INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA

LABORATORIOS DE BIOLÓGICOS Y REACTIVOS DE MÉXICO S.A. de C.V.

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD CON ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN VACUNOLOGÍA

"ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES ESQUEMAS DE INMUNIZACIÓN CON VENENOS DE *Bothrops asper y Crotalus basiliscus* PARA LA OBTENCIÓN DE UN ANTIVENENO POLIVALENTE EN UN MODELO MURINO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD CON ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN VACUNOLOGÍA

PRESENTA:

Q.F.B. Francisco Ramírez López

DIRECTOR:
Dr. Carlos Rubén Ortega Sánchez

México D.F. Febrero 2013

PRESENTACIÓN

Este proyecto de investigación forma parte integral de un mega proyecto para la mejora y optimización de procesos en el departamento de sueros heterólogos de BIRMEX.

La primera parte del presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S.A. de C.V. (BIRMEX), bajo la dirección del Dr. Carlos Rubén Ortega Sánchez.

Los venenos de las serpientes *Bothrops asper y Crotalus basiliscus* fueron generosamente facilitados por la Gerencia de Producción de Sueros Heterólogos de BIRMEX.

Para el buen fin del presente proyecto se facilitaron las siguientes áreas del Instituto Nacional de Higiene, por cada uno de los responsables:

- Bioterio de ratones
- Departamento de Investigación
- Departamento de Coordinación Ambiental

La segunda y última etapa se concluyó en el Laboratorio de Inmunoquímica II de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Julieta Luna Herrera.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por el Don de la vida y dejarme concluir una etapa más.

A la Dra. Julieta Luna Herrera por abrirme las puertas del Laboratorio de Inmunoquímica II del Departamento de Inmunología de la ENCB del Instituto Politécnico Nacional y brindarme su apoyo incondicional para llevar a buen fin éste proyecto.

A los Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S.A. de C.V. (BIRMEX) por promover, implementar y contribuir en el desarrollo de la Maestría en Ciencias de la salud con área de concentración en vacunología en comunión con el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP).

Al Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) por creer en BIRMEX y en su personal, gracias por las facilidades y apoyo para la realización de este proyecto.

Al Dr. Samuel Ponce de León Rosales, Director General de BIRMEX y a la Dra. Ma. Eugenia Jiménez Corona, Directora de Investigación de BIRMEX. Gracias por el apoyo y las facilidades para realizar mi estancia en el Instituto Politécnico Nacional y poder concluir la parte experimental del presente proyecto.

Al Dr. José Luis Valdespino Gómez † Por la oportunidad que me brindó para ser parte de esta Maestría.

A mi Director de Tesis el Dr. Carlos Rubén Ortega Sánchez por su paciencia y apoyo incondicional para llevar a buen fin este proyecto. Mil gracias.

A mis Asesores M. en C. Francisco Reta Mares y M. en C. Nelson Jesús Álvarez Anell les agradezco el compartir conocimientos, experiencias y comentarios al presente trabajo.

A la Dra. Julieta Luna Herrera, Dr. Humberto Lanz Mendoza, Dr. Carlos Rubén Ortega Sánchez, Dr. Mario González Pacheco, Dra. Blanca Estela García Pérez miembros del Jurado que evaluó este trabajo, les agradezco las sugerencias y observaciones realizadas a este proyecto.

A mi Maestra y Coordinadora de la Maestría en Ciencias de la Salud con Área de Concentración en Vacunología, la Dra. Gabriela Echaniz Avilés por compartir sus conocimientos y darme todo su apoyo incondicional y motivación tanto en las clases como en el seguimiento de este proyecto.

A la Dra. Lizbel Esperanza León Solís, coordinadora de la maestría por parte de BIRMEX, por su apoyo incondicional, su excelente disposición para guiarme en esta faceta del posgrado y por su motivación para llevar a buen fin este proyecto.

Al MVZ. Alejandro Pérez Grovas Robles Gil y a la compañera MVZ. Patricia Hernández Rivera por facilitarme ratones para la realización de este proyecto. Muchas gracias.

A la M. en C. Angélica López Sotelo, al QBP. Luis Recamier Palacios y a la QFB. Areli Leal Barrera por las facilidades y apoyo para llevar acabo este proyecto. Gracias por todo su apoyo.

Al M. en C. QBP. José Alfredo Uscanga Reynell Gerente de Sueros Heterólogos por proporcionarme generosamente los venenos de serpiente de los géneros de *Crotalus basiliscus y Bothrops asper.* Muchas gracias.

A la QFB. Hortensia Nolasco Soriano, QBP Claudia Ariadna Uribe Gutiérrez y a la Tec. Elia Vasilio Soriano por el apoyo en la preparación de los inóculos y en el manejo de ratones, muchas gracias.

Al C. Juan Alcibíades López Beltrán Secretario General del Sindicato Único de Trabajadores de BIRMEX por el apoyo incondicional y estar al pendiente del desarrollo de este proyecto.

A mi esposa Wendy Herrera Fragoso y a mis hijos Wendy Fernanda, Noemí, Francisco y Emmanuel, ya que sin el apoyo incondicional y comprensión definitivamente no hubiera logrado cursar este posgrado. Mil gracias los amo.

A mis Padres Margarita López Padilla e Ignacio Ramírez Ramírez que en todo momento me han apoyado y me han impulsado a crecer como ser humano y profesionalmente. Gracias por ser los mejores padres del mundo.

Mantén tus pensamientos positivos
porque tus pensamientos se convierten en tus palabras.

Mantén tus palabras positivas
porque tus palabras se convierten en tus acciones.

Mantén tus acciones positivas
porque tus acciones se convierten en tus hábitos.

Mantén tus hábitos positivos
porque tus hábitos se convierten en tus valores.

Mantén tus valores positivos
porque tus valores se convierten en tu destino.

MAHATMA GANDHI

Este proyecto se los dedico a:

Wendy Herrera Fragoso, mi esposa; a mis hijos Noemi, Wendy Fernanda, Emmanuel y Francisco de quienes he aprendido muchas cosas y que en todo momento me han apoyado, comprendido y me han impulsado a seguir preparándome.

A mis Padres Margarita López Padilla e Ignacio Ramírez Ramírez, quienes con su amor, apoyo incondicional y transmisión de valores a través del ejemplo me han sabido transmitir la superación personal y académica.

A mi hermano Ignacio Ramírez López, quien siempre me ha apoyado en todos los momentos de mi vida.

A mis sobrinos Lourdes, Viviana e Ignacio Ramírez Hernández a quienes admiro por su entusiasmo, calidez humana y forma de ver la vida; los amo.

A mi Director de Tesis, el Dr. Carlos Rubén Ortega Sánchez, quien me ha apoyado y acompañado en esta faceta de mi vida.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS……I

ÍNDICE DE FIGURAS……II

ABREVIATURAS……III

RESUMEN……IV

1 Introducción……1

1.1 Marco teórico……1

1.2 Planteamiento del problema ……10

1.3 Justificación……11

1.4 Hipótesis……14

1.5 Objetivos……15

2 Material y métodos……16

3 Resultados……26

4 Discusión……32

5 Conclusiones……39

6 Perspectivas……40

7 Referencias bibliográficas……42

8 Apéndice……45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Diferentes serpientes que habitan en laRepública Mexicana.	3
Tabla 2.	Casos acumulados por mordedura de serpiente en el 2010 y casos reportados hasta la semana 52 del 2011.	5
Tabla 3.	Características de los venenos utilizados.	16
Tabla 4.	Características del modelo animal utilizado.	16
Tabla 5.	Resultados de las absorbancias para la realización de la curva tipo de proteína.	17
Tabla 6.	Concentración de contenido de proteínas de los venenos de *Crotalus basiliscus y Bothrops asper* y del estándar.	18
Tabla 7.	Formulación de los inóculos.(cantidades para 10 ratones).	19
Tabla 8.	Esquema general de inmunización utilizado para los tres grupos de estudio.	20
Tabla 9.	Estadísticos descriptivos para el estudio de Ba-BaM y de Cb-Cb M.	29
Tabla 10.	Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para determinación de los grupos de trabajo.	31
Tabla 11.	Prueba estadística de Kruskal-Wallis y prueba de Mann-Whitney.	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Distribución de serpientes en el mundo.	3
Figura 2.	Principales serpientes en México.	7
Figura 3.	Diagrama de producción del faboterápico polivalente antiviperino actual y el esquema propuesto.	13
Figura 4.	Curva patrón en la determinación de proteínas.	18
Figura 5.	Adaptación de la técnica de ELISA indirecta para el veneno de *Crotalus basiliscus* a 1 µg y 5 µg.	22
Figura 6.	Estandarización de la técnica de ELISA para el veneno de *Bothrops asper.* a 1 µg y 5 µg.	23
Figura 7.	Producción de IgG totales inducidos por el veneno de *Crotalus basiliscus* y *Crotalus basiliscus* de la mezcla durante tres muestras a lo largo del estudio, (14, 28 y 42 días).	26
Figura 8	Producción de anticuerpos de la muestra 1, 2 y 3 de Ba y Ba M a los días 14, 28 y 42 respectivamente.	27
Figura 9.	Producción de anticuerpos clase IgG para BaM, CbM, Ba y Cb durante 3 tomas de muestra una al día 14 otra al día 28 y otra al día 42.	28
Figura 10.	Comportamiento en un gráfico de caja de la producción de anticuerpos IgG contra los venenos de Cb, Cb M y Ba, Ba M.	30

LISTA DE ABREVIATURAS

Ba	*Bothrops asper.*
Ba M	*Bothrops asper* Mezcla.
BCA	Ácido bicinconínico.
BIRMEX	Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S.A. de C.V.
Cb	*Crotalus basiliscus*.
Cb M	*Crotalus basiliscus* Mezcla.
CICUAL	Comité Interno Para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.
CO_2	Bióxido de carbono.
ELISA	*Enzime Linked Immunosorbant Assay.*
Ha	Hipótesis alterna.
Ho	Hipótesis nula.
INH	Instituto Nacional de Higiene.
kDa	kilodalton.
mL	mililitro.
nm	nanómetro.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
PBS-T	Solución amortiguadora de fosfatos adicionada de 0.05 % de Tween 20.
rpm	Revoluciones por minuto.
SSA	Secretaría de Salud.
WHO	Organización Mundial de la Salud, por sus siglas en inglés World Health Organization.

RESUMEN

Introducción. El problema de intoxicación por veneno de serpiente en el mundo es crucial ya que se reportan de 30 000 a 40 000 muertes por año. En México se informa de aproximadamente 3 850 casos anuales. Hasta el momento, el único producto terapéutico eficiente disponible para neutralizar los efectos del envenenamiento por accidentes con serpientes y otros animales ponzoñosos son los antivenenos que contienen los anticuerpos completos o las fracciones F(ab)2 específicas.

