 ml a 5 mg/ml.

7.2.2.1 Irradiación de la mezcla de Vipéridos

7.2.2.1.1 Irradiación de la mezcla de Vipéridos congelada y liofilizada

La mezcla de Vipéridos ya resuspendida en NaCl 150 mM, se mantuvo congelada a -70 °C. Posteriormente, fué expuesta en estas condiciones (mantenidas en hielo seco) a diferentes dosis de radiación gamma. En la siguiente tabla se muestra la dosis y tasa de radiación a la que fueron sometidas diferentes alícuotas de 1 ml, a una concentración de proteína de 1.5 mg/ml; de igual manera, alícuotas de este volumen y a esta misma concentración de proteína fueron liofilizadas y así sometidas a diferentes dosis de radiación gamma (Tabla 6).

Tabla 6. Dosis de radiación aplicadas (kGy) a diferentes MV congeladas y liofilizadas . La tasa de radiación fué a 0.2 kGy/min.

	Condición	
	Congelada	Liofilizada
Dosis de radiación (kGy)	0.5	4
	1	8
	2	12
	4	16
	8	20
	16	32
	32	64

7.2.2.1.2 Irradiación de la mezcla de Vipéridos en condiciones líquidas.

La mezcla de Vipéridos ya resuspendida en NaCl 150 mM se mantuvo congelada a -70 °C. Momentos antes de ser sometida a radiación gamma, cada muestra se descongeló y una vez a temperatura ambiente, fue sometida a radiación ionizante. En la siguiente tabla se muestran la dosis y tasa de

radiación a la que fueron sometidas diferentes alícuotas de 1 ml a una concentración de proteína de 1.5 mg/ml (Tabla 7).

Tabla 7. Dosis de radiación aplicadas (kGy) a diferentes MV líquidas a 1.5 mg/ml. La tasa de radiación fué de 0.2 kGy/min.

<i>Muestras líquidas</i>	
1.5 mg/ml	
	0.5
	0.7
	1.5
Dosis de radiación	2
(kGy)	4
	8
	16
	32

Siguiendo el mismo protocolo anterior, se irradiaron muestras con una concentración de proteína de 5 mg/ml, en volúmenes de 1 y 12 ml a la misma temperatura (Tabla 8). Los recipientes fueron del mismo material (polipropileno).

Tabla 8. Dosis de radiación aplicadas (kGy) a diferentes MV líquidas a 5 mg/ml. La tasa de radiación fué de 0.2 kGy/min.

<i>Muestras líquidas</i>	
5 mg/ml	
	1.7
	1.9
	1.7 +0.4
Dosis de radiación	2.1
(kGy)	1.9 + 0.4
	2.3
	2.1 + 0.7
	2.1 +0.7 + 0.66

7.2.2.2 Irradiación de la mezcla de Elápidos

7.2.2.2.1 Irradiación de la mezcla de Elápidos congelada y liofilizada

La mezcla de Elápidos ya resuspendida en NaCl 150 mM, se mantuvo congelada a -70 °C. Ésta fue expuesta en estas condiciones (mantenidas en hielo seco) a diferentes dosis de radiación gamma. En la siguiente tabla se muestra la dosis y tasa de radiación a la que fueron sometidas diferentes alícuotas de 1 ml, el veneno estaba a una concentración de proteína de 1.5 mg/ml; de igual manera, alícuotas de este volumen y a esta misma concentración de proteína fueron liofilizadas y así sometidas a diferentes dosis de radiación gamma (Tabla 9).

Tabla 9. Dosis de radiación aplicadas (kGy) a diferentes ME congeladas y liofilizadas . La tasa de radiación fué a 0.2 kGy/min.

	Condición	
	Congelada	Liofilizada
Dosis de radiación (kGy)	0.5	4
	1	8
	2	12
	4	16
	8	20
	16	40
	32	60

7.2.2.2.2 Irradiación de la mezcla de Elápidos en condiciones líquidas

La mezcla de Elápidos ya resuspendida en NaCl 150 mM, se mantuvo congelada a -70 °C. Momentos antes de ser sometida a radiación gamma, cada muestra se descongeló y una vez a temperatura ambiente, fue sometida a radiación ionizante. En la tabla 10 se muestra la dosis y tasa de radiación a la

que fueron sometidas diferentes alícuotas de 1 ml de esta mezcla de veneno a una concentración de proteína de 1.5 mg/ml.

Tabla 10.- Dosis de radiación aplicadas a diferentes ME Líquidas a 1.5 mg/ml. La tasa de radiación fue de 0.2 kGy/min.

Muestras líquidas	
1.5 mg/ml	
	0.5
	0.7
	1.5
Dosis de radiación	2
(kGy)	4
	8
	16
	32

De igual manera, se irradiaron muestras a concentraciones de proteína de 5 mg/ml en volúmenes de 1 y 12 ml a la misma temperatura (Tabla 11). Los recipientes fueron del mismo material (polipropileno).

Tabla 11.- Dosis de radiación aplicadas a diferentes ME líquidas a 5 mg/ml. La tasa de radiación fue de 0.2 kGy/min.* Irradiados en un volumen de 12 ml.

Muestras líquidas	
5 mg/ml	
	2
	2.5
Dosis de radiación	2.5 + 0.9
(kGy)	3.4*
	3.4 + 1.2*

7.2.3 Electroforesis de proteínas (SDS- PAGE)

El equipo utilizado para este método fue de Bio- Rad (California, E.U.). La separación de proteínas se llevo a cabo en geles de poliacrilamida a diferentes concentraciones. Se utilizó TEMED (1,2-bis (dimetilamino)-etano) y PSA (Persulfato de amonio) como agentes polimerizantes. Para la mezcla de Vipéridos se utilizaron geles al 12.5% en condiciones reductoras (hervidas 5 min, 10% glicerol + 2.5% SDS + 50 mM Tris-HCl pH. 6.8 + 5% 2-mercaptoetanol + 0.002% Azul Bromofenol) y en condiciones no reductoras (sin hervir y sin agentes reductores). Para la mezcla de Elápidos se utilizaron geles al 15% en condiciones reductoras y no reductoras. Los marcadores de peso molecular fueron de Biolabs (Ontario, Canadá). Las corridas se llevaron a cabo a voltaje constante (120 mV). La tinción de los geles fue con azul Brillante de Coomasie G250 (50% metanol + 10% Acido acético + 0.2% Azul de Coomasie G250) durante una hora, y la destinción, con una solución al 10% de ácido acético y 10 % de metanol durante una hora en agitación constante.

7.2.4 Espectrofotometría (Absorción a 280 nm)

Para comparar cambios a nivel de absorbancia (200–800 nm) de las muestras irradiadas con respecto a la nativa, se utilizó el Sistema UV-Visible 8453 ChemStation Rev. A. de Agilent Technologies (California, E.U.).

7.2.5 Determinación de la toxicidad de las mezclas

Para determinar la toxicidad de estas mezclas, calculamos la dosis letal media. Esta dosis se define como la dosis de veneno que causa la muerte del 50% de una población de animales experimentales. Para ello, se inocularon grupos de 6 ratones (de peso y cepa ya descritos) vía intravenosa con diferentes concentraciones de veneno disuelto en NaCl 0.15 M a un volumen final de 0.5 ml. A las 24 horas posteriores a la inoculación, se determinó el porcentaje de

sobrevivientes en cada nivel de dosis; la dosis letal media (DL₅₀) se calculó por regresión no lineal a través de una curva sigmoide dosis-respuesta, con la ayuda del programa Prism (versión 4) de Graph pad (San Diego, CA).

7.2.6 Inmunización de conejos con las mezclas de veneno irradiadas y nativas

Para comparar la capacidad inmunogénica neutralizante de las mezclas nativas e irradiadas, se inmunizaron grupos de cuatro conejos con cada una de ellas. Se utilizaron dosis crecientes de cada inmunógeno. Ambos se disolvieron en solución salina isotónica y se mezclaron con los diferentes adyuvantes. La concentración de proteína para ambos grupos fue la misma, es decir, el grupo de conejos inmunizados con la mezcla irradiada, recibió la misma concentración de proteína que su grupo control correspondiente. La inmunización se hizo intradérmica, inoculando al menos cinco puntos (inmunización en rosario) con un volumen final de 0.5 mL para cada conejo (Chotwiwatthanakun *et al.*, 2001).

Con el fin de monitorear la respuesta inmune de los animales se tomaron sangrías de 2 mL cada semana durante todo el esquema de inmunización. Al final, los conejos se sangraron a blanco y el suero obtenido se almacenó a – 20 °C. Para ambas mezclas (Elápidos y Vipéridos; nativas e irradiadas) se utilizó el esquema de inmunización mostrado en la Tabla 12.

Tabla 12. Esquema de inmunización de conejos con MV y ME; nativa e irradiada. Se muestra el día, número de inmunización, sangría y la concentración de veneno por conejo, así como el tipo de adyuvante.

Día	Sangría	Inmunización	Veneno (μg)	Adyuvante
0	1	1	100	CFA
7	2			
14	3	2	250	IFA
21	4			
28	5	3	250	ALUM
35	6			
42	7	4	500	IFA
49	8			
56	9	5	500	ALUM
63	10			
70	11	6	750	IFA
77	12			
84	13	7	750	ALUM
91	14			
98	15	8	750	IFA
105	16			

7.2.7 Inmunización de caballos con las mezclas de veneno irradiadas

Para comparar la capacidad inmunogénica neutralizante de ambas mezclas irradiadas, se inmunizaron grupos de tres caballos con cada toxoide. Cada mezcla se disolvió en solución salina isotónica y se mezcló con diferentes adyuvantes. Con el fin de monitorear la respuesta inmune de los animales durante todo el esquema de inmunización, se tomaron sangrías de 5 ml cada catorce días hasta el día 70, y posteriormente de 200 mL cada siete días hasta el día 112, el suero obtenido se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

7.2.7.1 Inmunización de caballos con la mezcla de Vipéridos irradiada

Se inmunizaron tres caballos con la mezcla de Vipéridos irradiada, disuelta en solución salina isotónica. El esquema de inmunización (Tabla 13) fue idéntico al utilizado para la producción del Antivipmyn® África. La última inmunización se realizó con veneno no irradiado.

Tabla 13. Esquema de inmunización de caballos con la MV irradiada. Se muestra el día, número de inmunización, día y la concentración de veneno por caballo, así como el tipo de adyuvante.

Día	Sangría	Inmunización	Veneno (mg)	Adyuvante
0	1	1	500	CFA
14	2	2	1000	IFA
28	3	3	1000	ALUM
42	4	4	1500	IFA
56	5	5	2000	ALUM
70	6	6	2500	IFA
84	7	7	3000	Sin adyuvante
91	8			
98	9	8	3000	Sin adyuvante
105	10			
112	11			

CFA= Adyuvante completo de Freund. **IFA=** Adyuvante incompleto de Freund.

7.2.7.2 Inmunización de caballos con la mezcla de Elápidos irradiada

Se inmunizaron tres caballos con la mezcla de Elápidos irradiada disuelta en solución salina isotónica. El esquema de inmunización (Tabla 14) fue idéntico al utilizado para la producción del Antivipmyn® África. La última inmunización se realizó con veneno no irradiado.

Tabla 14. Esquema de inmunización de caballos con la ME irradiada. Se muestra el día, número de inmunización, día y la concentración de veneno por caballo, así como el tipo de adyuvante.

Día	Sangría	Inmunización	Veneno (mg)	Adyuvante
0	1	1	200	CFA
14	2	2	500	IFA
28	3	3	500	ALUM
42	4	4	1000	IFA
56	5	5	1500	ALUM
70	6	6	2000	IFA
84	7	7	2500	Sin adyuvante
91	8			
98	9	8	2500	Sin adyuvante
105	10			
112	11			

CFA= Adyuvante completo de Freund. **IFA=** Adyuvante incompleto de Freund

7.2.8 Medición de títulos por ELISA

La titulación de los anticuerpos a partir de sueros se llevó a cabo por inmunoensayos enzimáticos. La técnica se basa en la interacción antígeno-anticuerpo. La interacción se detecta por un conjugado compuesto de un anticuerpo unido covalentemente a una enzima que permite generar una señal colorida. Los títulos se definieron como la dilución del suero hiperinmune en la cual se encuentra la mitad de la absorbancia máxima.

La prueba de ELISA consistió en:

- a) Sensibilizar placas de 96 pozos para ELISA (NUNC™) con una solución de antígeno (mezcla sin irradiar) a una concentración de 1 µg/ml disuelta en 100 mM carbonato/bicarbonato pH 9.5. Por cada pozo se colocaron 100 µl hasta la columna 12. La placa se incubó 2 horas a 37 °C, ó bien toda la noche a 4 °C.

- b)** Concluida la incubación, la placa se lavó tres veces con 250 μ l de buffer de lavado (50 mM Tris/HCL pH 8 + 150mM NaCl + 0.05% Tween 20). Este proceso se repitió entre cada paso a lo largo del protocolo.
- c)** Se bloquearon los sitios en donde pudiese haber uniones inespecíficas incubando con 200 μ l de solución de bloqueo (50mM Tris/HCl pH. 8 + 5 mg/mL gelatina + 0.2% Tween 20) por 2 horas a 37 °C.
- d)** Se hicieron diluciones seriadas de los sueros empezando con diluciones 1:30 para los sueros de conejo y caballos inmunizados con las mezclas de Vipéridos nativas e irradiadas y 1:2700 para los sueros obtenidos de conejos de las mezclas de Elápidos y 1:10 para los sueros de caballos. En cada pozo se adicionaron 100 μ l de la solución de reacción para ELISA (50mM Tris/HCl pH. 8 + 0.5 M NaCl + 1mg/ml gelatina + 0.05% Tween 20) y se realizaron diluciones seriadas 1:3 hasta la columna 11 dejando la columna 12 como control negativo. Se incubó 1 hora a 37 °C.
- e)** Se incubó el segundo anticuerpo anti-conejo o anti-caballo, según el caso, conjugado a la enzima peroxidasa diluido 1:1000 en solución de reacción para ELISA, poniendo 100 μ l/pozo. Se incubó una hora a temperatura ambiente.
- f)** La reacción se reveló con 100 μ l/pozo de sustrato ABTS (Diamonio 2,2'-Azino-bis-[3-etilbenzoliazo-lino-6 sulfonato]), incubándose por 10 minutos a temperatura ambiente. Al final, la reacción se detuvo con 100 μ l de SDS 10%, quedando a una concentración final de SDS al 5% y se procedió a leer la placa en un lector de ELISA (Marca TECAN línea SUNRISE) a una longitud de onda de 405 nm.

