



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA
INMUNE HUMORAL EN CABALLOS CONTRA
EL VENENO DE *Micrurus tener***

T E S I S

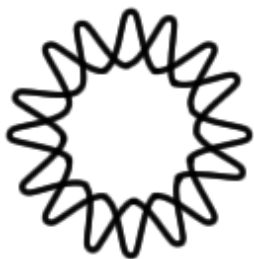
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A:

Q.F.B. ARLENE CALDERÓN CORONA

TUTOR: Dr. ALEJANDRO ALAGÓN CANO





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM y en especial al laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano por el apoyo brindado para llevar a cabo la realización de este proyecto.

Al Instituto Bioclón S.A. de C.V. y a los Laboratorios Silanes S.A. de C.V. por los recursos otorgados.

Al Bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM y al Rancho Ojo de Agua, por mantener los animales experimentales en optimas condiciones y proveer de todos los recursos necesarios para ello.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada a lo largo de mis estudios de maestría.

A los Investigadores que formaron parte de mi comité tutorial:

Dr. Alejandro Alagón Cano

Dr. Gerardo A. Corzo Burguete

Dr. Jorge f. Paniagua Solís.

A los Investigadores que aceptaron formar parte del comité sinodal:

Dr. Lourival Domingos Possani Postay

Dr. Baltazar Becerril Lujan.

Dr. Enrique Rudiño Piñera

Dr. Fernando Roguer Esquivel Guadarrama.

Dra. José Luis Montiel Hernández

En especial a mi tutor, el Dr. Alejandro Alagón Cano, por la formación académica y por guiarme a lo largo de este proyecto.

❖ CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL:

ABREVIATURAS	1
I. INTRODUCCIÓN	3
I.1. <i>Los envenenamientos por mordedura de serpientes como problema de salud pública mundial</i>	3
I.2. <i>Generalidades de las serpientes</i>	5
I.3. <i>Generalidades de las serpientes de coral</i>	7
I.4. <i>Características del veneno de las serpientes de coral</i>	8
I.5. <i>Características generales de M. tener, M. fulvius y M. nigrocinctus</i>	10
I.5.1. <i>Micrurus tener</i>	11
I.5.2. <i>Micrurus fulvius</i>	12
I.5.3. <i>Micrurus nigrocinctus</i>	12
I.6. <i>Envenenamiento por Micrurus</i>	13
I.7. <i>Producción de antivenenos</i>	14
I.7.1. <i>Generación de la respuesta inmune humoral</i>	14
I.7.2. <i>Producción de antivenenos</i>	17
II. ANTECEDENTES	19
III. JUSTIFICACIÓN	22
IV. HIPÓTESIS	22
V. OBJETIVOS	23
VI. METODOLOGÍA	24
VI.1. <i>Preparación de soluciones de veneno y cuantificación de proteína</i>	24
VI.1.1. <i>Preparación de soluciones de veneno</i>	24
VI.1.2. <i>Determinación de proteína por el método del ácido bicinonínico (BCA)</i>	25
VI.1.2.1. <i>Preparación de la mezcla de reactivos para BCA</i>	25
VI.1.2.2. <i>Preparación de la curva estándar y muestras de veneno a evaluar</i>	25
VI.1.3. <i>Determinación de proteína por absorbancia a 280nm</i>	26
VI.2. <i>Producción de antisueros de origen equino</i>	26
VI.2.1. <i>Producción del antisuero monovalente contra el veneno de la especie M. tener</i>	26
VI.2.2. <i>Producción de antisuero polivalente mediante inmunización con mezcla de venenos de las especies M. tener (Mt), M. fulvius (Mf) y M. nigrocinctus (Mn)</i>	29
VI.3. <i>Medición de títulos de anticuerpos mediante la técnica de ELISA</i>	30
VI.4. <i>Determinación de la DL₅₀ de los venenos de M. tener, M. fulvius y M. nigrocinctus</i>	31
VI.5. <i>Medición de la potencia neutralizante de los antisueros</i>	32
VI.6. <i>Análisis estadístico</i>	32

VII. RESULTADOS	33
<i>VII.1 Cuantificación de proteína en los venenos</i>	33
<i>VII.2 Determinación de la dosis letal media (DL₅₀) de los venenos</i>	34
<i>VII.3 Evolución de títulos de anticuerpos de sueros monovalentes anti-<i>M. tener</i></i>	35
<i>VII.4 Potencia neutralizante de sueros monovalentes anti-<i>M. tener</i></i>	40
<i>VII.5 Evolución de títulos de anticuerpos de sueros trivalentes de origen equino</i>	45
<i>VII.6 Potencia neutralizante de sueros trivalentes</i>	46
VIII. DISCUSIÓN	50
<i>VIII.1 Determinación de la dosis letal media (DL₅₀) de los venenos</i>	50
<i>VIII.2 Reconocimiento específico y para-específico de anticuerpos en sueros monovalentes hacia venenos de serpientes de coral</i>	50
<i>VIII.3 Potencia neutralizante específica y para-específica de sueros monovalentes</i>	53
<i>VIII.4 Antisero polivalente de origen equino</i>	57
IX. CONCLUSIONES	61
ANEXOS	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1. Incidencia mundial de envenenamientos causados por mordeduras de serpiente.....	4
Tabla 2. Esquema de inmunización con veneno de <i>M. tener</i> empleado en la producción de sueros monovalentes en los caballos 1 y 3.....	27
Tabla 3. Esquema de inmunización con veneno de <i>M. tener</i> empleado en la producción de suero monovalente en el caballo 2.....	28
Tabla 4. Esquema de inmunización con venenos de <i>M. tener</i> , <i>M. fulvius</i> y <i>M. nigrocinctus</i> empleado en la producción de sueros trivalentes en caballos 1, 2 y 3.....	29
Tabla 5. Concentración de veneno de <i>M. tener</i> determinada en diferentes preparaciones...	33
Tabla 6. Concentración de veneno de <i>M. fulvius</i> determinada en diferentes preparaciones.	33
Tabla 7. Concentración de veneno de <i>M. nigrocinctus</i> en diferentes preparaciones.....	33
Tabla 8. Evolución de títulos de anticuerpos en sueros monovalentes anti- <i>M. tener</i> correspondientes al caballo 1.....	36
Tabla 9. Evolución de títulos de anticuerpos de sueros monovalentes anti- <i>M. tener</i> correspondientes al caballo 3.....	37
Tabla 10. Evolución de títulos de anticuerpos de sueros monovalentes anti- <i>M. tener</i> correspondientes al caballo 2.....	39
Tabla 11. Potencia neutralizante (DE ₅₀) de sueros monovalentes anti- <i>M. tener</i> de caballo 1	41
Tabla 12. Potencia neutralizante (DE ₅₀) de sueros monovalentes anti- <i>M. tener</i> de caballo 3	43
Tabla 13. Potencia neutralizante (DE ₅₀) de sueros monovalentes anti- <i>M. tener</i> de caballo 2	44
Tabla 14. Potencia neutralizante de sueros trivalentes de caballo 1, inmunizado con venenos de Mt, Mf y Mn.....	47

Tabla 15. Potencia neutralizante de sueros trivalentes de caballo 2, inmunizado con venenos de Mt, Mf y Mn.....	47
Tabla 16. Potencia neutralizante de sueros trivalentes de caballo 3, inmunizado con venenos de Mt, Mf y Mn.....	48
Tabla 18. DE ₅ de mezclas de sueros de caballos 1, 2 y 3.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Clasificación de las serpientes en base al tipo de dentadura.....	6
Figura 2. Distribución geográfica de las especies <i>M. fulvius</i> y <i>M. tener</i>	11
Figura 3. Distribución geográfica de la especie <i>M. nigrocinctus</i>	13
Figura 4. DL ₅₀ de venenos de serpientes de coral.....	34
Figura 5. Reconocimiento específico y para-específico de anticuerpos hacía venenos de serpientes de coral. Sueros correspondientes al caballo 1.....	36
Figura 6. Reconocimiento específico y para-específico de anticuepos hacía venenos de serpientes de coral. Sueros correspondientes a caballo 3.....	37
Figura 7. Reconocimiento específico y para-específico de anticuerpos hacía venenos de serpientes de coral. Sueros correspondientes a caballo 2.....	39
Figura 8. Representación gráfica de la potencia neutralizante de sueros monovalentes de caballo 1 contra venenos homólogos y heterólogos.....	42
Figura 9. Representación gráfica de la potencia neutralizante de sueros de caballo 3 contra venenos homólogo y heterólogos.....	43
Figura 10. Representación gráfica de la potencia neutralizante de sueros de caballo 2 contra venenos homólogo y heterólogos.....	44
Figura 11. Reconocimiento específico y para-específico de anticuerpos hacía venenos de serpientes de coral.....	46
Figura 12. Potencia neutralizante de antisueros de caballos 1, 2 y 3 contra veneno de <i>M. fulvius</i>	49

❖ ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
ALUM	Hidróxido de aluminio (alúmina)
AV	Antiveneno (antisuero)
BCA	Ácido bicinconínico
CFA	Adyuvante completo de Freund
DE₅₀	Dosis efectiva media
DL₅₀	Dosis letal media
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
g	Gramos
h	Hora
IFA	Adyuvante incompleto de Freund's
IgG	Inmunoglobulinas de tipo G
i.c	Intervalo de confianza
i.v.	Intravenoso
kDa	Kilo Dalton
m	Metros
Max	Máximo
Mf	<i>Micrurus fulvius</i>
mL	Mililitro
Mn	<i>Micrurus nigrocinctus</i>
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
Mt	<i>Micrurus tener</i>
µg	Microgramos
µL	Microlitros
NACSA	North American coral snake Antivenom (Antiveneno para serpientes de coral en America del Norte)
ND	No determinado
nm	Nanómetro
NN	No neutraliza

PLA2	Fosfolipasa 2
PNPP	<i>para</i> -nitrofenil fosfato
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
V	Veneno
Vol.	Volumen

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Los envenenamientos por mordeduras de serpientes como problema de salud pública mundial.

Los envenenamientos por mordeduras de serpientes constituyen un problema de de salud pública mundial, ya que existe una gran diversidad de especies venenosas de importancia médica en todos los continentes y en casi todos los países. Se estima que aproximadamente un 80% de las muertes registradas en el mundo debidas a envenenamientos por animales ponzoñosos son causadas por mordeduras de serpientes (Stock et al., 2007; Ramos et al., 2008).

Los envenenamientos por mordeduras de serpientes son de mayor relevancia en las zonas tropicales y en países en vías de desarrollo, especialmente en las zonas rurales, donde la población se dedica principalmente a las actividades agrícolas y los asentamientos humanos coinciden con las distribuciones de especies de serpientes venenosas, sin embargo, en países industrializados también se presentan casos, pero estos se encuentran generalmente asociados a accidentes con animales en cautiverio (Chippaux, 1998).

La insuficiencia de servicios médicos, las dificultades de acceso a los centros de salud y la baja accesibilidad y/o escasez de antivenenos eficaces, entre otros, da como resultado que las tasas de mortalidad en regiones como África, Asia y América Latina sean altas (Gutiérrez y col., 2006, Theakston y Warrell, 2000, Chippaux, 1998). Además, en los países en desarrollo, más del 80 % de las personas mordidas por serpientes recurren a tratamientos a base de remedios caseros y después a la medicina moderna, por lo que tardan mucho tiempo en recibir un tratamiento adecuado (Chippaux, 1998).

En las zonas tropicales, donde los envenenamientos por mordeduras de serpientes son más comunes, existen muy pocos datos confiables. En la mayoría de los países, los accidentes por mordeduras de serpientes no son reportados de una forma sistemática y comúnmente los datos están limitados a algunas áreas geográficas, por lo que son muy pocos los países que poseen datos epidemiológicos capaces de proveer cifras precisas

(Swaroop y Grab, 1954; Chippaux, 1998; Kasturiratne et al., 2008), y además los resultados de los estudios no son constantes.

En 1998 Chippaux reportó que la cantidad total de mordeduras podría exceder los 5 millones por año, con un nivel de mortalidad de 125,000 personas y cerca de 2.5 millones de casos de envenenamiento (Tabla 1). Más tarde, en el 2008, el grupo de Kasturiratne, publicó un estudio acerca de la tasa global de mordeduras de serpientes, donde se estima que globalmente ocurren al menos 420,000 envenenamientos y 20,000 muertes cada año, sin embargo, estas cifras podrían llegar hasta 1,841,000 y 94,000, respectivamente (Kasturiratne, 2008).

Tabla 1

Incidencia mundial de envenenamientos causados por mordeduras de serpiente.

Región	Población (x 10 ⁶)	Mordeduras	Envenenamientos	Muertes (% mortalidad)
Europa	730	25 000	8 000	30 (0.38)
Oriente medio	160	20 000	15 000	100 (0.6)
EEUU/Canadá	270	45 000	6 500	15 (0.23)
América Latina	400	300 000	150 000	5 000 (3.3)
África	760	1 000 000	500 000	20 000 (4.0)
Asia	3 500	4 000 000	2 000 000	100 000 (5.0)
Oceanía	20	10 000	3 000	200 (6.6)
Total	5 840	5 400 000	2 682 500	125 345

Fuente: Chippaux, 1998.

1.2. Generalidades de las serpientes.

Los ofidios o serpientes pertenecen al orden Squamata, suborden Serpentes y clase Reptilia. Se estima que las serpientes aparecieron en el Cretáceo, hace aproximadamente 100 a 150 millones de años y en se han adaptado a diferentes hábitats y climas extremos.

Estos reptiles se caracterizan por poseer un cuerpo largo, flexible y sin extremidades. Carecen de parpados y oído externo, pero poseen una escama transparente que recubre el ojo. Su órgano sensitivo más desarrollado es el olfato. Su tamaño oscila entre 20 cm y casi 10 m. Se alimentan de animales vivos como mamíferos (roedores), aves, anfibios, lagartos, peces, insectos, arácnidos, huevos y otras serpientes (Pineda, 2002; Lee, 2002).

Las serpientes poseen dos vías mediante las cuales pueden someter a su presa o enemigo, ya sea mediante el uso de fuerza a través de habilidades como la constricción (usada generalmente por serpientes grandes como: boas, anacondas y pitones) o empleando venenos altamente tóxicos que son introducidos dentro de la presa, causándole daño y llevando a la pérdida de funciones vitales que pueden conducir a la muerte (Roze, 1996).

El aparato de producción e inoculación de veneno de las serpientes venenosas consiste en dos componentes principalmente: un diente modificado (colmillo) por medio del cual el veneno es liberado dentro de la presa y la glándula de veneno, en la cual es producido y almacenado el veneno (Kardong, 1982).

Las serpientes han desarrollado diferentes características en su dentadura (Figura 1), por lo que pueden ser clasificados de la siguiente manera:

Aglifas: En este grupo se encuentran las serpientes que carecen de colmillos inoculadores de veneno. En esta categoría se incluyen la mayoría de las serpientes, incluso las más primitivas como las boas y las anacondas.

Opistoglifas: Aquí se encuentran clasificadas las serpientes como los colúbridos, que tienen un colmillo pequeño inoculador de veneno en la parte posterior de su maxila.

Proteroglifas: Los individuos de este grupo poseen colmillos de veneno que se encuentran en la parte anterior del maxilar, son fijos y están recubiertos por una membrana que se

conecta con la glándula venenosa, facilitando la inoculación del veneno o el lanzamiento de este a un punto dirigido, como son los ojos de sus presas. Dentro de este grupo encontramos a miembros de la familia Elapidae, como las serpientes de coral, cobras, mambas y serpientes marinas, entre otras.

Solenoglifas: Se caracterizan por poseer un colmillo grande que puede alcanzar hasta los 4 cm. Se encuentra en la parte anterior del maxilar superior y posee un canal interno conectado directamente a la glándula de veneno. Estos colmillos son móviles, al rotar el maxilar forman un ángulo de 90° en el momento del ataque. En este grupo se encuentran los miembros de la familia Viperidae, como las serpientes de cascabel.

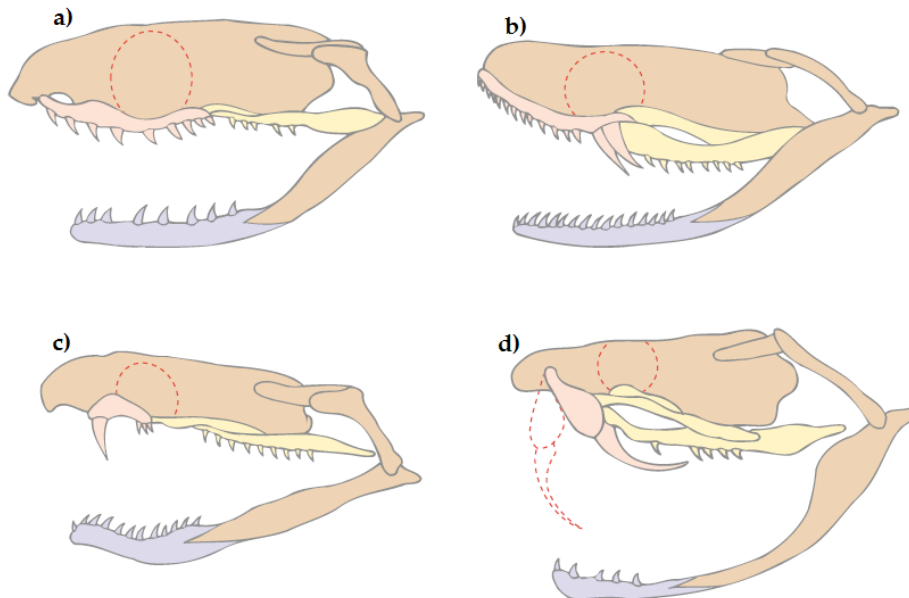


Figura 1

Clasificación de las serpientes en base al tipo de dentadura.

a) Aglifas, b) Opistoglifas, c) Proteoglifas y d) Solenoglifas. (Fuente: Tay, 2002)

En estos últimos dos grupos se encuentran las serpientes de mayor riesgo para el hombre. Actualmente hay descritas cerca de 3000 especies en todo el mundo, de las cuales, aproximadamente el 80% de las especies no son venenosas (Pineda, 2002; Tay et al., 2002; Lee, 2002).

En el continente Americano, las serpientes responsables del mayor número de casos de envenenamiento en humanos provienen de la familia Viperidae. Sin embargo, la familia Elapidae, aunque representa un porcentaje mucho menor, es de importancia clínica, debido a que posee venenos altamente tóxicos (de Roodt, 2004).

1.3. Generalidades de las serpientes de coral

Las serpientes de coral o coralillos, provienen de la familia Elapidae. En el continente Americano, están representadas por los géneros *Micrurus*, *Leptomicrurus* y *Micruroides*, y se distribuyen en gran parte de este, por lo que también se conocen como Elápidos del nuevo mundo (Roze, 1996; Campbell y Lamar, 2004). Estas se pueden encontrar desde el sureste y suroeste de los Estados Unidos, a través de México, Centro América y la mayor parte de Sur América, llegando hasta el centro de Argentina.

Sus hábitats son muy variados, puesto que van desde las partes bajas de los bosques lluviosos y desiertos hasta las partes altas de los bosques nebulosos. Se pueden encontrar desde regiones que van desde el nivel del mar hasta 3,000 m de altura. Su tamaño es muy variado, encontrándose especies inferiores a los 50 cm de longitud y otras que pueden exceder los 150 cm (Roze, 1996; Campbell y Lamar, 2004).

La mayoría de las serpientes de coral tienen un patrón de colores basado en la combinación del rojo, amarillo y negro, que generalmente se encuentran dispuestos en anillos a lo largo del cuerpo, sin embargo, la combinación puede ser únicamente entre el negro y algún otro color (rojo, amarillo o blanco). Son animales con colmillos de tipo proteroglifo, que se caracterizan por ser acanalados, rectos y fijos en la parte frontal del hocico. Su alimentación está compuesta principalmente por pequeñas serpientes, lagartijas, cecílicos y anfisbénidos (Roze, 1996; Campbell y Lamar, 2004).

La importancia médica de los casos de envenenamientos radica en la neurotoxicidad de su veneno, que puede resultar en una parálisis respiratoria en la víctima (Rosso et al., 1996; Roze, 1996, de Roodt et al., 2004; Campbell y Lamar, 2004).

1.4. Características del veneno de las serpientes de coral

Los venenos de serpientes son una mezcla heterogénea de compuestos, principalmente de tipo proteico, que pueden causar efectos nocivos en las funciones biológicas de otros organismos. Aunque su función principal es matar o inmovilizar a sus presas o enemigos, el efecto del veneno puede estar determinado por varios factores, tales como: el tipo de presa, la temporada, la localización geográfica, la edad de la especie, la cantidad de veneno inyectada, el tamaño de la presa y el área anatómica donde se ha llevado a cabo la mordedura (Roze, 1996; Chippaux et al., 1991).

Los Elápidos, incluyendo las serpientes de coral, presentan un veneno que posee actividades principalmente neurotóxicas (pre/post sinápticas), sin embargo, también se le han adjudicado una gama de otras actividades como: cardiotoxicas, miolíticas, coagulantes (anticoagulantes), hemostáticas (activando o inhibiendo), hemorrágicas, nefro o hepatotóxicas (Chippaux et al., 1991).

El veneno de las serpientes de coral es un líquido viscoso y amarillento que contiene sustancias enzimáticas y no enzimáticas (Roze, 1996). Dentro de los componentes enzimáticos se encuentran: la fosfolipasa A2 (PLA2), responsable de la hidrólisis y catálisis de lípidos, por lo que puede actuar como “factor propagador”, facilitando el paso del veneno; la hialuronidasa, que también actúa facilitando la propagación del veneno, debido a que lleva a cabo la destrucción de barreras tisulares; la L-aminoacidooxidasa, que actúa principalmente sobre los L-aminoácidos convirtiéndolos en cetoácidos y H₂O₂ (Leão et al., 2009); las fosfatasas, tales como la fosfodiesterasa y la acetilcolinesterasa, que han sido reportadas en el veneno de *M. fulvius* (Kocholaty et al., 1971; Kumar et al., 1973), estas enzimas están involucradas en la hidrólisis de polinucleótidos y en la inhibición de la acetilcolinesterasa, respectivamente.

También se pueden encontrar un gran número de otros complejos proteínicos no enzimáticos con pesos moleculares que varían en un intervalo entre 2,000 a más de 12,000 Da, donde se incluyen neurotoxinas presinápticas, postsinápticas y cardiotoxinas. Además de los componentes proteínicos, los venenos de las serpientes de coral contienen otro tipo

de compuestos, tales como: algunos lípidos, carbohidratos, rivo flavina y algunas sales metálicas de zinc, calcio, potasio y magnesio (Campbell y Lamar, 2004; Roze, 1996).

En general, los componentes de mayor importancia clínica, dentro de estos venenos, son las α -neurotoxinas, que actúan a nivel postsináptico en la placa neuromuscular y las fosfolipasas de tipo A₂ (PLA₂) que pueden presentar neurotoxicidad a nivel presináptico, por lo que también se les conoce como β -neurotóxicas (Vital Brazil, 1987; Leão et al., 2009).