Objetivo. Determinar los títulos de anticuerpos IgG totales en tres grupos de ratones al ser inmunizados con venenos de *Crotalus basiliscus y Bothrops asper* inoculados de forma individual y mezclados.

Justificación. Actualmente el esquema de inmunización consiste en mezclar los venenos para inocular los caballos, se propone inocularlos de forma independiente para evitar la necesidad de retirar de las plasmaféresis a equinos que no alcanzan el título suficiente de anticuerpos contra la fracción crotálica a pesar de tener buenos niveles de protección para la fracción botrópica. Esta situación ha sido observada, lo que representa una pérdida en la producción.

Metodología. Se determinó la cantidad de proteínas a los venenos de *Bothrops asper* (Ba) *y Crotalus basiliscus* (Cb). Bajo un esquema de inmunización se administró por vía subcutánea 3 µg de proteína de estos venenos a cada ratón de tres grupos (grupo 1, ratones inmunizados con Ba, grupo 2, ratones inmunizados con Cb y el grupo 3 fue inmunizado con la mezcla de estos venenos). Se determinaron los niveles de anticuerpos por medio de la técnica de ELISA indirecta a los 14, 28 y 42 días. Se realizó un análisis estadístico no paramétrico “Mann-Whitney ”.

Resultados. Se pudo verificar que la mezcla de los venenos aplicados en ratones da un comportamiento equivalente en la producción de anticuerpos para cada veneno. Mientras que cuando se administró de manera individual se observa una diferencia significativa.

Conclusiones. Por los resultados observados se concluye que el veneno de *Crotalus basiliscus* tiene una mejor respuesta inmunológica cuando se administra en combinación con el veneno de *Bothrops asper* que cuando se administra sólo, atribuible entre otras causas a factores no descritos que pudieran tener una reacción cruzada cuando los venenos se inoculan mezclados en ratones.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 MARCO TEÓRICO

1.1.1 HISTORIA DE LOS ANTIVENENOS

En 1888, Roux y Yersin identificaron la toxina diftérica, en el mismo año Faber identificó la toxina tetánica, poco tiempo después, en 1890 Emil Adolf von Behring y Shibasaburo Kitasato reportaron las propiedades protectoras del suero de cobayos inmunizados con las toxinas diftérica y tetánica y sugirieron el uso de estos antisueros para el tratamiento de dichas enfermedades. La seroterapia nace cuando Roux utiliza con éxito la antitoxina de Behring para tratar exitosamente a niños que padecían difteria severa. Con este trabajo, Behring se hace merecedor al primer Premio Nóbel concedido en medicina y fisiología en 1901 [Rojas, 2007].

En 1894, Calmette y Bertrand presentaron sus observaciones sobre las propiedades antitóxicas del suero de animales inmunizados con venenos de cobra y otras serpientes dando inicio a la seroterapia contra venenos. Tres años más tarde, en 1897, Calmette reportó por primera vez el tratamiento exitoso de pacientes con suero antiviperino.

Las experiencias en la producción de sueros hiperinmunes contra venenos de ofidios, en el Instituto (Seroterápico) Butantan de São Paulo, Brasil, motivaron a Carlos de la Peña e Isauro Venzor, en el estado de Durango, México a iniciar en 1926 estudios para elaborar un suero hiperinmune contra el veneno del alacrán (*Centruroides sufusus sufusus*). Con este fin inmunizaron a un caballo administrándole dosis crecientes de veneno, durante tres meses; iniciando con el contenido de veneno en 6/10 partes del telson (glándula) hasta llegar a administrarle el contenido de veneno de 350 telsones. Posteriormente sangraron el caballo, obtuvieron el suero y determinaron su potencia neutralizante para usarlo en personas picadas por alacrán [Monroy, 1961].

A partir de 1930, en México se contó con la producción de un suero polivalente contra los venenos de las especies más peligrosas causantes del accidente ofidico a nivel nacional [Vega-Franco, 2007].

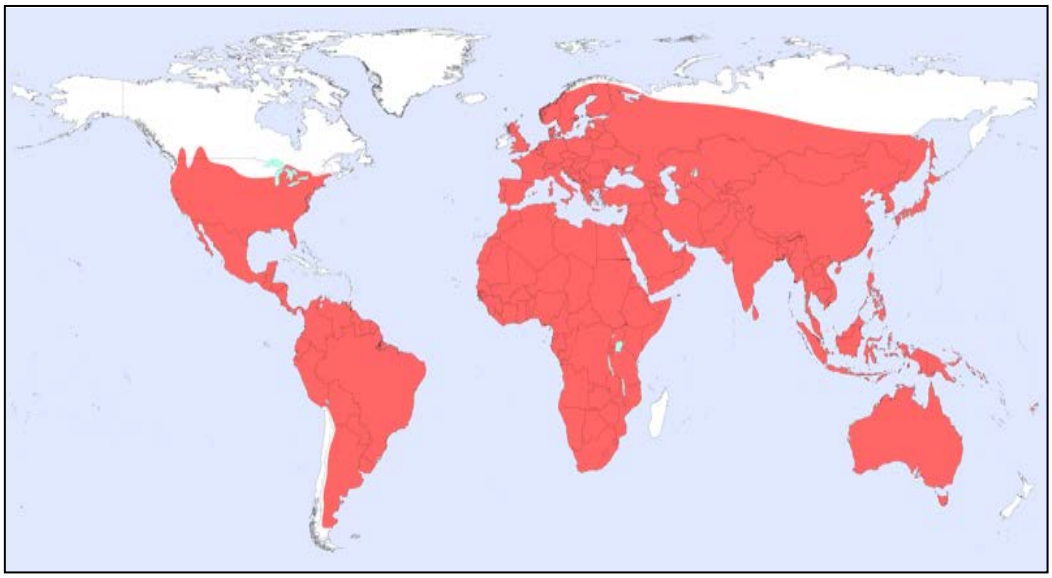
Después de que se reconoció la función de las inmunoglobulinas en la inactivación de los venenos, se comenzó a usar gammaglobulina hiperinmune. Pero aún así, había efectos adversos considerables por las proteínas del suero heterólogo, (mal del suero) por lo que se desarrolló la segunda generación de sueros con globulinas purificadas, obtenidas del suero de equinos inmunizados. Y fue así que se redujeron significativamente los efectos secundarios. Sin embargo esta generación de sueros aún causaba manifestaciones indeseables en algunos casos. Por ello, fue necesario someter las inmunoglobulinas a un proceso de digestión enzimática y separar la fracción Fc, de tal manera que los antivenenos contienen únicamente las fracciones variables de Fab o F(ab´)2, por lo que en 1977 el Dr. Alejandro Alagón sugirió llamarlos faboterápicos [Vega, 2007].

1.1.2 SITUACIÓN MUNDIAL

En el mundo hay cerca de 3 000 especies de serpientes (Figura 1) de las cuales 532 son las que llamamos venenosas y son clasificadas de la siguiente forma: 180 elápidos, 52 hidrófidos, 180 vipéridos y 120 crotálidos [Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2007].

Los responsables de la mayoría de los accidentes con serpientes en América pertenecen a la familia viperidae con más del 90 % de los casos.

Figura 1. Distribución de serpientes venenosas en el mundo [OMS, 2010].



1.1.3 SITUACIÓN EN MÉXICO

En México, debido a sus diversos climas y zonas: neo ártica y neo tropical, con desiertos y selvas que enriquecen la flora y fauna del país, existen tres subfamilias de serpientes: Viperidos, elápidos e hidrófilos, en la tabla 1 se hace mención a las dos primeras.

Tabla 1. Diferentes serpientes que habitan en la República Mexicana [Frayre y col, 2006].

FAMILIA	GÉNEROS	NOMBRE COMÚN
Elapidae	*Pelamis*	Serpientes marinas
	Micruroides *Micrurus*	Coralillos
Viperidae	*Bothrops* *Botriechis* *Porthidium* *Agkistrodon*	Nauyacas Cantiles
Crotálidos	*Crotalus* *Lepidus* *Lachesis* *Molossus* *Polystictus* *Sculatus* *Sistrurus*	Serpientes de cascabel

1.1.4 PRODUCCIÓN DE ANTIVENENOS EN MÉXICO

Hasta el momento, el único producto terapéutico eficiente disponible para neutralizar los efectos del envenenamiento por accidentes con serpientes, alacranes y otros animales ponzoñosos son los antivenenos que contienen los anticuerpos completos o las fracciones $F(ab)_2$ específicas [De Roodt, 2004].

La escasez de antivenenos se ha convertido en un problema crítico de salud a nivel mundial. Por tal motivo, la innovación y optimización de los procesos de producción para obtener una mayor cantidad de antivenenos es fundamental para cubrir la atención a todos los accidentes con estos animales ponzoñosos [OMS, 2010].

Actualmente, los Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S.A. de C.V. (BIRMEX), produce y comercializa los antivenenos: Faboterápico Polivalente Antialacrán y Faboterápico Polivalente Antiviperino. Estos biológicos contienen la fracción $F(ab)_2$ para neutralizar los componentes tóxicos de los venenos de alacranes y serpientes que provocan los mayores índices de accidentes en México [Solano, 2012].

Las mordeduras de serpientes en México son un problema sanitario al que debe prestársele especial atención, en la tabla 2 se describen los casos acumulados en el 2010 y los casos reportados hasta la semana No. 52 del 2011.

Tabla 2. Casos acumulados por mordedura de serpiente en el 2010 y casos reportados hasta la semana 52 del 2011 [Boletín semana 52/ 2011 Secretaría de Salud].

ENTIDAD FEDERATIVA	MORDEDURAS POR SERPIENTE		
	2011 (Semana 52)		2010
	HOMBRES	MUJERES	ACUMULADO
Aguascalientes	7	3	19
Baja California	11	14	17
Baja California Sur	8	3	17
Campeche	36	30	48
Coahuila	11	6	27
Colima	21	21	25
Chiapas	131	70	234
Chihuahua	77	43	102
Distrito Federal	34	11	65
Durango	10	8	46
Guanajuato	56	58	115
Guerrero	141	47	108
Hidalgo	198	68	273
Jalisco	64	27	83
México	90	44	173
Michoacán	59	72	78
Morelos	11	10	25
Nayarit	45	26	62
Nuevo León	41	27	75
Oaxaca	399	188	441
Puebla	178	98	343
Querétaro	18	8	33
Quintana Roo	70	47	79
San Luis Potosí	225	107	317
Sinaloa	37	14	72
Sonora	48	14	78
Tabasco	67	37	122
Tamaulipas	48	41	91
Tlaxcala	58	34	66
Veracruz	268	186	364
Yucatán	55	28	77
Zacatecas	31	6	65
TOTAL	2 553	1 396	3 740

Este problema intensifica su gravedad debido a que el grueso de estos casos ocurren en poblaciones donde es difícil tener acceso a un centro de salud u hospital donde los pacientes pueden ser atendidos oportunamente.