- g) Para determinar los títulos de las lecturas obtenidas, las curvas sigmoideas se generaron con el programa Prisma. El punto de inflexión se calculó ajustando los datos experimentales para cada mezcla y antiveneno por regresión no lineal de las curvas.

7.2.9 Determinación de la potencia neutralizante de los antisueros (Dosis efectiva media; DE₅₀).

El ensayo para determinar la potencia de neutralización de los antisueros, consistió en mezclar la cantidad de veneno correspondiente a 3 x DL₅₀ con cantidades variadas del antisuero correspondiente. Esta mezcla se incubó durante 30 minutos a 37 °C y se inyectó vía intravenosa a grupos de 5 ratones de la cepa y peso previamente descritos. El volumen final inyectado, siempre fue de 500 µl. Finalmente se registro el porcentaje de sobrevida por grupo a las 48 horas después de la inyección.

La capacidad neutralizante del suero, se expresó en µl de suero necesaria para que el 50 % de la población sobreviviera. Los controles sin suero siempre produjeron el 100% de la mortalidad. La dosis efectiva media se calculó por regresión no lineal a través de una curva sigmoide dosis-respuesta utilizando el software Prisma 4.0b (GraphPad Software, California, E.U.).

7.2.9 Análisis estadístico.

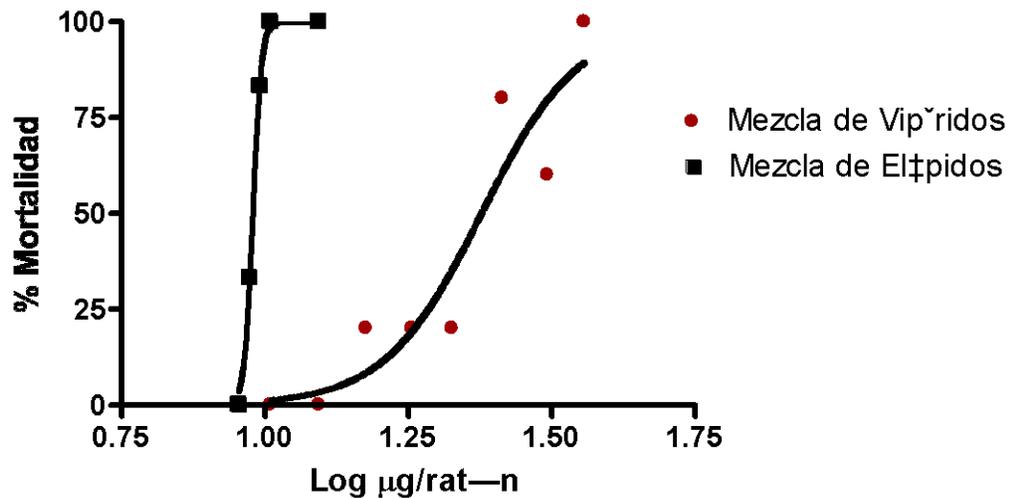
Con la prueba t de Student se comparan las medias y las desviaciones estándar de grupo de datos y se determina si entre esos parámetros las diferencias son estadísticamente significativas o si sólo son diferencias aleatorias. De este modo, la comparación de medias entre grupos se realizó utilizando la prueba estadística t de Student misma que es incluida en el programa Prisma 4

8. RESULTADOS

8.1 Dosis letal media de las mezclas de Vipéridos y Elápidos no irradiadas

Se inocularon vía intravenosa diferentes dosis de veneno, posteriormente se registró el porcentaje de sobrevida para cada dosis. Se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 5):

A



B

Veneno	DL ₅₀ ($\mu\text{g/ratón}$)	IC. 95%	R ²
Vipéridos	23.8	19.7 – 28.8	0.85
Elápidos	9.5	9.5 – 9.6	0.99

Figura 5. Determinación de la DL₅₀ de la mezcla de Vipéridos y Elápidos. A) Ajuste sigmoideo dosis-respuesta de la dosis de veneno (log $\mu\text{g/ratón}$) contra el porcentaje de mortalidad. **B)** DL₅₀ ($\mu\text{g/ratón}$) con su respectivo intervalo de confianza y R².

8.2 Irradiación de la mezcla de Vipéridos congelada y liofilizada.

Cada mezcla irradiada liofilizada se resuspendió en 1 mL de agua estéril, para quedar a una concentración de proteína de 1.5 mg/mL. Partiendo de una dilución 1:10, se comparó el espectro de absorción a una longitud de onda de 280 nm de las muestras irradiadas con respecto a la nativa. Las muestras correspondientes a las diferentes dosis de radiación, se inocularon vía intravenosa. Se uso la cantidad correspondiente a 2 DL₅₀ a grupos de 3 ratones de la cepa y peso ya descritos y se obtuvieron los siguientes resultados de mortalidad a las 24 horas (Tabla 15 y 16).

Tabla 15. Mortalidad y absorbancia (280 nm) de la MV irradiada Liofilizada.

Dosis de Radiación (kGy)	Absorbancia(280 nm)	Mortalidad (%)
0	0.16	100
4	0.21	100
8	0.16	100
12	0.17	100
16	0.17	100
32	0.16	100
64	0.17	100

Tabla 16. Mortalidad y absorbancia (280 nm) de la MV irradiada Congelada

Dosis de Radiación (kGy)	Absorbancia(280 nm)	Mortalidad (%)
0.5	0.14	100
1	0.17	100
2	0.16	100
4	0.15	100
8	0.17	100
16	0.14	100
32	0.15	100

Las muestras fueron corridas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS para comparar el patrón electroforético de la mezcla nativa con respecto a las irradiadas a diferentes dosis (Figura 6 y 7). Cualquier diferencia en este patrón podría sugerir modificaciones de las proteínas del veneno por la radiación gama.

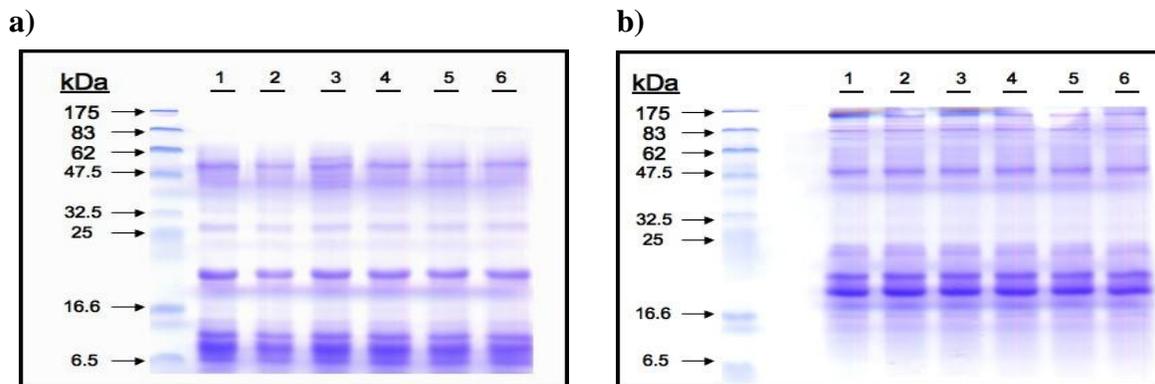


Figura 6. SDS-PAGE al 12.5% de poliacrilamida en condiciones reductoras (a) y no reductoras de la MV irradiada liofilizada (b) Carril 1.-muestra sin irradiar, Carril 2.- muestra irradiada a 4 kGy, Carril 3.- muestra irradiada a 8 kGy. Carril 4.- muestra irradiada a 12 kGy. Carril 5.- muestra irradiada a 16 kGy. Carril 6.- muestra irradiada a 32 kGy.

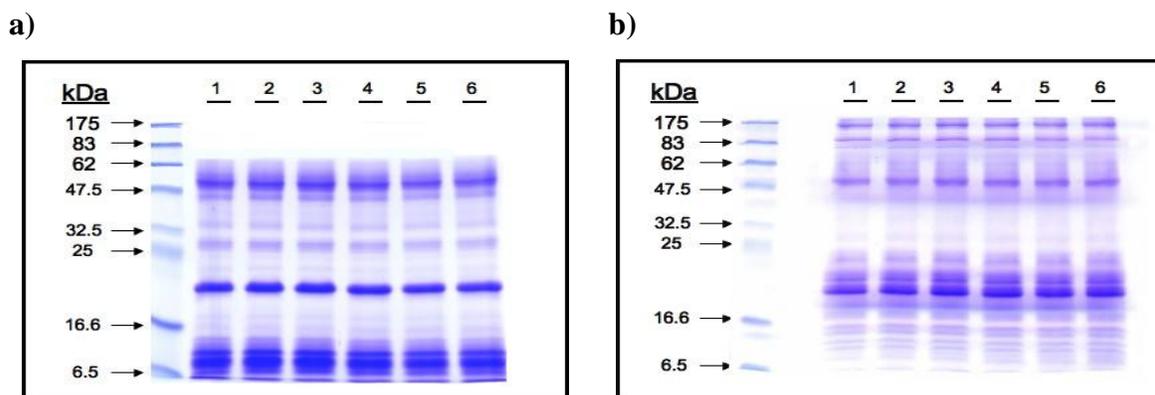


Figura 7. SDS-PAGE al 12.5% de poliacrilamida en condiciones reductoras (a) y no reductoras de la MV irradiada congelada (b) Carril 1.- muestra sin irradiar, Carril 2.- muestra irradiada a 0.5 kGy, Carril 3.- muestra irradiada a 1 kGy. Carril 4.- muestra irradiada a 1 kGy. Carril 5.- muestra irradiada a 2 kGy. Carril 6.- muestra irradiada a 4 kGy. Carril 6.- muestra irradiada a 8 kGy.

El patrón electroforético y la toxicidad de cada una de las muestras, revelan que el veneno mantiene su integridad. En este sentido, no hay evidencia de alguna modificación del veneno para ninguna dosis de radiación en estas condiciones.

8.3 Irradiación de la mezcla de Vipéridos líquida

Debido a que algunas de las muestras irradiadas en estas condiciones presentaron precipitados, se centrifugaron 1 min a 14,000 rpm en tubos eppendorf de 1.5 mL. Los sobrenadantes fueron utilizados para la determinación del espectro de absorción a 280 nm y las pruebas de detoxificación. Los precipitados fueron lavados 2 veces con PBS-1X para descartar proteínas solubles y posteriormente se resuspendieron en solución solubilizadora en presencia del agente reductor 2-mercaptoetanol.

Se comparó el espectro de absorción a una longitud de onda de 280 nm de las muestras irradiadas con respecto a la nativa; con una dilución 1:10 para las muestras de 1.5 mg/ml y 1:30 para las de 5 mg/ml (Tabla 17 y 18). En el caso de las muestras irradiadas a 5 mg/ml se determinó la DL₅₀ de cada una de ellas.

Tabla 17. Mortalidad y absorbancia (280 nm) de la MV irradiada Líquida a 1.5 mg/ml.

Dosis de Radiación (kGy)	Absorbancia (280 nm)	Mortalidad (%)
0	0.21	100
0.5	0.18	100
0.7	0.16	100
1.5	0.19	0
2	0.31	0
4	0.22	0
8	0.13	0
16	0.12	0
32	0.12	0

Tabla 18. Mortalidad y absorbancia (280 nm) de la MV irradiada Líquida a 5 mg/ml.

Dosis de Radiación (kGy)	Absorbancia (280 nm)	DL₅₀ (μg/ratón)
0	0.21	23.8
1.7	0.20	44.2
1.9	0.21	50.4
1.7 + 0.4	0.19	52.1
2.1	0.25	46.5
1.9 + 0.4	0.22	70.6
2.3	0.19	57.8
2.1 + 0.7	0.18	46.3
[2.1 + 0.7] + (0.66)	0.19	104.8

De igual manera, se realizaron geles de poliacrilamida SDS de algunas muestras para comparar el patrón electroforético de éstas con respecto al control (Figura 8).

a) Sobrenadantes

b) Precipitados

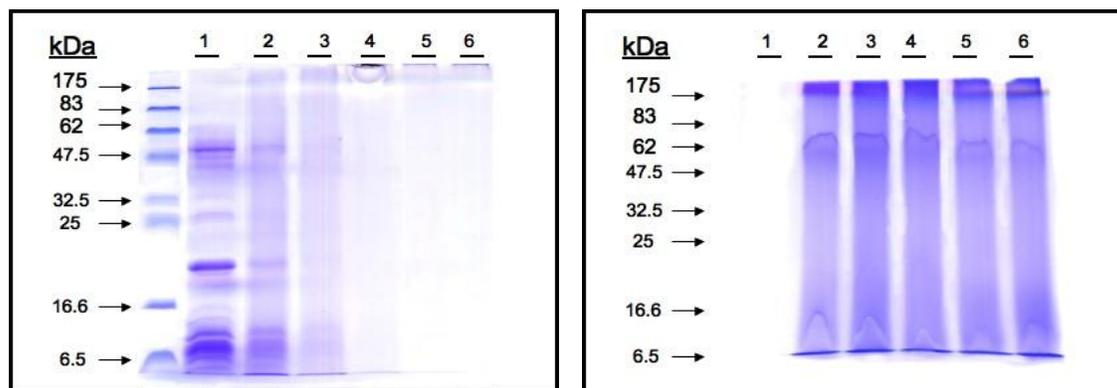


Figura 8. SDS-PAGE al 12.5% de poliacrilamida en condiciones reductoras de los sobrenadantes (a) y precipitados (b) de la MV irradiada líquida a 1.5 mg/ml. Carril 1.- muestra sin irradiar, Carril 2.- muestra irradiada a 2 kGy, Carril 3.- muestra irradiada a 4 kGy. Carril 4.- muestra irradiada a 8 kGy, Carril 5.- muestra irradiada a 16 kGy, Carril 6.- muestra irradiada a 32 kGy.