Las neurotoxinas son proteínas que interfieren con la señalización neural. Estas proteínas se encuentran altamente representadas en los venenos de los géneros *Naja*, *Dendroaspis*, *Haemachatus*, *Bungarus* y *Micrurus*. En base a su modo de acción, las neurotoxinas pueden dividirse en presinápticas y postsinápticas. Las más estudiadas y mayormente representadas, son las α -neurotoxinas que inhiben la transmisión de los estímulos nerviosos en la membrana postsináptica de la placa neuromuscular, bloqueando los receptores colinérgicos (Oliveira et al., 2000; Roze, 1996). Las α -neurotoxinas presentes en los venenos de coralillos, son polipéptidos no enzimáticos y provienen de la gran familia de las toxinas de tres dedos (3FTX). Los miembros de esta familia contienen de 60-74 residuos de aminoácidos y son ricos en enlaces disulfuro, donde, cuatro de ellos se conservan en todos los miembros de la familia, por lo que presentan un patrón de plegamiento similar, que consiste en la formación de tres loops que asemejan a tres dedos (Fry et al., 2003; Leão et al., 2009).

Las PLA₂ presentes en los venenos de Elápidos son enzimas con un peso molecular entre 13 y 15 kDa. Son proteínas que tienen la actividad de hidrolizar el enlace éster en la posición sn-2 de los glicerofosfolípidos, dando como resultado un lisofosfolípido y un ácido graso (Rodríguez, et al., 2002). Debido a que llevan a cabo la catálisis de lípidos, tienen una amplia gama de acciones tóxicas, causando daño principalmente a nivel de membranas. Así también, estas proteínas están relacionadas con la inhibición de la coagulación sanguínea y pueden provocar neurotoxicidad (β -bungarotoxina de *Bungarus multicinctus*, taipoxina de *Oxyuranus scutellatus scutellatus*, crotoxina de *Crotalus durissus terrificus*, notexina de *Notechis scutatus scutatus* y ammodytoxina de *Vipera ammodytes ammodytes*), lo cual depende del tipo de fosfolipasa A₂ (PLA₂) (Dal Belo et al., 2005;

Roze, 1996). En los venenos de coralillos, el efecto más importante ocasionado por estas enzimas es la β -neurotoxicidad, la cual está relacionada con la alteración de la neurotransmisión a nivel presináptico, inhibiendo la liberación de acetilcolina producida por impulsos nerviosos y posteriormente incrementando la liberación espontánea de esta (Vital, 1987). Sin embargo, se ha reportado la existencia de PLA₂ con efectos directos sobre el músculo esquelético y cardíaco (Vital, 1987; Moraes et al., 2003).

Recientemente, se han realizado análisis transcriptómicos de glándulas de veneno de algunas especies del género *Micrurus*, como *M. corallinus* y *M. nigrocinctus*, donde se ha observado que las principales clases de componentes son las neurotóxicas de la familia de tres dedos (3FTx) y las fosfolipasas A₂ (PLA₂) (Leão et al., 2009; Fernández et al., 2011). También se encontró que los componentes postsinápticos (3FTx) son muy diversos en secuencias, mientras que los componentes presinápticos (PLA₂) son más conservados (Leão et al., 2009). La alta expresión de ambos tipos de toxinas concuerda con las actividades pre y post sinápticas que se han descrito en los venenos de las especies que constituyen este género (Vital Brazil, 1987).

1.5. Características generales de M. tener, M. fulvius y M. nigrocinctus.

Dentro de la familia Elapidae, el género representativo en abundancia y diversidad dentro del continente Americano es *Micrurus*, que deriva del griego *mikros* que significa “pequeño” y *oura* que significa “cola”, lo cual hace referencia a su cola pequeña. Este género, es actualmente reconocido por contener aproximadamente 70 especies (Campbell y Lamar, 2004). Algunas de las especies de importancia clínica en Estados Unidos y México son: *M. tener*, *M. fulvius* y *M. nigrocinctus*.

Los estudios bioquímicos sobre los venenos de las especies de *Micrurus* son escasos, debido a las dificultades que existen en la correcta identificación de las especies, la extracción del veneno y el mantenimiento de los animales en cautiverio. Sin embargo, hay estudios en los cuales se ha observado variaciones en su composición, relacionadas con la distribución geográfica, edad, género y dieta (Tanaka, 2010); por lo cual, existe variedad

en cuanto a la manifestación de efectos locales y sistémicos en los envenenamientos causados por serpientes de coral.

I.5.1. *Micrurus tener*:

Su nombre deriva del latín que significa “delicado”, en referencia a las características delicadas y elegantes en el comportamiento de esta especie.

Se distribuyen principalmente en Estados Unidos. Se encuentra en el suroeste de Arkansas, al oeste, en dos terceras partes de Louisiana, y a través del este, centro y sur de Texas. En México, se ha descrito su presencia en las bajas, moderadas e intermedias elevaciones del estado de Morelos, hacía el norte a través de las montañas y el altiplano de Hidalgo, Querétaro, este de Guanajuato y San Luis Potosí, y al sur de Tamaulipas (Figura 2).

En Estados Unidos, las especies se encuentran principalmente en elevaciones bajas, desde cerca del nivel del mar hasta aproximadamente 500 m.s.n.m., pero en México la distribución vertical excede cerca de los 2000 m.s.n.m. Su tamaño puede exceder hasta el metro de longitud, pero principalmente se encuentra alrededor de los 80 cm (Campbell y Lamar, 2004).

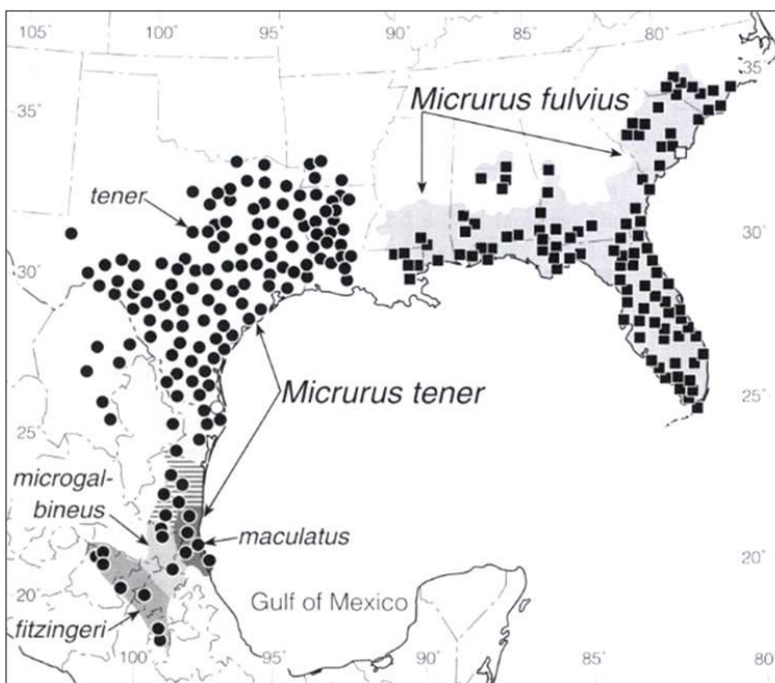


Figura 2

Distribución geográfica de las especies *M. fulvius* y *M. tener*

(Fuente: Campbell y Lamar, 2004).

I.5.2 *Micrurus fulvius*:

Su nombre deriva del latín *fulvius*, que significa “leonado” ó “amarillo rojizo”. Esta especie se distribuye principalmente en el sureste de los Estados Unidos, en parte del estado de Carolina del Norte; hacía el sur, a través de Carolina del Sur y la península de Florida; al oeste, a través del sur de Georgia, Alabama, Mississippi y al sureste de Louisiana (Figura 2). La distribución vertical va desde el nivel del mar hasta unos 400 m.s.n.m.

El tamaño de esta especie se encuentra generalmente por debajo de los 80 cm, sin embargo se han reportado ejemplares de hasta más de un metro de longitud. El patrón de colores consiste en anillos negros, amarillos y rojos, el hocico es totalmente negro, incluyendo internasales, prefrontales, supraoculares, nasales, preoculares y la porción anterior de los parietales (Campbell y Lamar, 2004).

La especie de *M. fulvius* ha sido comúnmente considerada como conespecífica de *M. tener*, sin embargo, Roze en 1996 señaló que no se encuentran distribuidas en el mismo espacio geográfico, ya que se encuentran divididas por una amplia zona, de aproximadamente 100 Km de ancho, a lo largo del valle del Mississippi, de hecho, este ha sido considerado como la línea divisora, geográficamente hablando, de ambas especies. Además, se han encontrado importantes diferencias en cuanto a la composición protéica del veneno entre estas dos especies (Stevan y Seligman, 1970).

I.5.3 *Micrurus nigrocinctus*:

Su nombre deriva del latín *nigrum*, que significa “negro” y *cinctum*, que significa “cinturón”, en referencia a los anillos negros que se encuentran dentro de su patrón de colores.

Esta especie se distribuye en la vertiente del Pacífico. En México se distribuye en los estados de Oaxaca y Chiapas. Hacia el sudeste, se encuentra desde centro América, excepto las partes altas, hasta el noroeste de Colombia; en Nicaragua y en las islas de San José, San Miguel, Coiba y Toboga y en Panamá (Figura 3).

La distribución vertical en la mayoría de las regiones en las cuales se encuentra distribuida esta especie, va desde cerca del nivel del mar hasta cerca de los 1300 m.s.n.m., aunque se ha reportado a esta especie hasta los 2000 m.s.n.m en Costa Rica (Campbell y Lamar, 2004).

El tamaño de esta especie puede exceder a los 100 cm, sin embargo, la mayoría de los adultos se encuentra entre 60-75 cm. Los colores de esta especie son anillos negro, amarillo y rojo.

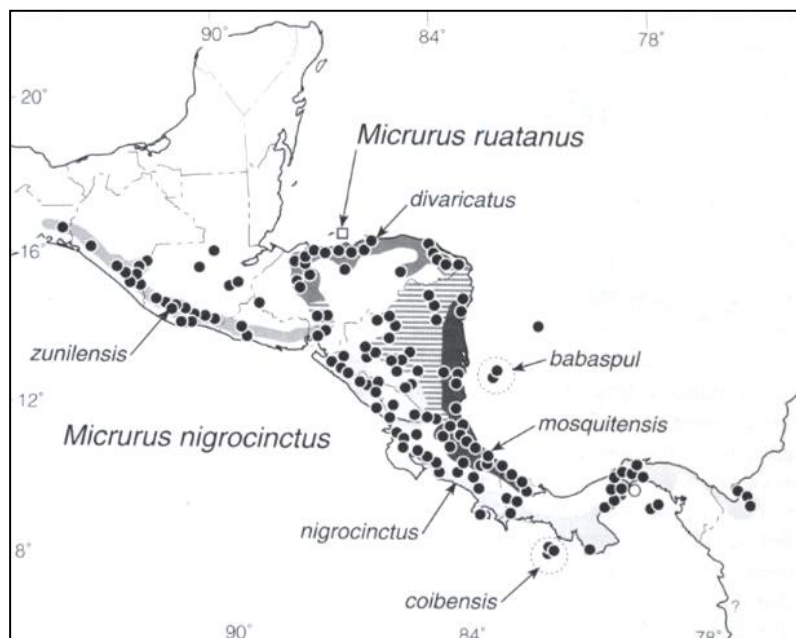


Figura 3

Distribución geográfica de la especie *M. nigrocinctus*.
(Fuente: Campbell y Lamar, 2004).

1.6. Envenenamiento por Micrurus.

Los síntomas de envenenamiento generalmente se presentan durante las primeras 2-6 horas después de la mordida y, en algunas ocasiones, es necesario dejar transcurrir 48 horas para poder observar el efecto máximo. Mediante observaciones clínicas se ha determinado que el veneno de *Micrurus* induce principalmente efectos neurotóxicos en humanos, tal como ptosis palpebral, oftalmoplegía, parálisis de mandíbula, de los músculos

de laringe y faringe, así como parálisis del cuello y extremidades, además de debilidad generalizada en los músculos. En los casos de envenenamiento severo, si no es aplicado un tratamiento en corto tiempo con un antiveneno adecuado, el paciente puede morir debido a la pérdida de la fuerza muscular del diafragma que resulta en parálisis respiratoria y muerte por asfixia (Moraes et al., 2003; Oliveira et al., 2000; Vital Brazil, 1987; Campbell y Lamar, 2004).

En los últimos 5 años fueron reportados 70 casos anuales, en promedio, relacionados con mordeduras de serpientes de coral en los Estados Unidos, con una mortalidad de los envenenamientos no tratados de cerca del 10% (Sánchez et al., 2008). En México no se conoce la incidencia pero aproximadamente se presentan entre 200-300 casos anuales. Sin embargo, las estimaciones acerca de los envenenamientos por mordeduras de serpientes, se encuentran comúnmente subestimados, ya que la mayoría de las víctimas recurren a tratamientos tradicionales poco eficaces y pueden morir en sus casas sin ser registrados (Theakston et al., 2003).

1.7. Producción de antivenenos:

1.7.1. Generación de la respuesta inmune humoral.

La respuesta inmune humoral se caracteriza por la activación específica de los linfocitos B y su diferenciación en células plasmáticas, las cuales son capaces de generar un gran número de moléculas de anticuerpos clonospecíficas. Los anticuerpos tienen la capacidad de reconocer antígenos externos y potencialmente tóxicos y activar los mecanismos para su eliminación (complemento, citotoxicidad mediada por anticuerpo, neutralización). Cuando se lleva a cabo el primer contacto del antígeno con el organismo, se produce la respuesta inmune, donde únicamente las células con el receptor apropiado, son capaces de unirse al antígeno. La unión de las proteínas antigénicas junto con la producción de moléculas coestimuladoras derivadas de células T, llevan a las células B a proliferar y a diferenciarse ya sea como células de memoria o como células plasmáticas, productoras de anticuerpos. En un segundo contacto con el antígeno, la capacidad para montar la respuesta está determinada principalmente por la memoria inmunológica, que

depende de la presencia de células B de memoria, por lo que esta segunda respuesta aparece más rápidamente y es más eficiente (Gold y Defranco, 1994; Wingren, 2007).

Una vez que las células B maduras de la periferia entran en contacto con el antígeno, viajan hacia los centros germinales que se encuentran en los folículos linfoides de los ganglios linfáticos, donde son seleccionadas las células productoras de anticuerpos con mayor afinidad hacia el antígeno. Las células capaces de producir anticuerpos de alta afinidad, están destinadas a convertirse en células de memoria que podrán diferenciarse en células plasmáticas productoras de anticuerpos en una estimulación subsiguiente por el antígeno (Wabl y Steinberg, 1996).

Después de una inmunización, especialmente después de inmunizaciones repetidas, la afinidad de los anticuerpos en el suero aumenta dramáticamente con el tiempo: son posibles mejoras en tres y hasta cuatro órdenes de magnitud. Este incremento en la calidad de anticuerpos en el suero centrada hacia a la respuesta inmune de un antígeno en particular, se le llama maduración de la afinidad (Wabl y Steinberg, 1996).

En 1887, Henry Sewall demostró que la inmunización de palomas con inoculaciones repetidas de dosis cada vez más grandes de veneno de serpientes de cascabel, producía resistencia de las palomas para soportar hasta 6 veces la dosis letal del veneno, gracias a la inmunidad desarrollada (Sewall, 1887).

En la actualidad, con la finalidad de promover una respuesta inmune más eficiente, son empleados adyuvantes en las mezclas de inmunización. Los adyuvantes son sustancias que administradas simultáneamente con el antígeno, potencian la respuesta inmune. Al emplearlos, se pueden usar menores cantidades de antígeno y la respuesta de anticuerpos deseada puede ser alcanzada en menor tiempo (Morris et al., 1999).

Los más empleados son el adyuvante completo de Freund (CFA), el adyuvante incompleto de Freund (IFA) y el hidróxido de aluminio.

El IFA y CFA, son sustancias a base de aceites minerales, que al ser mezcladas con un antígeno en solución acuosa forman una emulsión, lo cual permite una lenta liberación de los antígenos con menor riesgo para el animal inmunizado. Además, provocan una

inflamación en el sitio de inoculación que promueve la llegada de células dendríticas y macrófagos, las cuales son responsables de la captación y presentación de antígenos a los linfocitos (Morris, 1999; Aguilar, 2007; Laloo y Theakston, 2003). El CFA contiene extracto de *mycobacterias* y por tanto presentan un nivel importante de lipopolisacáridos (componentes de su pared celular), ello favorece la activación de macrófagos, liberación de citocinas pro-inflamatorias y la subsecuente activación de linfocitos T.

Los adyuvantes que contienen sales de aluminio (principalmente hidróxido y fosfato de aluminio), forman una suspensión con el antígeno y lo adsorben sobre su superficie. Se sabe que este tipo de adyuvantes también activan células dendríticas, monocitos y macrófagos, que a su vez, incrementan la liberación de moléculas de adhesión y co-estimuladoras. Estos eventos median el reclutamiento de células inflamatorias y son cruciales para estimular la respuesta inmune (Aimaniada, 2009).

En 1993, Kevi Ratanabanangkoon reportó que la respuesta inmunológica mejora cuando se administra el inmunógeno empleando adyuvante completo de Freund. Mas tarde, se demostró que si la inmunización se lleva a cabo por vía intradérmica, en múltiples sitios de administración, es posible disminuir los efectos inflamatorios locales, además al aumentar la superficie de contacto entre el antígeno y el área anatómica del animal inmunizado se puede alcanzar una mayor respuesta por parte del organismo y, una mayor producción de anticuerpos (Theakston et al., 2003 y Chotwiwatthanakun et al., 2001).

Existen estudios que revelan que en algunos casos es el adyuvante y no el inmunógeno *per se*, el que limita la respuesta de anticuerpos, por lo que el empleo de éstos puede dar como resultado un incremento de la cantidad de anticuerpos obtenidos, utilizando menores cantidades de veneno (Sunthornandh y Ratanabanangkoon, 1993).

I.7.2. Producción de antivenenos.

A más de un siglo de que Bertrand, Phisalix y Fraser reportaran las propiedades antitóxicas de la sangre de animales inmunizados con venenos de serpientes, los antivenenos producidos en animales continúan siendo el pilar en el tratamiento de los casos de envenenamiento (Phisalix y Bertrand, 1894a; Phisalix y Bertrand, 1894b; Fraser, 1895).

Albert Calmette, en 1898, preparó el primer antiveneno comercial producido en equinos, contra el veneno de cobra para su uso en Vietnam (fue el primer suero usado como antiveneno en humanos para tratamiento); por lo que es reconocido por introducir el uso de la sero-terapia para tratar los casos de envenenamientos. Más tarde, en 1911, Vital Brazil llevó a cabo una producción a gran escala de antivenenos en Brasil, aunque actualmente su elaboración se realiza en diferentes países (Lalloo y Theakston, 2003).

La principal producción de antivenenos comerciales, se ha llevado a cabo tradicionalmente en caballos, porque son empleados para la producción de antivenenos debido a que son animales dóciles, se pueden obtener grandes cantidades de suero/plasma, son capaces de tolerar grandes dosis de veneno y desarrollar buenas cantidades de anticuerpos neutralizantes (Lalloo y Theakston, 2003).

Los primeros antivenenos consistían en suero equino crudo, pero con el tiempo, se han optimizando los procesos de producción. En 1939, Pope introdujo el uso de sulfato de amonio para precipitar la fracción IgG del suero (Pope, 1939). Modificaciones subsecuentes incluyeron la digestión de las IgG con pepsina, que remueve el fragmento Fc de la molécula de IgG, dando como resultado la obtención de fragmentos $F(ab')_2$ y, más recientemente, con papaína para producir fragmentos Fab. También, se han implementado estrategias como el uso de métodos de purificación por afinidad para remover los anticuerpos no específicos y la estabilización con ácido caprílico para precipitar las proteínas que no pertenecen a las IgG. Estos procedimientos reducen la probabilidad de reacciones anafilácticas (Theakston, 2003).

En la actualidad, la gran mayoría de los antivenenos son producidos de acuerdo a los mismos principios, en donde un animal, más comúnmente, un caballo, es inoculado por vía parenteral (Angulo, 1997) a lo largo de varios meses con dosis crecientes de veneno de

una sola especie (para producir un suero monovalente) o con una mezcla de venenos de varias especies (para producir sueros polivalentes). Las inmunizaciones sucesivas producen un aumento progresivo de anticuerpos neutralizantes (IgG) en el animal. (Lalloo y Theakston, 2003).

Para realizar las inmunizaciones, es importante usar venenos provenientes de varios individuos de la misma especie, representando diferentes edades y diferentes orígenes geográficos, con la finalidad de obtener un antiveneno que tenga la máxima eficacia contra envenenamientos causados por dicha especie (Vonk et al., 2011).

Los antivenenos monovalentes pueden mostrar considerable potencia para neutralizar un veneno, pero están limitados sólo a una especie de animal venenoso, aunque puede mostrar reactividad cruzada hacia venenos de algunas especies muy cercanamente relacionadas. Por su parte, los antivenenos polivalentes pueden ser producidos usando venenos de un grupo de especies de animales venenosos, lo cual hace más amplio su espectro de acción, disminuyendo la importancia de la identificación de la especie responsable del envenenamiento. Sin embargo, existe cierta controversia sobre la importancia de los antivenenos polivalentes. La mayoría de los reportes sugieren que las preparaciones polivalentes presentan menor potencia, mientras que otros indican un efecto sinérgico cuando una mezcla de venenos es usada como inmunógeno (Chippaux, 1997).

II. ANTECEDENTES

El primer suero antielapídico americano fue elaborado por Oswaldo Vital-Brazil a partir de la inmunización de caballos con venenos de las especies *M. frontalis* y *M. corallinus* (Rawat et al., 1994). El estudio de estos venenos y producción de antivenenos ha continuado en importantes centros de investigación como el Instituto Butantan en Brasil, el Instituto de Biotecnología de la UNAM en México y el Instituto Clodomiro Picado en Costa Rica. Estas investigaciones han revelado que antivenenos producidos contra una especie en particular son capaces de reconocer a otras especies, fenómeno conocido como reactividad cruzada (Cohen et al 1968; Bolaños et al., 1978; de Roodt et al., 2004).

Aunque varios antivenenos son producidos por diferentes laboratorios, éstos no siempre se encuentran disponibles para el tratamiento del paciente intoxicado, incluso para el uso en el mismo país de producción. Sólo unos pocos laboratorios producen antivenenos específicos para serpientes de coral, y a pesar de la reactividad cruzada encontrada en los venenos de algunas especies de este género, el tratamiento no siempre es efectivo.

Bolaños y colaboradores, en 1978, desarrollaron un antiveneno contra los venenos de las especies *M. nigrocinctus*, *M. mipartitus* y *M. frontali*. Este antiveneno también fue capaz de reconocer y neutralizar los venenos de *M. fulvius*, *M. alleni*, *M. carnicauda*, *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. lemniscatus*, *M. mipartitus*, *M. nigrocinctus* y *M. spixii*. Estos resultados muestran que algunos componentes tóxicos comparten cierta similitud inmunoquímica entre las diferentes especies, al menos a nivel de epítopes neutralizantes (Bolaños et al., 1978).