A las serpientes que pertenecen al género *Crotálus* se les conoce comúnmente como cascabeles. A las integrantes del género *Agkistrodon* cantiles, a las *Bothrops* como nauyacas, a las *microrus* y *macruroides* como corales y coralillos respectivamente. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha calculado 40 mil muertes anuales por mordedura de serpiente de estos reptiles en todo el mundo [Russell y Walter, 2000].

En México, la Secretaría de Salud (SSA) tiene registrados en los últimos años un promedio de 3 850 casos, de los cuales la mayoría son por nauyaca común (*Bothrops asper*) y por diferentes especies del género *Crotalus.* [Sotelo 2003].

Ante esta problemática es imperativo abordar nuevas e inmediatas estrategias para asegurar la disponibilidad permanente de antivenenos eficaces y seguros y fortalecer los sistemas de producción de estos tratamientos en todo el mundo [OMS, 2010].

Los géneros *Bothrops y Crotalus* son los principales responsables de accidentes con serpientes en México, por lo que los antivenenos utilizados para el tratamiento de las mordeduras de las mismas debe neutralizar los venenos de estas serpientes [Campbell, Lamar, 2004]. En la figura 2 se muestra la distribución geográfica de las principales serpientes que habitan en la República Mexicana.

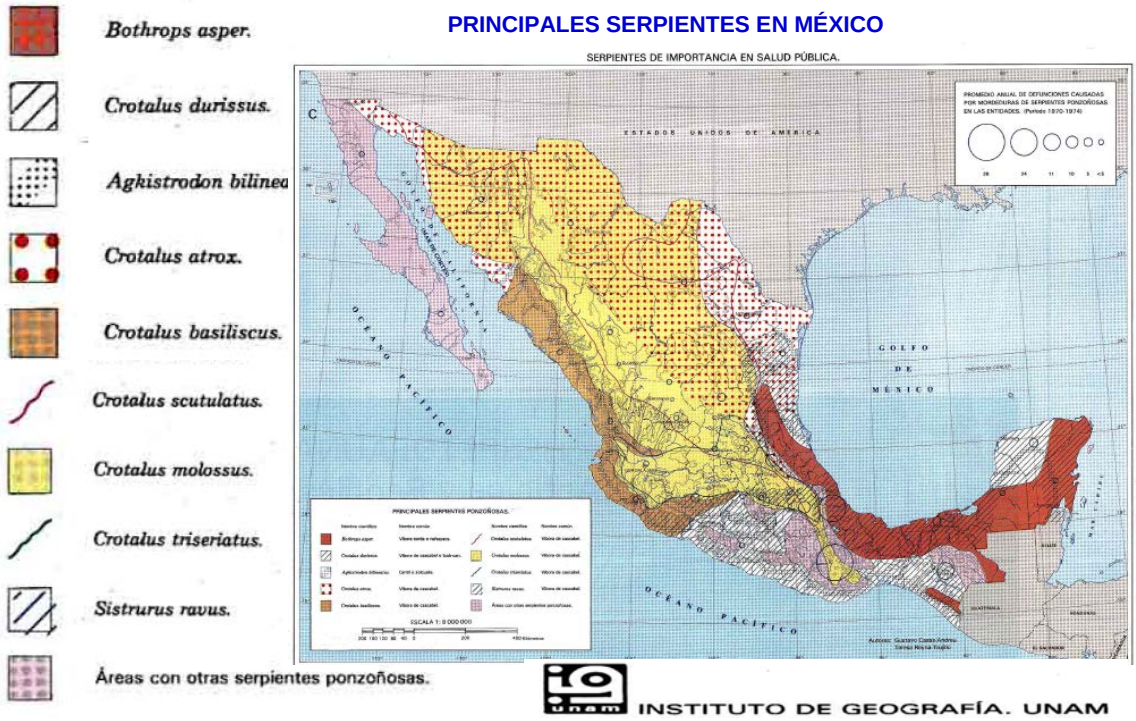


Figura 2. Principales serpientes en México [UNAM, 1991].

En México se conocen unas 700 especies y subespecies de serpientes, de las cuales sólo el 21% posee veneno capaz de ocasionar daños serios al hombre. Las serpientes venenosas de nuestro país están agrupadas en dos principales familias: Elapidae y Viperidae; la primera de ellas incluye a las serpientes marinas (*Pelamis*) y coralillos (*Micruroides* y *Micrurus*); mientras que la familia Viperidae está integrada por las serpientes de cascabel (*Crotalus y Sistrurus*), las nauyacas (*Bothrops, Botriechis, Porthidium*, etc.) y los cantiles (*Agkistrodon*) [Sistema Único de Información Epidemiológica, 2007].

Los venenos de serpientes son mezclas complejas de cientos de proteínas y péptidos cuya función es inmovilizar o matar a las presas al mismo tiempo que inician la digestión de la misma [Menezes, et al., 2006].

Las manifestaciones clínicas del envenenamiento dependen de dos factores principales: la toxicidad intrínseca y la cantidad de veneno inyectada. Existen diversos signos y síntomas presentes durante el envenenamiento de los que se pueden mencionar los siguientes:

- Parálisis flácida,
- Coagulopatías y hemorragias,
- Daño y falla renal,
- Cardiotoxicidad,
- Daño local en el sitio de la mordedura [Kohn, et al., 2006].

De Roodt condujo un estudio en 2004 donde se estudiaron las actividades tóxicas de los venenos de *Bothrops asper, Athropoides nummifer, Agkistrodon billineatus, Crotalus durissus durissus, Crotalus basiliscus, Crotalus scutulatus, Crotalus atrox y Micrurus nigrocinctus*. A los venenos se les realizaron los siguientes estudios: Determinación de la potencia letal, y de las actividades: hemorrágica, necrosante, coagulante en plasma y fibrinógeno, fosfolipásica y fibrinogenolítica. Los venenos de vipéridos mostraron actividades hemorrágicas, necrosante, coagulante sobre plasma, protrombínica, fibrinogenolítica y fosfolipásica importantes. Los venenos de mayor potencia letal fueron los de *Micrurus nigrocinctus y Crotalus scutulatus*, sin embargo el veneno que presentó en general potencias tóxicas mayores fue el de *Bothrops asper*. Las especies de vipéridos pertenecientes a los géneros *Crotalus y Bothrops* pueden encontrarse a lo largo de todo el continente mientras que los otros géneros de esta familia tienen una distribución más limitada: *Lachesis* se encuentra en Sur y Centroamérica, *Agkistrodon y Sistrurus* en Norteamérica y *Athropoides, Bothriopsis, Bothriechis y Porthidium* en Centroamérica y Norte de Sudamérica. En México, si bien no representan uno de los mayores problemas sanitarios, las mordeduras por serpientes venenosas son comunes en determinadas zonas poniendo en peligro la vida de los pacientes. Las principales responsables de los accidentes ofídicos en México son especies de los Géneros *Bothrops* y *Crotalus* [De Roodt y Alagón, 2004].

En México del 2003 a 2007 se registró un total de 18 848 accidentes por mordedura de serpiente; los estados con mayor incidencia por este tipo de lesiones fueron Veracruz, Oaxaca, San Luis Potosí, Hidalgo y Puebla (Oaxaca es el más afectado con un total de 2 266 mordeduras, seguido por Veracruz con 2 231 casos). Esto se debe a las características geográficas y climáticas de dichas regiones, que favorecen una diversidad mayor de ofidios. Las especies que fueron confirmadas como las causantes de los accidentes dentro de estos cinco estados fueron *Crotalus molossus*, *Crotalus atrox, Crotalus durissus, Agkistrodon bilineatus y Bothrops asper* (esta última es la serpiente que más lesiones ocasionó, con 48% de los casos). Existe un predominio del género masculino entre las víctimas, con 67% de los casos, ya que la mayoría de los accidentes ocurren al realizar labores agrícolas. Llama la atención que a pesar de que existen esquemas disponibles para la atención de las víctimas afectadas por mordedura de serpiente venenosa todavía se presentan casos de mortalidad, durante este periodo se registrarón 2 912 muertes que representan 15.44% del total de los accidentes registrados en estos estados. En cuanto al grupo de edad más afectado, los resultados señalan que el mayor riesgo de mordedura para cada año se observó en la población de 25 a 44 años, con 29% de los casos. La región anatómica más afectada, con 72% de los casos correspondió a los miembros inferiores (tobillos y pies) [Salud Pública de México, 2009].

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los géneros *Bothrops y Crotalus* son los principales responsables de accidentes con serpientes en México, por lo que los antivenenos utilizados para el tratamiento de las mordeduras de las mismas debe neutralizar los venenos de estas serpientes [Campbell y Lamar, 2004].

En BIRMEX, el faboterápico polivalente antiviperino se obtiene inmunizando un grupo de caballos con la mezcla de venenos de serpientes de los géneros *Bothrops asper* y *Crotalus basiliscus*. Al final del esquema de inmunización los equinos deben tener buenos títulos de anticuerpos protectores contra ambos géneros y si no es así, el equino se retira de los pasos siguientes de la producción. Esto representa una pérdida en la producción del faboterápico ya que aunque el equino normalmente da buenos títulos de anticuerpos contra la fracción bothrópica en ocasiones la producción se ve condicionada a la fracción crotálica.

Este estudio se realizó en un modelo murino y busca sentar las bases para tener alguna evidencia para resolver la problemática de retirar de la plasmaféresis algunos equinos que no cumplen con los niveles de anticuerpos contra *Crotalus basiliscus* aunque tengan buenos niveles de anticuerpos protectores contra *Bothrops asper*.

Se propuso un esquema de trabajo que involucra tres grupos de ratones para ser inoculados con los venenos, un grupo de ratones se inoculó con *Bothrops asper* (Ba), otro grupo con *Crotalus basiliscus* (Cb) y al tercer grupo se le inoculó la mezcla de los dos venenos. El presente proyecto se realizó en ratones con el propósito de escalarlo posteriormente a caballos.

La pregunta de investigación planteada fue:

¿Cuál es la respuesta en cuanto a producción de anticuerpos en ratones cuando se utilizan esquemas de inmunización con venenos individuales de serpientes del género *Bothrops asper* y del género *Crotalus basiliscus*, comparados con la inmunización de la mezcla de estos venenos?

1.3 JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo hace énfasis en la evaluación de diferentes estrategias de inmunización con los venenos de las serpientes de mayor importancia epidemiológica en México, con la finalidad de encontrar diferencias significativas entre tres esquemas de inmunización, y así buscar la optimización del proceso actual de producción del faboterápico polivalente antiviperino en BIRMEX.