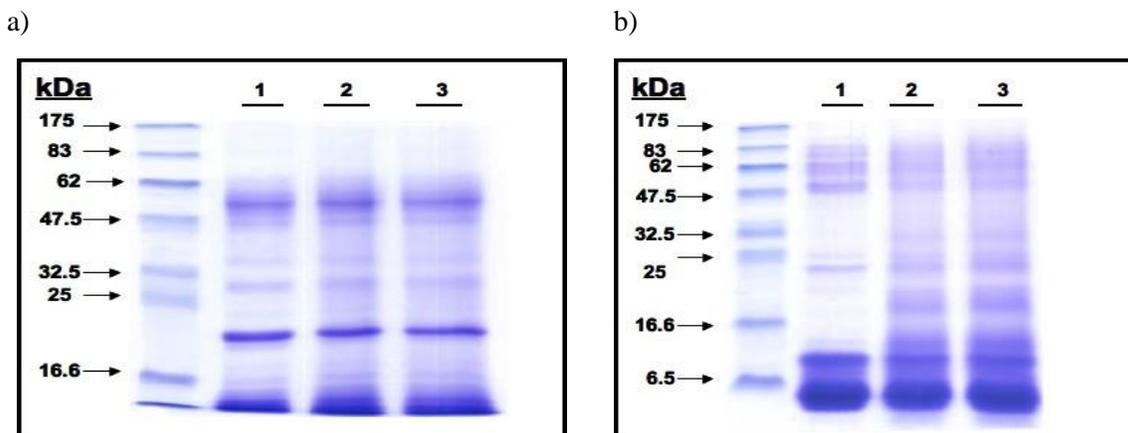


Figura 9. SDS-PAGE al 12,5% de poliacrilamida de la MV irradiada líquida a 5 mg/ml. a) Carril 1.- muestra sin irradiar, Carril 2.- muestra irradiada a 1.7 kGy, Carril 3.- muestra irradiada a 1.9 kGy. b) Carril 1.- muestra sin irradiar, Carril 2.- muestra irradiada a 1.7 + 0.4 kGy, Carril 3.- muestra irradiada a 1.9 + 0.4 kGy.

Las pruebas de toxicidad y el patrón electroforético de ambas muestras indican que el veneno sufrió alguna modificación por parte de la radiación gama en estas condiciones. Además, también se puede observar que las muestras irradiadas a una concentración de proteína de 1.5 mg/ml son más sensibles a la de radiación (Figura 8 y 9).

8.4 Obtención del toxoide de la mezcla de Vipéridos

La mezcla de veneno de Vipéridos fue irradiada líquida a temperatura ambiente, a una dosis de radiación de 2.1 kGy, posteriormente a una segunda de 0.7 (ambas en un volumen de 12 ml) y por último una tercera dosis de 0.66 KGys, en un volumen de 1 ml a una concentración de proteína de 5 mg/mL. Finalmente, se decidió trabajar con este toxoide (Figura 10) (cuatro veces detoxificado) para probar su capacidad inmunogénica neutralizante en animales experimentales (conejos) y de producción (caballos).

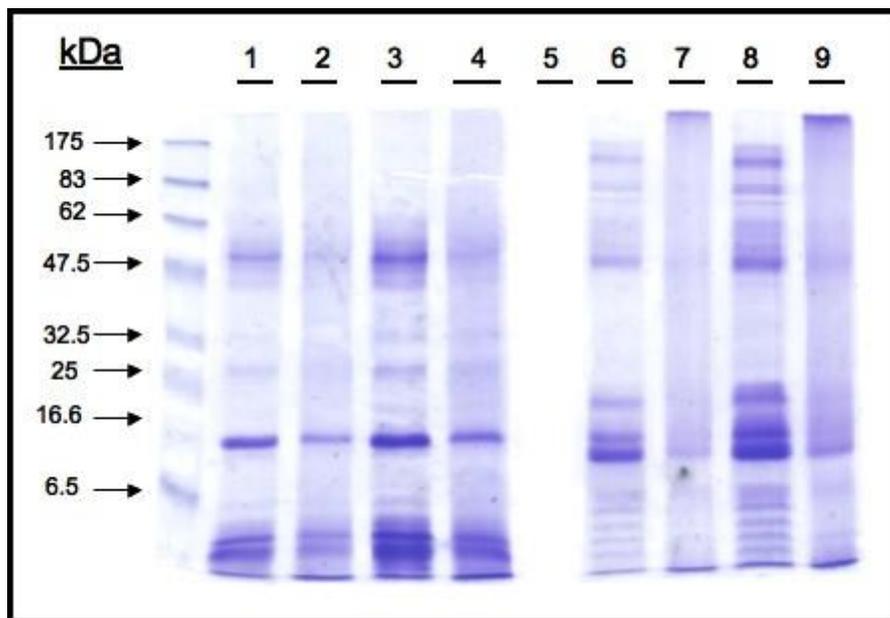


Figura 10. SDS-PAGE al 12.5% de poliacrilamida en condiciones reductoras y no reductoras de la mezcla de la MV nativa e irradiada (toxoides obtenidos). Carril 1.- 10 μg de la muestra sin irradiar, Carril 2.- 10 μg de la muestra irradiada a 2.1 + 0.7 + 0.6 kGy, Carril 3.- 20 μg de la muestra sin irradiar, Carril 4.- 20 μg de la muestra irradiada a 2.1 + 0.7 + 0.6 kGy, CONDICIONES NO REDUCTORAS. Carril 6.- 10 μg de la muestra sin irradiar, Carril 7.- 10 μg de la muestra irradiada a 2.1 + 0.7 + 0.6 kGy, Carril 8.- 20 μg de la muestra sin irradiar, Carril 9.- 20 μg de la muestra irradiada a 2.1 + 0.7 + 0.6 kGy.

8.5 Generación de anticuerpos en conejos contra el toxoide de Vipéridos

El toxoide de Vipéridos 2.1 + 0.7 + 0.6 kGy fue utilizado para inmunizar un grupo de cuatro conejos. Como control se inmunizó otro grupo con el mismo número de animales inmunizados con la mezcla nativa. Para la medición de títulos de ELISA, se sensibilizaron las placas con buffer 100 mM carbonato/bicarbonato pH 6 con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de la mezcla nativa. Como resultado, el suero obtenido de los conejos (anti-toxoides) mostró títulos tan altos de

anticuerpos, comparables con los obtenidos del suero de los conejos control (Figura 11).

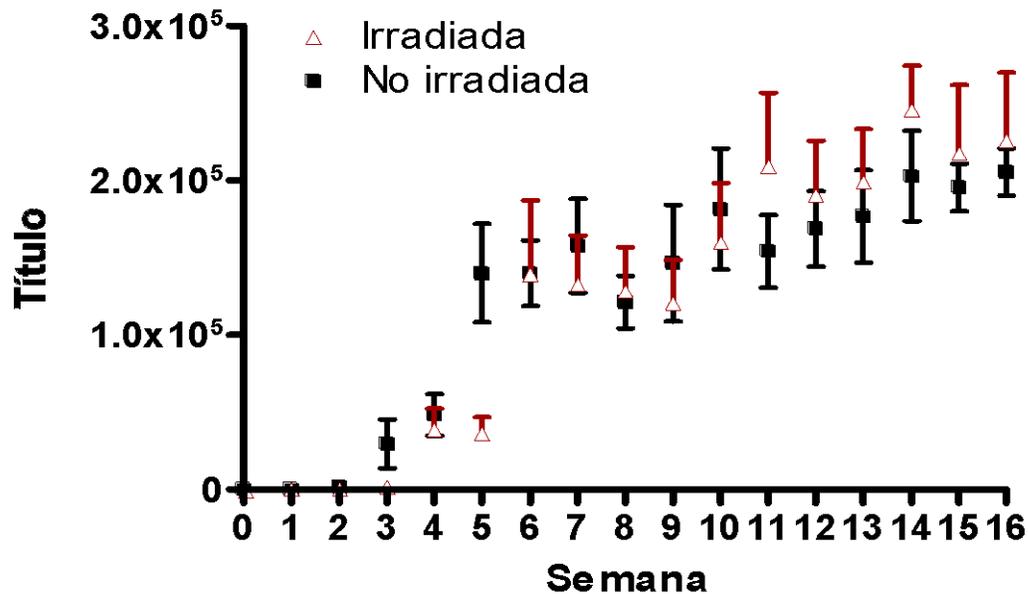


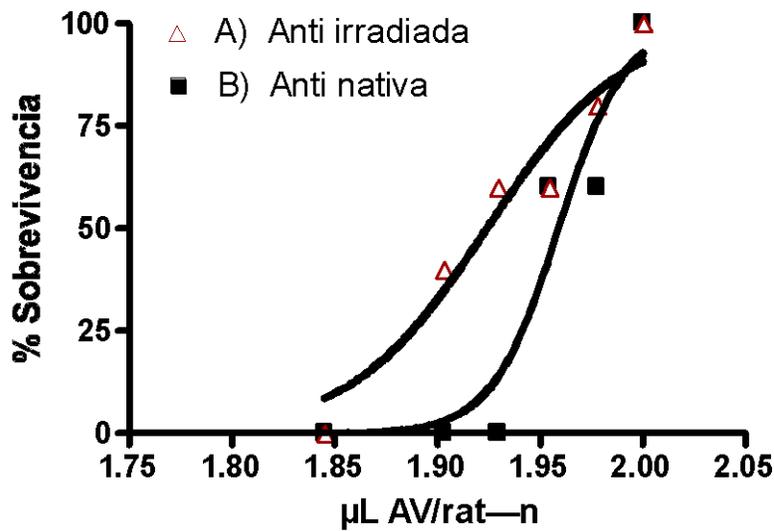
Figura 11. Evolución de los títulos de anticuerpos de conejo contra la MV nativa e irradiada. Títulos promedio de las diferentes sangrías (1-16) de conejos inmunizados con la mezcla nativa e irradiada mediante el reconocimiento específico del antisuero por la mezcla de veneno nativa. (n=4, valor p= 0.7581, coeficiente de correlación (r) = 0.8752).

8.6 Determinación de la potencia neutralizante de los antisueros de conejo

La medición de la potencia neutralizante se realizó mediante la determinación de la DE₅₀ de los antisueros (anti-nativa e irradiada) contra la mezcla nativa. Para lo anterior se utilizaron los sueros de la sangría número 16 de cada conejo de un mismo grupo y se mezclaron en cantidades iguales cada uno de ellos.

Esta mezcla de sueros representa la capacidad neutralizante del grupo inmunizado con un mismo inmunógeno. La evaluación de la potencia neutralizante se realizó a través de la administración de diferentes dosis de antisuero retado contra 3DL₅₀ de la mezcla de vipéridos sin irradiar (Figura 12).

A)



B)

Suero	DE ₅₀ (µl/ratón)	IC. 95%	R ²	DE ₅₀ (ml de antisuero /mg de veneno)
Anti-nativo	90.1	87.1 – 95.1	0.91	1.4
Anti-irradiado	84.0	80 – 88	0.94	1.2

Figura 12. Determinación de la DE₅₀ específica del antisuero obtenido contra la MV nativa e irradiada. A) Los gráficos indican el ajuste sigmoideo dosis-respuesta de las dosis de antisuero (log µl/ratón) contra el porcentaje de supervivencia. **B)** Se muestra la DE₅₀ (µl de antisuero/ratón) que protege contra 3 DL₅₀ de la mezcla sin irradiar, con su respectivo intervalo de confianza y R². La DE₅₀ es representada en mililitros de antisuero necesarios para neutralizar un miligramo de veneno cuantificado por peso.

8.7 Generación de anticuerpos en caballos contra la mezcla de vipéridos irradiada

Con la finalidad de comparar la capacidad inmunogénica neutralizante del toxoide, éste fue utilizado para inmunizar un grupo de 3 caballos. El esquema de inmunización, fué el mismo que se utiliza en el sistema de producción del Antivipmyn® África. Para fines comparativos de la potencia neutralizante, se utilizó suero de animales implicados en la producción de éste antiveneno. La medición por ELISA directo del reconocimiento de la mezcla de venenos no irradiada permitió evaluar la evolución de anticuerpos específicos (Figura 13).

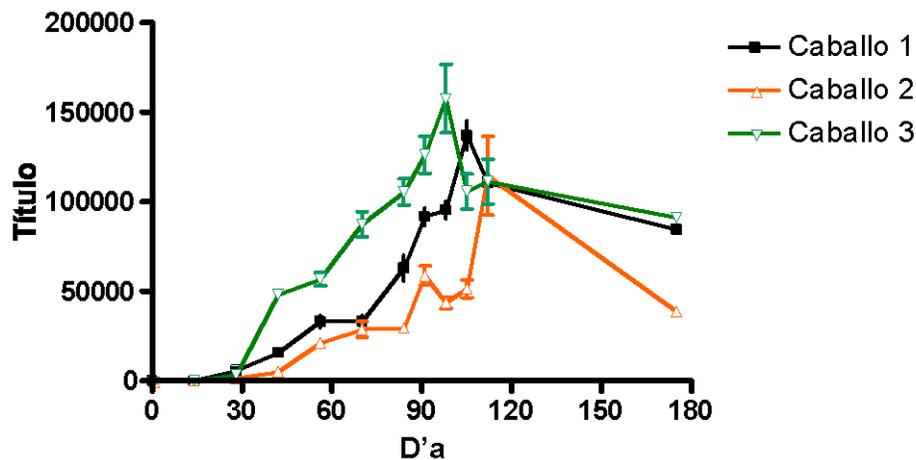


Figura 13. Evolución de los títulos del antisuero de origen equino anti-MV irradiada. Títulos de las diferentes sangrías del antisuero mediante el reconocimiento específico del antisuero por la mezcla de vipéridos nativa durante el esquema de inmunización.