Debido a la alta toxicidad del veneno de las especies de *Micrurus*, durante varios años, algunos grupos de investigación se han dedicado al estudio y caracterización de venenos y antivenenos de diferentes especies de este género. En 1990, Gutiérrez y colaboradores, reportaron la capacidad neutralizante de un antiveneno equino monovalente producido en Costa Rica, contra el veneno de *M. nigrocintus*. Este estudio mostró una neutralización efectiva de la letalidad, miotoxicidad y actividad de la fosfolipasa A₂; también se reportó que cuando el antiveneno es administrado por vía intravenosa se logra la

neutralización de la letalidad del veneno, a diferencia de la administración intramuscular, en la cual no se neutraliza dicho efecto.

En México, el único antiveneno específico contra serpientes de coral se comercializa con el nombre de Coralmyn® y es producido por el Instituto Bioclon S.A. de C.V. Este antiveneno es elaborado mediante la inmunización en caballos con el veneno de *M. nigrocinctus* y la posterior purificación de los fragmentos F(ab')₂ de las inmunoglobulinas. Se ha demostrado la eficacia clínica de este antiveneno en varias ocasiones, aunque en la mayoría de los casos se desconoce la identidad de la serpiente involucrada. Sin embargo, este antiveneno muestra baja actividad, en el laboratorio, contra algunas especies como *M. tener* (Carbajal, 2004).

En el 2004 se realizó una evaluación de 2 antivenenos terapéuticos contra 4 venenos de diferentes especies: *M. surinamesis* y *M. pyrrhocryptus* (Suramérica), *M. nigrocinctus* (Centro América) y *M. fulvius* (Norte América). Los antivenenos evaluados fueron el suero anti-*Micrurus* (del Instituto Nacional de Producción de Biológicos-A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán” Buenos Aires, Argentina) y el antiveneno Coralmyn® (del Instituto Bioclón, México DF). Al final de este estudio, se encontró que Coralmyn fue efectivo contra *M. nigrocinctus* y *M. fulvius*, pero no neutralizó a las especies de Suramérica. Por otro lado el suero anti-*Micrurus* neutralizó las especies de Suramérica pero presentó baja actividad contra *M. fulvius* y *M. nigrocinctus*. Esto llevó a la conclusión de que los antivenenos pueden ser utilizados para tratar el envenenamiento de algunas especies pero es necesaria su evaluación cuidadosa en su uso contra venenos de otras especies de diferente región (de Roodt et al., 2004).

El estudio de las características bioquímicas de los venenos de coralillos así como el desarrollo de antivenenos eficaces y de amplio espectro han progresado muy lentamente debido a diversos factores, entre los que destacan: la gran complejidad en la captura y el mantenimiento en cautiverio de estas serpientes y la baja cantidad de veneno que es posible obtener en cada ordeña (Carbajal, 2004). Por lo que es importante considerar las dificultades para la obtención de venenos de las serpientes de coral y por tanto la producción de antiveneno. Además, considerando que es difícil la identificación de las especies involucradas en los casos de envenenamientos, es necesario el desarrollo de un

antiveneno polivalente para tratar los casos de envenenamiento por mordeduras de serpientes de coral de diferentes regiones (de Roodt et al., 2004).

En los Estados Unidos, la compañía farmacéutica Wyeth se ocupó de la producción de un antiveneno para serpientes de coral en America del Norte denominado NACSA (North American Coral Snake Antivenom). Antes de la introducción de este antiveneno en el año 1967, el porcentaje de casos fatales se encontraba alrededor del 10% (debido a fallas respiratorias o cardiovasculares). Sin embargo, Wyeth detuvo la producción de este antiveneno en octubre del año 2008, por lo que ya no se encontrará disponible a partir del 2012 en dicho país, por todo esto, es de interés la evaluación y mejoramiento de otros antivenenos alternativos que ayuden en el tratamiento de envenenamientos por serpientes de coral en los Estados Unidos (Sánchez et al., 2008).

III. JUSTIFICACIÓN

El envenenamiento por mordeduras de serpientes de coral, es un problema de salud pública por su letalidad, debido a la neurotoxicidad que producen. NACSA, el antiveneno de origen equino producido en Estados Unidos para tratar envenenamientos por especies de importancia clínica en esa región, detuvo su producción en octubre del 2008. En este sentido, es importante mejorar la calidad y potencia de antivenenos como Coralmyl®, que puedan satisfacer las necesidades de salud, ampliando e incrementando la actividad contra otras especies como *M. tener* y *M. fulvius*, de importancia clínica en Estados Unidos y México. Por esta razón, resulta fundamental caracterizar la respuesta inmune humoral, en términos de potencia neutralizante, de caballos empleados en la producción de este tipo de antivenenos.

IV. HIPÓTESIS

Debido a que diferentes venenos de especies del mismo género mantienen similitudes en cuanto a los componentes responsables de los efectos tóxicos, los anticuerpos producidos en el suero equino mediante la inmunización con veneno de *M. tener*, serán capaces de reconocer y neutralizar a componentes que intervienen en la letalidad del veneno de *M. tener* y de otras especies de México y de Estados Unidos del mismo género.

V. OBJETIVOS

General:

- Caracterizar la respuesta inmune en caballos inmunizados con veneno de *Micrurus tener*.
-

Particulares:

- Llevar a cabo la hiper-inmunización intradérmica y subcutánea del veneno de *Micrurus tener* en 3 caballos.
- Determinar los títulos de anticuerpos hacía el veneno completo de *M. tener* en diferentes sueros tomados a lo largo del esquema de inmunización y por cada caballo.
- Determinar *in vitro* el reconocimiento de antisueros hacía diferentes fracciones o toxinas selectas del veneno.
- Determinar los títulos de anticuerpos del suero anti-*M. tener* contra otras especies del mismo género
- Evaluar la potencia neutralizante específica y para-específica *in vivo* del suero monovalente anti-*M. tener*.
- Determinar sí caballos previamente inmunizados con veneno de *M. tener* pueden modificar y mejorar la respuesta inmune humoral, llevando a cabo la producción de un antisuero trivalente mediante inmunizaciones con venenos de las especies *M. tener*, *M. fulvius* y *M. nigrocinctus*.
- Realizar evaluaciones mediante ensayos *in vitro* (determinación de los títulos de anticuerpos a lo largo del esquema de inmunización) e *in vivo* (determinación de la potencia neutralizante hacia los venenos empleados) en los antisueros troivalentes.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Preparación de soluciones de veneno y cuantificación de proteína.

Los venenos empleados en este trabajo fueron proporcionados en forma liofilizada por el banco de venenos del Instituto Bioclón, México D.F., y provienen del Natural Toxins Research Center (NTRC). Todos los venenos corresponden a un “pool” de varios individuos.

Cada una de las diferentes soluciones de veneno usadas a lo largo de este proyecto, fue preparada a una concentración de 5 mg/mL, en base a su peso seco. La cuantificación de proteína, para cada una de las diferentes preparaciones se llevó a cabo por dos métodos: absorbancia a 280 nm (A_{280}) y ácido bicinconínico (BCA). Esto con la finalidad de determinar la relación que existe entre los resultados obtenidos por cada método y disminuir los errores experimentales.

VI.1.1 Preparación de soluciones de veneno.

El veneno liofilizado, fue pesado en una balanza analítica (Adventurer Ohaus) y posteriormente disuelto en el volumen necesario de PBS (8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g de Na_2HPO_4 y 0.24g de KH_2PO_4 en 1 L de agua destilada a un pH de 7.4) bajo agitación suave y continua a una temperatura de 4°C, para quedar a una concentración final de 5 mg/mL.

En cada preparación fue determinada la concentración de proteína por A_{280} y BCA. Finalmente, se hicieron alícuotas de 250 μl que fueron almacenadas aproximadamente a -20°C.

VI.1.2 Determinación de proteína por el método del ácido bicinonínico (BCA).

El ácido bicinonínico¹, es un reactivo estable en su forma de sal de sodio, sensible y específico para el ión Cu⁺¹. La estructura macromolecular de la proteína a evaluar y los aminoácidos (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) son responsables de una reacción colorimétrica, puesto que la proteína reacciona con el ion Cu⁺² en medio alcalino produciendo iones cuprosos Cu⁺¹, los cuáles, al formar complejos con el BCA, generan una coloración púrpura con un máximo de absorción de 570 nm.

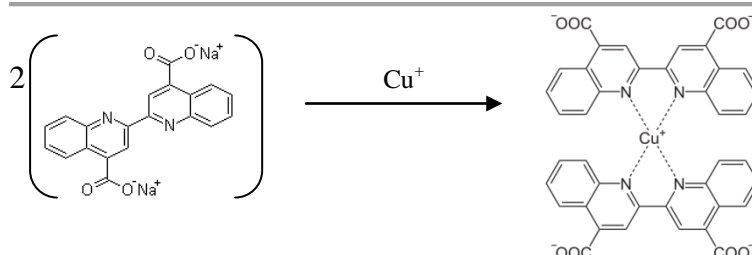
VI.1.2.1. Preparación de la mezcla de reactivos para BCA.

La mezcla de reacción para BCA fue preparada a partir de un kit comercial de la marca Pierce®. El procedimiento consistió en realizar una mezcla en una relación 1:50 de los dos reactivos contenidos en el kit. Uno de los reactivos, el que es colocado en menor proporción, consiste en una solución que contiene 4% de sulfato cúprico pentahidratado y sirve como fuente de iones Cu²⁺. El otro reactivo consiste en una mezcla de varios compuestos: BCA, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio y tartrato de sodio, en medio alcalino (NaOH 0.1 N).

V.1.2.2. Preparación de la curva estándar y muestras de veneno a evaluar.

Curva estándar: La curva estándar fue preparada a partir de diferentes soluciones de albúmina sérica bovina a diferentes concentraciones: 20, 40, 80, 160 y 320 µg/ml, en PBS. En una placa para BCA marca Falcon, se colocaron 25 µL de cada una de las soluciones de albúmina y posteriormente se adicionaron 200 µL a cada pozo de la mezcla de reactivos para BCA.

1



Muestras de veneno: A partir de la solución de veneno a una concentración 5 mg/ml (concentración determinada por peso), se realizó una dilución 1:100 en PBS. Posteriormente fueron colocados 25 µL de esta dilución de veneno más 200 µL de la mezcla de reactivos para BCA en un pozo de la placa. Como control negativo se usó una solución de PBS sin proteína. Cada una de las muestras fue evaluada por duplicado.

La placa con las muestras de veneno y la curva estándar fue incubada a 37°C durante 2 h. Finalmente, se registró la absorbancia a 570nm en un lector Tecan, de la línea Sunrise.

La curva estándar fue elaborada graficando la concentración de albúmina contra la absorbancia. La absorbancia de los venenos fue interpolada en la curva estándar para así determinar la concentración de proteína en la solución de veneno.

VI.1.3 Determinación de proteína por absorbancia a 280nm:

La mayoría de proteínas presenta un máximo de absorbancia a 280 nm, debido a la presencia de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano y fenilalanina).

El método consiste en medir la absorbancia de proteína a una longitud de onda de 280 nm en una celda de cuarzo de 1cm de longitud (Marca Beckman), las mediciones fueron realizadas en un espectrofotómetro (Eppendorf, Biophotometer). La concentración de la solución de veneno fue determinada asumiendo que 1 unidad de absorbancia (UA) corresponde a una concentración de proteína en el veneno de 1 mg/mL.

VI.2 Producción de antisueros de origen equino.

VI.2.1 Producción del antisuero monovalente contra el veneno de la especie *M. tener*.

La obtención de suero monovalente contra el veneno de la serpiente de coral *M. tener*, se llevó a cabo mediante la hiperinmunización de tres caballos, designados con los números 1, 2 y 3. La hiperinmunización puede ser definida como la exposición repetida a un antígeno, con la finalidad de lograr un estado aumentado de inmunidad (Murphy et al., 2008).

Al inicio de este proyecto se estableció un mismo esquema de inmunización para los tres caballos, pero debido a causas ajenas al desarrollo de esta tesis, uno de los animales experimentales falleció, por lo que fue sustituido por un nuevo caballo (denominado como 2), al cual se le diseñó un nuevo y diferente esquema de inmunización. De este modo, los caballos 1 y 3 fueron inmunizados de acuerdo al esquema que se muestra en la Tabla 2 y el caballo 2 de acuerdo al esquema que se muestra en la Tabla 3.

Tabla 2

Esquema de inmunización con veneno de *M. tener* empleado en la producción de sueros monovalentes en los caballos 1 y 3.

Cantidad de veneno y adyuvantes empleados (para más detalle, ver anexo A).

Día	No. inmunización	Sangría	Veneno (µg)	Adyuvante
0	1	1	3.3	CFA
7	2		6.7	CFA
14	3		13.3	IFA
21	4		26.7	ALUM
28	5		53.3	IFA
35	6		106.7	ALUM
42	7	2	166.7	IFA
56	8		166.7	ALUM
70	9	3	166.7	IFA
84	10		250.0	ALUM
98	11	4	250.0	IFA
112	12	5	250.0	ALUM
126	13	6	333.3	IFA
140	14		333.3	ALUM
154	15	7	1000.0	
161		8		
168	16	9	1000.0	
175		10		
182	17	11	3000.0	
189		12		
196	18	13	3000.0	
203		14		
210		15		

*CFA (Adyuvante completo de Freund)

*IFA (Adyuvante incompleto de Freund)

*ALUM (Hidróxido de aluminio (40 µg/mL) e hidróxido de magnesio (40 µg/mL)

Tabla 3

Esquema de inmunización con veneno de *M. tener* empleado en la producción de suero monovalente en el caballo 2.

Cantidad de veneno y adyuvantes empleados.

Día	No. inmunización	Sangría	Veneno (µg)	Adyuvante
0	1	1	10	CFA
7	2		20	IFA
14	3	2	40	ALUM
21	4		80	IFA
28	5	3	160	ALUM
35	6		320	IFA
42	7	4	500	ALUM
49	8		500	IFA
63	9	5	500	ALUM
70	10	6	1000	
77		7		
84	11	8	3000	
91		9		
98		10		

*CFA (Adyuvante completo de Freund)

*IFA (Adyuvante incompleto de Freund)

*ALUM (Hidróxido de aluminio (40 µg/mL) e hidróxido de magnesio (40 µg/mL))

Para todos los caballos, la primera inmunización se llevó a cabo por vía intradérmica en múltiples sitios (8 a 10) a lo largo del cuello del animal, las inmunizaciones posteriores, fueron realizadas por vía subcutánea en cuatro sitios diferentes. Cada aplicación fue realizada en un volumen total de 200-300 µL.

El veneno fue administrado en forma de emulsión, empleando adyuvante completo de Freund (CFA) en las dos primeras inmunizaciones (salvo en el caballo 2, donde solo fue una vez) y alternando adyuvante incompleto de Freund (IFA) e hidróxido de aluminio (ALUM) en las inmunizaciones posteriores.

Las sangrías se llevaron a cabo mediante punción de la vena yugular y la sangre fue colectada en matraces. Posteriormente se dejó en reposo durante 1 hora aproximadamente, para permitir la coagulación y la retracción del coágulo. Finalmente, se procedió a centrifugar el suero y colectar el suero libre de células, mismo que fue distribuido en diferentes tubos y almacenado aproximadamente a -20 °C para su uso posterior en las pruebas *in vitro* e *in vivo*.

Las pruebas *in vitro* corresponden a la determinación de títulos de anticuerpos mediante la técnica de ELISA (inmunoenzayo enzimático). Las pruebas *in vivo*, nos permitieron determinar la capacidad neutralizante (DE₅₀) específica, hacia el veneno homólogo (*M. tener*) y para-específica, hacia los venenos heterólogos (*M. fulvius* y *M. nigrocinctus*).

VI.2.2 Producción de antisuero polivalente mediante inmunización con mezcla de venenos de las especies *M. tener* (Mt), *M. fulvius* (Mf) y *M. nigrocinctus* (Mn).

Los tres caballos empleados en la producción del antisuero monovalente contra *M. tener* fueron, posteriormente inmunizados bajo un nuevo esquema (Tabla 4), empleando mezclas de los venenos de Mt, Mf y Mn.

Tabla 4

Esquema de inmunización con venenos de *M. tener*, *M. fulvius* y *M. nigrocinctus* empleado en la producción de sueros trivalentes en los caballos 1, 2 y 3.

Día	Sangría	No. Inm.	Veneno para inmunización (µg)				Adyuvante
			Mezcla	Mt	Mf	Mn	
0	1	1	166.7	---	83.3	83.3	IFA
14	2	2	333.3	---	166.7	166.7	ALUM
28	3	3	333.3	---	166.7	166.7	IFA
42	4	4	500	166.7	166.7	166.7	ALUM
56	5	5	1000	333.3	333.3	333.3	
70	6	6	1000	333.3	333.3	333.3	
77	7						
84	8	7	1000	333.3	333.3	333.3	
91	9						
98	10						
112	11						
126	12						
140	14						
154	14						
224	15	8	1500	750	750	-	
231	16	9	1500	750	750	-	
238	17						
245		10	3000	1500	1500	-	
252	18						
259							
273	19	11	3000	1500	1500	-	
280							

CFA (Adyuvante completo de Freund), IFA (Adyuvante incompleto de Freund) y ALUM (Hidróxido de aluminio (40 µg/mL) e hidróxido de magnesio (40 µg/mL)

VI.3 Medición de títulos de anticuerpos mediante la técnica de ELISA.

El título de anticuerpos fue determinado por medios de ensayos inmunoenzimáticos de tipo ELISA. Este tipo de ensayos permite detectar los anticuerpos presentes en la fase líquida de la sangre, ya sea el suero o el plasma. Las determinaciones se realizaron mediante diluciones seriadas, y el recíproco de la dilución en el punto al cuál disminuye la unión de los anticuerpos al antígeno que se encuentra unido a la placa de ELISA, en un 50% del máximo, es considerado como "el título de anticuerpos". Mediante este ensayo se determinó el nivel de producción de anticuerpos generados como respuesta a las inmunizaciones y que son capaces de reconocer a componentes presentes en los venenos de *M. tener*, *M. fulvius* y *M. nigrocinctus*.

El ensayo se llevó a cabo de la siguiente manera:

1ª Etapa (Sensibilizado): Los pozos de la placa son llenados con 100 μ L de una solución con veneno a una concentración de 1 μ g/mL, en buffer de sensibilizado (100 mM Carbonato-Bicarbonato pH 9.5), es decir, 100 ng de veneno/pozo. La última columna de la placa fue usada como blanco, por lo que sólo se colocó buffer. Finalmente, la placa se incubó a 37 °C durante 2h.

2ª Etapa (Bloqueo): Con la finalidad de bloquear los espacios sobre la superficie de la placa a los cuales no se hubiesen pegado componentes del veneno, cada uno de los pozos se llenó con 200 μ L de solución de bloqueo (0.5% de gelatina y 0.2% Tween 20 en 50 mM Tris/HCl pH 8). Posteriormente, la placa fue incubada a 37°C durante 2h.

3ª Etapa (Incubación con el antisuero): En la primera columna de cada placa, fueron colocados (por duplicado) 150 μ L de las muestras de antisuero en una dilución 1:30 en solución de reacción (50 mM Tris/HCl pH 8, 500 Mm NaCl, 1 mg de gelatina/mL y 0.05% Tween 20). Los pozos restantes fueron llenados con 100 μ L de solución de reacción; posteriormente se hicieron diluciones seriadas en una relación 1:3, directamente sobre la placa, tomando 50 μ L de la dilución inicial 1:30 de los primeros pozos, los cuales fueron depositados en los pozos de la segunda columna, se mezclaron y se llevaron 50 μ L a los pozos de la tercera columna y así sucesivamente hasta la columna 10. Finalmente se descartaron los últimos 50 μ L de la dilución de antisuero.

Los pozos de las columnas 11 y 12 correspondieron a los blancos. La placa con el suero fue incubada durante 1h a 37° C.

4ª Etapa (Anticuerpo conjugado): En este paso se empleó un anticuerpo unido covalentemente a una enzima que permite generar una señal colorida al degradar un sustrato, en este caso se utilizó un anticuerpo de conejo anti-IgG de caballo, acoplado a fosfatasa alcalina (marca Rockland), en una dilución 1:2000 en solución de reacción, llenando cada pozo con 100 µL e incubando la placa durante 1 h a una temperatura promedio de 37° C.

5ª Etapa (Revelado): Cada pozo se llenó con 100µL de una solución 1:100 de PNPP (para-nitrofenilfosfato, Invitrogen) en buffer para PNPP (Invitrogen) 1:10 y agua destilada. El PNPP actúa como sustrato de la fosfatasa alcalina y da como resultado una reacción colorida. Finalmente, las absorbancias de las soluciones de cada pozo fueron determinadas en un lector de ELISA (Tecan Sunrise) a una longitud de onda de 405 nm.

Con la finalidad de remover todo aquello que no reaccionó dentro de los pozos, entre cada uno de los pasos anteriormente descritos se llevó a cabo la adición de 200 µL de solución de lavado (50 mM Tris/HCl pH8, 150 mM de NaCl y 0.05% Tween 20). Los lavados se llevaron a cabo por triplicado.

VI.4 Determinación de la DL₅₀ de los venenos de *M. tener*, *M. fulvius* y *M. nigrocinctus*.

La DL₅₀ se define como la dosis de veneno que produce la muerte de la mitad del total de la población de animales bajo experimentación. Este parámetro nos fue útil para conocer y comparar la toxicidad de los venenos empleados en este estudio

La determinación de las DL₅₀ de los venenos se llevó a cabo en ratones de la cepa ICR-CD-1 con un peso entre 18-20 g y fueron utilizados grupos de 5 ratones. Para cada grupo fueron empleadas diferentes cantidades de veneno en un volumen final de 500 µL de solución salina, de acuerdo a las tablas que se muestran en el anexo C. La administración fue realizada por vía intravenosa (i.v) en la cola del ratón. Las lecturas fueron tomadas a las 48 h después de la inyección del veneno, para registrar el porcentaje de mortalidad. El análisis de los datos fue realizado por regresión no lineal a través de una curva sigmoidea de dosis-respuesta usando el programa Graph Pad Prism

4.03 (San Diego, CA) para encontrar la DL_{50} (cantidad de veneno que produce la muerte del 50% de los animales tratados).

VI.5 Medición de la potencia neutralizante de los antisueros.

La DE_{50} se define como la dosis de antisuero que mezclada con tres DL_{50} de veneno es necesaria para que sobreviva la mitad de la población de animales bajo experimentación.

Este valor se determinó administrando por vía intravenosa diferentes volúmenes de suero pre-incubados, a 37°C por 30 min, con 3 DL_{50} del veneno correspondiente, en un volumen total de 0.5 mL por ratón. En cada ensayo fueron empleados grupos de 5 ratones de la cepa ICR-CD-1, con un peso entre 18-20 g. La cantidad de animales vivos y muertos fue tomada después de las 48 horas de haber realizado la administración. Los controles positivos consistieron en grupos de ratones inyectados con 3 DL_{50} del veneno y los controles negativos únicamente fueron administrados con el antisuero a probar. Finalmente, el análisis de los datos fue realizado graficando el % de animales vivos como función del logaritmo del volumen de suero, utilizando regresión no lineal a través de una curva sigmoidea de dosis-respuesta usando el programa Graph Pad Prism 4.03.

VI.6. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se empleó la prueba de ANOVA (análisis de varianza). Este método permite comparar mediciones repetidas a partir de muestras independientes, con un tamaño de muestra igual o diferente. Esta prueba es elegida cuando el modelo experimental tiene tres o más muestras independientes, y no permite comparar valores individuales. El análisis fue llevado a cabo usando el programa Graph Pad Prism 4.03.