Se reconocen diferencias inmunogénicas en los venenos de *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper* ya que durante el proceso de producción de los antivenenos se requiere aplicar en un mismo equino hasta seis veces más cantidad de veneno de *Crotalus* que de *Bothrops* [Ortega, 2008], y aún así, no se asegura que los niveles de anticuerpos contra *Crotalus* sean suficientemente protectores. Este proyecto se origina de la necesidad de que BIRMEX optimice sus procesos de producción, considerando la posibilidad de modificar la estrategia tradicional de inmunización que consiste en la aplicación de una mezcla de venenos de *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper* en caballos con la intención de producir un antiveneno polivalente (Figura 3).

Se plantea como estrategia alterna de inmunización la aplicación de los venenos sin mezclarlos es decir, de manera individual en grupos de caballos independientes y así se buscaría obtener las siguientes ventajas.

- Evita la competencia inmunológica (Fenómeno Antagónico) entre los antígenos empleados.
- Favorece la maduración de los anticuerpos formados hacia los componentes de un solo veneno.
- Procura un sistema de trabajo menos agresivo para los caballos productores de antivenenos ya que recibirían una cantidad de toxinas significativamente menor al aplicar un solo veneno en vez de dos, como actualmente se realiza.
- Al contar con un sistema de inmunización más racional se puede aspirar a que la vida de los caballos será más larga, cómoda y productiva.

- Evita la necesidad de retirar de la plasmaféresis a equinos que no alcanzan el título suficiente de anticuerpos contra la fracción crotálica a pesar de tener buenos niveles de protección para la fracción bothrópica. Esta situación ha sido observada, lo que representa una pérdida en la producción.

Con este proyecto se pretende sentar las bases y analizar qué tan factible sería el escalamiento a caballos en búsqueda de una mejora en la producción del faboterápico polivalente antiviperino mediante la inoculación de los venenos de forma individual y no mezclados tal como se realiza en otros países productores de antivenenos tales como Brasil, Costa Rica y Perú [Rodríguez, 2009], es decir, destinar un grupo de caballos para inmunizarlos con veneno de *Crotalus basiliscus* y otro grupo de caballos inmunizarlos con veneno de *Bothrops asper.* El proyecto se realizó en un modelo murino y no en caballos por varias razones pero básicamente por optimización de recursos, por ejemplo:

- La cantidad de veneno inoculada a un ratón es mucho menor a la que se usaría al inmunizar un grupo de caballos.
- No se tuvo la cantidad de equinos *naive* suficientes para sustentar un estudio con el soporte estadístico adecuado.
- Es un estudio pionero que tiene como finalidad emprender la búsqueda de nuevas alternativas en los procesos productivos en la obtención de los antivenenos y mejorar la calidad de vida de los equinos.
- Se tiene mejor control en los ratones en cuanto a las condiciones de algunos parámetros que podrían influir en los resultados como son: temperatura, humedad, edad, sexo, raza y alimentación.

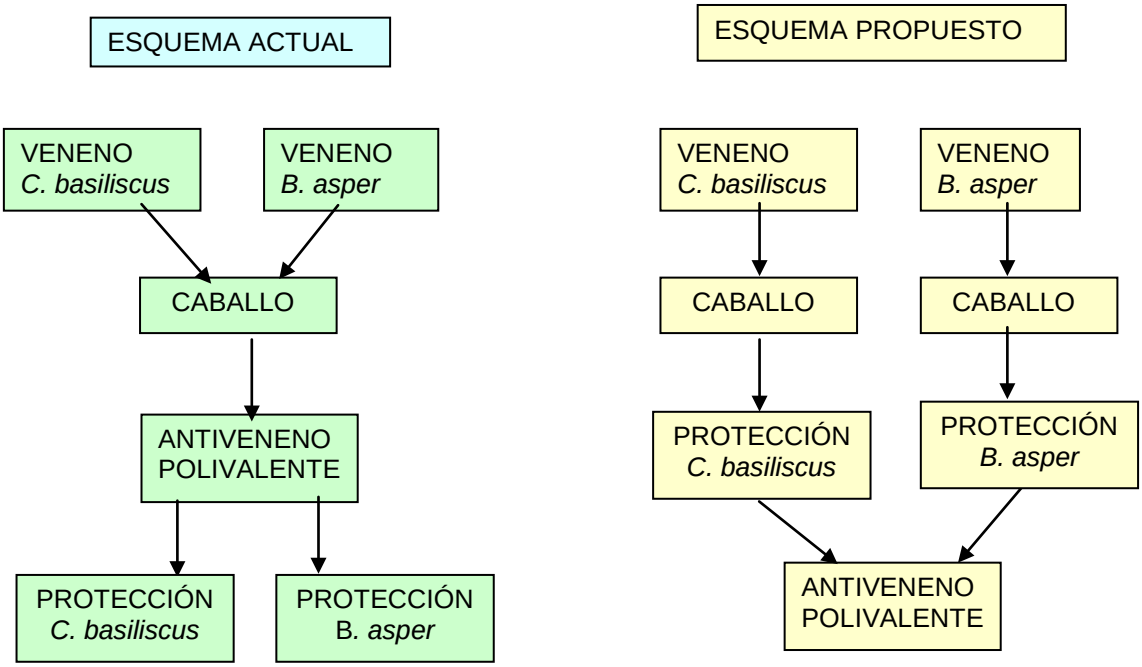


Figura 3. Diagrama de producción del Faboterápico polivalente antiviperino actual y el esquema propuesto.

Para evaluar la efectividad del esquema alternativo de inmunización se utilizó un modelo murino ya que ofrece ventajas como: facilidad de alojamiento, alimentación, cuidados y facilidad de manejo [NOM-062-ZOO-1999]. Todas estas características redundan en un sistema económicamente accesible y confiable. Una vez que se demuestre la ventaja en la utilización del modelo alternativo se propondrá su aplicación directa a los equinos productores de suero antiviperino de BIRMEX, procurando conseguir una mejora en el método de producción de faboterápicos.

1.4 HIPÓTESIS

Ho: La producción de anticuerpos (clase IgG) en ratones NO presenta diferencia cuando se inoculan los venenos de *Crotalus basiliscus y Bothrops asper* de forma individual que cuando se inoculan mezclados.

Ab´s IgG de Ba y Cb Mezclados = Ab´s IgG de Ba + Cb

Ha: La producción de anticuerpos (clase IgG) en ratones es diferente cuando se inoculan los venenos de *Crotalus basiliscus y Bothrops asper* de forma individual que cuando se inoculan mezclados.

Ab´s IgG de Ba y Cb Mezclados ≠ Ab´s IgG de Ba + Cb

1.5 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Comparar la producción de anticuerpos clase IgG totales en un modelo murino empleando diferentes esquemas de inmunización con venenos de *Crotalus basiliscus y Bothrops asper* inoculados de forma individual y mezclados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar un esquema de inmunización utilizando adyuvante de Freund y veneno de serpientes de los géneros *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper* solos y combinados y obtener el antisuero generado en estos animales.

- Determinar la cantidad de antígeno necesaria para la sensibilización en la adaptación de la técnica de ELISA indirecta.

- Evaluar la producción de anticuerpos de clase IgG mediante la técnica de ELISA indirecta en los sueros de los ratones al ser inmunizados con venenos de serpientes de los géneros *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper* de forma individual y mezclados.

- Realizar un estudio estadístico a los resultados (Absorbancias) de los sueros de los ratones al ser inmunizados con venenos de serpientes de los géneros *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper* de forma individual y mezclados.

2. MATERIAL Y METODOS

VENENOS Y MODELO ANIMAL

En la tabla 3 se describen las características de los venenos de *Crotalus basiliscus y Bothrops asper* que fueron utilizados en el presente estudio los cuales fueron generosamente facilitados por la Gerencia de Producción de Sueros de BIRMEX.

Tabla 3. Características de los venenos utilizados.

VENENO	LOTE	REGISTRO	FECHA DE OBTENCIÓN
Bothrops asper	Vba0701	10425	10-NOV-2010
Crotalus basiliscus	Vcb0903	10426	28-OCT-2010

Los ratones fueron proporcionados por la Gerencia de Bioterios de BIRMEX y sus características se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Características del modelo animal utilizado.

CANTIDAD DE RATONES	LOTE	CEPA	SEXO	EDAD PROMEDIO	PESO PROMEDIO
24	01-11	NIH	Hembras	6 semanas	21 g
48	08-11	NIH	Hembras	6 semanas	22 g

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DE LOS VENENOS DE LAS SERPIENTES

Se realizó la determinación de la concentración de proteínas a los venenos de *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper* conforme al procedimiento de BIRMEX el PNOPH228 “Determinación de proteínas por el método del ácido bicinconínico de Smith.” El ácido bicinconínico, sal sódica es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{+1} en medio alcalino este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorear el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino. La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas.

En tubos que contienen concentraciones conocidas, de una proteína estándar (Albúmina sérica bovina) se agregó el reactivo de Smith, incubándose a 37 ºC durante 30 min, determinando la absorbancia en un espectrofotómetro a 562 nm. Los resultados en absorbancia para la curva tipo se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de las absorbancias para la realización de la curva tipo de proteína.

TUBO	PROTEÍNA (µg)	ABSORBANCIA 562 nm	PROMEDIO ABSORBANCIA 562 nm
1	0	0.0618	0.06683
		0.0757	
		0.0630	
2	6.25	0.1692	0.15817
		0.1478	
		0.1575	
3	12.5	0.2249	0.22853
		0.2268	
		0.2339	
4	25	0.2759	0.34890
		0.3806	
		0.3902	
5	37.5	0.5056	0.52290
		0.5206	
		0.5425	
6	50	0.6399	0.65797
		0.6494	
		0.6846	

Los resultados en absorbancia para la determinación de proteína para cada veneno incluyendo el estándar se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Concentración de contenido de proteínas de los venenos de *Crotalus basiliscus y Bothrops asper* y del estándar.

MUESTRA	DILUCIÓN	VOLUMEN µL	ABSORBANCIA 562 nm	PROMEDIO DE ABSORBANCIAS 562 nm	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS mg/mL
Bothrops asper	1:100	100	0.1935	0.191	9.9271
			0.1904		
			0.1888		
Crotalus basiliscus	1:100	100	0.2085	0.210	11.5267
			0.2118		
			0.2084		
Estándar	1:1	100	0.3955	0.401	27.9092
			0.4041		
			0.4036		

El resultado de la curva de los promedios para determinar la concentración de las proteínas contenidas en los venenos de serpientes de *Crotalus basiliscus y Bothrops asper* a una absorbancia de 562 nm se observa en la figura 4. Cabe mencionar que se aplicó regresión lineal a los datos dando una R^2= 0.9771.