A partir de la tercer sangría hay un reconocimiento específico alto contra la mezcla nativa y que fue incrementándose hasta el día 120. La respuesta inmunológica contra el toxoide fué similar para los tres caballos.

8.8 Determinación de la potencia neutralizante del suero antitoxoide de origen equino

Para probar la capacidad neutralizante de los anticuerpos contra el toxoide de vipéridos, se determinó la DE_{50} contra la mezcla de vipéridos nativa (MV) y dos venenos presentes en la mezcla inmunogénica: *E. ocellatus* y *B. arietans* (ver Tabla 4). Para lo anterior, se utilizaron los sueros de la sangría del día 105 de cada caballo y se mezclaron en cantidades iguales cada una de ellas. Así, diferentes cantidades de este suero fueron incubadas con $3DL_{50}$ de cada veneno.

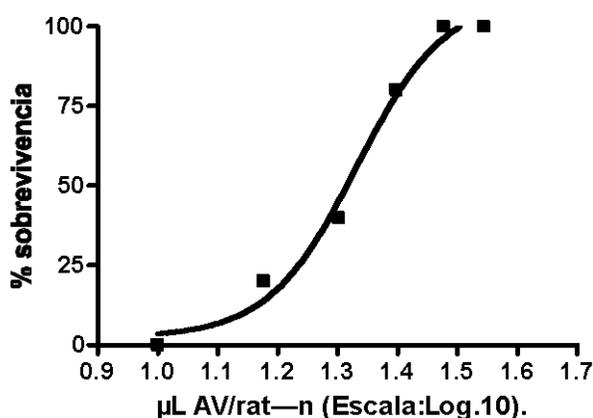


Figura 14. Determinación de la DE_{50} específica del antisuero anti MV irradiada de origen equino. Ajuste sigmoideo dosis-respuesta de la dosis de antisuero ($\log \mu\text{l/ratón}$) contra el porcentaje de sobrevivencia. La DE_{50} (μl de antisuero/ratón) equivale a 21.5 que protege contra $3DL_{50}$ de la mezcla sin irradiar, su intervalo de confianza fué de 16.5 a 27.9 y su coeficiente de determinación equivalente a 0.98. La dosis efectiva, representada en mililitros de antisuero que neutraliza un miligramo de veneno es equivalente a 0.29.

Tabla 19. DE_{50} contra la mezcla de vipéridos, *E. ocellatus* y *B. arietans*.

Veneno	DE_{50} Anti irradiado $\mu\text{l/ratón}$ (I.C. 95%)	DE_{50} Anti viperino nativo $\mu\text{l/ratón}$
MV	21.5 (16.5-27.9)	nd
<i>E. ocellatus</i>	39.3 (35-43)	$10.5^1 - 26.5^2$
<i>B. arietans</i>	4.6 (3-7)	$6.7^1 - 25^2$

¹Representa la mejor potencia neutralizante registrada en la base de datos de los caballos inmunizados con la mezcla de Vipéridos nativa.

²Representa la potencia neutralizante mas baja en la base de datos de los caballos inmunizados con la mezcla de Vipéridos nativa.

nd= no determinado.

Los resultados indican que el suero antitoxoide de origen equino tiene la capacidad de reconocer y neutralizar los efectos tóxicos de la mezcla sin irradiar (Figura 14) de la misma manera que lo hace con el veneno de dos serpientes incluidas en la mezcla inmunogénica (Tabla 19).

En el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón, se creó una base de datos con las DE_{50} de cada uno de los sueros de los caballos involucrados en la producción del Antivipmyn® África (Grupo control).

La DE_{50} del suero antitoxoide obtenida contra *B. arietans* fué mejor que las registradas en la base de datos del grupo control (Sueros bioclon): sin embargo, para el caso de *E. ocellatus*, la DE_{50} es mas alta comparada con la base de datos antes mencionada (Tabla 19; ver discusión: Inmunogenicidad neutralizante de los toxoides en caballos).

8.9 Irradiación de la mezcla de Elápidos congelada y liofilizada

De la misma manera que la mezcla de venenos de vipéridos, cada mezcla de Elápidos irradiada liofilizada se resuspendió en 1 mL de agua estéril, para quedar a una concentración de proteína de 1.5 mg/mL. Con una dilución 1:10, se comparó el espectro de absorción a una longitud de onda de 280 nm de las muestras irradiadas con respecto a la nativa. Las muestras correspondientes a las diferentes dosis de radiación se inocularon vía intravenosa. Se usó la cantidad correspondiente a 2 DL₅₀ en grupos de 3 ratones de la cepa y peso ya descritos y se obtuvieron los siguientes resultados de mortalidad a las 24 horas (Tablas 20 y 21).

Tabla 20.- Mortalidad y absorbancia de la ME irradiada liofilizada.

Dosis de Radiación (kGy)	Absorbancia (280 nm)	Mortalidad (%)
0	0.18	100
4	0.20	100
8	0.19	100
16	0.19	100
20	0.17	100
40	0.16	100
60	0.17	100

Tabla 21.- Mortalidad y absorbancia de la ME irradiada congelada.

Dosis de Radiación (kGy)	Absorbancia (280 nm)	Mortalidad (%)
0	0.17	100
0.5	0.18	N.D
1	0.16	N.D
2	0.16	N.D
4	0.15	N.D
8	0.19	N.D
16	0.16	100
32	0.15	100

Se realizaron geles de poliacrilamida SDS al 15% para comparar el patrón de distribución las proteínas de la mezcla no irradiada con respecto a las irradiadas a diferentes dosis (Figuras 15 y 16), lo que pudiera sugerir modificaciones de las proteínas por la radiación gama. Al igual que con los venenos de vipéridos, las muestras liofilizadas o congeladas, inclusive con las dosis mas altas, no presentan cambios en su actividad biológica (Tablas 20 y 21) ni en los patrones electroforéticos.

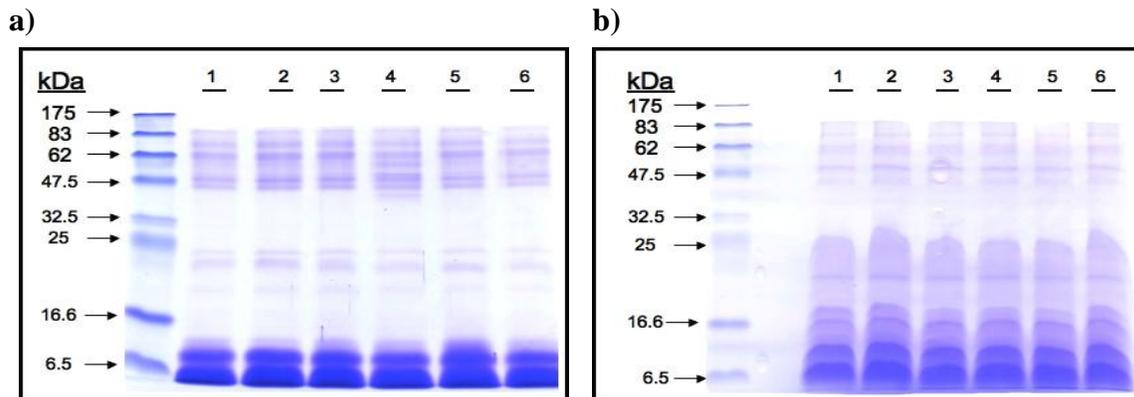


Figura 15. SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida en condiciones reductoras (a) y no reductoras (b) de la ME irradiada liofilizada. Carril 1.-muestra sin irradiar, Carril 2.- muestra irradiada a 4 kGy, Carril 3.- muestra irradiada a 8 kGy. Carril 4.- muestra irradiada a 8 kGy. Carril 5.- muestra irradiada a 16 kGy. Carril 6.- muestra irradiada a 40 kGy.

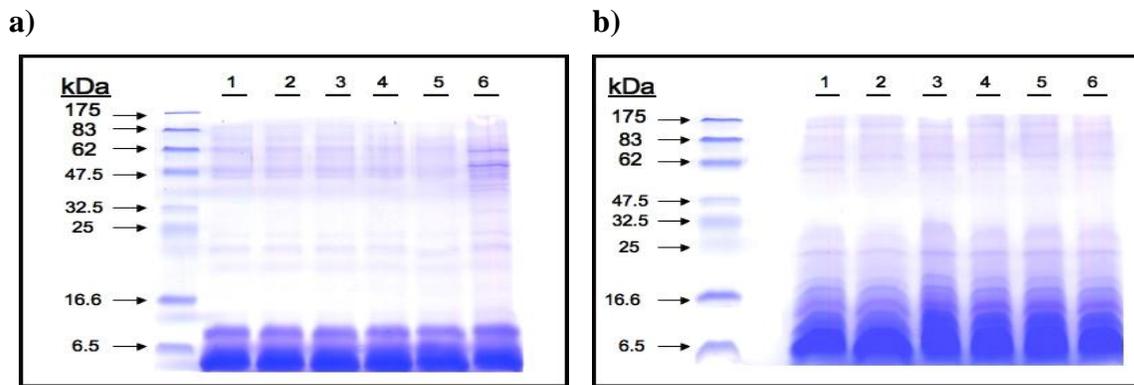


Figura 16. SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida en condiciones reductoras (a) y no reductoras (b) de la ME irradiada congelada Carril 1.- muestra sin irradiar, Carril 2.- muestra irradiada a 0.5 kGy, Carril 3.- muestra irradiada a 2 kGy. Carril 4.- muestra irradiada a 4 kGy. Carril 5.- muestra irradiada a 8 kGy. Carril 6.- muestra irradiada a 16 kGy.

8.10 Irradiación de la mezcla de Elápidos líquida

Al igual que en la muestra de Vipéridos (Fig. 8), la mezcla de Elápidos irradiada bajo estas condiciones, presentó precipitados sobretodo en las dosis mas altas por ello se procedió a centrifugarlas 1 min a 14,000 rpm en tubos eppendorf de 1.5 mL. Los sobrenadantes fueron utilizados para la determinación del espectro de absorción a 280 nm y las pruebas de detoxificación. Los precipitados fueron lavados 2 veces con PBS-1X para descartar proteínas solubles, y posteriormente se resuspendieron en solución solubilizadora en presencia del agente reductor.

Con una dilución 1:10 para las muestras de 1.5 mg/ml (Tabla 22) y 1:30 para las de 5 mg/ml (Tabla 23), se compararon los espectros de absorción a una longitud de onda de 280 nm de las muestras irradiadas con respecto a las nativas. Para las muestras irradiadas a 5 mg/ml se determinó la DL₅₀ de cada una de ellas (Tabla 23).

Tabla 22.- Mortalidad y absorbancia de la ME irradiada líquida a 1.5 mg/ml.

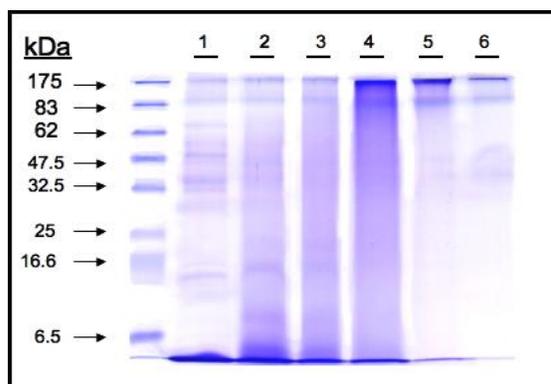
Dosis de Radiación (kGy)	Absorbancia (280 nm)	Mortalidad (%)
0	0.21	100
0.5	0.18	100
0.7	0.18	100
1.5	0.19	0
2	0.15	0
4	0.19	0
8	0.20	0
16	0.24	0
32	0.21	0

Tabla 23.- Mortalidad y absorbancia de la ME irradiada líquida a 5 mg/ml.

Dosis de Radiación (kGy)	Absorbancia (280 nm)	DL₅₀ (µg/ratón)
0	0.21	9.51
2	0.20	15.1
2.5	0.21	24
2.5 + 0.9	0.21	26.4
34	0.22	23
3.4	0.25	22.6
3.4 + 1.2	0.22	30.3

Se hicieron geles de poliacrilamida SDS para comparar el patrón de distribución de las bandas de la mezcla no irradiada con respecto a las irradiadas a diferentes dosis (Figuras 17 y 18). De manera parecida a lo obtenido irradiando los venenos de vipéridos en condiciones líquidas, las ME presentaron un borramiento de las bandas originales y la aparición de un sombreado difuso a lo largo de los carriles que representan diverso grado de entrecruzamiento entre los distintos componentes del veneno.

a) Sobrenadantes



b) Precipitados

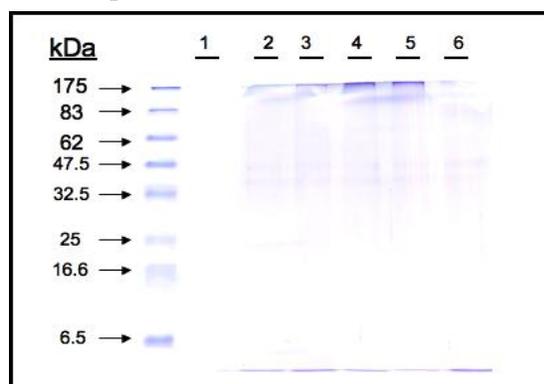


Figura 17. SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida en condiciones reductoras de los sobrenadantes (a) y precipitados (b) de la ME irradiada líquida a 1.5 mg/ml. Carril 1.- muestra sin irradiar, carril 2.- muestra irradiada a 2 kGy, carril 3.- muestra irradiada a 4 kGy. carril 4.- muestra irradiada a 8 kGy, carril 5.- muestra irradiada a 16 kGy, carril 6.- muestra irradiada a 32 kGy.