VII. RESULTADOS

VII.1 Cuantificación de proteína en los venenos.

La determinación de proteína fue relativamente semejante entre las diferentes soluciones de veneno empleadas a lo largo de este trabajo (coeficientes de variación entre 3 y 10%), al comparar entre los métodos empleados: A₂₈₀ y BCA (Tablas 5, 6 y 7). Además de permitir monitorear la uniformidad de las diferentes soluciones de veneno, y disminuir los errores experimentales, la determinación de proteína permitió ajustar la concentración: 5 mg de polvo equivalieron a 6-8 mg de proteína.

Tabla 5

Concentración de veneno de *M. tener* determinada en diferentes preparaciones.

Solución de veneno	Conc. de veneno de <i>M.tener</i> (mg/mL) determinado por:		
	Peso seco	A280 nm	BCA
1	5.0	5.9	7.4
2	5.0	6.7	6.8
3	5.0	6.0	6.5
4	5.0	5.6	6.2
5	5.0	5.8	6.4
6	5.0	5.8	5.8
Promedio:		6.0	6.5
Coefficiente de variación (%):		6.1	8.8

Tabla 6

Concentración de veneno de *M. fulvius* determinada en diferentes preparaciones

Solución de veneno	Conc. de veneno de <i>M.fulvius</i> (mg/mL) determinado por:		
	Peso seco	A280 nm	BCA
1	5.0	7.8	6.5
2	5.0	7.8	6.3
3	5.0	7.7	5.6
4	5.0	8.3	7.1
Promedio:		7.9	6.4
Coefficiente de variación (%):		3.7	9.9

Tabla 7

Concentración de veneno de *M. nigrocinctus* determinada en diferentes preparaciones

Solución de veneno	Conc. de veneno de <i>M.nigrocinctus</i> (mg/mL)		
	Peso seco	A280 nm	BCA
1	5.0	7.0	6.1
2	5.0	7.4	5.7
Promedio:		7.2	5.9
Coefficiente de variación (%):		3.9	4.8

VII.2 Determinación de la dosis letal media (DL_{50}) de los venenos.

La DL_{50} determinadas por vía i.v. en ratones fueron 14.04 $\mu\text{g}/\text{ratón}$, 6.01 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ y 4.04 $\mu\text{g}/\text{ratón}$, para los venenos de *M. tener*, *M. fulvius* y *M. nigrocinctus*, respectivamente (Figura 4). Las Tablas con las diferentes cantidades de cada veneno empleadas y el porcentaje de mortalidad en cada caso se muestran en el Anexo C. Es importante mencionar que las cantidades de veneno empleadas en cada ensayo se basaron en la concentración de veneno determinada por peso seco.

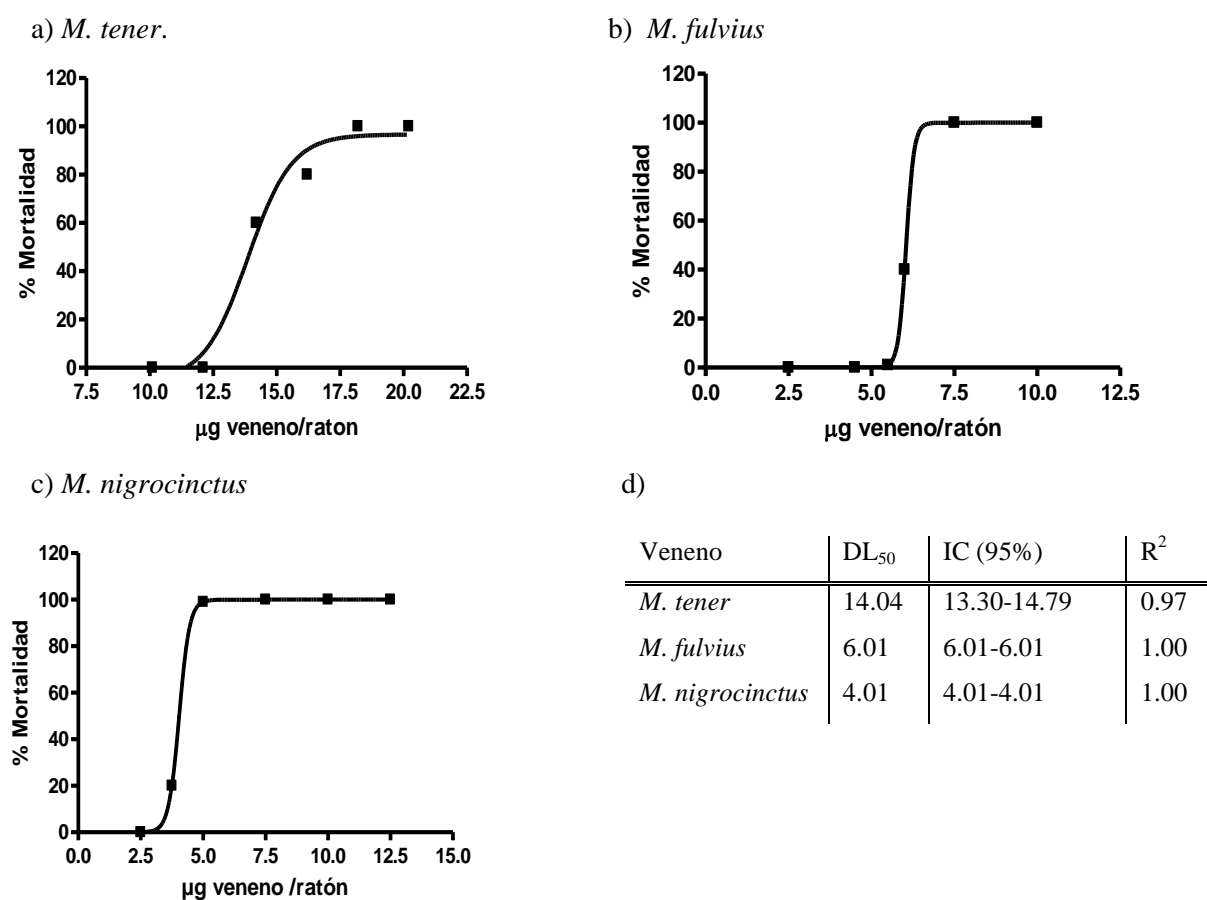


Figura 4

DL_{50} de venenos de serpientes de coral.

Estos valores fueron determinados en ratones y fueron obtenidos mediante ajuste sigmoideo dosis-respuesta (a, b y c).

Valores de DL_{50} , R^2 e intervalos de confianza para cada veneno (d).

VII.3 Evolución de los títulos de anticuerpos de sueros monovalentes anti-M. tener.

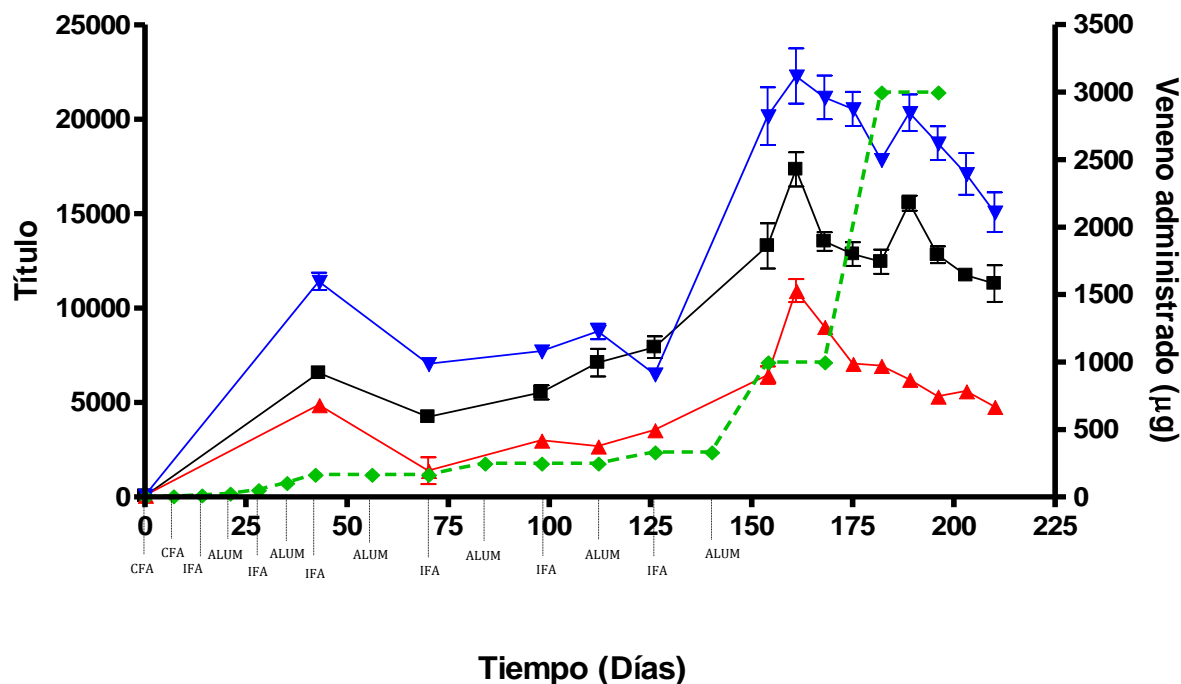
La determinación de los títulos de anticuerpos se realizó mediante evaluaciones *in vitro* de tipo ELISA. Los títulos de anticuerpos muestran el nivel de reconocimiento específico (hacia el veneno homólogo) y para-específico (hacia los venenos heterólogos) de los anticuerpos presentes en los sueros hacia los venenos.

El resultado obtenido para la primera muestra de suero (muestra basal o preinmune) de los caballos 1 y 3, reflejó la ausencia de anticuerpos capaces de reconocer a los componentes en los venenos. En la sangría tomada a los 43 días, después de haber iniciado el esquema de inmunización, se observó un aumento importante en el título de anticuerpos para ambos caballos, sin embargo la intensidad de respuesta entre ellos fue distinta: el caballo 3 que mostró títulos más altos, siendo estos de alrededor de 20 000 para los tres venenos evaluados (Figura 6 y Tabla 9), mientras que el caballo 1, mostro una respuesta mayor hacía el veneno de Mn, donde el valor obtenido fue de 11,391, mientras que para el veneno homólogo (Mt) fue de 6,548 y para Mf de 4,879 (Figura 5 y Tabla 8).

En la tercera sangría, tomada a los 70 días, se registró una disminución en el título de anticuerpos hacía cada uno de los venenos evaluados, manteniéndose este nivel hasta la 6ª sangría, correspondiente a los 126 días (Figuras 5 y 6). Cabe resaltar que esto coincidió con un incremento medurado en la cantidad de veneno empleado en la inmunización.

En las sangrías posteriores (tomadas después del día 126), se observó un aumento importante en la intensidad de reconocimiento, hacía los 3 venenos evaluados (sangrías 7ª y 8ª) aunque en el 1er caballo el título fue más elevado para Mn y después para Mt, mientras que el caballo 3, el mayor reconocimiento fue para el veneno homólogo (Mt) y relativamente semejante para Mn y Mf (Figuras 5 y 6).

Finalmente, a partir del día 168, los títulos de anticuerpos empezaron a decrecer, manteniéndose esta tendencia hasta la última sangría, que correspondió a los 210 días (Figuras 5 y 6).

**Figura 5**

Reconocimiento específico y para-específico de anticuerpos hacia venenos de serpientes de coral. Sueros correspondientes al **caballo 1**. Cada punto representa el título de anticuerpos determinado por ELISA de los sueros monovalentes anti-*M. tener* tomados a diferentes tiempos.

* —■— *Mt*, —▲— *Mf*, —▼— *Mn*

*La línea punteada indica la cantidad de veneno de *Mt* administrada a lo largo del esquema de inmunización. Sobre el eje de las abscisas se indican los puntos en los se emplearon adyuvantes, en donde: CFA (adyuvante completo de Freund), IFA (adyuvante incompleto de Freund) y ALUM (hidróxido de aluminio).

*Análisis estadístico no paramétrico tipo ANOVA y Tukey: $P < 0.001$ (entre todos los venenos).

Tabla 8

Evolución de títulos de anticuerpos en sueros monovalentes anti-*M. tener* correspondientes al caballo 1.

# Sangría	Día	Título de anticuerpos hacia venenos (I.C. 95%)		
		<i>M. tener</i>	<i>M. fulvius</i>	<i>M. nigrocinctus</i>
1	0	56 (48-65)	87 (62-119)	66 (25-168)
2	43	6548 (6060-7075)	4879 (4606-5166)	11391 (10623-12214)
3	70	4233 (3921-4570)	2310 (1870-2400)	7039 (6594-7515)
4	98	5512 (4911-6186)	3003 (2789-3233)	7705 (7270-8166)
5	112	7041 (5891-8416)	2674 (2371-3018)	8743 (8056-9489)
6	126	7892 (6971-8933)	3546 (3190-3942)	6488 (5915-7117)
7	154	13185 (11280-15414)	6424 (9884-11994)	20049 (17582-22861)
8	161	17296 (15792-18943)	10887 (8412-9635)	22185 (19800-24858)
9	168	13506 (12682-14385)	9002 (8411-9635)	21087 (19182-23181)
10	175	12828 (11783-13966)	7066 (6711-7441)	20504 (18992-22136)
11	182	12418 (11356-13579)	6958 (6829-7091)	17843 (17260-18445)
12	189	15545 (14879-16244)	6223 (5977-6479)	20288 (18679-22037)
13	196	12804 (12066-13587)	5328 (5130-5532)	18687 (17213-20287)
14	203	11731 (11271-12209)	5614 (5361-5879)	17030 (15236-19035)
15	210	11097 (9719-13056)	4726 (4520-5118)	15000 (13295-16924)

Los números en negritas corresponden a las sangrías a las cuales se les evaluó la potencia neutralizante (Los resultados se muestran más adelante)

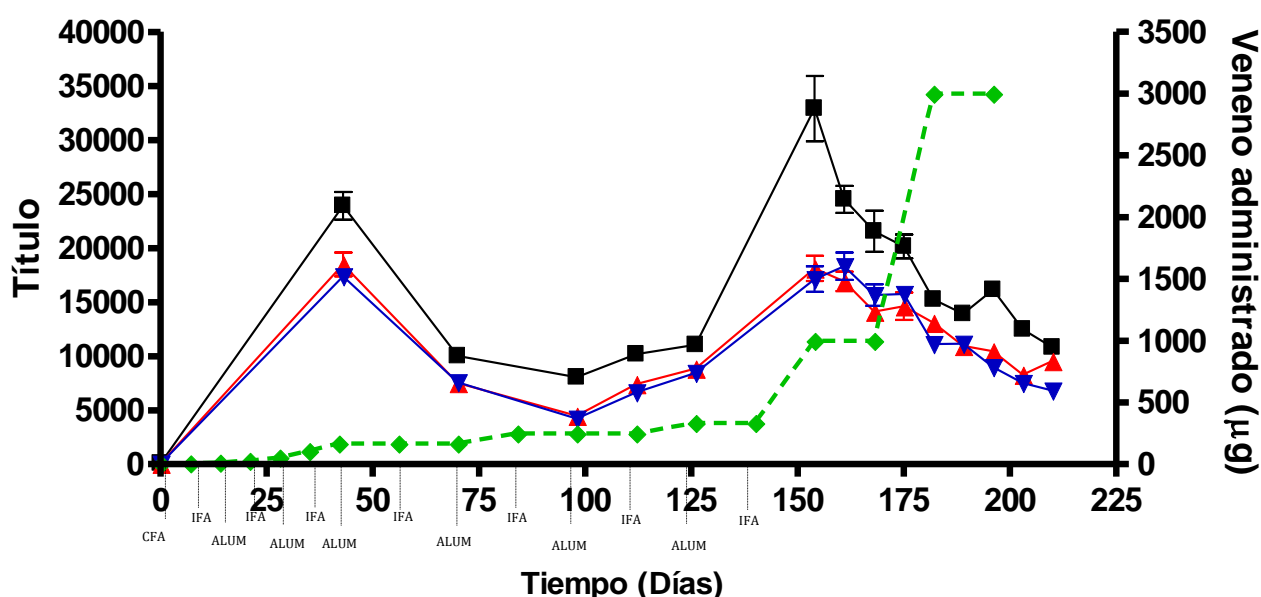


Figura 6

Reconocimiento específico y para-específico de anticuerpos hacia venenos de serpientes de coral. Sueros correspondientes al **caballo 3**. Cada punto representa el título de anticuerpos determinado por ELISA de los sueros monovalentes anti-*M. tener* tomados a diferentes tiempos.

* —■— Mt, —▲— Mf —▼— Mn

*La línea punteada indica la cantidad de veneno de Mt administrada a lo largo del esquema de inmunización. Sobre el eje de las abscisas se indican los puntos en los se emplearon adyuvantes, en donde: CFA (adyuvante completo de Freund), IFA (adyuvante incompleto de Freund) y ALUM(hidróxido de aluminio).

*Análisis estadístico no paramétrico tipo ANOVA y Tukey: entre Mt y Mf, $P < 0.001$; entre Mt y Mn, $P < 0.001$ y entre Mf y Mn $P > 0.05$.

Tabla 9

Evolución de títulos de anticuerpos de sueros monovalentes anti-*M. tener*, correspondientes al caballo 3.

# Sangría	Día	Título de anticuerpos hacia venenos (I.C. 95%)		
		<i>M. tener</i>	<i>M. fulvius</i>	<i>M. nigrocinctus</i>
1	0	67 (53-83)	50 (41-61)	65 (54-77)
2	43	23834 (21737-26132)	18419 (16597-20440)	17378 (16440-18368)
3	70	10005 (9558-10471)	7511 (7077-7972)	7567 (6779-8447)
4	98	8052 (7545-8592)	4465 (4316-4622)	4222 (4061-4389)
5	112	10184 (9657-10740)	7398 (6945-7881)	6649 (6312-7005)
6	126	11030 (10345-11762)	8818 (7886-9861)	8420 (7739-9161)
7	154	32628 (27827-38258)	18046 (16158-20156)	17046 (15124-19213)
8	161	24437 (22349-26719)	16866 (15388-18486)	18218 (16151-20550)
9	168	21387 (18346-24930)	14086 (12817-15480)	15598 (13971-17414)
10	175	20088 (18255-22105)	14496 (12472-16847)	15723 (14474-17081)
11	182	15216 (14294-161989)	13082 (12774-13398)	11115 (10780-11460)
12	189	13881 (12819-15030)	10958 (10577-11353)	11110 (10259-12032)
13	196	16145 (15234-17112)	10439 (9612-11337)	8955 (8419-9526)
14	203	12464 (12057-12885)	8267 (7697-8879)	7493 (7051-7965)
15	210	10804 (10254-11383)	9514 (8475-10681)	6815 (6491-7155)

Los números en negritas corresponden a las sangrías a las cuales se les evaluó la potencia neutralizante (Los resultados se muestran más adelante)

En el caballo 1, la diferencia de reconocimiento hacía cada uno de los venenos fue estadísticamente significativa entre todos ellos ($P < 0.001$), presentándose mayores títulos de anticuerpos, en cada una de las muestras, hacía el veneno de Mn, donde se alcanza el pico más alto a los 161 días, siendo este de 22,185. La menor respuesta se presentó hacía el veneno de Mf, donde el mayor reconocimiento se obtiene al mismo tiempo, pero con un título de 10,887 (Tabla 8).

Con respecto al caballo 3, los resultados no mostraron diferencia significativa entre el reconocimiento de los sueros hacía los venenos de Mf y Mn ($P > 0.05$). Sin embargo, los títulos de anticuerpos alcanzados para Mt fueron superiores a lo largo de todo el esquema de inmunización, y en el punto más alto (154 días) se observaron títulos hasta dos veces mayores que para los otros dos venenos, resultando en un reconocimiento hacía este veneno significativamente diferente con relación a los otros dos ($P < 0.001$) (Figura 6 y Tabla 9).

Aunque la tendencia general de reconocimiento hacia los 3 venenos (M.t, M.f y M.n) a lo largo del esquema de inmunización fue similar en ambos caballos (1 y 3), reconocieron de forma distinta a los venenos, además el caballo 3 presentó títulos más altos.

Por otro lado, el caballo 2, inmunizado bajo un esquema diferente (Tabla 3), las muestras de suero fueron tomadas cada 7 días a partir de la primera administración de veneno, lo que permitió observar el incremento gradual de los títulos durante las primeras 4 sangrías. Sin embargo, los títulos más altos se observaron a los 77 días (Figura 7 y Tabla 10).

A partir de los resultados obtenidos se puede afirmar que los anticuerpos generados en el caballo 2 reconocen de manera similar a los venenos de Mt y Mn ($P > 0.05$). Sin embargo, el nivel de reconocimiento hacía el veneno de Mf muestra una diferencia significativa con respecto a los dos primeros ($P < 0.05$), ya que los títulos alcanzados para Mf fueron mayores, principalmente en la última fase del esquema (Figura 7).

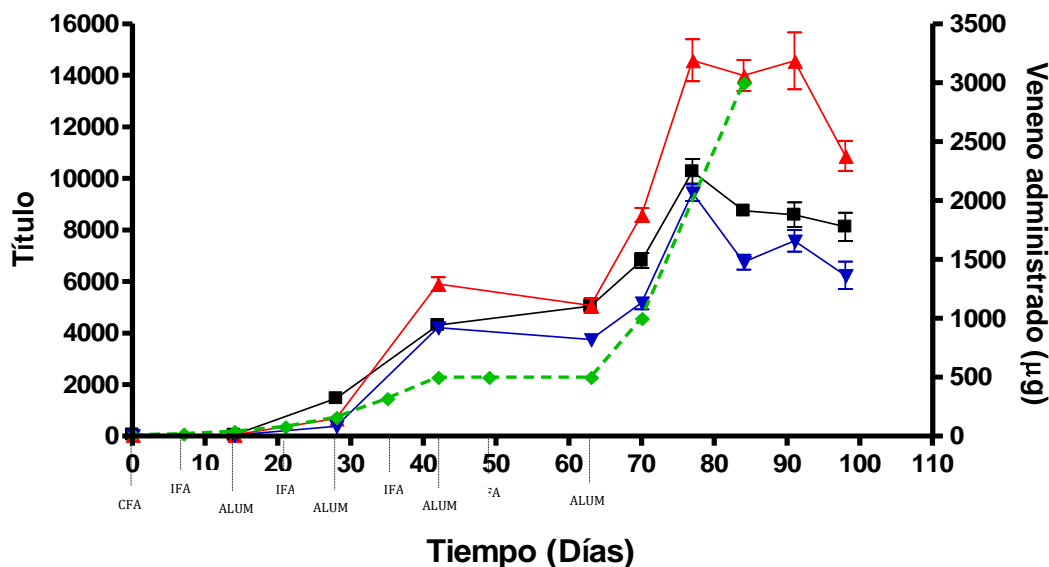


Figura 7

Reconocimiento específico y para-específico de anticuerpos hacia venenos de serpientes de coral. Sueros correspondientes al **caballo 2**. Cada punto representa el título de anticuerpos determinado por ELISA de los sueros monovalentes anti-*M. tener* tomados a diferentes tiempos.

* —■— *Mt* —▲— *Mf*, —▼— *Mn*.