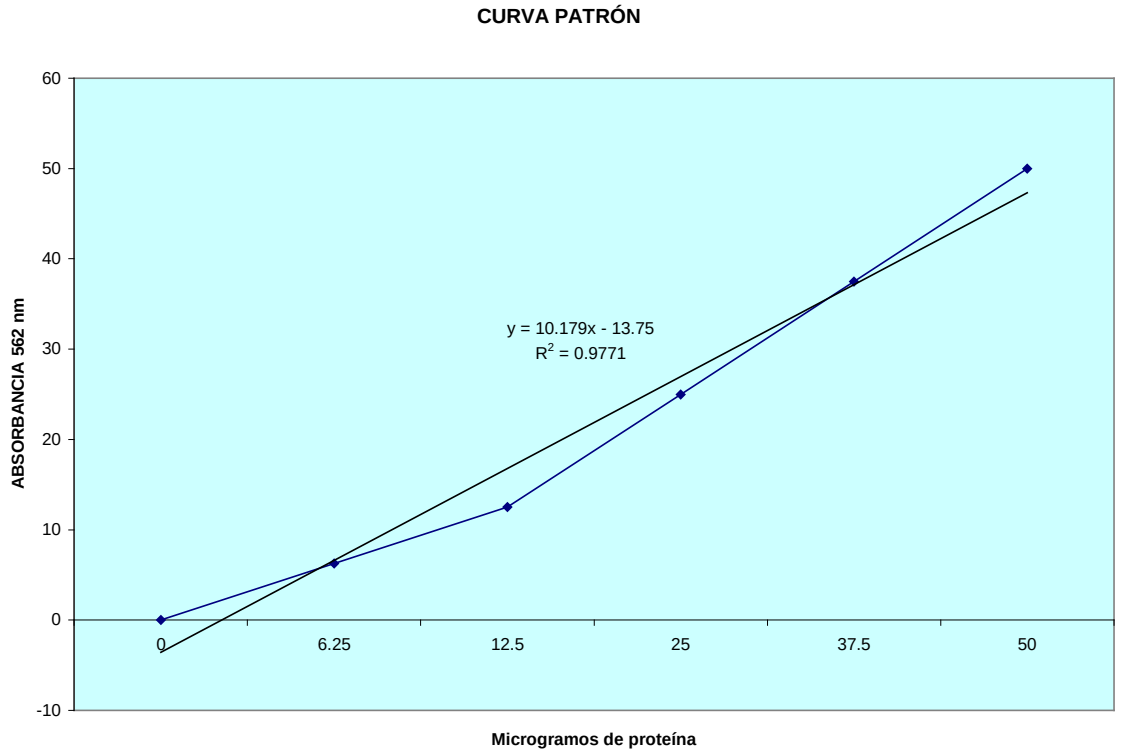


Figura 4. Curva patrón en la determinación de proteínas.

FORMULACIÓN DE LOS INÓCULOS

La preparación de los inóculos se llevó a cabo con los venenos de *Bothrops asper* y *Crotalus basiliscus* y la mezcla de ellos con adyuvante completo e incompleto de Freund y solución salina fisiológica. La formulación para cada grupo se realizó conforme a las cantidades descritas en la tabla 7. De tal manera que cada ratón en estudio pertenecientes al grupo 1 y 2 recibieron 3 µg de proteína del veneno de cada serpiente y los ratones del grupo 3 recibieron ambos venenos (3 µg de proteína de *Bothrops asper* y 3 µg de proteína de *Crotalus basiliscus)*. La preparación se realizó el mismo día que en que se inoculó [Ortega, 2008].

Cabe mencionar que sólo en la preparación del primer inóculo se utilizó adyuvante completo de Freund con la finalidad de estimular al sistema inmunológico del ratón y propiciar la producción de anticuerpos. En las siguientes cinco formulaciones se utilizó adyuvante incompleto de Freund [Ortega, 2008].

Tabla 7. Formulación de los inóculos (cantidades para 10 ratones).

PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS	CANTIDADES
GRUPO 1 Solución salina fisiológica Adyuvante de Freund Veneno de *Bothrops asper*	 500 µL 500 µL 30 µg
GRUPO 2 Solución salina fisiológica Adyuvante de Freund Veneno de *Crotalus basiliscus*	 500 µL 500 µL 30 µg
GRUPO 3 Solución salina fisiológica Adyuvante de Freund Veneno de *Crotalus basiliscus* Veneno *de Bothrops asper*	 500 µL 500 µL 30 µg 30 µg

ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN

La inoculación se realizó simultáneamente a los tres grupos de acuerdo al programa descrito en la tabla 8. Para ello se trabajó dentro del bioterio de ratones del Instituto Nacional de Higiene conforme a lo estipulado en el PNOPO414 H “Uso de roedores para procesos de investigación, producción y control de calidad de biológicos”.

Dentro del bioterio de ratones se trabajó bajo las especificaciones y recomendaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio [NOM-062-ZOO-1999].

Tabla 8. Esquema general de inmunización utilizado para los tres grupos de estudio.

DÍA	INOCULO	MUESTRA	ADYUVANTE
0	1		Completo de Freund
7	2		Incompleto de Freund
14	3	1	Incompleto de Freund
21	4		Incompleto de Freund
28	5	2	Incompleto de Freund
35	6		Incompleto de Freund
42		3	Incompleto de Freund

INOCULACIÓN

A los ratones de los tres grupos se inocularon con 0.1 mL del inóculo por vía subcutánea en el lomo del ratón, utilizando diferentes sitios de inoculación. De acuerdo al esquema propuesto en la tabla 8. Se revisó periódicamente que no tuvieran lesiones, se corroboró el estado de salud de cada uno de los ratones.

TOMA DE MUESTRA SANGUÍNEA

Se tomaron muestras sanguíneas por vía submandibular a los días 14, 28 y 42 en las fechas indicadas en la tabla 8. Las muestras se centrifugaron a 5 000 rpm y el suero se colocó en tubos previamente identificados y se almacenaron a una temperatura de – 20 ºC para su conservación hasta su lectura.

Al término de las pruebas, se dispuso de los animales de experimentación en apego al PNO 04504 H "Baja y eutanasia de animales".

ADAPTACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTA PARA EL VENENO DE SERPIENTE DEL GÉNERO DE *Crotalus basiliscus.*

Determinar la cantidad de veneno para sensibilizar las placas de ELISA con 1 y 5 µg de proteína de veneno tanto de *Bothrops asper* (Ba) como de *Crotalus basiliscus* (Cb). Se usó solución reguladora de carbonatos y se dejó en refrigeración (entre 2 y 8 ºC) durante toda la noche.

Transcurrido el tiempo de sensibilización se realizaron diluciones del suero problema y del anticuerpo secundario a: 1:250, 1:500, 1:1 000, 1:2 000, 1:4 000, 1:8 000, 1:16 000 y 1:32 000 para determinar la cantidad de veneno a usar en la técnica de ELISA indirecta.

En la Figura 5 se observa una gran similitud en el comportamiento de las lecturas al utilizar 1 ó 5 µg de proteína del veneno de Cb decidiéndose utilizar 1 µg de proteína para la optimización de este recurso. Utilizando diferentes diluciones del suero problema y del anticuerpo secundario se tomó la decisión de usar la dilución a 1:4 000, ya que a ésta concentración se observa una cercanía a la absorbancia 1.

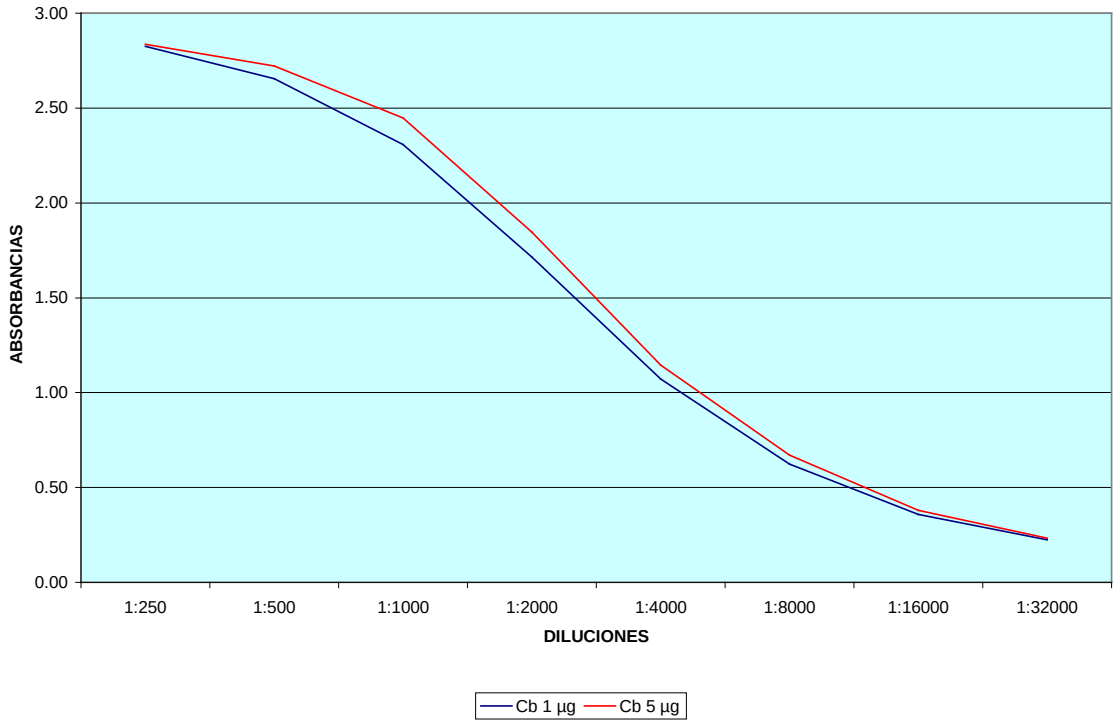


Figura 5. Cantidad de antígeno (1 y 5 microgramos) a diferentes diluciones para la adaptación de la técnica de ELISA indirecta para el veneno de *Crotalus basiliscus*.

ADAPTACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTA PARA EL VENENO DE SERPIENTE DEL GÉNERO DE *Bothrops asper.*

En la figura 6 se observa una gran similitud en el comportamiento de las lecturas al utilizar 1 ó 5 µg de proteína del veneno de Ba por lo cual se decidió utilizar 1 µg de proteína para la optimización de éste recurso; a una dilución de 1:4 000 ya que a esta dilución a lo igual que Cb se observa una cercanía a la absorbancia 1.