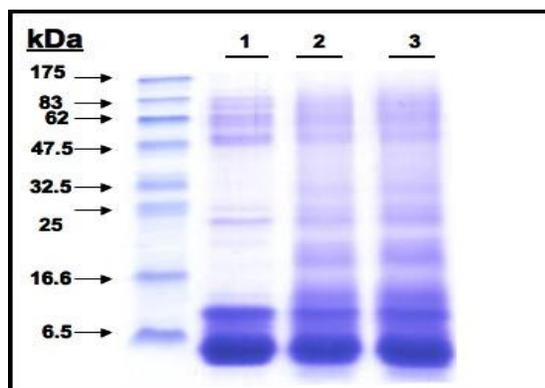


Figura 18. SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida de la ME irradiada líquida a 5 mg/ml. Carril 1.- muestra sin irradiar, Carril 2.- muestra irradiada a 2.5 + 0.9 kGy, Carril 3.- muestra irradiada a 3.4 kGy.

Los precipitados obtenidos en las mezclas son el resultado del entrecruzamiento de las proteínas del veneno. En este caso la formación de agregados de alto peso molecular fue tal que no lograron entrar en el gel de precipitados (Figura 17). Las mezclas a una concentración de proteína de 5 mg/ml fueron menos sensibles a la radiación, ya que una dosis de radiación de 3.4 kGy a esta concentración de proteína no provoca la formación de precipitados (Figura 18) como lo hace una irradiada a 2 kGy a 1.5 mg/ml (Figura 17).

8.11 Obtención del toxoide de la mezcla de Elápidos

La mezcla líquida (12 ml a 5 mg/ml) de veneno de Elápidos fue irradiada a temperatura ambiente, recibió primeramente, una dosis de radiación de 3.4 kGy, como la detoxificación fue de solo 2.4 veces (Tabla 23), se decidió dar una segunda ronda de irradiación a 1.2 kGy. Se decidió trabajar con este toxoide (tres veces detoxificado) para probar su capacidad inmunogénica neutralizante (Figura 19).

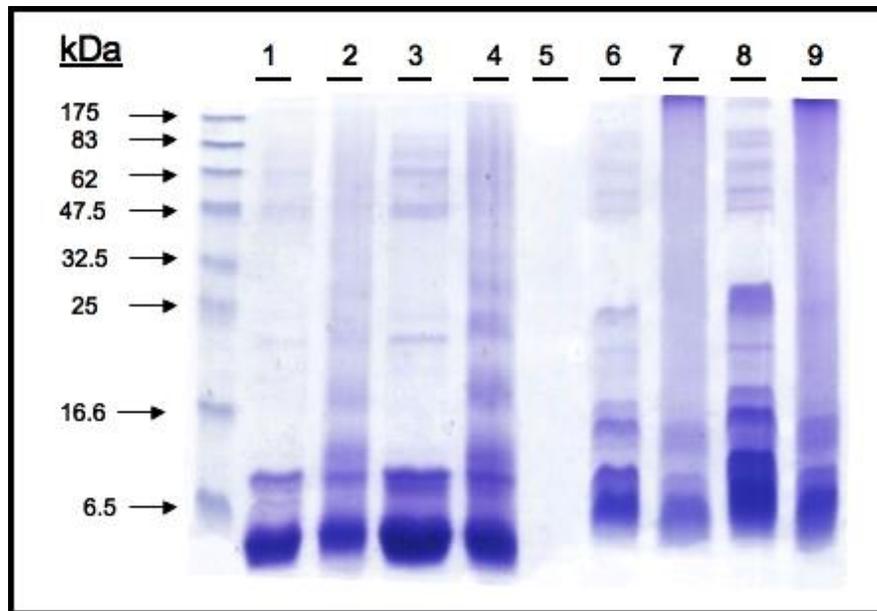


Figura 19. SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida en condiciones reductoras y no reductoras de la ME irradiada y nativa (toxoides obtenidos). Carril 1.- 10 μg de la muestra sin irradiar, Carril 2.- 10 μg de la muestra irradiada 3.4 + 1.2 kGy, Carril 3.- 20 μg de la muestra sin irradiar, Carril 4.- 20 μg de la muestra irradiada 3.4 + 1.2 kGy, CONDICIONES NO REDUCTORAS. Carril 6.- 10 μg de la muestra sin irradiar, Carril 7.- 10 μg de la muestra irradiada a 3.4 + 1.2 kGy, Carril 8.- 20 μg de la muestra sin irradiar, Carril 9.- 20 μg de la muestra irradiada 3.4 + 1.2 kGy.

8.12 Generación de anticuerpos en conejos contra el toxoide de Elápidos

De la misma manera que la mezcla no irradiada, el toxoide de Elápidos 3.4 + 1.2 kGy fue usado para inmunizar grupos de cuatro conejos. Para la medición de títulos de ELISA, se sensibilizaron las placas con buffer 100 mM carbonato/bicarbonato pH 6 con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de la mezcla nativa. El suero de los conejos anti-toxoide, mostró títulos altos de anticuerpos, comparables con el suero de los conejos inmunizados con la mezcla nativa (Figura 20).

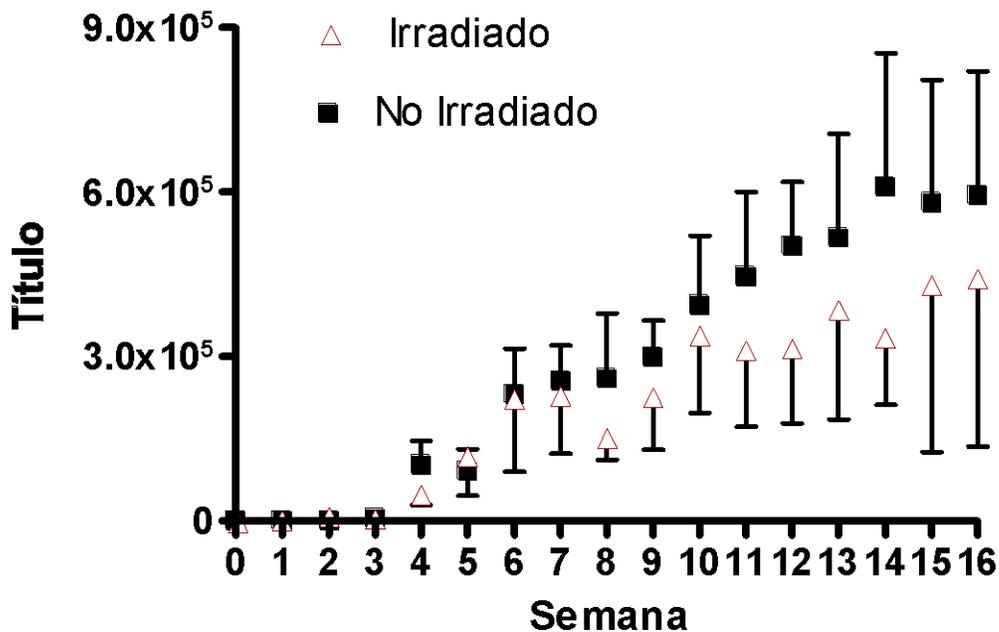


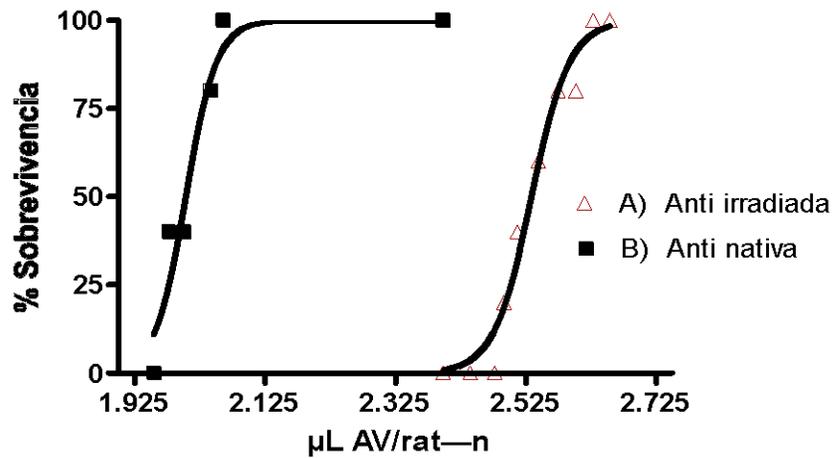
Figura 20. Evolución de los títulos de anticuerpos de conejo contra la ME nativa e irradiada. Títulos promedio de las diferentes sangrías (1-16) de conejos inmunizados con la mezcla nativa e irradiada mediante el reconocimiento específico del antisuero por la mezcla de veneno nativa. n=4, valor p = 0.0036, coeficiente de correlación (r) = 0.73

8.13 Determinación de la potencia neutralizante de los antisueros de conejo

La medición de la potencia neutralizante se realizó mediante la determinación de la DE₅₀ de los antisueros (anti-nativa e irradiada) contra la mezcla de Elápidos nativa. Para lo anterior, se utilizaron los sueros de la sangría número 16 de cada conejo del mismo grupo y se mezclaron en cantidades iguales cada una de ellas. Esta mezcla de sueros representa la capacidad neutralizante del grupo inmunizado con un mismo inmunógeno. La evaluación de la potencia neutralizante de estos sueros, se realizó mediante

la administración de diferentes dosis de antisuero retado contra 3DL₅₀ de la mezcla de venenos sin irradiar.

A)



B)

Suero	DE ₅₀ (µl/ratón)	IC. 95%	R ²	DE ₅₀ (ml de antisuero /mg de veneno)
Anti-nativo	100.1	96.3 – 105	0.94	3.5
Anti- irradiado	342.0	333 – 350.1	0.97	11.9

FIGURA 21. Determinación de la DE₅₀ específica del antisuero obtenido contra la ME nativa e irradiada. A) Los gráficos indican el ajuste sigmoideo dosis-respuesta de las dosis de antisuero (log µl/ratón) contra el porcentaje de sobrevivencia. **B)** Muestran la DE₅₀ (µl de antisuero/ratón) que protege contra 3 DL₅₀ de la mezcla sin irradiar, con su respectivo intervalo de confianza y R²: DE₅₀ representada en mililitros de antisuero necesarios para neutralizar un miligramo de veneno cuantificado por peso.

Los antisueros obtenidos reconocieron a la mezcla de venenos de Elápidos en placas de ELISA, sin embargo, comparando el título promedio de ellos, demuestra que la mezcla nativa es más inmunogénica que la mezcla irradiada (Figura 20). La capacidad de los antisueros de neutralizar a la mezcla sin irradiar fue diferente, se necesita 1 ml del suero anti-nativo para neutralizar 3.5 mg de la mezcla y el mismo volumen del suero anti-irradiado para neutralizar 11.97 mg. Estos resultados indican que el suero anti-nativo es más efectivo que el suero anti irradiado (Figura 21).

8.14 Generación de anticuerpos en caballos contra la mezcla de Elápidos irradiada

Con la finalidad de medir la capacidad inmunogénica neutralizante en animales de producción, el toxoide de Elápidos 3.4 + 1.2 kGy, el mismo que fue utilizado para inmunizar conejos, se uso para inmunizar grupos de 3 caballos. El esquema de inmunización fue idéntico al utilizado en la producción del Antivipmyn® África. La medición por ELISA directo del reconocimiento de la mezcla no irradiada, permitió evaluar la evolución de los títulos del antisuero.

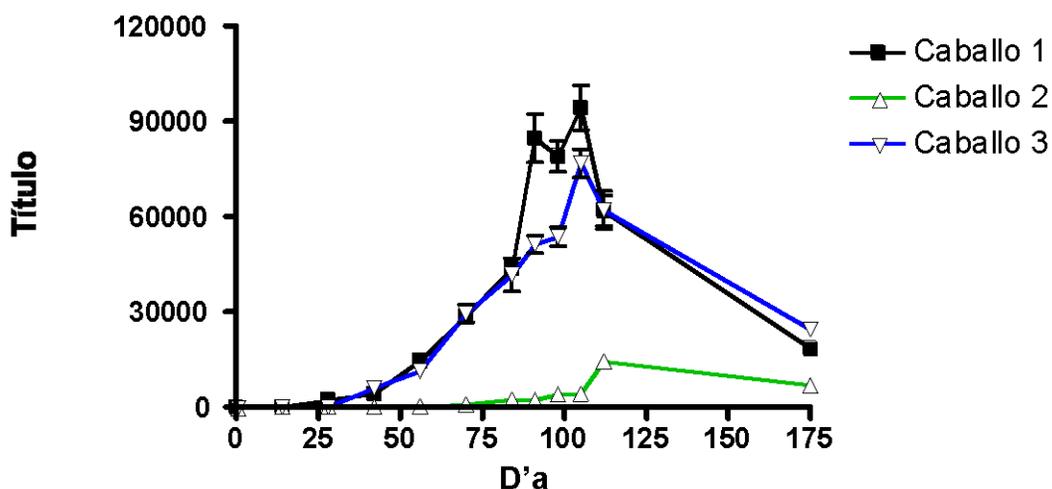


Figura 22. Evolución de los títulos del antisuero de origen equino anti ME irradiada. Títulos de las diferentes sangrías del antisuero mediante el reconocimiento específico del antisuero por la mezcla de elápidos nativa durante el esquema de inmunización.

El análisis de los títulos, refleja que a partir de la cuarta sangría, inicia un reconocimiento específico contra la mezcla nativa y que fue incrementándose hasta el día 120. La respuesta, no fue similar para los tres animales; los caballos 1 y 2 respondieron de manera más favorable al toxoide que el caballo 3. Estas diferencias son comunes y se sabe, que se deben a respuestas fisiológicas propias de cada individuo y dependen de múltiples factores (edad, peso, estado de salud, raza, factores ambientales, etc.).