*La línea punteada indica la cantidad de veneno de *Mt* administrada a lo largo del esquema de inmunización. Sobre el eje de las abscisas se indican los puntos en los se emplearon adyuvantes, en donde: CFA (adyuvante completo de Freund), IFA (adyuvante incompleto de Freund) y ALUM (hidróxido de aluminio).

*Análisis estadístico no paramétrico tipo ANOVA y Tukey: entre *Mt* y *Mf*, $P < 0.05$; entre *Mt* y *Mn*, $P > 0.05$ y entre *Mf* y *Mn* $P < 0.001$.

Tabla 10

Evolución de títulos de anticuerpos de diferentes sueros monovalentes anti-*M. tener* correspondientes al caballo 2.

# Sangría	Día	Título de anticuerpos hacia venenos (I.C. 95%)		
		<i>M. tener</i>	<i>M. fulvius</i>	<i>M. nigrocinctus</i>
1	0	56 ₍₄₂₋₇₄₎	43 ₍₂₇₋₇₁₎	21 ₍₈₋₅₆₎
2	14	48 ₍₃₄₋₆₈₎	35 ₍₁₅₋₈₀₎	16 ₍₃₋₇₉₎
3	28	1458 ₍₁₃₆₈₋₁₅₅₄₎	677 ₍₆₂₇₋₇₃₂₎	379 ₍₃₅₄₋₄₀₈₎
4	42	4302 ₍₄₀₂₆₋₄₅₉₅₎	5887 ₍₅₄₅₅₋₆₃₅₄₎	4212 ₍₄₀₅₇₋₄₃₇₃₎
5	63	5038 ₍₄₇₁₆₋₅₃₈₂₎	5046 ₍₄₅₇₁₋₅₅₇₀₎	3735 ₍₃₄₃₆₋₄₀₆₀₎
6	70	6797 ₍₆₃₂₃₋₇₃₀₈₎	8579 ₍₈₁₂₆₋₉₀₅₇₎	5159 ₍₄₇₄₀₋₅₆₁₆₎
7	77	10250 ₍₉₄₆₃₋₁₁₁₀₃₎	14533 ₍₁₃₁₉₁₋₁₆₀₁₂₎	9432 ₍₈₈₉₁₋₁₀₀₀₅₎
8	84	8745 ₍₈₅₁₀₋₈₉₈₆₎	13964 ₍₁₂₉₆₄₋₁₅₀₄₂₎	6742 ₍₆₂₆₀₋₇₂₆₃₎
9	91	8562 ₍₇₇₇₆₋₉₄₂₆₎	14470 ₍₁₂₆₈₄₋₁₆₅₀₆₎	7552 ₍₆₈₆₅₋₈₃₀₉₎
10	98	8088 ₍₇₁₉₇₋₉₀₉₀₎	10842 ₍₉₈₈₂₋₁₁₈₉₅₎	6194 ₍₅₃₃₈₋₇₁₈₇₎

Los números en negritas corresponden a las sangrías a las cuales se les evaluó la potencia neutralizante (Los resultados se muestran más adelante).

VII.4 Potencia neutralizante de sueros monovalentes anti-*M. tener*.

La determinación de la potencia neutralizante específica y para-específica de los sueros se llevó a cabo mediante la determinación de la dosis efectiva media (DE₅₀). Como ya ha sido indicado anteriormente, la neutralización específica corresponde a las evaluaciones realizadas contra el veneno de Mt, y la para-específica contra los venenos de Mf y Mn.

Caballo 1

Ninguna de las muestras sometidas a ensayos de potencia neutralizante tomadas antes de los 210 días (sangrías 4^a, 8^a y 13^a) presentó actividad neutralizante específica. Sin embargo, sí mostraron neutralización para-específica hacía los venenos de Mf y Mn.

Por su parte, la sangría correspondiente a los 98 días de inmunización presentó una baja potencia neutralizante para-específica hacía el veneno de Mf, neutralizando 66 µg de veneno por mL de suero (Tabla 11 y Figura 8). Para Mn no pudo ser determinado debido a la falta de veneno.

Conforme transcurrió el tiempo, se registró un incremento en la potencia neutralizante de cada una de las sangrías hacía los venenos heterólogos (Figura 8). A los 161 días (8^a sangría), se registró una buena potencia neutralizante hacia el veneno de Mn, donde la DE₅₀ fue de 26 µl de suero/3DL₅₀, en otras palabras y considerando el valor de DL₅₀ de este veneno (4.01µg/ratón), 454 µg de veneno fueron neutralizados con 1 mL de antisuero (Tabla 11). Mientras que para el veneno de Mf la potencia neutralizante resultó de 357µg de veneno por cada mL de antisuero, para la misma sangría.

En la siguiente sangría, tomada a los 196 días, la potencia neutralizante se mantuvo con un comportamiento similar. La DE₅₀ contra el veneno de Mn fue de 27 µl/3DL₅₀ (435µg veneno/mL antisuero) y para el veneno de Mf, fue de 47 µl/3DL₅₀ (384µg veneno/mL antisuero).

En el caso de la sangría correspondiente a los 210 días (15^a) se registró una potencia de 588, 500 y 714 μg de veneno neutralizados por mL de suero, para los venenos de Mt, Mf y Mn, respectivamente. En esta sangría se observó una mayor potencia neutralizante para el veneno de Mn y Mf. Por otro lado, a diferencia de las sangrías previas, ésta mostró neutralización hacia el veneno de Mt (Tabla 11), con una potencia semejante a la observada para el veneno de Mf, en términos de μg de veneno neutralizados por mL de suero. Es importante resaltar que en este suero se obtuvieron menores títulos de anticuerpos, que en las sangrías previamente evaluadas, lo cual indica que no existe una relación directa entre los títulos de anticuerpos y la DE_{50} .

Tabla 11

Potencia neutralizante (DE_{50}) de sueros monovalentes anti-*M. tener* de caballo 1.

Sangría	Especie	Título	Potencia Neutralizante		
			$\mu\text{L AV}/3\text{DL}_{50}$	$\text{DL}_{50}/\text{ml AV}$	$\mu\text{g V}/\text{mL AV}$
4a (98 días)	Mt	7369	NN		
	Mf	4689	275 (275-275)	11(11-11)	66(66-66)
	Mn	4575	ND		
8 ^a (161 días)	Mt	15314	NN		
	Mf	22635	51(45-57)	59(54-64)	357(312-400)
	Mn	15512	26(24-28)	115(112-118)	454(435-500)
13 ^a (196 días)	Mt	11337	NN		
	Mf	11078	47(48-53)	63(56-72)	384(333-385)
	Mn	13065	27(28-28)	110(109-110)	435(435-435)
15 ^a (210 días)	Mt	9826	70(70-70)	43(43-43)	588(588-588)
	Mf	9826	29(24-33)	105(90-122)	500(435-588)
	Mn	10487	17(15-20)	176(130-239)	714(625-833)

NN: No neutraliza, los ratones no sobrevivieron aún utilizando el máximo volumen de suero posible (400 $\mu\text{L}/\text{ratón}$). ND: Datos no determinados, AV: antisuero, V: veneno

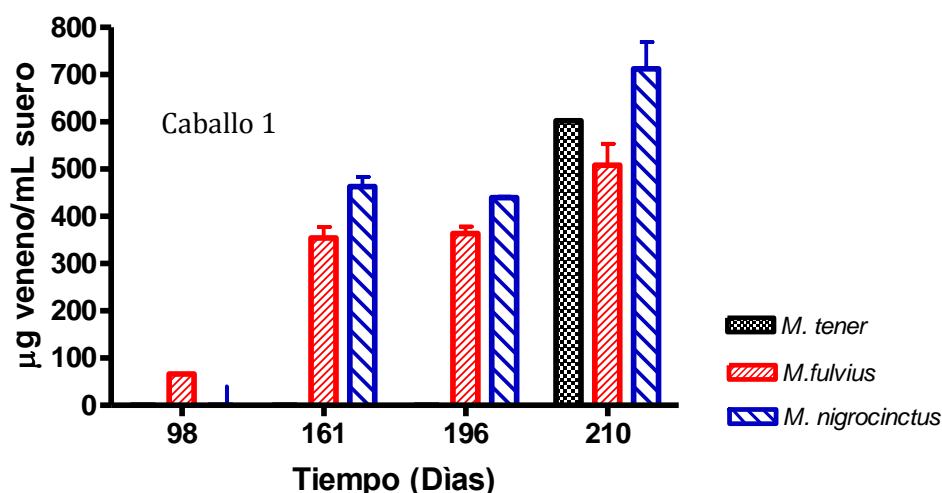


Figura 8

Representación gráfica de la potencia neutralizante de sueros monovalentes de caballo 1 contra venenos homólogos y heterólogos.

Muestras tomadas a diferentes tiempos durante el esquema de inmunización.

Es importante resaltar que cuando los resultados son expresados como μg de veneno neutralizados por mL de suero, la cantidad de veneno neutralizada de Mt es mayor que la de Mf (210 días, Figura 8), debido a que el veneno de Mf es aproximadamente dos veces más letal que el de Mt, por lo que al llevar a cabo los ensayos de neutralización empleando 3DL_{50} , se está introduciendo mayor masa de veneno en los ensayos de Mt que en los de Mf, por esta razón, al comparar estos mismos resultados en la forma de DL_{50} neutralizadas por mL de suero, observamos que son neutralizadas más DL_{50} del veneno de Mf que del veneno de Mt (Tabla 11).

Caballo 3

En el suero tomado a los 98 días, no presentó acción neutralizante contra los venenos de Mt y Mf (Figura 9 y Tabla 12), pero en el suero correspondiente a los 161 días, se registró capacidad neutralizante hacia los 3 venenos, sin embargo, la actividad fue muy baja para Mt, donde 1mL de suero neutralizó los efectos tóxicos de 158 μg de veneno, que en relación a los 667 μg de veneno de Mn y 500 μg de Mf neutralizados con el mismo volumen de antisuero, es poco eficiente y además, esta acción se pierde en la muestra tomada 35 días después (196 días, Figura 9).

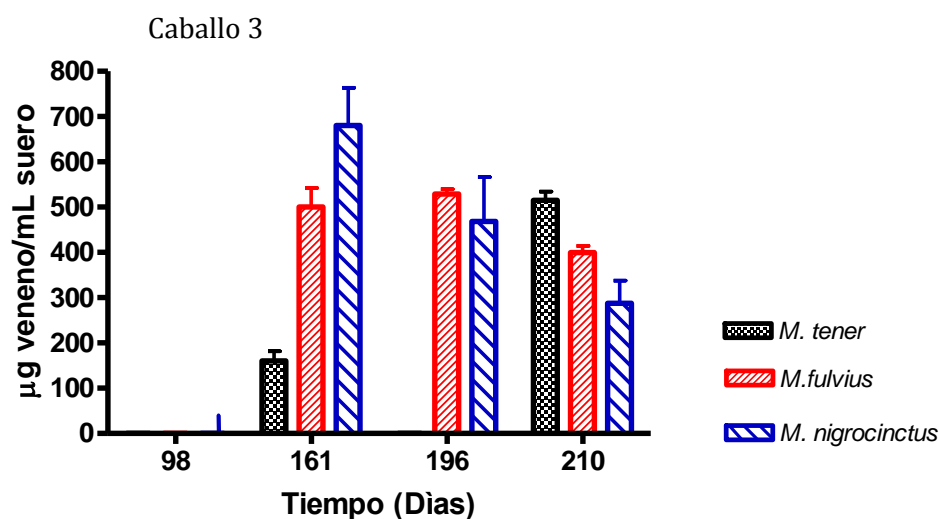
Fue hasta los 210 días que se logró obtener un suero con la capacidad de neutralizar al veneno homólogo, neutralizando el efecto de 526 µg de veneno por mL de antisuero (Tabla 12 y Figura 9).

Tabla 12

Potencia neutralizante de sueros monovalentes anti-*M. tener* de caballo 3.

Sangría	Especie	Título	Potencia Neutralizante		
			µL AV/ 3DL50	DL50/ml AV	µg V/mL AV
4a (98 días)	Mt	7369		NN	
	Mf	4689		NN	
	Mn	4575		ND	
8 ^a (161 días)	Mt	18382	267(212-336)	12(9-25)	158(125-200)
	Mf	17712	36(31-42)	83(71-96)	500(435-588)
	Mn	19741	18(14-22)	167(135-207)	667(555-833)
13 ^a (196 días)	Mt	12145		NN	
	Mf	10962	34(33-35)	88(61-85)	526(500-555)
	Mn	9704	27(19-39)	111(84-148)	455(312-500)
15 ^a (210 días)	Mt	8127	82(77-88)	37(34-39)	526(555-500)
	Mf	9991	36(34-39)	83(77-88)	400(370-417)
	Mn	7384	43(32-59)	70(51-94)	278(204-385)

NN: No neutraliza, los ratones no sobrevivieron aún utilizando el máximo volumen de suero posible (400 µL/ratón). ND: Datos no determinados, AV: antisuero, V: veneno

**Figura 9**

Representación gráfica de la potencia neutralizante de sueros de caballo 3 contra venenos homólogo y heterólogos.

Muestras tomadas a diferentes tiempos durante el esquema de inmunización.

Caballo 2

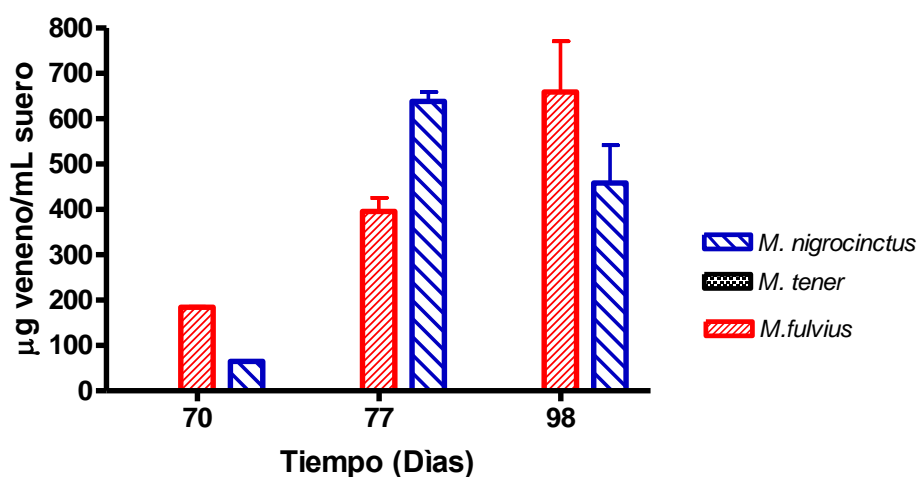
En los sueros del caballo 2, ninguna de las muestras presentaron efectividad en la neutralización del veneno homólogo; no obstante, la potencia neutralizante fue aumentando a lo largo del tiempo para los venenos heterólogos (Tabla 13 y Figura 10), donde la respuesta fue muy similar entre ellos.

Tabla 13

Potencia neutralizante de sueros monovalentes anti-*M. tener* de caballo 2.

Sangría	Especie	Título	Potencia Neutralizante		
			$\mu\text{L AV/ 3DL}_{50}$	$\text{DL}_{50}/\text{ml AV}$	$\mu\text{g V/mL AV}$
6ª (70 días)	Mt	7086	NN		
	Mf	6356	78(77-79)	39(38-40)	184(182-187)
	Mn	5424	186(184-186)	16(15-17)	65(63-66)
7ª (77 días)	Mt	10686	NN		
	M f	10768	46(40-52)	65(58-75)	393(345-448)
	Mn	9916	19(18-20)	158(150-167)	637(603-674)
10ª (98)	Mt	8432	NN		
	M f	8033	28(21-38)	107(88-130)	640(475-862)
	Mn	6512	27(20-37)	111(81-150)	443(323-609)

NN: No neutraliza, los ratones no sobrevivieron aún utilizando el máximo volumen de suero posible (400 $\mu\text{L}/\text{ratón}$). ND: Datos no determinados, AV: antisuero, V: veneno

**Figura 10**

Representación gráfica de la potencia neutralizante de sueros de caballo 3 contra venenos homólogo y heterólogos.

Muestras tomadas a diferentes tiempos durante el esquema de inmunización.

VII.5 Evolución de títulos de anticuerpos en sueros trivalentes de origen equino.

Los mismos caballos inmunizados con veneno de *M. tener*, fueron sometidos a un nuevo esquema de inmunización, en el cual se incluyeron los venenos de *M. nigrocinctus* y *M. fulvius* (Tabla 4).

En la Figura 11 se muestran los resultados comparativos de los tres caballos. De manera basal, los tres caballos mostraron un reconocimiento inicial con un título de anticuerpos cercano a 5000, para el caballo 1 y 3. Para el caballo 2, el reconocimiento inicial hacía cada uno de los venenos es más alto (Figura 11), posiblemente porque para este caballo transcurrieron únicamente 7 días entre el esquema anterior y este (por las razones ya indicadas en la metodología), mientras que para los dos primeros hubo un periodo de 43 días en los cuales no se llevaron a cabo inmunizaciones.

En las sangrías posteriores, se observó un aumento gradual de los títulos de anticuerpos, coincidiendo con incrementos en las cantidades de veneno administradas, excepto para el caballo 2, que los títulos se mantuvieron relativamente constantes hasta el día 56, a partir del cual empieza a observarse un incremento en la respuesta.

Entre los días 91 y 224 no se realizaron inmunizaciones, por lo que en las sangrías tomadas durante este periodo se observó una disminución gradual en los títulos de anticuerpos para los 3 animales y para los 3 venenos, aunque la pendiente fue más pronunciada en los caballos 2 y 3. Posteriormente, en los días 224 y 231 se realizaron administraciones de 1500 µg de veneno, lo cual llevó a un incremento en los títulos, aunque estos nunca alcanzaron los niveles de la primera fase del esquema de inmunización (Figura 11). Cabe mencionar que en las últimas 7 determinaciones ya no se contaba con veneno de Mn, por lo que no fue posible evaluar los títulos contra este.

En todos los caballos, la respuesta de los anticuerpos en cuanto a reconocimiento *in vitro* de los venenos, no mostró diferencia significativa entre Mf y Mt ($P>0.05$), sin embargo, la respuesta hacía el veneno de Mn fue mayor en los tres individuos, aunque solo fue significativa para el caballo 1 ($P<0.001$).

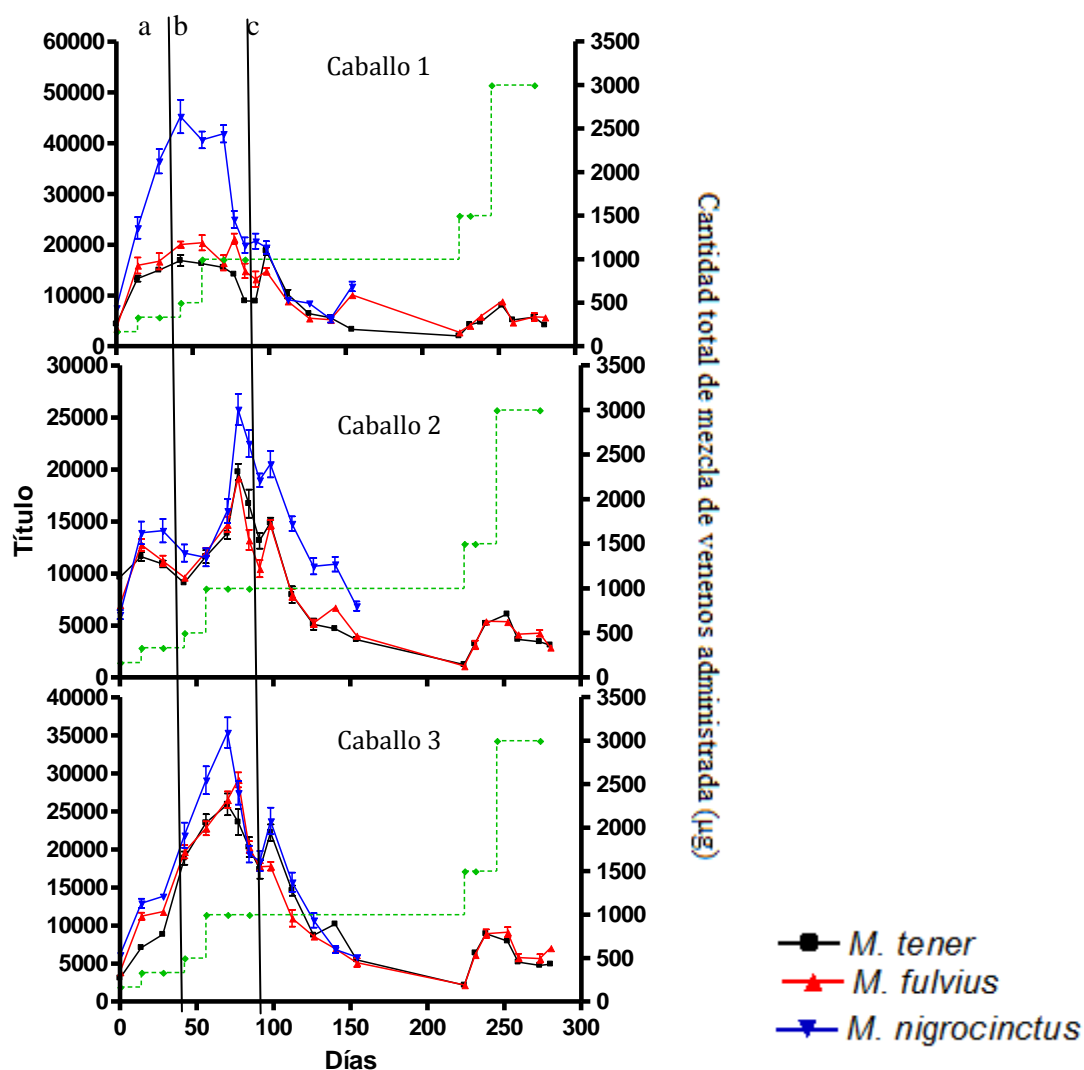


Figura 11

Reconocimiento específico y para-específico de anticuerpos hacia venenos de serpientes de coral.

Cada punto representa el título de anticuerpos en los sueros trivalentes tomados a diferentes tiempos.

*La línea punteada corresponde a las cantidades de veneno administradas en cada inmunización

*Las líneas verticales corresponden a las combinaciones de venenos empleadas.: a: Mf y Mt, b: Mt, Mf y Mn, c: Mt y Mf. Los adyuvantes únicamente se usaron en las primeras 4 inmunizaciones (42 días).

VII. 6 Potencia neutralizante de sueros trivalentes.

Estos resultados mostraron que de las sangrías tomadas al día 70, únicamente la del caballo 1 presentó neutralización específica, con un valor de 396 µg de veneno de Mt neutralizado por mL de antisuero. Los sueros de los caballos 2 y 3, presentaron neutralización parcial, empleando volúmenes altos de suero (400 µL) (Tablas 14, 15 y 16). Es importante resaltar que estos sueros sí fueron efectivos para neutralizar los

efectos del veneno de Mf, siendo las sangrías de los 70 y 98 días del caballo 1 y 2, las que mostraron la mayor potencia neutralizante (Figura 12). Las potencias neutralizantes contra el veneno de Mn no fueron determinadas, debido a que no se contó con la cantidad de veneno suficiente.

Tabla 14

Potencia neutralizante de sueros trivalentes de caballo 1, inmunizado con venenos de Mt, Mf y Mn.