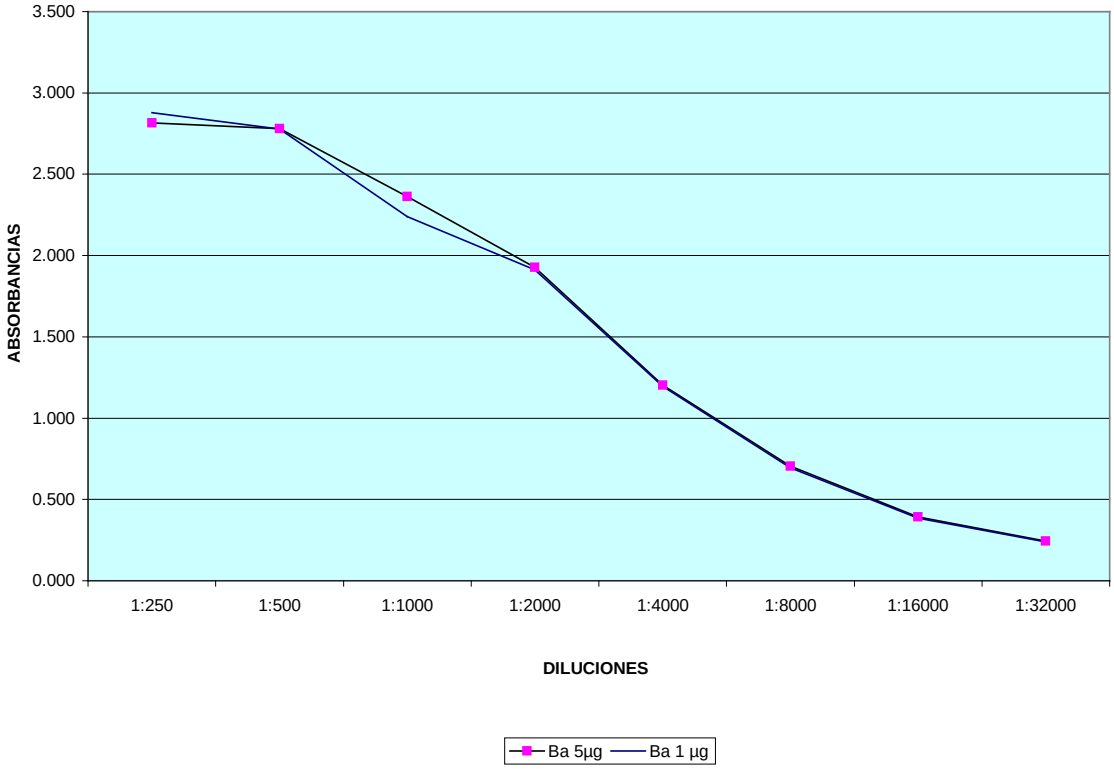


Figura 6. Cantidad de antígeno (1 y 5 microgramos) a diferentes diluciones para la adaptación de la técnica de ELISA indirecta para el veneno de *Bothrops asper*.

DETERMINACIÓN DE LOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS CLASE IgG TOTALES POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE ELISA INDIRECTA.

Se adaptó una técnica de ELISA indirecta para la determinación de los anticuerpos contra los venenos de serpientes de los géneros *Bothrops asper y Crotalus basiliscus,* obtenidos mediante tres variantes en las inmunizaciones del estudio [Ortega, 2008].

Los pozos de ELISA se sensibilizaron con 1 µg de proteína de veneno de *Bothrops asper* (Ba) y otros pozos fueros sensibilizados con la misma cantidad de proteína de *Crotalus basiliscus* (Cb) en solución reguladora de carbonatos permitiendo la sensibilización durante toda la noche en refrigeración. Al día siguiente el exceso de veneno se retiró mediante cinco lavados con 100 µL por pozo de PBS-T. A continuación se adicionó 150 µL en cada pozo de leche descremada en PBS como bloqueador y se incubó a una temperatura de 37 ºC durante 1 hora. Pasado este tiempo se retiró el exceso mediante cinco lavados

con 100 µL por pozo de PBS-T. Como siguiente paso se adicionó a cada pozo 100 µL de las diluciones del suero problema en PBS-T (Anticuerpo primario); 1:4 000, 1:8 000, 1: 16 000 y 1:32 000 y incubando a una temperatura de 37 ºC durante 1 hora. Pasado este tiempo se procedió a realizar cinco lavados con 100 µL por pozo de PBS-T. Enseguida se adicionó a cada pozo 100 µL del anticuerpo secundario en solución de bloqueo (anti-IgG de ratón elaborado en cabra marcado con peroxidasa marca sigma lote A8924) a una dilución de 1: 1 000 y también se adicionó 100 µL a cada pozo de sustrato (Orto-fenilendiamina en presencia de peróxido de hidrógeno en solución reguladora de citrato fosfato) y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min. teniendo la precaución de protegerlo de la luz.

La reacción se detuvo con 50 µL por pozo de ácido sulfúrico 2 M y en seguida se realizó la lectura en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 492 nm. [Ortega, 2008].

CONTROLES

Durante todas las realizaciones de la técnica de ELISA se corrieron cinco controles los cuales se describen a continuación:

1.- Pozos a los que se les adicionó el antígeno, el conjugado y el sustrato pero no el suero problema.

2.- Pozos a los que se les adicionó el conjugado y el sustrato pero no el antígeno ni el suero problema.

3.- Pozos a los que se les adicionó el antígeno y el sustrato pero no el conjugado ni el suero problema.

4 Pozos a los que se les adicionó el sustrato pero no el conjugado ni el antígeno ni el suero problema.

5.- Pozos a los que se les adicionó el sustrato, conjugado y el suero problema pero no el antígeno.

Para realizar de manera segura y humanitaria las inoculaciones y toma de muestras de los ratones, se estableció un programa de capacitación en el bioterio de ratones del Instituto Nacional de Higiene, donde semanalmente se realizaron prácticas para efectuar las inoculaciones vía subcutánea y toma de muestra sanguínea por diferentes vías con la intención de adquirir la pericia suficiente a fin de efectuar estas acciones con el mínimo riesgo posible. Cabe mencionar que el manejo de los ratones (confinamientos o encierros primarios alimentación y cuidados) se realizó en base a la NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.”

3. RESULTADOS

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CLASE IgG TOTALES EN EL SUERO DE RATONES INMUNIZADOS CON *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper.*

Los resultados de los sueros problema a los 14, 28 y 42 días con respecto a la cantidad de anticuerpos clase IgG totales, tanto para las muestras de sangre de los ratones que fueron inoculados con veneno de serpiente de *Crotalus basiliscus* (Cb), como las muestras de sangre de los ratones que se inocularon con veneno de serpiente de *Bothrops asper* (Ba), se muestran en las figuras 7 y 8 respectivamente. Para el caso de *Crotalus basiliscus* se observa que se va incrementando la producción de anticuerpos conforme aumenta el tiempo y número de inoculaciones a los ratones. El mismo fenómeno se observa para Ba. Con la diferencia de que *Bothrops asper* mezclado (BaM) tuvo una ligera disminución en la producción de anticuerpos en comparación con Ba (Figura 8).

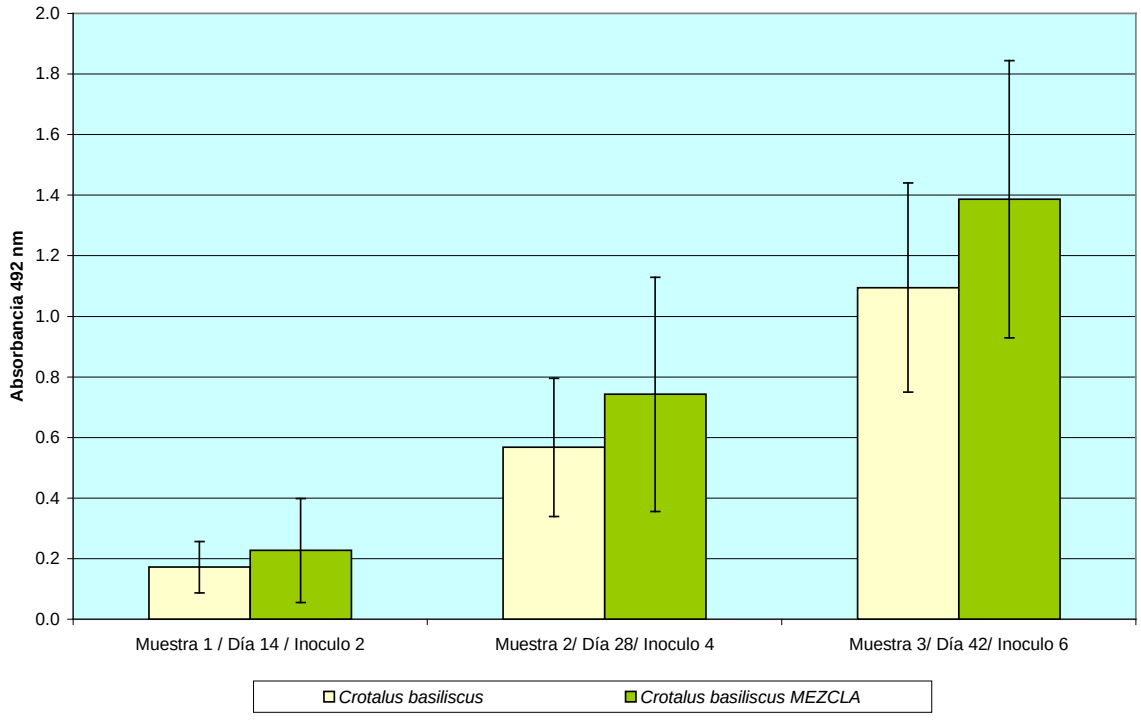


Figura 7. Producción de IgG totales inducidos por el veneno de *Crotalus basiliscus* y *Crotalus basiliscus* de la mezcla durante tres muestras a lo largo del estudio, (14, 28 y 42 días).

Se observó como la cantidad de anticuerpos se fue incrementando en medida que transcurrió el tiempo y el número de inoculaciones a los ratones. Las muestras se tomaron a los 14, 28 y 42 días. Se observó en las tres muestras que Cb M presenta un incremento con respecto a Cb.