8.15 Determinación de la potencia neutralizante del antitoxoide de Elápidos de origen equino

La medición de la potencia neutralizante, se realizó mediante la determinación de la DE₅₀ contra la mezcla de Elápidos sin irradiar (Figura 23) y dos venenos (Tabla 24) presentes en la mezcla: *N. nigricollis* y *D. polylepis* (Tabla 5). Para lo anterior se utilizaron los sueros de la sangría del día 105 de cada caballo y se mezclaron en cantidades iguales. Así, diferentes cantidades de este suero fueron incubadas con 3DL₅₀ de cada veneno. De esta manera se compararon las potencias neutralizantes de los sueros anti mezcla irradiada y nativa.

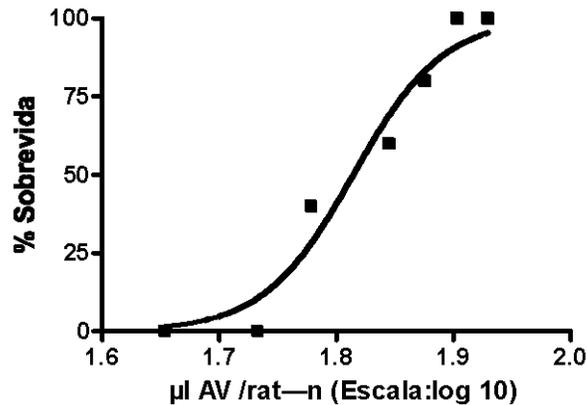


Figura 23. Determinación de la DE₅₀ específica del antisuero anti-ME irradiada. Ajuste sigmoideo dosis-respuesta de la dosis de antisuero (log μl/ratón) contra el porcentaje de sobrevida. La DE₅₀ (μl de antisuero/ratón) equivale a 65.2 que protege contra 3DL₅₀ de la mezcla sin irradiar, su intervalo de confianza fue de 61 a 69 y su coeficiente de determinación equivalente a 0.95. La dosis efectiva, representada en mililitros de antisuero que neutraliza un miligramo de veneno es equivalente a 2.28.

Tabla 24. DE₅₀ contra la mezcla de Elápidos, *N. nigricollis* y *D. polylepis*.

Veneno	DE ₅₀ Anti irradiado μl/ratón (I.C. 95%)	DE ₅₀ Anti elápidos nativo μl/ratón
ME	65.2 (61-69)	Nd
<i>N. nigricollis</i>	82 (80 - 83)	32.5 ¹ -70 ²
<i>D. polylepis</i>	52.3 (50 - 54)	60 ¹ -83 ²

¹Representa la mejor potencia neutralizante registrada en la base de datos de los caballos inmunizados con la mezcla de Elápidos.

²Representa la potencia neutralizante mas baja en la base de datos de los caballos inmunizados con la mezcla de Elápidos.

nd = No determinado

El análisis de la potencia neutralizante del antisuero, indica que tiene la capacidad de neutralizar los efectos tóxicos de la mezcla nativa (Tabla 23) y además, neutraliza la letalidad de dos especies de Elápidos. Si bien, ésta capacidad es óptima para neutralizar a *D. Polylepsis*, es menos efectiva para *N. nigricollis* (Tabla 24) .

Las dosis efectivas medias utilizadas como referencia en las tablas 19 y 24, corresponden a sueros de caballos empleados en la producción del antiveneno comercial Antivipmyn® África, son conocidos como sueros Bioclon. En el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón se creó una base de datos con las DE₅₀ de cada uno de estos sueros.

Se seleccionó el valor más alto y más bajo de dicha base de datos para poder compararlos con los sueros obtenidos en este estudio (sueros experimentales), los resultados indican que no existe diferencia significativa entre las potencias neutralizantes de los sueros anti toxoide y los sueros de producción (Tablas 19 y 24) (ver discusión: Inmunogenicidad neutralizante de los toxoides en caballos).

9. DISCUSIÓN

9.1 Determinación de la toxicidad de las mezclas inmunogénicas

Los venenos ofídicos contienen diferentes toxinas que participan conjuntamente y en diferente grado en el envenenamiento que puede conducir a la muerte. En el veneno existen componentes mayoritarios a los que se les puede atribuir la mayor parte de la potencia tóxica, sin embargo, existe evidencia que muchos componentes minoritarios también son importantes en su letalidad.

La mezcla de venenos de Vipéridos utilizada en este trabajo contiene el veneno de cinco especies que pertenecen a los géneros *Echis* y *Bitis*; su DL₅₀ fue de 23.8 microg/ratón. En el caso de la mezcla de venenos de Elápidos su DL₅₀ fué de 9.5 microg/ratón; contiene el veneno de seis especies que pertenecen a los géneros *Naja* y *Dendroaspis*.

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que, la mezcla de veneno de los Elápidos es mas letal que la de los Vipéridos, ya que necesitamos menor cantidad de veneno para causar la muerte al mismo número de ratones. Este resultado es congruente con lo reportado en la literatura, en donde está demostrado que el veneno de los Elápidos (neurotóxicos en su mayoría) tiene una toxicidad más alta que el de los Vipéridos (no neurotóxicos) (Kochva, 1987).

En nuestro caso -al igual que lo reportado- la diferencia en la toxicidad de las mezclas es atribuida a los componentes propios de cada familia de serpientes. Por ejemplo: las dendrotoxinas o cobratoxinas (neurotoxinas las cuales carecen de actividad enzimática, características de los géneros *Dendroaspis* y *Naja*, respectivamente) dado su tamaño y mecanismo de acción actúan con mayor rapidez que aquéllas con pesos moleculares superiores y, que además, requieren de un sustrato para poder ejercer su efecto toxico; ejemplos de estas son la Ecarina del veneno de *E. ocellatus* y un gran número de

metaloproteasas (SVMPs) presentes en el veneno de los Vipéridos *Bitis arietans* y *B. gabonica* (Kamiguti *et al.*, 1996).

Finalmente, la toxicidad de las mezclas utilizadas en este estudio, depende de la acción en conjunto de las toxinas y enzimas que pertenecen a cada uno de los venenos y no de la toxicidad de una especie en particular.

9.2 Irradiación de la mezclas congeladas, liofilizadas y líquidas

Almacenar venenos en forma congelada y, generalmente, liofilizada, es una práctica muy usada en bioquímica. Está reportado que en estas condiciones, la tasa de degradación por proteólisis y oxidación es muy baja comparada con aquéllas mantenidas a temperatura ambiente. Por ello, congelar y liofilizar venenos permite preservar sus propiedades inmunogénicas, bioquímicas y toxicológicas durante un largo tiempo (Kempner, 2001).

Nuestras mezclas de veneno se almacenaron congeladas y liofilizadas; bajo ambas condiciones fueron irradiadas con dosis de radiación de hasta 64 kGys, con una razón de dosis de 200 Gys/min en el irradiador gammabeam. La toxicidad de dichas mezclas se mantuvo inalterada de igual manera que su patrón electroforético. Esto indican que la radiación gama, bajo estas condiciones, no genera daño de manera directa o indirecta a las proteínas de las mezclas.

Nuestros resultados apoyan el concepto de que la modificación o daño que puede llegar a causar la radiación gama sobre moléculas biológicas, es mediante la formación de radicales libres, y no a través de la interacción directa de la radiación con la proteína. Los radicales involucrados en el daño a las proteínas son el producto de la radiólisis del agua (radicales OH[·]). Cuando se generan, deben viajar e interactuar con los diferentes aminoácidos que conforman a estas macromoléculas.

La unión de los radicales con las proteínas genera enlaces covalentes de manera estocástica: mayoritariamente en los aminoácidos expuestos al solvente (mayor probabilidad de interacción).

Las muestras liofilizadas aún contienen agua asociada a las proteínas (agua de solvatación); sin embargo, está reportado que la producción de radicales libres en materiales liofilizados, es mucho menor que en muestras líquidas (Marciniec *et al.*, 2010a). En nuestro estudio, se probaron dosis menores a 70 kGy sin observar ningún cambio en su actividad biológica y perfil electroforético. Marciniec y colaboradores (2010b) observaron el mismo fenómeno. Al igual que nosotros, sus experimentos consistieron en irradiar muestras liofilizadas con distintas dosis de radiación (de 25 a 800 kGy). A dosis menores de 100 kGy sólo el 0.1% del total de su muestra presentó alguna modificación química. A dosis de 800 kGy, encontraron radiodegradación por diferentes vías, en su mayoría, oxidación por radicales libres y, en menor medida, por la interacción directa de la radiación con dicha muestra (Marciniec *et al.*, 2010b).

No existen estudios sistemáticos en donde se comparen los cambios químicos y los productos radiolíticos del agua en muestras congeladas, liofilizadas y líquidas. Actualmente, se asume que el comportamiento químico del agua y sus productos, bajo éstas tres condiciones, son los mismos. Colin-García y colaboradores, en el 2009, midieron la aparición de materiales orgánicos a partir de la irradiación de cianuro de hidrógeno líquido (HCN_l) y congelado (HCN_c). Encontraron que es necesario aplicar al menos 100 kGy a una muestra de HCN_c para poder detectar los mismos productos que se obtiene irradiando con 10 kGy HCN_l . Concluyen que, los cambios químicos, los productos obtenidos y los radicales generados fueron los mismos en ambas condiciones y, que posiblemente, la diferencia consista en la velocidad con la que los radicales interactúan con la muestra (Colin-García *et al.*, 2009).

Los productos de la radiólisis del agua tienen tiempos de vida del orden de femtosegundos (Draganic y Draganic, 1971); una vez generados pueden reaccionar con moléculas estables (otras moléculas de agua, O₂, proteínas, sales disueltas, etc.) u otros radicales; pueden sufrir reordenamientos intermoleculares para alcanzar estructuras estables, en algunos casos, y en otros, generar moléculas altamente oxidantes como el H₂O₂ (Denaro y Jason, 1972).

Cuando un fotón de radiación gama interactúa con una molécula de agua la radicaliza: el evento es conocido como *evento de radiólisis*. Cuando se lleva a cabo, los productos (radicales libres) deben difundir de él hacia el medio. En este sentido, se postula, a partir del *modelo de difusión*, que las propias moléculas de agua forman una red que rodea al evento radiolítico, y que la salida de los radicales del sitio, al medio, se ve impedida por la interacción que puede ocurrir con cualquier molécula de agua presente. Denaro y Jayson (1972) bajo el esquema de la dinámica química, proponen que la unión de los radicales con otras moléculas que no sean parte del solvente (proteínas, sales, etc.) es dependiente de la difusión y la velocidad, que a su vez dependen de la temperatura del sistema y el tiempo de vida media de los radicales.

Las mezclas de venenos irradiadas líquidas fueron las únicas sensibles a la radiación gama. Asumiendo (según los modelos expuestos) que obtenemos los mismos productos radiolíticos del agua bajo las tres condiciones ya mencionadas, la modificación de las proteínas de las mezclas de venenos estará sujeta a el tiempo de vida media de los radicales, a la distancia que deben recorrer y a su velocidad. La energía cinética del medio influye en la tasa de recombinación de los radicales, en la difusión y en la probabilidad de una coalición proteína – radical. Así, cuanto mayor energía haya en el sistema, mayor será la probabilidad de que dos moléculas se encuentren e interaccionen.

Existe mayor energía cinética en muestras líquidas que en muestras congeladas o liofilizadas. Como resultado de la baja movilidad en una red cristalina y ordenada como el hielo, la probabilidad de una interacción radical – radical o radical – solvente (agua) es mayor que una radical – proteína. En contraparte, cuando los experimentos se llevan a cabo a temperatura ambiente (muestras líquidas) los radicales y iones pueden moverse con mayor facilidad, de esta manera, aumenta la probabilidad de que una interacción radical - proteína ocurra. Para observar un cambio en muestras congeladas y liofilizadas, se necesitan dosis mayores de radiación que las necesarias para observar el mismo fenómeno en muestras líquidas. Nuestros resultados sugieren que las dosis aplicadas a las muestras de venenos congeladas y liofilizadas no fueron suficientes para detectar algún tipo de modificación en su actividad biológica o en su patrón electroforético.

Otro factor importante en la modificación de las proteínas por radicales libres es la concentración. Las mezclas a una concentración de proteína de 1.5 mg/ml mostraron mayor sensibilidad a la radiación que las muestras a 5 mg/ml. Este efecto según Tong y colaboradores (Tong *et al.*, 2007), puede deberse a que el número de radicales libres producidos a una determinada dosis de radiación es el mismo, y provocan un mismo número de modificaciones. Si el sustrato para estos radicales aumenta, sólo se alcanzará el mismo producto aumentando el tiempo de exposición a ellos, es decir, aumentando la dosis de radiación. También se postula que los productos generados por la oxidación pueden servir como *scavengers*, que reaccionan con radicales e impidan la oxidación de proteínas aun inalteradas.

Finalmente se decidió trabajar con muestras de 5 mg/ml en condiciones líquidas. El toxoide de Vipéridos (tres veces irradiado) y de Elápidos (dos veces irradiado) se detoxificaron cuatro y tres veces, respectivamente. La absorbancia a 280 nm de estas mezclas indicó que más del 95% de las proteínas se mantuvo en solución, lo que indica que la detoxificación se debió a la modificación de las

toxinas por la radiación, y no a la pérdida de proteína debido a la radiodegradación (ruptura de enlaces covalentes) o formación de precipitados insolubles.

Resultados posteriores al desarrollo formal de esta tesis.

Los toxoides utilizados en este estudio recibieron dosis alternadas de radiación; no hay reportes contundentes en donde se demuestre que dosis alternadas deben ser consideradas como aditivas. Por la necesidad de encontrar una dosis de radiación única para cada mezcla, decidimos probar diferentes dosis de radiación que disminuyera la toxicidad de los venenos sin alterar su solubilidad. Así, diversas muestras de las mezclas de venenos de Vipéridos y Elápidos fueron sometidas a diferentes dosis de radiación. El resultado, fueron mezclas detoxificadas que nos permite afirmar que: el volumen en el que se encuentra la muestra en el momento de la irradiación no afecta de manera significativa su detoxificación y, nos permiten sugerir una dosis única de radiación para cada mezcla (Anexo 3 y 4) y así poder generar el toxoide correspondiente.