Sangría (Día)	Especie	Potencia neutralizante (DE50)		
		$\mu\text{L AV/ 3DL50}$	DL50/ml AV	$\mu\text{g V/mL AV}$
70	Mt	106(88-129)	28(23-34)	396(326-477)
	Mf	25(18-34)	120(88-167)	720(529-1000)
98	Mt		NN	
	Mf	20(20-20)	150(50-150)	900(900-900)
126	Mt		NN	
	Mf	35(33-37)	86(81-91)	514(486-545)
154	Mt		NN	
	Mf	66(65-67)	45(44-46)	273(269-277)
259	Mt		NN	
	Mf	44(40-47)	68(64-75)	409(383-450)
273	Mt		NN	
	Mf	35(29-42)	86(71-103)	514(429-621)
280	Mt		NN	
	Mf	51(46-56)	59(54-65)	353(321-391)

NN: No neutraliza, los ratones no sobrevivieron aún utilizando el máximo volumen de suero posible (400 μL /ratón). AV: antisuero, V: veneno

Tabla 15

Potencia neutralizante de sueros trivalentes de caballo 2 inmunizado con venenos de Mt, Mf y Mn.

Sangría (Día)	Especie	Potencia neutralizante (DE50)		
		$\mu\text{L AV/ 3DL50}$	DL50/ml AV	$\mu\text{g V/mL AV}$
70	Mt	Con 400 μL se neutralizan los efectos letales del veneno en el 60% de la población		
	Mf	23(22-24)	130(125-136)	788(750-818)
98	Mt		NN	
	Mf	51(42-63)	59(48-71)	353(286-429)
126	Mt		NN	
	Mf	39(34-44)	77(68-88)	462(409-529)
154	Mt		NN	
	Mf	77(67-89)	39(34-45)	234(202-269)
259	Mt		NN	
	Mf	47(43-50)	64(60-70)	383(360-419)
273	Mt		NN	
	Mf	57(47-70)	53(43-64)	316(257-383)
280	Mt		NN	
	Mf	66(61-71)	45(42-49)	273(254-295)

NN: No neutraliza, los ratones no sobrevivieron aún utilizando el máximo volumen de suero posible (400 μL /ratón). AV: antisuero, V: veneno

Tabla 16

Potencia neutralizante de sueros trivalentes de caballo 3, inmunizado con venenos de Mt, Mf y Mn.

Sangría (Día)	Especie	Potencia neutralizante (DE50)		
		$\mu\text{L AV/ 3DL}_{50}$	DL ₅₀ /ml AV	$\mu\text{g V/mL AV}$
70	<i>Mt</i>	Con 400 μL se neutralizan los efectos letales del veneno en el 40% de la población		
	<i>Mf</i>	41(37-45)	73(67-81)	439(400-486)
98	<i>Mt</i>	NN		
	<i>Mf</i>	40(39-41)	75(73-77)	450(439-461)
126	<i>Mt</i>	NN		
	<i>Mf</i>	111(107-115)	27(26-28)	162(157-168)
154	<i>Mt</i>	NN		
	<i>Mf</i>	173(170-176)	17(17-18)	104(102-106)
259	<i>Mt</i>	NN		
	<i>Mf</i>	115(112-118)	26(25-27)	157(153-161)
273	<i>Mt</i>	NN		
	<i>Mf</i>	106(102-110)	28(27-29)	170(164-176)
280	<i>Mt</i>	NN		
	<i>Mf</i>	94(87-102)	32(29-34)	191(176-207)

NN: No neutraliza, los ratones no sobrevivieron aún utilizando el máximo volumen de suero posible (400 μL /ratón). AV: antisuero, V: veneno

En las muestras correspondientes a los días 98, 126 y 154, se observó una pérdida de capacidad neutralizante en los sueros hacia el veneno de Mf, presentándose los valores más bajos a los 154 días, donde la capacidad de neutralización disminuyó entre un 60 y 76% para todos los caballos, en comparación con la primera muestra. Este resultado coincide con la ausencia de inmunizaciones entre los días 91 y 224 (Tabla 4). Posteriormente, cuando se reanuda las administraciones de veneno (a los 224 días), nuevamente se incrementan las potencias de los sueros (sangría 259, de la Figura 12) y esto se mantiene para los tres caballos.

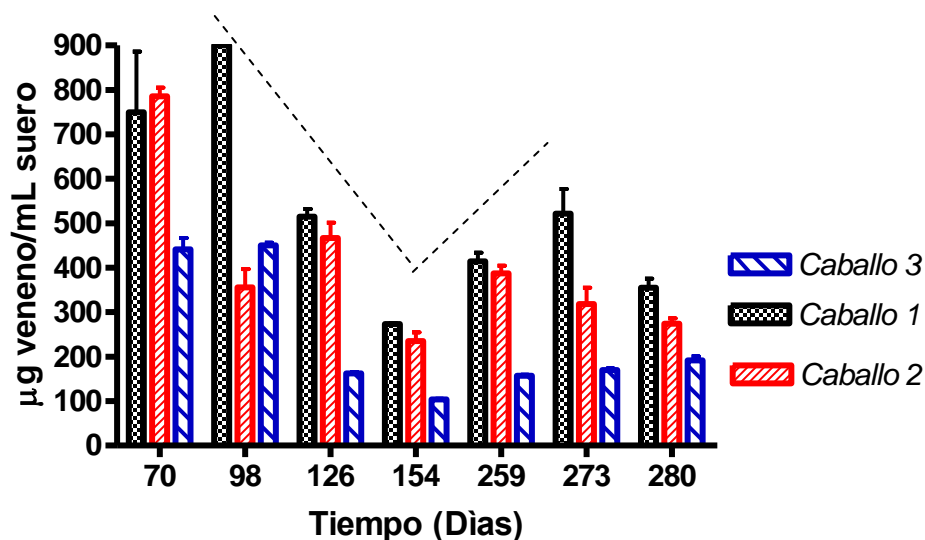


Figura 12

Potencia neutralizante de antisueros trivalentes de caballos 1, 2 y 3 contra veneno de *M. fulvius*. Muestras tomadas a diferentes tiempos del esquema de inmunización.

Adicionalmente, se determinaron las DE₅₀ de mezclas equivalentes de antisueros de los tres caballos (días 126, 259 y 273, Tabla 18), con la finalidad de establecer si la potencia neutralizante de los sueros se ve incrementada al usar mezclas de sueros. Los resultados obtenidos mostraron que las potencias neutralizantes empleando las mezclas de los sueros son aproximadamente iguales al promedio de las DE₅₀ de los sueros por separado (Tablas 14,15, 16 y 18).

Tabla 18

DE₅₀ de mezclas de suero de los tres caballos.

Potencia Neutralizante (DE ₅₀)				
Sangría (Día)	Especie	µL AV/ 3DL ₅₀	DL ₅₀ /ml AV	µg V/ml AV
126	Mf	61(53-71)	49(42-56)	295(253-340)
273	Mf	55(48-64)	54(47-63)	327(281-375)
259	Mf	61(48-49)	49(38-63)	295(228-375)

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1 Determinación de la dosis letal media (DL₅₀) de los venenos.

El valor de la DL₅₀ del veneno de la especie *M. tener* fue 3.5 y 2.3 veces menor que la de los venenos de *M. nigrocinctus* y *M. fulvius*, respectivamente; es decir, se requiere mayor masa de veneno de *M. tener* para producir la muerte de la mitad de la población de los animales evaluados. Es importante resaltar que estos resultados concuerdan con valores previamente publicados para las mismas especies, empleando el mismo modelo experimental (Salazar et al., 2011; de Roodt et al., 1991)

VIII.2 Reconocimiento específico y para-específico de anticuerpos en sueros monovalentes hacia venenos de serpientes de coral.

La respuesta inmune humoral se caracteriza por la producción de moléculas de anticuerpos por las células plasmáticas derivadas de linfocitos B, donde estas últimas fueron activadas de manera específica. Al haberse realizado inmunizaciones sucesivas con veneno de *M. tener*, se buscó propiciar la generación de anticuerpos con mayor grado de afinidad hacia componentes de los venenos. Para evaluar si estos anticuerpos eran capaces de reconocer a elementos en el veneno homólogo (reconocimiento específico) y venenos de otras especies de mismo género (reconocimiento para-específico) se realizaron inmunoensayos enzimáticos de tipo ELISA.

Como era de esperarse, la muestra de suero tomada para los caballos 1 y 3, previa a la inmunización (suero pre-inmune), no mostró niveles detectables de anticuerpos capaces de reconocer a los componentes de los venenos. Por el contrario, el título de anticuerpos específicos correspondientes a la segunda sangría fue considerablemente mayor en relación a la primera, coincidiendo con el incremento gradual en las cantidades de veneno administradas durante este periodo (42 días), desde 3.3µg hasta 106.7 µg (Tabla 2). Además, es importante considerar que las respuestas inmunes subsecuentes normalmente alcanzan mayores títulos de anticuerpos específicos en comparación con la respuesta primaria (Gold y Defranco, 1994; Wingren 2007). Por

otro lado, otro factor de relevancia fue el empleo de adyuvantes en la mezcla de inmunización. Se sabe que estos estimulan al sistema inmune, ayudando a incrementar la producción de anticuerpos por parte de las células del organismo (Sunthornandh y Ratanabanangkoon, 1994).

En las inmunizaciones realizadas entre los días 70 y 140, no se incrementó significativamente la cantidad de veneno de *M. tener* administrada a los caballos, por lo que los títulos de anticuerpos determinados en las sangrías tomadas durante este periodo sólo mostraron una ligera tendencia a incrementarse. Sin embargo, la sangría tomada a los 154 días (7^a) presentó un aumento importante en el título de anticuerpos que no se relaciona con incrementos significativos en las cantidades de veneno administradas, pero puede ser una respuesta a todas las inmunizaciones realizadas hasta el día 140.

Finalmente, a partir de la 8^a muestra de suero, se registró un ligero decremento en los títulos de anticuerpos, a pesar de que en las últimas inmunizaciones se aumentaron significativamente las cantidades de veneno administradas. Quizás esto pueda ser explicado por dos razones: la eliminación de los adyuvantes de la mezcla de inmunización y el empleo de grandes cantidades de veneno en las últimas 4 inmunizaciones. Ya que, por un lado, se sabe que los adyuvantes son sustancias que inyectadas simultáneamente con el antígeno, hacen más efectiva la respuesta inmune, incrementando la inmunogenicidad de las sustancias con las que se mezclan. Estimulan la respuesta inmune innata, provocando una inflamación local y/o ayudando a incrementar los títulos de anticuerpos formando un depósito de antígenos de larga vida, lo que favorece la llegada de células presentadoras de antígeno que expresan moléculas coestimuladoras y producen citocinas (Abbas, 2004; Janeway et al., 2003; Marcianini, 2003, Amanianda, 2009; Coffman et al., 2010); consecuentemente, al ser un componente de la mezcla de inmunización, promueven una mayor respuesta de anticuerpos. Por lo tanto, eliminar los adyuvantes podría provocar que la respuesta del organismo hacia el antígeno disminuya llevando a una menor producción de anticuerpos capaces de reconocer a componentes de los venenos y reflejándose en una disminución en el título de anticuerpos.

Por otro lado, puede ser que al emplear dosis altas de veneno se este produciendo un estado de tolerancia inmunológica hacia algunos de los componentes

del veneno, ya que se sabe que dosis altas de un inmunógeno, pueden inducir un estado de tolerancia en el organismo hacía este, lo cual podemos estar observando en la última fase del esquema de inmunización, ya que a pesar de que las cantidades de veneno administradas a partir del día 154 son entre 3 y 9 veces más altas que al día 140, la respuesta en cuanto a títulos de anticuerpos disminuye significativamente.

Aunque el perfil general de títulos de anticuerpos fue similar para los caballos 1 y 3, este último presentó títulos más altos, además los dos animales mostraron diferente reconocimiento hacía cada uno de los venenos: en el caballo 1 se observó diferencia estadísticamente significativa en el reconocimiento entre todos los venenos ($P < 0.001$), sugiriendo un orden de reconocimiento: $Mn > Mt > Mf$ (Figura 5); mientras que en el caballo 3 sólo se encontró diferencia significativa en la capacidad de reconocimiento para del veneno de Mt con relación a Mf y Mn ($P < 0.001$), esto es $Mt > Mf = Mn$ (Figura 6). Aunque estas evaluaciones nos permitieron confirmar que existe reconocimiento de los anticuerpos hacía los componentes del veneno total, este ensayo no brinda información acerca de las componentes que están siendo reconocidos, por lo que diferencias en composición o proporción en los constituyentes de los venenos no puede verse reflejada en el reconocimiento.

En el caso del caballo 2, las muestras de suero durante los primeros 40 días del esquema de inmunización fueron tomadas con intervalos de tiempo menores, en comparación con los caballos 1 y 3, por lo que fue posible observar el incremento gradual en los títulos de anticuerpos de la primera sangría a las siguientes. La memoria producida como resultado de la inmunización inicial, que desencadena la respuesta inmunitaria primaria, preparó al organismo para montar una respuesta más potente a exposiciones subsiguientes al mismo antígeno, de modo que la respuesta a cada inmunización fue cada vez más intensa, y las respuestas subsiguientes fueron de magnitud cada vez mayor (Murphy et al., 2008). Esto se refleja en el incremento notable de reconocimiento durante los primeros 78 días, coincidiendo a la vez, con un aumento en la cantidad de veneno administrada (Figura 7).

En general, para los caballos 1 y 3 se obtuvieron mayores títulos de anticuerpos en comparación con el caballo 2, lo que puede estar relacionado con la duración y forma del esquema de inmunización, ya que para los primeros duró 112 días más que para el 2.

Además de estas diferencias, el reconocimiento hacía cada uno de los venenos fue distinto para cada caballo, lo cual se puede atribuir a diferencias entre estos animales como: edad, peso, predisposiciones genéticas, entre otras. Sin embargo, es importante mencionar que en los tres caballos se observó un decremento en los títulos de anticuerpos que coincide con la eliminación del adyuvante de la mezcla de inmunización y con incrementos importantes de que las cantidades de veneno administrado.

VIII.3 Potencia neutralizante específica y para-específica de sueros monovalentes.

La importancia de determinar la potencia neutralizante o dosis efectiva media (DE₅₀) radica en establecer si dentro de la población de anticuerpos que reconocen al veneno *in vitro*, existe una proporción de estos que sean capaces de reconocer o unirse a componentes o partes de moléculas que son responsables de la toxicidad que el veneno produce *in vivo*.

Se sabe que los anticuerpos neutralizantes son aquellos capaces de bloquear la actividad de las toxinas responsables de la letalidad (de Roodt et al., 2004; da Silva et al., 2001). El potencial neutralizante de un antisuero, depende de la respuesta inducida por los componentes de la mezcla empleada en la inmunización. La evaluación de la potencia neutralizante, permitió determinar que la sangría correspondiente al día 98, de los caballos 1 y 3, carece de actividad neutralizante específica y para-específica (Figuras 8 y 9). Para el veneno homólogo, ésta ausencia de acción neutralizante se mantuvo hasta el día 196. Estos resultados, en conjunto con los ensayos *in vitro*, donde se mostró que existe reconocimiento hacía los venenos totales de las especies de *Micrurus*, sugieren que la inmunización propició la generación de anticuerpos que reconocen epítomos de moléculas presentes en los venenos, pero que éstas no son importantes en la actividad tóxica. Sin embargo, es posible que estos sean los mas inmunogénicos o se encuentran representados en mayor proporción en el veneno, y, en consecuencia, son más fácilmente reconocidos por el sistema inmune del organismo, montando una buena respuesta de anticuerpos (observada en los títulos de ELISA). Por otro lado, los componentes que causan una mayor toxicidad no son los más inmunogénicos, por lo que la generación de una clona específica de memoria es menos probable. Como consecuencia, los anticuerpos aptos para reconocer a epítomos o elementos importantes

en la acción tóxica del veneno se encuentran ausentes o su proporción es baja, dando como resultado una deficiente capacidad neutralizante de los efectos letales. También, es posible que los anticuerpos estén reconociendo a moléculas tóxicas pero en epítomos que no intervienen en la letalidad.

En la muestra tomada a los 210 días, correspondiente a la sangría 15 de los caballos 1 y 3, se logró obtener un suero con la capacidad de neutralizar los efectos letales del veneno homólogo, a pesar de que esta sangría presentó títulos de anticuerpos menores, lo cual sugiere que no existe una relación directa entre los títulos de anticuerpos y la potencia neutralizante del suero. Al haber transcurrido más tiempo, los componentes del veneno han sido presentados más veces al sistema y, consecuentemente, se podría generar una respuesta más específica hacia estos, incluso para los que se encuentran en menor proporción o su capacidad inmunogénica es baja. Después de inmunizaciones repetidas, la afinidad de los anticuerpos en el suero aumenta con el tiempo, fenómeno conocido como maduración de afinidad, que se basa en la selección por parte del sistema inmune de los anticuerpos que son capaces de unir mejor al antígeno (Wabl y Steinberg, 1996).

La evaluación de la potencia neutralizante para-específica de los sueros de los caballos 1 y 3, de las sangrías posteriores a los 98 días, mostraron la capacidad de estos para neutralizar los efectos letales de los venenos heterólogos empleados en este estudio. Estos resultados indican que la inmunización con veneno de *M. tener* indujo la generación de anticuerpos que reconocen a componentes tóxicos en estos venenos, a pesar de que no neutralizaron al veneno homólogo. Esto sólo puede ser explicado por la variabilidad inter-específica que existe entre los venenos, lo cual se refleja en la diferente efectividad del suero hacía cada uno. De manera similar, ninguno de los sueros obtenidos del caballo 2, fueron capaces de neutralizar al veneno homólogo, pese a que se logró alcanzar una buena efectividad contra los venenos heterólogos, neutralizando alrededor de 100 DL₅₀/mL de suero (Tabla 13 y Figura 10). Este hecho puede deberse a que el esquema de inmunización se llevó a cabo en un periodo de tiempo más corto (Tabla 4), y, en base a los resultados obtenidos para los caballos 1 y 3, parece que la extensión del esquema de inmunización es necesaria para generar un antisuero neutralizante contra el veneno de Mt. Semejante a los resultados de este estudio, existen varios reportes en los que se muestran reactividad cruzada entre un suero monovalente

producido con especies de *Micrurus* y que muestran neutralización hacia venenos de otras especies del mismo género (Arce et al., 2003; Prieto da Silva et al., 2001; de Roodt et al., 2004).

Aunque existen pocos estudios encaminados hacia la caracterización bioquímica de venenos de serpientes de coral, se ha observado que los componentes tóxicos principales en los venenos de estas serpientes son las α -neurotoxinas, con un peso molecular de alrededor de 7 kDa, y las PLA₂ con un peso aproximado entre 13-15 kDa, además se sabe que ambos tipos de componentes juegan un papel importante en la toxicidad de los venenos (Vital, 1987; de Roodt, 2004; Carbajal, 2004; Benard, 2011). Sin embargo, se sabe que la composición y/o proporción de las toxinas pueden variar entre venenos. En este sentido, y con la finalidad de conocer los perfiles electroforéticos de los venenos empleados en este proyecto, se realizó la separación de las proteínas de los venenos de Mf y Mt mediante electroforesis en geles SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida (Anexo E_a) (el veneno de Mn no fue analizado debido a que ya no se contaba con cantidades suficientes de éste). El patrón electroforético bajo condiciones reductoras del veneno de Mt mostro dos bandas muy intensas, una de ellas con un patrón de migración por debajo de los 10 kDa y la otra ligeramente arriba de los 10 kDa; por su parte, en el perfil electroforético del veneno de Mf, bajo las mismas condiciones, se observó sólo una banda intensa que corresponde a un peso molecular por arriba de los 10 kDa (ver Anexo E_a). Sin embargo, cuando los venenos son separados bajo condiciones no reductoras, para el veneno de Mf se observan bandas adicionales que migran con pesos moleculares entre 15 y 25 kDa, lo cual sugiere que las proteínas contenidas en este veneno pueden formar agregados, principalmente las PLA₂. Para el veneno de Mt también se observan bandas adicionales que corresponden a proteínas con pesos moleculares cercanos a 15 kDa y menores a 10 kDa, pero estas son difusas y menos intensas (ver Anexo E_a).

Recientemente, se han realizado estudios bioquímicos mediante fraccionamiento por HPLC de fase reversa de los venenos de Mt y Mf (Bénard, 2011; Paniagua, 2011, Tesis en desarrollo). Para el veneno de Mt se encontraron dos grupos de componentes principales: el primero, formado por 9 fracciones que presentan componentes con un peso molecular entre 6 y 8 kDa y, que en conjunto, representan aproximadamente el 40% del veneno completo, estas fracciones muestran picos con un tiempo de retención

entre 24 y 34 min (Anexo F), además 6 de estas son capaces de bloquear receptores nicotínicos de acetilcolina y mediante ensayos *in vivo* en ratones (con un peso entre 18 y 20 g) se observó que 2 de estas fracciones producen letalidad con una DL₅₀ de 1.8 y 19.46 µg/ratón. El otro grupo de componentes presentan tiempos de retención entre 34 y 48 min y representan aproximadamente el 40% del veneno total. Estos componentes corresponden a proteínas con pesos moleculares entre 13 y 14 kDa y la mayoría de ellos muestra actividad fosfolipasa, los ensayos de DL₅₀ mostraron que tres fracciones presentan letalidad con una dosis de 24.4, y 14.8 µg/ratón (Benard, 2011).

Por otro lado, para el veneno de Mf, se han observado 6 fracciones principales con un tiempo de retención entre 36 y 44 min que representan una proporción de aproximadamente el 80% del veneno completo. Estos componentes presentan un peso molecular aproximado a los 13 kDa y muestran actividad fosfolipasa. Hasta el momento únicamente se ha determinado la DL₅₀ para 2 de estas fracciones (N y O, Anexo F), que por si solas representan el 66% del veneno, y los resultados mostraron letalidad en ratones con una DL₅₀ de 10.9 y 18.3 µg/ratón. También se encontraron fracciones correspondientes a componentes con un peso molecular cercano a 7 kDa, pero estas se encuentran en un porcentaje menor (6% aproximadamente) (Paniagua, 2011, tesis en desarrollo, Anexo F).

En cuanto al veneno de Mn, estudios previos han mostrado que cuando las proteínas del veneno son separadas por electroforesis en geles SDS-PAGE en condiciones reductoras, se observa una banda prominente que corresponde a un peso molecular cercano a 14.5 kDa y que representa el 48% del veneno total, sin embargo también se han encontrado bandas con pesos moleculares mayores (Alape-Girón et al., 1994). Más recientemente, estudios transcriptómicos del veneno de Mn han reforzado estos resultados, ya que revelan que contiene una importante proporción de componentes de tipo PLA₂, con peso molecular cercano a los 14 kDa (Fernández et. al., 2011).