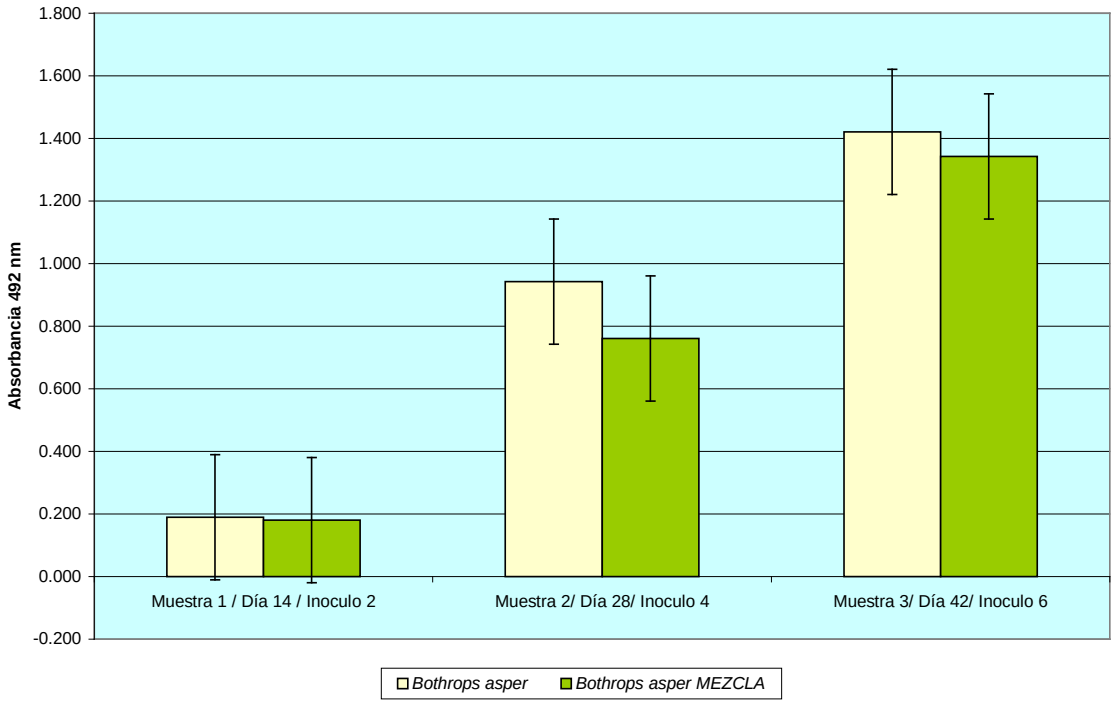


Figura 8. Producción de anticuerpos de la muestra 1, 2 y 3 de Ba y Ba M a los días 14, 28 y 42 respectivamente.

Se observó cómo la cantidad de anticuerpos se va incrementando. La segunda muestra en comparación con la primera y la tercera en comparación con la segunda muestra (14, 28 y 42 días respectivamente). La producción de anticuerpos para Ba mostró un ligero incremento en las tres muestras en comparación con Ba M. El estudio estadístico que se aplicó a los datos obtenidos se concentran en la muestra tres tanto para Ba-BaM como para Cb-CbM, ya que es después del inóculo seis donde se observa la mayor cantidad de anticuerpos producidos en los ratones a lo largo del estudio.

Observando la figura 9, en la que se resumen todos los resultados del estudio se puede apreciar que en la muestra 1 existe una gran similitud en la producción de anticuerpos para Cb, Ba, Cb M y Ba M. En la segunda muestra se observó

que la cantidad de anticuerpos es muy similar para CbM y BaM en comparación con Ba y Cb, en esta misma muestra se visualiza cómo la cantidad de anticuerpos producidos por Cb es menor que CbM y BaM pero la cantidad de anticuerpos es todavía menor en comparación con Ba.

En la tercer muestra (figura 9) los resultados muestran un incremento en la producción de anticuerpos los datos obtenidos por Ba, BaM y CbM en comparación con Cb, lo cual es observado desde la muestra 2 hasta la muestra 3.

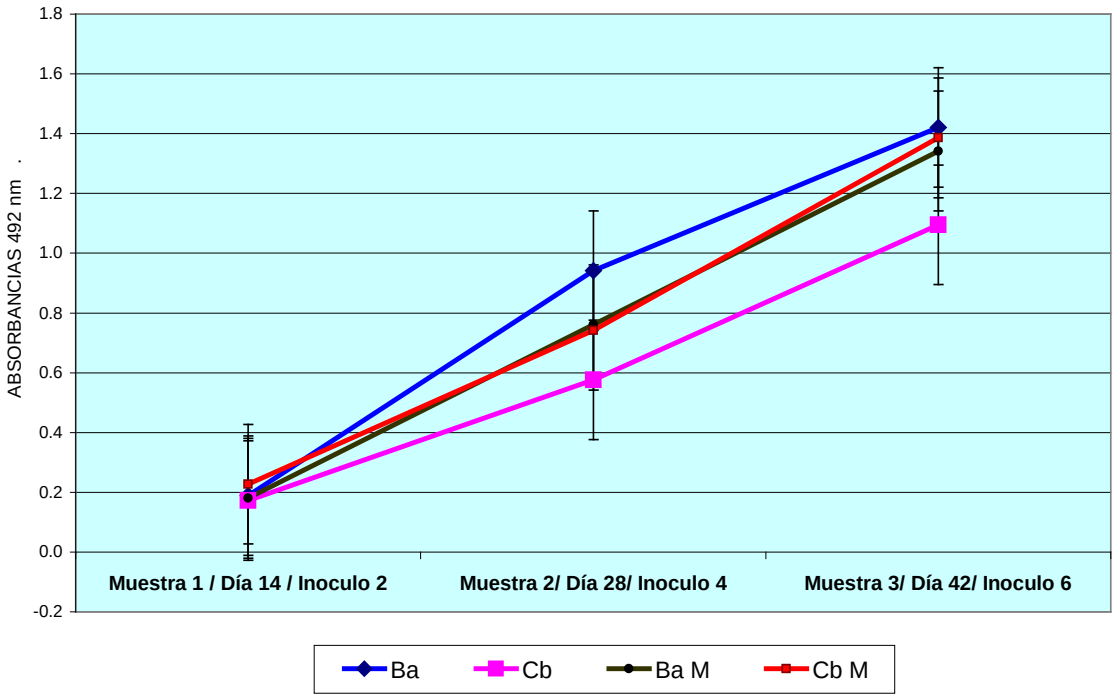


Figura 9. Producción de anticuerpos clase IgG para BaM, CbM, Ba y Cb durante 3 tomas de muestra una al día 14 otra al día 28 y otra al día 42.

En esta figura se observa como a lo largo de las tres muestras (14, 28 y 42 días) la cantidad de anticuerpos se va incrementado conforme se incrementa el número de inóculos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un estudio estadístico descriptivo el cual dió un panorama general del comportamiento de los datos obtenidos y que marca las directrices conclusivas en torno a los objetivos y a la hipótesis. En la tabla 9 se describen los valores obtenidos para la media como medida de tendencia central y la desviación estándar como medida de dispersión.

Tabla 9. Estadísticos descriptivos para el estudio de Ba-BaM y de Cb-Cb M.

GRUPO DE ESTUDIO	N	MEDIA	DESVIACIÓN ESTANDAR
Ba	40	1.4205	0.54493
Cb	40	1.0949	0.34560
BaM	36	1.3421	0.49311
CbM		1.3860	0.45754

Se realizó una gráfica de caja donde se observa un panorama general (figura 10) incluyendo los cuatro resultados en cuanto a la producción de anticuerpos clase IgG de ratones al ser estimulados con veneno de serpientes de Cb, Ba, (inoculación de los venenos de forma individual) y CbM, BaM (inoculación de los venenos mezclados).

Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov a los datos para determinar si nuestra variable se distribuye en forma normal.

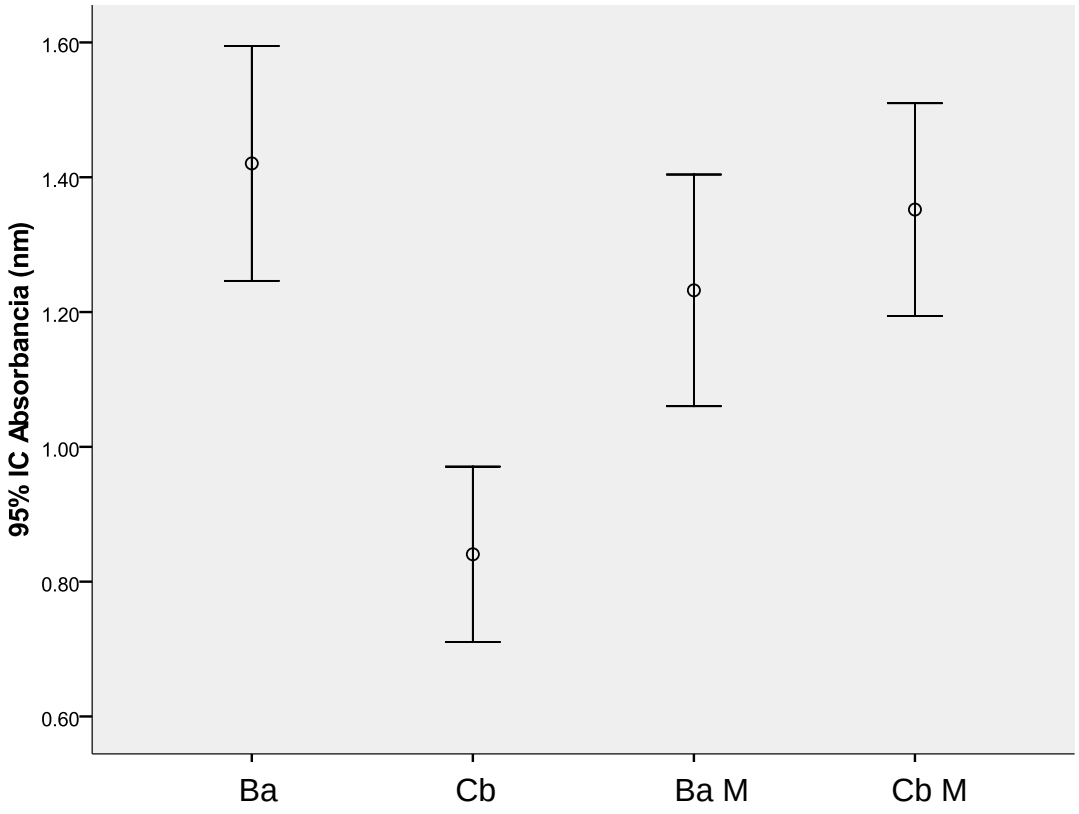


Figura 10. Comportamiento en un gráfico de caja de la producción de anticuerpos IgG contra los venenos de Cb, Cb M y Ba, Ba M.

En este gráfico de caja se representa el comportamiento en cuanto a la producción de anticuerpos de Ba, Cb y Ba M, Cb M. Se observa que existe una diferencia aparente entre Cb y Cb M; mientras que para Ba y Ba M no observa esta diferencia.