9.3 Inmunogenicidad neutralizante de los toxoides en conejos

Los toxoides que recibieron múltiples irradiaciones fueron utilizados para inmunizar grupos de cuatro conejos. Como control se inmunizó el mismo número de animales con la mezcla no irradiada. El esquema de inmunización duró 105 días, cada 14 días se inocularon, vía intradérmica, dosis crecientes de las mezclas de venenos; el uso de adyuvantes y las dosis crecientes de veneno son un buen método para hiperinmunizar a los animales. En nuestro caso, para la primera inmunización se utilizó adyuvante completo de Freund; posteriormente, se alternó adyuvante incompleto y alúmina (hidróxido de aluminio). Con el fin de

evaluar la evolución de títulos de anticuerpos se tomaron muestras de sangre cada 7 días hasta finalizar el esquema de inmunización.

Se colectaron muestras de sangre cada 7 días (16 en total) y al término, los conejos se sangraron a blanco. Mediante la medición de títulos por el método de ELISA se pudo evaluar la evolución de anticuerpos durante el esquema de inmunización.

La mezcla de Vipéridos nativa es inmunogénica, los ensayos *in vitro* indican que a partir de la cuarta sangría los títulos de anticuerpos empezaron a incrementarse hasta la sangría 16 que alcanzó un título de 250,000 (figura 11). Se sabe que a partir de la primer semana posterior al reconocimiento del antígeno se lleva a cabo la activación linfocitaria (inmunización inicial o primaria), que dirige al sistema inmune a la producción de anticuerpos cada vez mas específicos y a la memoria inmunológica.

La respuesta y la tendencia de los títulos de anticuerpos durante el esquema de inmunización fueron similares en todos los conejos del grupo control. El análisis estadístico que nos permitió evaluar las diferencias entre las medias aritméticas de cada grupo fue la prueba t de Student (Steel y Torrie, 1980). Los resultados obtenidos de dicha prueba indican que no hay diferencia significativa -en términos inmunogénicos- entre ambas muestras ($p= 0.75$). Es decir, el toxoide de Vipéridos fue inmunogénico, y los títulos determinados fueron tan altos como los obtenidos por la mezcla nativa (Figura 11).

Los ensayos de neutralización en ratones nos permitieron evaluar la potencia neutralizante de los sueros obtenidos de la mezcla irradiada y su control, contra la mezcla de venenos nativa. Las dosis efectivas de ambos anti-sueros (90 y 83 μl /ratón) fueron similares. El reconocimiento *in vitro* y las pruebas de neutralización del suero antitoxoide contra el veneno nativo, indican que existen epítopes que se mantienen inalterados por la radiación.

Por otra parte, la mezcla de venenos de Elápidos y su toxoide fueron altamente inmunogénicos ya que se obtuvieron títulos de anticuerpos de más de 300,000; sin embargo, el toxoide fue menos inmunogénico que la mezcla nativa (Figura 20). El análisis estadístico demuestra la diferencia en la inmunogenicidad de ambas muestras (valor de p de 0.0036). Los ensayos de neutralización muestran que el suero obtenido contra la mezcla nativa tiene la capacidad de neutralizar sus efectos tóxicos con una buena potencia (DE_{50} = 100 μ l/ratón). En contraparte, el suero anti toxoide mostró una potencia neutralizante muy baja (DE_{50} = 342 μ l/ratón) (Figura 20).

Así, se obtuvo un suero anti toxoide con títulos de anticuerpos inferiores a los obtenidos con el grupo control y con una capacidad neutralizante menor. El resultado pudiera explicarse por la pérdida de epítopes importantes para la producción de anticuerpos neutralizantes en conejos debido a los efectos de la radiación.

9.4 Inmunogenicidad neutralizante de los toxoides en caballos.

Con la finalidad de evaluar la capacidad inmunogénica neutralizante de los toxoides en animales de producción, se inmunizó un grupo de 3 caballos con cada toxoide.

Se utilizaron dosis crecientes del inmunógeno con diferentes adyuvantes. Se realizaron 8 inmunizaciones por animal y se tomaron 11 sangrías. El toxoide de Vipéridos fué inmunogénico; mediante la misma técnica *in vitro* se pudo evaluar la evolución de títulos de anticuerpos. A partir de la tercer sangría los títulos fueron incrementándose; la respuesta contra el inmunógeno fué similar en los tres animales; sin embargo, el caballo 3 dió más respuesta que el 1 y el 2.

La determinación de la potencia neutralizante del suero al final de la inmunización demostró que los anticuerpos obtenidos son neutralizantes (DE_{50} 21.5 μ l/ratón). Este resultado demuestra que los caballos producen anticuerpos hacia epítopes neutralizantes que se han mantenido inalterados por la radiación.

Se determinó la dosis efectiva contra el veneno de *E. ocellatus* y *B. arietans* (DE_{50} = 39 y 4.6 μ l/ratón, respectivamente). Estos valores al ser comparados con los obtenidos de los caballos de producción (Antivipmyn® África: inmunizados con la mezcla nativa) resultan ser -para el caso de *E. ocellatus*- mayores; en contraparte, para el caso de *B. arietans* resultaron ser menores (ver tabla 18).

El toxoide de Elápidos perdió su capacidad de producción de anticuerpos neutralizantes en conejos; sin embargo, fue necesario probarlo en animales de producción. Para ello, se inmunizó un grupo de 3 caballos con dosis crecientes de dicho toxoide (Tabla 14).

Mediante el reconocimiento de la mezcla nativa en placas de ELISA, se pudo evaluar la evolución de títulos de anticuerpos durante 120 días. Dos de los caballos respondieron de manera similar. A partir de la tercer sangría, se observa un incremento en los títulos de anticuerpos hasta la sangría 10. En contraste, el caballo 2 respondió muy pobremente al inmunógeno, no fué sino hasta la sangría 10 que mostró un título comparable con la sangría 3 de los otros dos caballos del mismo grupo (Figura 22). Este resultado puede atribuirse, a la respuesta fisiológica del animal frente al inmunógeno y no representa la inmunogenicidad global del toxoide. Estas respuestas individuales son comunes, por ello es importante monitorear la respuesta inmune de los animales hiperinmunizados en un sistema de producción de antivenenos. Cabe la posibilidad (dado que el caballo 2 generó considerablemente menos anticuerpos) que la potencia neutralizante sólo esté dada por los dos caballos que despertaron una mayor respuesta inmune frente al toxoide, y que la

potencia neutralizante expresada en microlitros de antisuero, se vea afectada por un suero que ofrece una baja neutralización hacia la mezcla nativa.

Los caballos generaron anticuerpos contra epítopes neutralizantes, ya que el antisuero tuvo la capacidad de neutralizar a la mezcla nativa ($DE_{50} = 62.2 \mu\text{l/ratón}$).

Para los estudios comparativos con los caballos de producción del Instituto Bioclon -inmunizados con veneno sin modificar- se utilizó el veneno de dos especies de serpientes que forman parte de la mezcla inmunogénica. La potencia neutralizante del anti toxoide contra *N. nigricollis* y *D. polylepis* fue de 82 y 52 $\mu\text{l/ratón}$ (Tabla 23). Para el caso de los sueros de los caballos Bioclon, las mejores potencias neutralizantes para *N. nigricollis* y *D. polylepis* fueron: 32 y 60 $\mu\text{l/ratón}$ y las potencias mas bajas: 70 y 83 $\mu\text{l/ratón}$, respectivamente.

Las dosis efectivas de los sueros anti toxoide de ambas mezclas de veneno (ME y MV) fueron hechas con la sangría del día 112 posterior a la primera inmunización. Como se observó en las tablas 14 y 23, en algunos casos, los sueros experimentales mostraron ser mejores que los sueros Bioclon. Es necesario señalar que los sueros control son de caballos que han sido inmunizados por mas de 300 días y, posiblemente, este es el factor que les confiere, en su caso, mejor potencia neutralizante. Es por ello que los animales experimentales continuaron siendo inmunizados; se determinó la potencia neutralizante del suero de la sangría correspondiente al día 315 (Ver esquema del anexo). Los resultados obtenidos demuestran que el suero de los animales experimentales mejoró, ya que tienen potencias neutralizantes mejores que los sueros de los caballos Bioclon (tablas 1 y 2 del anexo).

Además, durante todo el esquema de inmunización (Ver esquema del anexo) no se observaron cambios en el comportamiento ni en la salud de los caballos utilizados en este estudio. Estos resultados reafirman el concepto de

que la respuesta inmune hacia algún antígeno determinado va siendo -con el paso del tiempo- mas eficiente y, que un veneno detoxificado utilizado como inmunógeno, no compromete la salud de los animales.

Los trabajos reportados hasta la fecha, en donde se incluyen inmunizaciones (de animales experimentales) con venenos irradiados, han demostrado que los antisueros son capaces de neutralizar a los venenos nativos correspondientes (Abib, 2003; Hati, 1990; Oussedik-Oumehdi, 2008; Souza, 2002); sin embargo, no hay reportes en donde se demuestre la eficacia de estos toxoides en animales de producción. En nuestro estudio comprobamos dicha capacidad, y los resultados nos permiten proponer el uso de mezclas detoxificadas en la producción del Antivipmyn® África; ya que dichos inmunógenos, como queda demostrado, no comprometen la calidad del antiveneno ni pone en riesgo la salud de los animales.

10. CONCLUSIONES

- La mezcla utilizada de Elápidos fue mas tóxica que la de Vipéridos (9.5 y 23.8 $\mu\text{g}/\text{ratón}$, respectivamente).
- Las mezclas de veneno en estado líquido a temperatura ambiente son más sensibles a la radiación gama que aquéllas congeladas y liofilizadas. De la misma manera, las mezclas a concentraciones de proteína de 1.5 mg/ml son más sensibles que aquellas a 5 mg/ml sometidas al mismo tipo de radiación ionizante.
- Por medio de la aplicación de diferentes dosis de radiación a las mezclas inmunogénicas, se obtuvieron dos toxoides, cuya DL_{50} aumentó 3.2 veces para el caso de Elápidos y 4 veces para el caso de Vipéridos.
- Al igual que las mezclas nativas, los toxoides obtenidos fueron inmunogénicos. Los sueros anti toxoide de origen equino, tienen la capacidad de despertar una respuesta humoral neutralizante, para ciertas especies, tan efectiva como los sueros Bioclon.

Estos resultados demuestran que la aplicación de radiación gama sobre las mezclas de Vipéridos y Elápidos, no disminuye la potencia neutralizante de los antisueros generados en caballos, al tiempo que se conserva la salud de los animales productores.

12. ANEXO

1) DE₅₀ contra *E. ocellatus* y *B. arietans*.

Veneno	DE ₅₀ Suero Anti toxoide μ/ratón (I.C. 95%)	DE ₅₀ Anti víperido Bioclon μ/ratón
<i>E. ocellatus</i>	20 (19-21)	10.5 ¹ - 26.5 ²
<i>B. arietans</i>	6 (3-9)	6.7 ¹ - 25 ²

¹Representa la mejor potencia neutralizante registrada en la base de datos de los caballos Bioclon.

²Representa la potencia neutralizante mas baja en la base de datos de los caballos Bioclon.

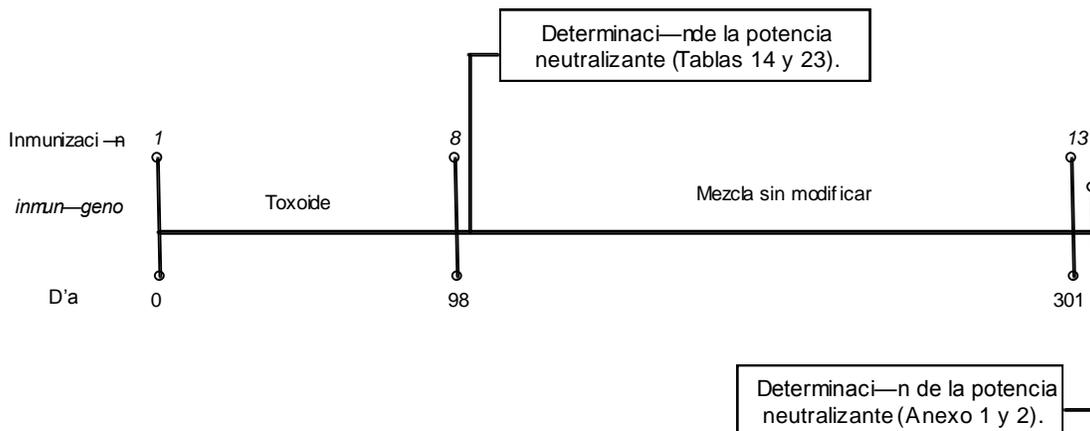
2) DE₅₀ contra *N. nigricollis* y *D. polylepis*.

Veneno	DE ₅₀ Suero Anti toxoide μ/ratón (I.C. 95%)	DE ₅₀ Anti elápido Bioclon μ/ratón
<i>N. nigricollis</i>	26 (24 - 28)	32.5 ¹ - 70 ²
<i>D. polylepis</i>	40.3 (37 - 43)	60 ¹ - 83 ²

¹Representa la mejor potencia neutralizante registrada en la base de datos de los caballos Bioclon.

²Representa la potencia neutralizante mas baja en la base de datos de los caballos Bioclon.

Anexo 1 y 2: Se comparan los sueros experimentales contra los sueros Bioclon. El suero experimental correspondió a la sangría del día 315; entre los días 98 y 301 los caballos recibieron veneno sin modificar (ver siguiente esquema). Los sueros experimentales tuvieron mejores potencias neutralizantes que los sueros Bioclon.