Los resultados y trabajos anteriormente descritos acerca de los venenos empleados en este trabajo, apoyan la idea de que la principal composición de estos son proteínas de tipo α -neurotoxinas y PLA₂, pero que las proporciones en cada uno de estos venenos son distintas, lo cual puede reflejarse en diferencias de neutralización hacia cada uno de los venenos. Se sabe que la inmunogenicidad de un compuesto puede estar

determinada por el tamaño y la complejidad molecular, entre otras características (Kindt et al., 2007). En este sentido y desde un punto de vista químico, las PLA₂ que tienen un peso cercano a 14 kDa y presentan aproximadamente 120 aminoácidos y de 6 a 7 puentes disulfuro (Dufton y Hider, 1983) son proteínas más complejas que las α -neurotoxinas, las cuales están formadas entre 60 y 74 aminoácidos y forman entre 4 y 5 puentes disulfuro (Tselin y Hucho, 2004). Por tanto, puede ser que estas últimas, al ser más pequeñas sean menos inmunogénicas y, consecuentemente, generan una respuesta de anticuerpos más débil; mientras tanto, los componentes de mayor peso, como las PLA₂, que se encuentran bien representadas en los venenos de Mf y Mn, fueron más inmunogénicas y dirigen la respuesta humoral para generar más anticuerpos neutralizantes, y, como consecuencia, los venenos con mayor porcentaje de componentes tóxicos de tamaño mayor son mejor neutralizados.

Además, algunos estudios transcriptómicos realizados a partir de glándulas de veneno de algunas especies del género *Micrurus* han mostrado que las fosfolipasas se encuentran más conservadas, manteniendo un 60% o más de homología, mientras que las α -neurotoxinas muestran mayor diversidad (Tanaka et al., 2010; Leão, 2009), por lo que es más fácil que un suero antisuero producido contra venenos ricos en este tipo de componentes mejor reacción cruzada hacía fosfolipasas que hacía α -neurotoxinas.

VIII.4 Antisuero polivalente de origen equino.

En este ensayo fueron empleados los mismos caballos usados en la producción del suero monovalente, pero las inmunizaciones se llevaron a cabo con mezclas de los tres venenos (Mt, Mf y Mn). Al tratarse de organismos previamente inmunizados, la respuesta inicial de reconocimiento *in vitro*, fue más rápida y potente contra cada uno de los venenos, en general, el título inicial estuvo por encima de 5000, y los títulos alcanzados durante los primeros 80 días fueron más elevados en comparación con los obtenidos durante la elaboración del suero monovalente.

En ningún caballo se encontró diferencia significativa en el reconocimiento hacía los venenos de Mf y Mt ($P > 0.05$), pero sí de ambos con respecto al reconocimiento hacía el veneno de Mn, principalmente en el caballo 1, donde la diferencia fue más significativa ($P < 0.001$). Cabe mencionar que aún en el esquema de

inmunización monovalente siempre fue mayor el reconocimiento de las muestras de este caballo hacía el veneno de Mn. Es importante resaltar que durante el periodo en el cual no se llevaron a cabo inoculaciones de veneno, los títulos de anticuerpos disminuyeron claramente en cada uno de los caballos y hacia los venenos.

En lo que respecta a los ensayos realizados para determinar la capacidad neutralizante de los sueros hacia la letalidad de los venenos, no se observó efectividad hacia el veneno de Mt en ninguno de los casos (Tablas 14, 15 y 16), a pesar de que al final del esquema monovalente, se había logrado obtener suero neutralizante. Puede ser que el hecho de introducir los venenos de Mf y Mn, que contienen una buena proporción de componentes de mayor peso molecular, dentro del esquema de inmunización, junto con el veneno de Mt, quizás modificó la respuesta humoral, orientando la especificidad hacia los componentes heterólogos y minimizando el reconocimiento hacía los componentes más pequeños que se encuentran en un alto porcentaje en el veneno homólogo. Lo anteriormente descrito, se podría comprobar llevando a cabo ensayos de neutralización hacía fracciones específicas de los venenos, ya que en este trabajo únicamente fueron empleados los venenos completos de cada especie.

A diferencia de las pruebas realizadas contra el veneno de Mt, todos los antisueros obtenidos de los tres caballos a lo largo del esquema de inmunización, mostraron ser efectivos en la neutralización del veneno de Mf (Figura 12). Como se menciono anteriormente, la composición del veneno puede tener repercusiones en la efectividad del suero, el hecho de que una buena proporción de toxinas constituyentes de este veneno sean fosfolipasas (Paniagua, 2011, tesis en desarrollo) y que forman parte de los componentes causantes de la letalidad, podría favorecer la generación de una respuesta que resulte en la neutralización de los efectos del veneno. Por otro lado, entre los días 126 y 259 se presentó una caída en la potencia neutralizante hacía el veneno de Mf que coincide tanto con un decremento en los títulos de anticuerpos, como con la suspensión de inmunizaciones, esto sugiere que el organismo requiere la presencia del antígeno en circulación para mantener una alta producción de anticuerpos.

Si analizamos la respuesta de los caballos por separado, los tres animales mantienen la misma tendencia (Figura 12), sin embargo, el caballo 1 es el que presenta

mayores potencias neutralizantes, mientras que el caballo 3, es el que respondió más débilmente. Lo anterior, puede ser explicado por la diferencia de peso que existe entre ambos caballos, ya que el caballo uno pesaba 575 Kg y el caballo tres 460 Kg.

Adicionalmente, se realizaron pruebas de neutralización de la sangría correspondiente a los 273 días del esquema de inmunización trivalente, empleando únicamente 2DL₅₀ de veneno de Mt (Anexo E_b). Es importante destacar que esta sangría no había mostrado efectividad neutralizante hacia 3DL₅₀ del veneno, aún empleando volúmenes altos de suero (400µL). Los resultados mostraron una DE₅₀ de 24.3 µL/ratón, lo que permitió determinar que las inmunizaciones llevadas a cabo en los caballos, sí generaron anticuerpos capaces de neutralizar algunos de los componentes responsables de la letalidad del veneno de Mt, ya que aunque la proporción de esta población de anticuerpos en el suero no es suficiente para neutralizar la cantidad de toxinas responsables de la toxicidad contenidas en 3DL₅₀ de veneno, sí muestra efectividad contra 2DL₅₀ (Anexo E_b).

Como se menciona anteriormente, actualmente se está realizando la caracterización bioquímica del veneno de la especie de coral *M. tener*, donde el análisis cromatográfico por HPLC permitió la obtención de 34 fracciones, dentro de las cuales, se han encontrado dos grupos de componentes principales: las que contienen componentes con un peso molecular cercano a los 7 kDa y los que presentan un peso molecular aproximado a los 13kDa (Anexo F)(Benard, 2011). Tomando en cuenta estos resultados y con la finalidad de evaluar el reconocimiento *in vitro* hacia cada una de estas fracciones, se decidió determinar el título de anticuerpos de algunos sueros hacia estas, para determinar el porcentaje de reconocimiento con relación al veneno completo de *M. tener*. Los resultados reforzaron la idea de que la respuesta de anticuerpos está dirigida hacia los componentes de mayor peso molecular, ya que estos son mejor reconocidos por todos los sueros evaluados, incluso para los que no muestran neutralización del veneno completo, mientras que para los componentes de menor tamaño la respuesta en cuanto al porcentaje de reconocimiento fue significativamente menor (Anexo G).

Aunque en general, no se logró obtener sueros capaces de neutralizar al veneno de *M. tener*, este trabajo ha permitido formar las bases necesarias para optimizar futuros esquemas de inmunización dirigidos hacia la neutralización de este tipo de venenos y basados en la composición de éstos. En este sentido, estudios posteriores deberán buscar métodos de obtención de altas cantidades de componentes como las α -neurotoxinas y generar mezclas de inmunización con venenos completos enriquecidos con estos componentes, para ampliar los espectros de acción de los antisueros.

Por otro lado, se sabe que el Coralmyn®, que es el antiveneno comercializado en México y producido por inmunizaciones en caballos con veneno de *M. nigrocinctus*, no muestra buena efectividad, en términos de potencia neutralizante, hacía el veneno de *M. fulvius* (Carbajal, 2004), que es la especie causante del mayor número de casos de envenenamiento por serpientes de coral en Estados Unidos, por lo que los resultados del presente trabajo sugiere que emplear mezclas de venenos o el veneno completo de *M. tener* dentro del esquema de inmunización puede mejorar sustancialmente la potencia de los sueros hacía este veneno y consecuentemente, desde un punto de vista clínico, generar un antiveneno capaz de cubrir las necesidades de envenenamiento por coralillos en Estados Unidos.

IX. CONCLUSIONES

- El suero monovalente obtenido de caballos inmunizados con el veneno total de la especie *Micrurus tener* contiene anticuerpos que reconocen a componentes en el veneno de esta especie y además presenta reconocimiento cruzado hacia otros venenos del mismo género (*M. fulvius* y *M. nigrocinctus*).
- De las 11 muestras de suero anti-*M. tener* sometidas a ensayos de neutralización, sólo las del día 210 de los caballos 1 y 3, lograron neutralizar al veneno homólogo a pesar de que todos los sueros presentaron altos títulos de anticuerpos contra este veneno, por tanto no existe una relación directa entre el título de anticuerpos y la potencia neutralizante.
- En los estudios *in vivo*, los efectos letales de los venenos de *M. fulvius* y *M. nigrocinctus* son neutralizados eficientemente por el antisuero anti-*M. tener*.
- Para lograr la neutralización del veneno de *M. tener* con el antisuero monovalente, se requieren esquemas de inmunización más largos que para los otros dos venenos.
- La producción de un antisuero trivalente por inmunización en caballos con venenos de *M. tener*, *M. nigrocinctus* y *M. fulvius*, produce altos títulos de anticuerpos contra cada uno de los venenos, sin embargo los antisueros no fueron capaces de neutralizar los efectos tóxicos del veneno de *M. tener*, pero si el de *M. fulvius* y *M. nigrocinctus*.
- El empleo de adyuvantes dentro del esquema de inmunización promueve la elevación de los títulos de anticuerpos.
- Las fracciones del veneno de *M. tener* que presentan componentes de mayor peso molecular son mejor reconocidas por los sueros monovalentes y trivalentes que los de menor tamaño.

ANEXO A: ESQUEMA DE INMUNIAZAIÓN CON VENENO DE *Micrurus tener*.

(Stock de veneno = 4.4 mg/mL)

CABALLOS 1 y 3.

Número de inmunización	Día	Veneno por caballo (µg)	10% Extra (µg)	Total por caballo (µg)	Total 3 caballos (µg)	Veneno (µL)	PBS (mL)	Adyuvante	Adyuvante (mL)	Vol. total (mL)	FECHA	Sangría
1	0	3.3	0.3	3.7	11.0	2.5	3.3	CFA	5.5	8.8	08-Dic-08	5ml
2	7	6.7	0.7	7.3	22.0	5.0	3.3	CFA	5.5	8.8	15-Dic-08	
3	14	13.3	1.3	14.7	44.0	10.0	3.3	IFA	5.5	8.8	22-Dic-08	
4	21	26.7	2.7	29.3	88.0	20.0	3.3	ALUM	3.3	6.6	29-Dic-08	
5	28	53.3	5.3	58.7	176.0	40.0	3.3	IFA	5.5	8.8	05-Ene-09	
6	35	106.7	10.7	117.3	352.0	80.0	3.2	ALUM	3.3	6.6	12-Ene-09	
7	42	166.7	16.7	183.3	550.0	125.0	3.2	IFA	5.5	8.8	19-Ene-09	50 ml
8	56	166.7	16.7	183.3	550.0	125.0	3.2	ALUM	3.3	6.6	02-Feb-09	
9	70	166.7	16.7	183.3	550.0	125.0	3.2	IFA	5.5	8.8	16-Feb-09	50 ml
10	84	250.0	25.0	275.0	825.0	187.5	3.1	ALUM	3.3	6.6	02-Mar-09	
11	98	250.0	25.0	275.0	825.0	187.5	3.1	IFA	5.5	8.8	16-Mar-09	100 ml
12	112	250.0	25.0	275.0	825.0	187.5	3.1	ALUM	3.3	6.6	30-Mar-09	50 ml
13	126	333.3	33.3	366.7	1100.0	250.0	3.1	IFA	5.5	8.8	13-Abr-09	100 ml
14	140	333.3	33.3	366.7	1100.0	250.0	3.1	ALUM	3.3	6.6	27-Abr-09	
Se tuvo que eutanizar el caballo 2 por fractura; las cantidades que siguen estan calculadas para dos caballos												
15	154	1000.0	100.0	1100.0	2200.0	500.0	1.5	No	0	2.0	11-May-09	100 ml
	161	0	Sólo sangría								18-May-09	100 ml
16	168	1000.0	100.0	1100.0	2200.0	500.0	1.5	No	0	2.0	25-May-09	100 ml
	175	0	Sólo sangría								01-Jun-09	100 ml
17	182	3000.0	300.0	3300.0	6600.0	1500.0	0.5	No	0	2.0	08-Jun-09	100 ml
	189	0	Sólo sangría								15-Jun-09	100 ml
18	196	3000.0	300.0	3300.0	6600.0	1500.0	0.5	No	0	2.0	22-Jun-09	100 ml
		0	Sólo sangría								29-Jun-09	100 ml
		0	Sólo sangría								06-Jul-09	100 ml

ANEXO B: ESQUEMA DE INMUNIAZAIÓN CON VENENO DE *Micrurus tener*.
(Stock de veneno = 4.4 mg/mL) CABALLO 2.

Número de inmu-nización	Día	Veneno por caballo (µg)	10% Extra (µg)	Total por caballo (µg)	Veneno (µL)	PBS (mL)	Adyuvante	Adyuvante (mL)	Vol. total (mL)	FECHA	Sangría
1	0	10	1.0	11.0	2.5	1.00	CFA	1.7	2.7	11May09	5 mL
2	7	20	2.0	22.0	5.0	1.00	IFA	1.7	2.7	18May09	
3	14	40	4.0	44.0	10.0	0.99	ALUM	1.0	2.0	25May09	5mL
4	21	80	8.0	88.0	20.0	0.98	IFA	1.7	2.7	1Jun09	
5	28	160	16.0	176.0	40.0	0.96	ALUM	1.0	2.0	8Jun09	5mL
6	35	320	32.0	352.0	80.0	0.92	IFA	1.7	2.7	15Jun09	
7	42	500	50.0	550.0	125.0	0.88	ALUM	1.0	2.0	22Jun09	5mL
8	49	500	50.0	550.0	125.0	0.88	IFA	1.7	2.7	29Jun09	
9	63	500	50.0	550.0	125.0	0.88	ALUM	1.0	2.0	6Jul09	5mL
10	70	1000.0	100.0	1100.0	50.0	0.75	No	0	1.0	13Jul09	100mL
	77	0.0								20Jul09	100mL
11	84	3000.0	300.0	3300.0	750.0	0.25	No	0	1.0	27Jul09	100mL
	91	0.0								3Ago09	100mL
	98	0.0								10Ago09	100mL

ANEXO C:

DETERMINACIÓN DE DL₅₀ DE VENENOS DE SERPIENTES DE CORAL.a) DL₅₀ de veneno de *M. tener*.

μg veneno/ratón	% Mortalidad
20	100
18	100
16	80
14	60
12	0
10	0

DL₅₀: 14.04 μg /ratón
Intervalo de confianza: 13.30 a 14.79

Fueron empleados grupos de 5 ratones en cada grupo.
El veneno fue administrado por vía i.v. en PBS, en un
Volumen no mayor de 0.5 mL.

b) DL₅₀ de veneno de *M. fulvius*.

μg veneno/ratón	% Mortalidad
10	100
7.5	100
6	40
5.5	0
4.5	0
2.5	0

DE₅₀: 6.01 μg /ratón
Intervalo de confianza: 6.01 a 6.01

Fueron empleados grupos de 5 ratones en cada grupo.
El veneno fue administrado por vía i.v. en PBS, en un
Volumen no mayor de 0.5 mL.

c) DL₅₀ de veneno de *M. nigrocinctus*.

μg veneno/ratón	% Mortalidad
12.5	100
10	100
7.5	100
5	100
3.75	20
2.5	0

DE₅₀: 4.01 μg /ratón
Intervalo de confianza: 4.01 a 4.01

Fueron empleados grupos de 5 ratones en cada grupo.
El veneno fue administrado por vía i.v. en PBS, en un
Volumen no mayor de 0.5 mL.

ANEXO D:

EJEMPLOS DE DETERMINACIÓN DE DE₅₀ DE SUEROS EQUINOS.

1. Caballo 1- 8^a sangría
 Veneno a probar: *M. nigrocinctus*
 DL₅₀ del veneno: 4.009 µg/ratón.

µl suero /ratón	% Sobrevida
50.0	100
35.0	100
30.0	80
25.0	40
20.0	0
15.0	0

DE₅₀: 26.11 µl/ratón
 Intervalo de confianza: 24.48 a 27.85

Fueron empleados grupos de 5 ratones en cada grupo.
 La dosis administrada de veneno por ratón fue de 3DL₅₀ (12.027µg/ratón)

2. Caballo 1- 13^a sangría
 Veneno a probar: *M. nigrocinctus*
 DL₅₀ del veneno: 4.009 µg/ratón.

µl suero /ratón	% Sobrevida
50.0	100
35.0	100
30.0	80
25.0	20
20.0	0
15.0	0

DE₅₀: 17 µl/ratón
 Intervalo de confianza: 12.54 a 23.06

Fueron empleados grupos de 5 ratones en cada grupo.
 La dosis administrada de veneno por ratón fue de 3DL₅₀ (12.027µg/ratón)

3. Caballo 1- 15^a sangría
 Veneno a probar: *M. nigrocinctus*
 DL₅₀ del veneno: 4.009 µg/ratón.

µl suero /ratón	% Sobrevida
50.0	100
25.0	100
20.0	60
15.0	40
10.0	0

DE₅₀: 26.11 µl/ratón
 Intervalo de confianza: 24.48 a 27.85

Fueron empleados grupos de 5 ratones en cada grupo.
 La dosis administrada de veneno por ratón fue de 3DL₅₀ (12.027µg/ratón)

4. Caballo 3- 8^a sangría
 Veneno a probar: *M. nigrocinctus*
 DL₅₀ del veneno: 4.009 µg/ratón.

µl suero /ratón	% Sobrevida
75.0	100
50.0	100
35.0	80
25.0	80
15.0	40
10.0	0

DE₅₀: 17.95 µl/ratón
 Intervalo de confianza: 13.54 a 23.80

Fueron empleados grupos de 5 ratones en cada grupo.
 La dosis administrada de veneno por ratón fue de 3DL₅₀ (12.027µg/ratón)

5. Caballo 3- 13^a sangría
 Veneno a probar: *M. nigrocinctus*
 DL₅₀ del veneno: 4.009 µg/ratón.

µl suero /ratón	% Sobrevida
75.0	100
50.0	100
35.0	60
15.0	20
10.0	0

DE₅₀: 27.14 µl/ratón
 Intervalo de confianza: 18.13 a 40.60

Fueron empleados grupos de 5 ratones en cada grupo.
 La dosis administrada de veneno por ratón fue de 3DL₅₀ (12.027µg/ratón)

6. Caballo 1- 15^a sangría
 Veneno a probar: *M. fulvius*
 DL₅₀ del veneno: 4.807 µg/ratón.

µl suero /ratón	% Sobrevida
40.0	100
35.0	80
30.0	80
25.0	0
20.0	0

DE₅₀: 28.57 µl/ratón
 Intervalo de confianza: 24.52 a 33.28

Fueron empleados grupos de 5 ratones en cada grupo.
 La dosis administrada de veneno por ratón fue de 3DL₅₀ (14.421µg/ratón)

7. Caballo 02- 6^a sangría
 Veneno a probar: *M. fulvius*
 DL₅₀ del veneno: 4.807 µg/ratón.

µl suero /ratón	% Sobrevida
85.0	100
80.0	80
77.5	40
75.0	0

DE₅₀: 78.14 µl/ratón
 Intervalo de confianza: 77.18 a 79.11

Fueron empleados grupos de 5 ratones en cada grupo.
 La dosis administrada de veneno por ratón fue de 3DL₅₀ (14.421µg/ratón)

8. Caballo 3- 6^a sangría
 Veneno a probar: *M. fulvius*
 DL₅₀ del veneno: 4.807 µg/ratón.

µl suero /ratón	% Sobrevida
60.0	100
55.0	100
50.0	80
45.0	80
40.0	80
35.0	40
30.0	20
25.0	0

DE₅₀: 36.13 µl/ratón
 Intervalo de confianza: 33.92 a 38.47

Fueron empleados grupos de 5 ratones en cada grupo.
 La dosis administrada de veneno por ratón fue de 3DL₅₀ (14.421µg/ratón)

9. Caballo 1- 15^a sangría
 Veneno a probar: *M. tener*
 DL₅₀ del veneno: 14.04 µg/ratón.

µl suero /ratón	% Sobrevida
75.0	100
70.0	40
65.0	0
60.0	0

DE₅₀: 70.08 µl/ratón
 Intervalo de confianza: 70.07 a 70.08

Fueron empleados grupos de 5 ratones en cada grupo.
 La dosis administrada de veneno por ratón fue de 3DL₅₀ (42.12µg/ratón)

10. Caballo 3- 15^a sangría
Veneno a probar: *M. tener*
DL₅₀ del veneno: 14.04 µg/ratón.

µl suero /ratón	% Sobrevida
75.0	100
70.0	40
65.0	0
60.0	0

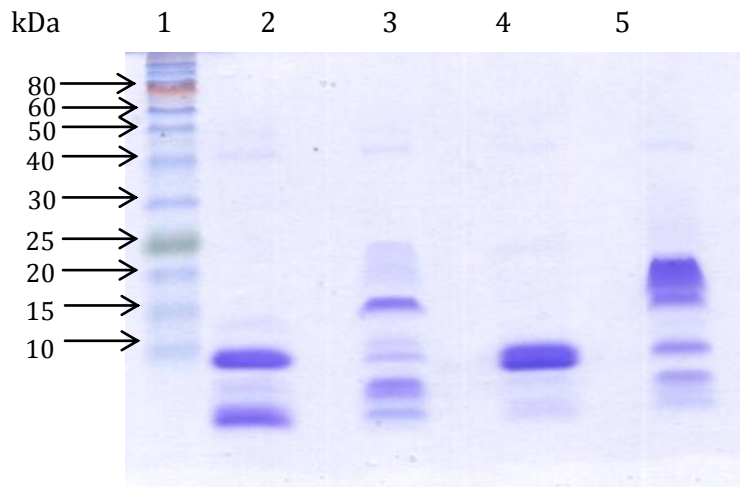
DE₅₀: 82.06 µl/ratón
Intervalo de confianza: 76.83 a 87.64

Fueron empleados grupos de 5 ratones en cada grupo.

La dosis administrada de veneno por ratón fue de 3DL₅₀ (42.12µg/ratón)

ANEXO E:

a) GEL SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida



1: Marcadores de peso molecular.

2: 10µg de eneno de *M. tener* en condiciones reductoras .

3: 10µg de veneno de *M. tener*.

4: 10µg de veneno de *M. fulvius* en condiciones reductoras.

5: 10µg de veneno de *M. fulvius*.

Condiciones reductoras: 2µL de solución de veneno + 14 µL de agua + 4µL de buffer de corrida desnaturante. Calentar a ebullición durante 5 min. y finalmente centrifugar a 10 000 rpm drante 2 min.

Condiciones no reductoras: 2µL de solución de veneno + 14 µL de agua + 4µL de buffer de corrida no desnaturante (sin 2-mercaptoetanol) y sin calentar. Finalmente centrifugar a 10 000 rpm drante 2 min

b)

Caballo 1- Sangría correspondiente a 273 días, bajo esquema de inmunización trivalente.