3) Detoxificación de la mezcla de Vipéridos con dosis únicas de radiación.

Dosis de radiación (kGy)	Volumen (mL)	DL ₅₀ (μg/ratón) [I.C.95%]	Detoxificación (Veces)	Toxicidad relativa (%)
0	-	14.5 [11-18]	1	100
3.1	12	41 [32-51]	2.8	35.7
3.3* ¹	1	72 [69-74]	4.9	20.2
3.3* ¹	12	72 [68-74]	4.9	20.2
3.5* ²	1	88 [83-93]	6	16
3.5* ²	12	85.2 [80-90]	5.9	17

*Precipitados
1= claro
2=ligeramente turbio

$\frac{DL_{50} \text{ Mezcla irradiada}}{DL_{50} \text{ Mezcla nativa}}$ Toxicidad relativa original
Veces de Detoxificación

Diferentes muestras de la mezcla de venenos de Vipéridos fueron irradiadas con diferentes dosis de radiación a una tasa de 165 kGy/min, a una concentración de proteína de 5 mg/ml. Los resultados indican que las muestras irradiadas en volúmenes de 1 y 12 ml se detoxifican el mismo número de veces. 3.1 kGy es la dosis de radiación mínima que detoxifica el veneno sin causar cambios en su solubilidad. Dicha dosis es la sugerida para generar el inmunógeno de Vipéridos del antiveneno Antivimyn® África.

4) Detoxificación de la Mezcla de Elápidos con dosis únicas de radiación.

Dosis de radiación (kGy)	Volumen (mL)	DL ₅₀ (μg/ratón)[I.C.95%]	Detoxificación (Veces)	Toxicidad relativa (%)
0	-	9.3 [9.2-9.4]	1	100
4.5	1	25.3 [23-27]	2.7	37.3
4.5	12	29.2 [28-30]	3.1	32
5.5	1	40 [39.7-40.3]	4.3	23.2
5.5	12	41 [40-42]	4.4	22.7
5.5	12	35 [34-36]	3.7	27

*Precipitados
1= claro
2= ligeramente turbio

DL₅₀ Mezcla irradiada
DL₅₀ Mezcla nativa

Toxicidad relativa original
Veces de Detoxificación

Diferentes muestras de la mezcla de venenos de Elápidos fueron irradiadas con diferentes dosis de radiación a una tasa de 165 kGy/min, a una concentración de proteína de 5 mg/ml. Al igual que la mezcla de Vipéridos, los resultados indican que irradiar muestras en volúmenes de 1 y 12 ml no altera de manera significativa el resultado. 5.5 kGy es la dosis de radiación mínima que detoxifica el veneno sin causar cambios en su solubilidad. Dicha dosis es la sugerida para generar el inmunógeno de Elápidos del antiveneno Antivimyn® África.

11. BIBLIOGRAFÍA.

Abib Lila, Laraba-Djebari F. 2003. Effect of gamma irradiation on toxicity and immunogenicity of *Androctonus australis hector* venom. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 81:1118-1124.

Aimanianda V., Haensler J., Lacroix-Desmazes S., Kaveri V. S., Bary J. 2009. Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants. *Trends in pharmacological sciences*. 701: 1-9.

Bogarín G., Romero M., Rojas G., Lutsch C., Casadamont M., Lang J., Otero R., Gutiérrez J.M. 1999. Neutralization by a monospecific *Bothrops lanceolatus* antivenom, of toxic activities induced by homologous and heterologous *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*. 37: 551-557.

Bogarín G., Segura E., Durán G., Lomonte B., Rojas G., Gutiérrez J.M. 1995. Evaluación de la capacidad de cuatro antivenenos comerciales para neutralizar el veneno de la serpiente *Bothrops asper* (Terciopelo) de Costa Rica. *Toxicon*. 33: 1242-1247.

Bradley Karen N., 2000. Muscarinic toxins from the green mamba. *Pharmacology & Therapeutics*. 85: 87-109.

Calmette A. 1894. Propriétés du sérum des animaux immunisés contre le venin des serpents et thérapeutique de l'envenimation. *C. R. Acad. Sci*. 68: 720-722.

Chippaux J-P., 1991. Williams V., White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*. 29: 1279-1303.

Chippaux J-P., 1998. Snake-Bites: appraisal of the global situation. *WHO Bulletin OMS*. 76: 515-524.

Chippaux J-P., 2002. The treatment of snake bites: Analysis of the requirements and assessment of therapeutic efficacy in tropical Africa . *New Jersey: John Wiley and Sons*. 457-472.

Chippaux J-P. 2006. Snake venoms and envenomations. Krieger publishing company.

Chotwiwatthanakun C., Pratanaphon R., Akesowan S., Sriprapat S., Ratanabanangkoon K., 2001. Production of potent polyvalent antivenom against three elapid venoms using a low dose, low volume, multi-site immunization protocol. *Toxicon*. 39: 1487-1494.

Colín-García M., Negrón-Mendoza A., Ramos-Bernal S. 2009. Organics Produced by Irradiation of Frozen and Liquid HCN Solutions: Implications for Chemical Evolution Studies. *Astrobiology* 9: 279-288.

Cruz Z. E., 1997. Rentabilidad de un irradiador de Co 60 semi-industrial tipo Gamma Beam 651 Pt. *Seminario nacional de irradiación de alimentos*. 97-102.

Denaro A. R., Jayson G. G. 1972. Fundamentals of radiation chemistry. *Ann Arbor science publishers Inc*.

de Sousa N. N. F., Amorim R. L., Brigatte P., Picolo G., Ferreira Jr W.A., Gutierrez V. P., Conceicao M. I., Della-Casa S M., Regina K. 2008. The analgesic effect of crotoxin on neuropathic pain is mediated by central muscarinic receptors and 5-lipoxygenase-derived mediators. *Pharmacol Biochem Behav.* 91: 252-260.

Draganic I. G., Draganic Z. D. 1971. The radiation chemistry of water. *Academia press, N.Y.*

Freitas, T.Y., Frézard, F. 1997. Encapsulation of native crotoxin in liposomes: a safe approach for production of antivenom and vaccination against *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, 35: 91–100.

Guidolin, R., Dias Da Silva W., Higashi H.G., Caricati C.P., Lima M.L.S.R., Morais J.F., Pinto J.R., Marcelino J.R., 1989. Hyperimunização de cavalos soroprodutores com venenos botrópicos e crotalico tratados por glutaraldeido. *Mem. Inst. Butantan.* 51: 85–90.

Gutierrez, J.M., Theakston, R.G.D, Warrell, D.A. 2006. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. *PLoS Med.* 3:150.

Harvey A. L. 2001. Twenty years of dendrotoxins. *Toxicon.* 39:15-26.

Hati, R.N., Mandal M., Haiti A.K. 1990. Active Immunization of rabbit with gamma irradiated Russel's viper venom toxoid. *Toxicon.* 28: 895-902.

Hawgood B.J. 1990. Crotoxin, the phospholipase A2 neurotoxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Mem.Inst.Butantan.* 52: 21-22.

Heneine, L.G.D., Cardoso V.N., Daniel J.P., Heneine I. F. 1986. Detoxification of the T2 fraction from a scorpion (*Tityus serrulatus*, Lutz and Mello) venom by iodination and some immunogenic properties of derivates. *Toxicon.* 24: 501–505.

Hung, C.C., Wu S.H., Chiou S.H. 1998. Two novel a-neurotoxins isolated from Taiwan Cobra: Sequence characterization and phylogenetic comparison of homologous neurotoxins. *Journal of protein chemistry.* 17: 107-114.

Jackson K. 2003. The evolution of venom-delivery systems in snakes. *Zoological Journal of the Linnean Society.* 137: 337–354.

Joshi G, Sultana R, Tangpong J, Cole MP, St Clair DK, Vore M, Estus S, Butterfield DA. 2005. Free radical mediated oxidative stress and toxic side effects in brain induced by the anti cancer drug adriamycin: insight into chemobrain. *Free Radic Res.* 39:1147-1154.

Kamiguti A.S., Hay C.R.M., Theakston R.D.G. , Zuzel M. 1996. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon.* 34: 627-642.

Kellerer AM, Roos H. 2005. Are all photon radiations similar in large absorbers? a comparison of electron spectra. *Radiat Prot Dosimetry.* 113:245-250.

Kempner E. S. 2001. Effects of high-energy electrons and gamma rays directly on protein molecules. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 90: 1637-1646.

Kerns R.T., Kini R.M., Steffanson S., Evans H.J. 1999. Targeting of venom

phospholipases: the strongly anticoagulant phospholipase A(2) from *Naja nigricollis* venom binds to coagulation factor Xa to inhibit the prothrombinase complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 369: 107-113.

Klein U., Tu Y., Stolovitzky G.A., Keller J.L., Haddad J. Jr., Miljkovic V., Cattoretti G., Califano A., Dalla-Favera R. 2003. Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 100:2639-2644.

Kochva E. 1987. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Toxicon* 25: 65-106.

López de Silanes J., Mancilla Nava R. and Paniagua-Solís J. 2004. Pharmaceutical composition of F(Ab')₂ fragments of antibodies and method for the preparation thereof. *U.S. Patent 6,709,655 B2, WO 02/068475 A2.*

Maleknia SD, Brenowitz M, Chance MR. 1999. Millisecond radiolytic modification of peptides by synchrotron X-rays identified by mass spectrometry. *Anal Chem. Sep.* 71:3965-3973.

Marciniec B., Ogrodowczyk M., Kwiecien´A. 2010a. Effect of radiation sterilization on alprenolol in solid state studied by high performance thin layer chromatography, *Journal of AOAC Internacional.* 3: 792 – 797.

Marciniec B., Stawny M., Danikiewicz W., Spólnik G., Jaroszkiewicz E., Needham M. 2010b. Identification of radiolysis products of solid thiamphenicol. *Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis.* 10: 7645- 7651.

Markland F.S. Jr., Perdon A. 1986. Comparison of two methods for proteolytic enzyme detection in snake venom. *Toxicon.* 24: 385-393.

Mebis D. 1989. Pharmacology of reptilian venoms. *Biology of the reptilia.* Carl Gans, 8: 437-559. Acad. Press, N.York-London.

Moroz C., Goldblun N., Vries A. 1963. Preparation of *Vipera palestinae* antineurotoxin using carboxymethyl cellulose-bound neurotoxin as antigen. *Nature.* 200: 697–698.

Oussedik-Oumehdi H., Laraba-Djebari F. 2008. Irradiated *Cerastes cerastes* Venom as a Novel Tool for Immunotherapy. *Immunopharmacol. and Immunotoxicol.* 30: 37-52.

Ramos-Cerrillo B., de Roodt A. R., Chippaux J-P., Olguin L., Casasola A., Guzman G., Paniagua-Solis J., Alagon A., Stock R. P. 2008. Characterization of a new polyvalent antivenom (Antivipmyn Africa) against African vipers and elapids. *Toxicon.* 52: 881-888.

Sewall H. 1887. Experiments on the preventive inoculation of rattlesnake venom. *J. Physiol.* 8: 203–210.

Stadtman E. R., Levine R. L., 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids.* 25:207-218.

Stock R.P., Massougbdji A., Alagón A., Chippaux J.-P. 2007. Bringing antivenoms to Sub-Saharan Africa. *Nature Biotechnol.* 25:173-177.

Souza F. A. D., Spencer P. J., Rogero J. R., Nascimento N., Pai-Silva M. D., Gallacci M. ⁶⁰Co gamma irradiation prevents Bothrops jararacussu venom neurotoxicity and myotoxicity in isolated mouse neuromuscular junction. 2002. *Toxicon*. 40: 1101-1106.

Steel G. D., Torrie H. J. 1980. Principles and procedures of statistics a biometrical approach. *Mc Graw-Hill*.

Tejason, P., Ottolenghi A. 1970. The effect of ultra-violet light on the toxicity and the enzymatic and antigenic activities of snake venom. *Toxicon*. 8: 225–233.

Theakston R.D.G., Reid H.A. 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the World Health Organization*. 61: 949-956.

Tong X., Wren C. J., Konermann L. 2007. Effects of protein concentration on extent of gamma-ray-mediated oxidative labeling studied by electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem*. 79: 6376-6382.

Tu A., Miller R.A. 1989. Biochemical studies of the sea snake neurotoxins. *Mem. Inst. Butantan*. 51: 177-193.

Vidal S. N., Hedges B. 2009. The molecular evolutionary tree of lizards, snakes, and amphisbaenians. *Comptes Rendus Biologies*. 332: 129-139.

van Deenen L.L.M., de Haas G.H. 1963. The substrate specificity of phospholipase A₂. *Biochem. Biophys. Acta*. 70: 538-553,

von Behring E.A., Kitasato S. 1890. Über das zustandekommen der diphterie-immunität und der tetanus-immunität bei thieren. *Dtsch. Med. Wochenschr*. 16: 1113-1114,

Ward, C.M. 1996. Characterization of mocarhagin, a cobra venom metalloproteinase from *Naja Mocambique Mocambique*. *Elsevier Science Ltd Tmmn*. 34:1203-1206.

Warrell, D.A. 1995. Clinical toxicology of snakebite in Africa and the middle east/arabian peninsula. *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*, CRC-Press, Boca Raton. 433-491.

World Health Organization. 1981. Progress in the Characterization of Venoms and Standardization of Antivenoms. *Offset Publication, WHO, Geneva*.

Xu G., Takamoto K, Chance MR. 2003. Radiolytic modification of basic amino acid residues in peptides: probes for examining protein-protein interactions. *Anal Chem*. 75: 6995-7007.

Xu G., Chance MR. 2004. Radiolytic modification of acidic amino acid residues in peptides: probes for examining protein-protein interactions. *Anal Chem*. 76: 1213-1221

Xu G., and Chance M. R. 2005. Radiolytic Modification and Reactivity of Amino Acid Residues Serving as Structural Probes for Protein Footprinting. *Anal. Chem*. 77: 4549-455.