Veneno a probar: *M. tener*

DL₅₀ del veneno: 14.04 µg/ratón.

µl suero /ratón	% Sobrevida
40	100
35	80
30	80
25	60
20	20
15	0

DE₅₀: 24.3 µl/ratón
Intervalo de confianza: 22.2 a 26.5.

Fueron empleados grupos de 5 ratones en cada grupo.

La dosis administrada de veneno por ratón fue de 2DL₅₀ (28.08µg/ratón)

ANEXO F:

Perfil cromatográfico de veneno de la especie *M. fulvius* (Tomado de Paniagua, 2011; tesis en desarrollo).

6.4 mg

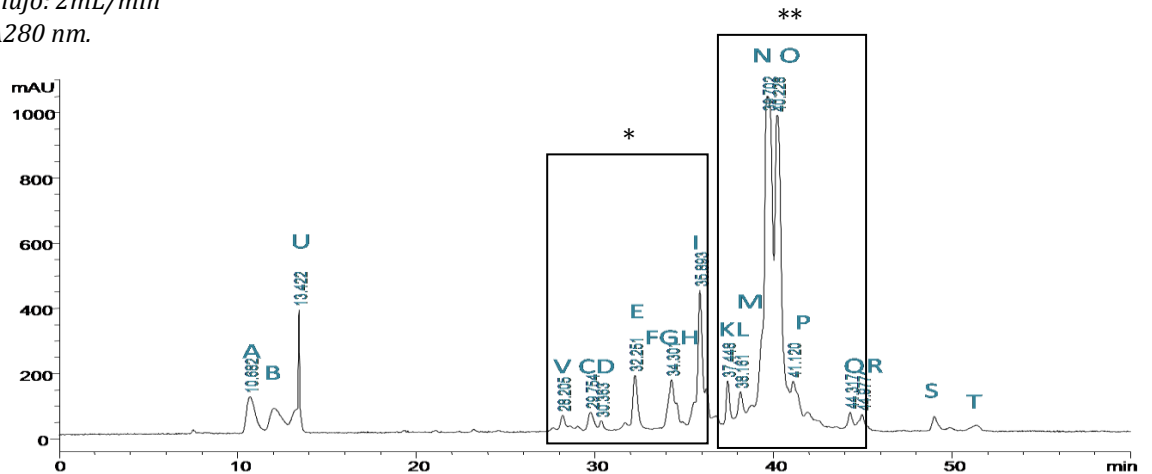
RP-HPLC

Columna C-18 semipreparativa

Gradiente de acetonitrilo de 0% a 60% en 60 min.

Flujo: 2mL/min

A280 nm.



* Fracciones que presentan componentes con un peso molecular aproximado a 7kDa.

**Fracciones que presentan componentes con un peso molecular aproximado a 13kDa.

Perfil cromatográfico del veneno de la especie *M. tener* (Tomada de Benard, 2011; tesis en desarrollo).

6.4 mg

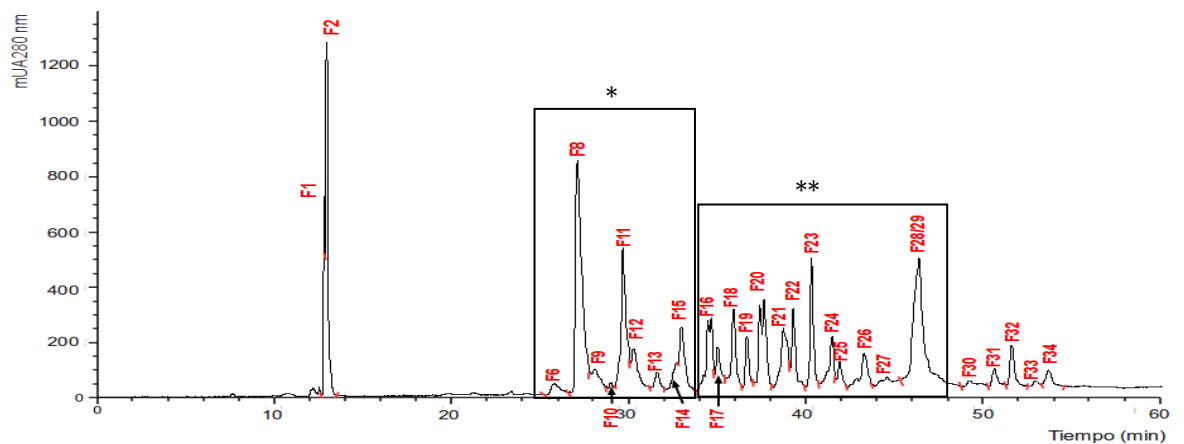
RP-HPLC

Columna C-18 semipreparativa

Gradiente de acetonitrilo de 0% a 60% en 60 min.

Flujo: 2mL/min

A280 nm.



* Fracciones que presentan componentes con un peso molecular aproximado a 7kDa.

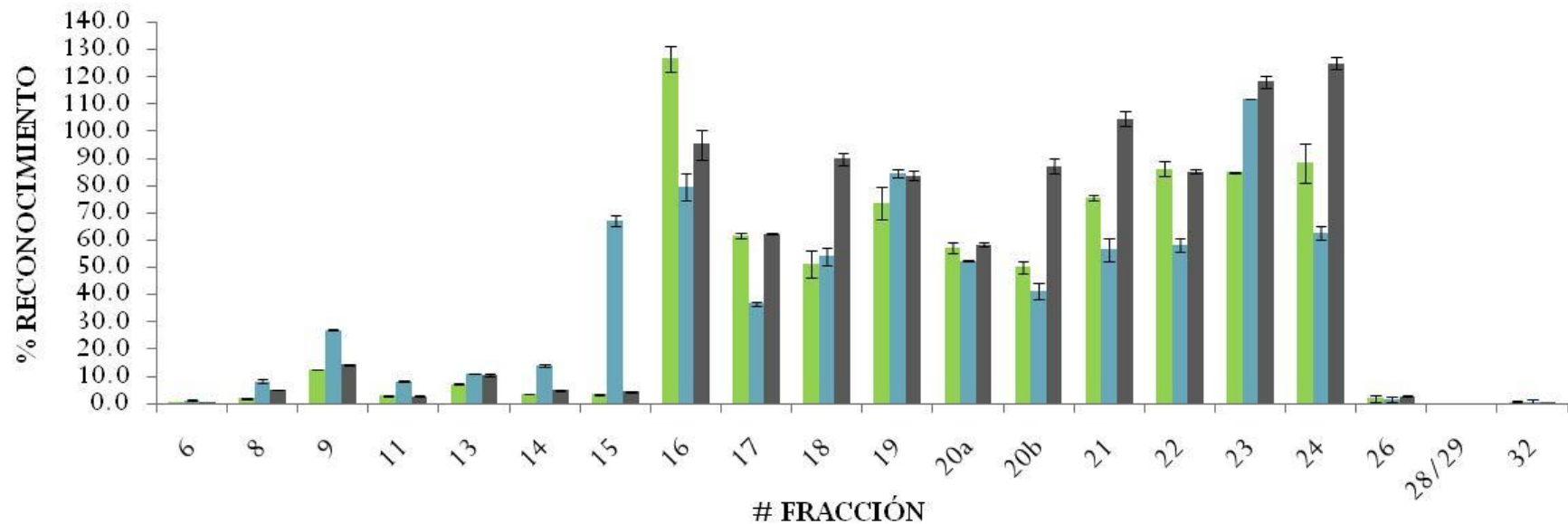
**Fracciones que presentan componentes con un peso molecular aproximado a 13kDa y que presentan actividad fosfolipasa (Benard, 2011; tesis en desarrollo).

ANEXO G:

Nivel de reconocimiento de sueros de caballo 1 hacia fracciones de veneno de *M. tener*.

Determinación llevada a cabo mediante el método de ELIS(Anexo H).

El % de reconocimiento está definido como el título hacia cada fracción con relación al veneno completo.



- Sangría correspondiente a los 98 días del esquema de inmunización trivalente (Suero que no neutraliza al veneno de Mt, Tabla 14)*
- Sangría correspondiente a los 210 días de inmunización bajo el esquema monovalente (Suero que sí neutraliza al veneno de Mt, Tabla 11)*
- Sangría correspondiente a los 70 días bajo el esquema de inmunización trivalente (Suero que sí neutraliza al veneno de Mt, Tabla 14).*

ANEXO H:

1.- ELECROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA AL 15%

Reactivos:

*Solución de acrilamida (30% de acrilamida + 0.8% de bis-acrilamida).

*Lower buffer (1.5M de tris + 0.4% de SDS).

*Upper buffer (0.5M de tris + 0.4% SDS).

*Tank buffer (0.25M tris + 0.19M de glicina + 0.1% de SDS).

*Buffer de corrida desnaturizante (10% glicerol + 2.5% SDS + 50mM tris-HCl pH 6.8 + 5% 2-mercaptoetanol + 0.002% Azul de bromofenol).

*Solución de tinción (50% metanol + 10% ácido acético + 0.2% de Azul de Coomasie G250).

*Solución de destinción (10% Metanol + 10% ácido acético).

*Agentes polimerizantes: Persulfato de amonio al 10 % y TEMED (1,2-bis dimetilamino-etanol).

Preparación de geles:

	Gel separador (15%)	Gel concentrador (4%)
Lower buffer (mL)	1.5	-
Upper buffer (mL)	-	0.63
Solución de acrilamida (mL)	3.0	0.33
Agua deionizada (mL)	1.5	1.54
TEMED (µL)	5	2.5
Persulfato de amonio 10% (µL)	20	12.5

Preparación de muestras:

Se partió de una solución de veneno de 5 mg/mL.

Condiciones reductoras: 2µL de solución de veneno + 14 µL de agua + 4µL de buffer de corrida desnaturizante. Calentar a ebullición durante 5 min. y finalmente centrifugar a 10 000 rpm durante 2 min.

Condiciones no reductoras: 2µL de solución de veneno + 14 µL de agua + 4µL de buffer de corrida no desnaturizante (sin 2-mercaptoetanol) y sin calentar. Finalmente centrifugar a 10 000 rpm durante 2 min.

Procedimiento:

Se adiciono un volumen total a cada pozo de 20µL.

En el primer pozo se adicionaron los marcadores de peso molecular y en los siguientes las muestras.

La corrida se llevó a cabo en un equipo Bio-Rad a un voltaje de 60 Volts hasta alcanzar el gel concentrador, posteriormente a un voltaje constante de 120 Volts, empleando tank buffer..

La tinción del gel fue realizada con azul de Coomasie G250, durante 1h. La destinción se realizó sumergiendo el gel en solución de destinción durante 12h aproximadamente.

2- TÍTULOS DE ANTICUERPOS CONTRA FRACCIONES DEL VENENO DE *M. tener* MEDIANTE ELISA.

La técnica empleada fue la misma que se muestra en la sección V.3 de la metodología. Pero en la 1ª etapa (sensibilizado), en lugar de usar veneno completo, fueron empleadas las diferentes fracciones de veneno de *M. tener* obtenidas por HPLC (Anexo F. Benard, 2011, tesis en desarrollo).

El porcentaje de reconocimiento de cada fracción fue determinado con relación al veneno completo.

❖ REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. *Inmunología celular y molecular*. ELSEVIER 2004; 5ª Edición: 85, 364, 478.
- Aimaniada, V., Haensler, J., Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S.V., Bayry, J. *Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants*. Trends in Pharmacological Sciences 2009; Vol xxx, No. x.
- Aguilar, J.C., Rodríguez, E.G. *Vaccine adjuvants revisited*. Vaccine 2007; 25: 3752-3762.
- Angulo, Y., Estrada, R., Gutiérrez, J.M. *Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (CROTALINAE) antivenom*. Toxicon 1997; 35: 81-90.
- Arce, V., Rojas, E., Ownby, C.L., Rojas, G., Gutiérrez, J.M. *Preclinical assessment of the ability of polyvalent (Crotalinae) and anticoral (Elapidae) antivenoms produced in Costa Rica to neutralize the venoms of North American snakes*. Toxicon 2003; 41: 851-860.
- Benard, V.M. *Similitud bioquímica e inmunoquímica entre venenos de coralillos norteamericanos*. Universidad Autónoma del estado de Morelos, Facultad de Ciencias Biológicas, 2009.
- Bolaños, R., Cerdas, L., Abalos, J.W. *Venoms of coral snakes (Micrurus spp): report on a multivalent antivenin for the Americas*. Bulletin of the Panamerican Health Organization 1978; 12:23-27.
- Calmette A. *Contribution a l'étude des venins*. Annales de l'Institut Pasteur 1895; 9: 225-251.
- Campbell, J.A., Lamar, W.W. *The venomous reptiles of the western hemisphere*. Cornell University Press 2004; 1:170-182.
- Carbajal, S.A. *Comparación inmunoquímica del veneno de serpientes de coral (Elapidae: Micrurus, Micruroides) mexicanas*. Universidad Nacional Autónoma de México 2004.
- Cecchini, A.L., Marcussi, S., Silveira, L.B., Borja-Oliveira, C.R., Rodrigues-Simoni, L., Amora, S., Stabeli, R.G., Giglio, J.R., Arentes, E.C., Soares, A.M. *Biological and enzymatic activities of Micrurus sp (Coral) snake venoms*. Comparative biochemistry and physiology 2005; 140: 125-134.
- Chippaux, J.-P. *Snake-bites: appraisal of the global situation*. Bulletin of the World Health Organization 1998; 76(5): 515-524
- Chippaux, J.P., Goyffon, M. *Venoms, antivenoming and immunotherapy*. Toxicon 1997; 36: 823-846.
- Chippaux, J.P., Williams, V., White, J. *Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation*. Toxicon 1991; 29 (11): 1279-1303.

- Chotwiwatthanakun, C., Pratanaphon, R., Akesowan, S., Sriprapat, S., Ratanabanangkoon, K. *Production of potent polyvalent antivenom against three elapid venoms using a low dose, low volume, multi-site immunization protocol.* Toxicon 2001; 39: 1487-1494.
- Coffman, R.L., Sher, A., Seder, R.A. *Vaccine adjuvants: Putting Innate Immunity to work.* Immunity 2010; 33: 492-503.
- Cohen, P., Dawson, J.H., Seligmann, E.B. Jr. *Cross neutralization of *Micrurus fulvius fulvius* (Coral Snake) venom by anti-*Micrurus carinicauda dumerilli* serum.* American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1968; 17: 308-310.
- Dal Belo, C.A., Leite, G.B., Toyama, M.H., Marangoni, S., Corrado, A.P., Fontana, M.D., Southan, A., Rowan, E.G., Hyslop, S., Rodrigues-Simioni, L. *Pharmacological and structural characterization of a novel phospholipase A₂ from *Micrurus dumerilli carinicauda* venom.* Toxicon 2005; 46: 736-750.
- de Roodt, A., Paniagua-Solis, J.F., Dolab, J.A., Estévez-Ramírez, J., Ramos-Cerrillo, B., Litwin, S., Dokmetjian, J.C., Alagón, A. *Effectiveness of two common antivenoms for North, Central, y South American *Micrurus* envenomations.* Journal of toxicology 2004; 42(2): 171-178.
- Fernández, J., Alape-Girón, A., Angulo, Y., Sanz, L., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., Lomonte, B. *Venomic and antivenomic analyses of the central American coral snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae).* Journal of Proteome Research 2011; 10: 1816-1827.
- Fraser, T.R. *The rendering of animals immune against the venom of the cobra and other serpents: On the antidotal properties of the blood serum of the immunized animals.* Immunity against snake poison, The british Medical Journal 1895; 1309-1312.
- Fry, B.G., Wüster, W., Kini, R.M., Brusica, V., Khan, A., Venkataraman, D., Rooney, A.P. *Molecular evolution and phylogeny of Elapid snake Venom Three-Finger toxins.* Journal of molecular evolution 1999; 57.
- Fry, B.G., Wüster, W., Kini, R.M., Brusica, V., Khan, A., Venkataraman, D., Rooney, A.P. *Molecular evolution and phylogeny of Elapids snake venom three-finger toxins.* Journal of molecular evolution 2003; 57: 110-129.
- Gold, M.R., DeFranco, A.L. *Biochemistry of lymphocyte activation.* Advances in Immunology 1994; 55: 221-295.
- Gutierrez, J.M., Rojas, G., Lomonte, B., Gene, J.A., Chaves, F., Alvarado, J. *Standardisation of assays for testing the neutralizing ability of antivenoms.* Toxicon 1990; 28: 1127-1129.
- Gutiérrez, J.M., Theakston, R.G.D., Warrell, D.A. *Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership.* PLoS Medicine 2006; 3(6): 727-731.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J. *Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad.* Masson 2003; 2ª Edición: 617.
- Kardong, K.V. *The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrids to Viperids and Elapids.* Memorias do Instituto Butantan 1982; 46: 105-118.

- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A.R., de Silva, N., Gunawardena, N.K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D.G., de Silva, H.J. *The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths*. PLoS Medicine 2008; 5(11):15911604.
- Kocholaty, W.F., Ledford, E.B., Daly, J.G., Billings, T.A. *Toxicity and some enzymatic properties and activities in the venoms of Crotalidae, Elapidae and Viperidae*. Toxicon 1971; 9: 131-138.
- Kumar, V., Rejent, T.A., Elliot, W.B. *Anticholinesterase activity of elapid venoms*. Toxicon 1973; 11: 131-138.
- Lalloo, D.G., Theakston, R.D.G. *Snake antivenoms*. Journal of Toxicology 2003; 41: 277-290.
- Leão, L.I., Ho, P.L., Junequeira-de-Acevedo I.L.M. *Transcriptomic basis for an antiserum against Micrurus corallines (coral snake) venom*. BioMed Central 2009; 10: 1-14.
- Lee, M.S.Y. *Serpentes (Snakes)*. Encyclopedia of Life Sciences 2002; pág: 1-5.
- Marciani, D.J. *Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity*. Therapeutic focus 2003; 8 (20): 934-943.
- Moraes, F.V., Sousa-e-Silva, M.C.C., Barbaro, K.C., Leitao, M.A., Furtado, M.F.D. *Biological and immunochemical characterization of Micrurus altirostris venom and serum neutralization of its toxic activities*. Toxicon 2003; 41: 71-79.
- Morgan, D.L., Borys, D.J., Stanford, R., Kjar, D., Tobleman, W. *Texas coral snake (Micrurus tener) bites*. Southern Medical Association 2007; 100(2): 152-156.
- Morris, H.J., Manrique, C.M., Abdala, T.T., Campos, O.D. *Adyuvantes inmunológicos*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas 1999; 18(2): 130-137.
- Oliveira, J.S., Brandão Prieto da Silva, A.R., Bento, S.M., Stephano, M.A., Oliveira, D.W., Rae, I., Lee Ho, P. *Cloning and characterization of an α -neurotoxin-type protein specific for the coral snake Micrurus corallinus*. Biochemical and biophysical research communications 2000; 267:887-891.
- Peterson, M.E. *Snake Bite: Coral Snakes*. Clinical Techniques in Small Animal Practice 2006; 21:183-186.
- Phisalix, C., Bertrand, G (a). *Attenuation du venin de vipère par la chaleur et vaccination du cobaye contre ce venin*. Comptes Rendus, Academies sciences, 1894; 118: 269.
- Phisalix, C., Bertrand, G (b). *Sur la propriété antitoxique du sang des animaux vaccinés contre le venin de vipère*. Comptes Rendus, Academies sciences, 1894; 118: 356-358.
- Pineda, D. *Accidentes por animales venenosos*. 1ª Edición. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Bogotá, Colombia. Instituto Nacional de Salud 2002; pág: 19-27.
- Pope, C.G. *The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera*. British journal of experimental pathology 1939; 20:132-149.
- Prieto da Silva, A.R., Yamagushi, I.K., Morais, J.F., Higashi, H.G., Raw, I., Ho, P.L., Oliveira, J.S. *Cross reactivity of different specific Micrurus antivenom sera with homologous and heterologous snake venoms*. Toxicon 2003; 39: 949-953.

- Ramos, C.B., Roodr, A.R., Chippaux, J.P., Olguín, L., Casasola, A., Guzmán, G., Paniagua, S.J., Alagón, A., Stock, R.P. *Characterization of new polyvalent antivenom (Antivipmyn® Africa) against African vipers and elapids*. *Toxicon* 2008; 52: 881-888.
- Rawat, S., Laining, G., Smith, D.C., Theakston, D., Landon, J. *A new antivenom to treat eastern coral snake (Micrurus fulvius fulvius) envenoming*. *Toxicon* 1994; 32: 185-190.
- Rosso, J.P., Vargas, R.O., Gutiérrez, J.M., Rochat, H., Bougis, P.E. *Characterization of α -neurotoxin and phospholipase A₂ activities from micrurus venoms. Determination of the amino acid sequence and receptor-binding ability of the major α -neurotoxin from Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. *European journal of biochemistry* 1996; 238: 231-239.
- Roze, J.A. *Coral snakes of the Americas: biology, identification and venoms*. Krieges publishing company 1996. Original edition: pp- 179,180 y 277.
- Sánchez, E.E., López-Johnston, J.C., Rodríguez-Acosta, A., Pérez, J.C. *Neutralization of two North American coral snake venoms with United States and Mexican antivenoms*. *Toxicon* 2008; 51: 297-303.
- Sewall, H. *Experiments on the preventive inoculation of rattlesnake venom*. *Journal of Physiology* 1887; 8: 203-210.
- Stevan, L.J., Seligman, E.D. *Agar-gel and acrylamide "disc" electrophoresis of coral snake venoms*. *Toxicon* 1970; 8:11-14.
- Stock, R.P., Massougbodji, A., Alagón, A., Chippaux, J.P. *Bringing antivenoms to Sub-Saharan Africa*. *Nature biotechnology* 2007; 25: 173-177.
- Sunthornandh, P., Ratanabanangkoon, K. *A comparative study of three vehicles on antibody response against elapid neurotoxin immunogens*. *Toxicon* 1993; 32: 561-571.
- Tanaka, G.D., Furtado, M.F.D., Portaro, F.C.V., Sant'Anna, O.A., Tambourgi, D.V. *Diversity of Micrurus snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization*. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2010; 4(3): 1-12.
- Tay, Z.J., Díaz, S.J.G., Sánchez, W.J.T., Ruiz, S.D., Castillo, L. *Serpientes y reptiles de importancia médica en México*. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM* 2002; 45(2): 212-219.
- Theakston, R.D.G., Warell, D.A., Griffiths, E. *Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms*. *Toxicon* 2003; 41:541-557.
- Tselin, V. *Snake venom α -neurotoxins and other "three finger" proteins*. *European Journal of Biochemistry* 1999; 264:281-286.
- Virelizier, J.L. *Adjuvants and formulations: How to make an immunogen from an antigen*. *The International Association for Biologicals* 2009; 37: 139-140.
- Vital Brazil, O. *Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1987; 29(3): 119-126.

Warrell, D.A., Theakston, R.D.G. *Crisis in snake antivenom supply for Africa*. The Lancet 2000; 356 (9247): 2104.

Wabl, M., Steinberg, C. *Affinity maturation and class switching*. Current Opinion in Immunology 1996; 8: 89-92.

Wingren, C. *Antibody responses: development*. Encyclopedia of Life Sciences 2007; pág: 1-8.