Se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov con un intervalo de confianza del 95% para determinar si la variable se distribuye en forma normal, los resultados de esta prueba estadística se describen en la tabla 10. A la luz de los resultados obtenidos se observa que BaM y CbM se distribuyen de una forma normal a diferencia de Cb y Ba, por lo que es necesario utilizar un ensayo no paramétrico “Kruskal-Wallis” esta prueba estadística fue seleccionada por dos motivos:

a) Se usa para grupos con distribuciones no paramétricas (no gaussianas).
b) Se usa para grupos que tengan más de 50 valores.

Tabla 10. Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para determinación de los grupos de trabajo.

GRUPO	Kolmogorov-Smirnov
Ba	0.2 *
Ba M	0.001
Cb	0.2 *
Cb M	0.004

* Este es un límite inferior de la significación verdadera

Los resultados de la prueba estadística Kruskal-Wallis se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Prueba estadística de Kruskal-Wallis y prueba de Mann-Whitney.

GRUPOS DE ESTUDIO	Kruskal-Wallis p	Mann-Whitney p
Ba	0.03	0.51
BaM		
Cb		0.01
CbM		

El valor de p para la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis es de 0.03, lo cual nos indica que sí existe una diferencia significativa entre los grupos de estudio. Posteriormente se aplicó una prueba estadística adicional para determinar entre qué grupos de estudio se encuentra la diferencia; para esto se usó la prueba de “Mann-Whitney” la cual indico que la diferencia significativa (p=0.01) esta en los grupos de estudio de Cb y CbM.

4. DISCUSIÓN

Las mordeduras de serpientes afectan la vida de 4.5 millones de personas en el mundo, dañan a 2.7 millones y causan la muerte de 125 000 personas. Se trata de una afección, que en pleno siglo XXI se sigue manejando de manera negligente.

La mayor cantidad de casos se presenta en los trópicos, donde muchas naciones permanecen en vías de desarrollo o padecen pobreza por gobiernos y conflictos sociales, carecen de recursos, padecen altos índices de enfermedades y falta de alimentos además de que por las condiciones sociales actuales, el hombre en su afán de urbanización, ha invadido los hábitats naturales de estos animales.

Las mordeduras de serpientes se encuentran subestimadas, ignoradas y no se les ha dado la importancia debida desde hace muchos años. Estos accidentes, comunes en las áreas rurales de muchos países tropicales en vías de desarrollo, afectan principalmente a niños y trabajadores agrícolas quienes carecen de voz y representación eficiente que canalicen y hagan escuchar sus demandas y necesidades.

Las intoxicaciones causadas por las mordeduras de serpientes se tratan adecuadamente con los sueros hiperinmunes o antivenenos cuya eficiencia ha sido bien demostrada, los cuales deben encontrarse en donde más se necesiten y que el personal médico esté bien capacitado y calificado en su uso.

La Organización Mundial de la Salud, reconoce la necesidad de impulsar los sistemas de producción de antivenenos a nivel mundial con el fin de hacerlos más eficientes y satisfacer la demanda de estos productos en las regiones donde más se necesitan.

Una de las limitaciones técnicas más importantes que frenan la producción de antivenenos es la baja inmunogenicidad de algunos venenos, como es el caso de *Crotalus basiliscus.*

El suero antiviperino se prepara de manera tradicional utilizando la mezcla de los venenos de *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper* aplicados a equinos en dosis de potencia ascendentes con la finalidad de generar una respuesta inmune humoral suficiente para neutralizar los efectos de los venenos que le dieron origen.

Hasta el momento en la literatura consultada no hay reportes que mencionen estudios relacionados a la producción de antivenenos utilizando cualquier modelo animal e inocularlos con venenos mezclados ó inoculando un sólo veneno del género *Bothrops asper y Crotalus basiliscus*. Ya que cada país fabrica sus antídotos en correspondencia con los tipos de serpiente que predominan en él.

Una manera de mejorar el sistema de producción de suero antiviperino es a través del estudio y comparación de diferentes esquemas de inmunización con la finalidad de conocer si la aplicación de venenos individuales en animales resulta en mejores títulos de anticuerpos que la mezcla de ellos como se realiza de manera tradicional en BIRMEX. En el presente trabajo se compararon tres esquemas de inmunización que involucran el uso individual de veneno de *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper* aplicados a grupos independientes de ratones y la mezcla de ambos a un tercer grupo de ratones.

Cada uno de los esquemas de inmunización se aplicó para poder establecer su capacidad de inducir una eficiente respuesta inmune humoral en ratones. Se apreciaron diferentes respuestas dependiendo del esquema de inmunización utilizado, es decir, al aplicar los venenos de manera independiente o mezclados; dichas respuestas fueron demostradas en los niveles de anticuerpos de clase IgG totales.

De manera general, podemos decir que, tanto los esquemas de inmunización con venenos independientes como el esquema con los venenos mezclados generaron un incremento significativo de los títulos de anticuerpos conforme avanzaba el número de inmunizaciones hasta alcanzar el máximo título después de seis inóculos.

Sin embargo, existen aspectos particulares para cada veneno ya que al comparar el título de anticuerpos de los diferentes esquemas al final estos en el día 42, se obtuvo que el título de anticuerpos para *Crotalus basiliscus* resultó ser menor cuando se aplica solo a los ratones que cuando se aplica mezclado con *Bothrops asper* (figura 9). Esta diferencia es estadísticamente significativa con una $p < 0.05$.

En contraste, la respuesta hacia el veneno de *Bothrops asper* muestra una tendencia hacia el incremento (figura 9), sin ser estadísticamente significativa ($p > 0.05$), cuando se aplica solo que cuando se aplica mezclado con el veneno de *Crotalus basiliscus.*

Lo anterior nos sugiere que el uso de un esquema de inmunización usando venenos de manera individual no sería lo más adecuado en nuestro modelo de ratón, al menos para el caso de *C. basiliscus* pues este presentó títulos menores y aunque el título para *B. asper* es similar si se usa de manera individual o como mezcla, la aplicación simultánea del veneno de *C. basiliscus* junto con el veneno de *B. asper* en el inóculo hace que se presente un ligero aumento del título de anticuerpos, lo cual pudiera explicarse por una reactividad cruzada.

Actualmente en la producción de sueros antiviperinos en BIRMEX se tiene que en el plasma de caballos inmunizados con la mezcla de venenos de las especies aquí estudiadas, el contenido de anticuerpos expresado como DL_{50} (capacidad neutralizante) es menor cuando se mide para la fracción crotálica en comparación con la fracción botrópica, sin embargo como se mencionó al principio esto es usando una mezcla de venenos como inóculo, ahora en base a nuestros resultados el uso del veneno de *C. basiliscus* individual muestra un menor título de anticuerpos que si se usa junto con el veneno de *B. asper*; si

hacemos la suposición que podría probablemente presentarse la misma situación en el modelo de caballo (especie usada en el proceso de BIRMEX) los títulos para *C. basiliscus* o bien la capacidad neutralizante daría aún menor, lo que nos indica que el uso de la mezcla de veneno produce una respuesta inmune efectiva reflejada en el aumento del título de anticuerpos y por lo tanto en la neutralización de venenos de ambas especies.

Por otro lado se demostró en un ensayo realizado en este estudio (resultados no mostrados) que el suero de ratón que fue inmunizado con veneno de *B. asper* reconoce proteínas presentes en el veneno de *C. basiliscus* en mayor cantidad que de las que el suero de *C. basiliscus* reconoce en el veneno de *B. asper*.

Lo anterior no es raro pues se ha reportado la similitud antigénica entre toxinas de especies de serpientes genéticamente relacionadas, y por lo tanto los sueros antiviperinos pueden neutralizar venenos que no han sido usados en esquemas de inmunización.

Ortega 2008, determinó la cantidad de veneno a utilizar para inmunizar a ratones (0.3 µg de proteína por ratón) siendo esta cantidad la idónea para estimular el sistema inmunológico en el ratón respondiendo así con la producción de IgG con el menor daño posible para el ratón.

Este tipo de estudio es importante para establecer si el inoculo usado para inmunización de los caballos requiere incluir una mezcla de venenos o veneno individual.

En relación al estudio estadístico para este ensayo podemos mencionar que el comportamiento de los datos (absorbancias) es muy variado ya que los valores obtenidos de Ba y Ba M tienen un comportamiento normal pero Cb y Cb M no presentan un comportamiento gaussiano. Para éste análisis se realiza la prueba de Kruskal-Wallis la cual nos indica que efectivamente existe una diferencia significativa entre los grupos de estudio, y para saber que grupo es, se recurre a otra herramienta estadística “prueba de Mann-Whitney” en la cual se observa que sí existe una diferencia significativa con un valor de p=0.01 cuando se

inmunizan los ratones con veneno de serpiente del género *Crotalus basiliscus* y *Crotalus basiliscus* mezclado, por lo tanto no se acepta Ho.

Los resultados de la prueba estadística de Mann-Whitney dio un valor de p de 0.51 para Ba comparado con BaM, esto nos indica que no hay diferencia significativa entre estos métodos de inmunización.

Solano en 2012 demostró que la capacidad neutralizante de un faboterápico experimental contra el efecto letal de *B. asper* es >1547.92 mientras que la protección que confiere el mismo faboterápico contra *C. basiliscus*, es >858.26 lo cual confirma que *B. asper* tiene mayor capacidad inmunogénica

El mayor título de anticuerpos que presenta *B. asper* en este estudio se pudiera explicar a que en patrones electroforéticos en una dimensión realizados para venenos de estas especies, *B. asper* presentó mayor cantidad de bandas con respecto a *C. basiliscus*, es decir, en el veneno de *B. asper* están presentes proteínas que no lo están en *C. basiliscus*, pero no sabemos si este mayor título pueda estar dado por estas proteínas o que las proteínas contenidas del veneno de *B. asper* sean más inmunogénicas, se ha reportado que muchas proteínas del veneno no son tóxicas y muchas de bajo peso molecular son altamente tóxicas pero menos inmunogénas. En consecuencia, la relación dosis-eficacia de antivenenos se ve afectada por la presencia de anticuerpos contra moléculas no tóxicas y la falta de anticuerpos neutralizantes para toxinas de bajo peso molecular [Calvete, 2009].

Actualmente se sabe que el veneno de estas serpientes contienen proteínas que pertenecen al menos a ocho familias entre estas: metaloproteasas, serina proteinasas, proteínas C tipo lectinas, L-amino acido oxidasa, desintegrinas, fragmento DC, proteína secretora rica en cisteína y fosfolipasa A2. Sin embargo, aún no se conoce detalladamente la composición del veneno de *C. basiliscus* no así para *B. asper*.

En un estudio de proteómica de venenos se compararon el porcentaje total de proteínas de venenos entre especies de *B. asper* y *C. atrox* donde para la fosfolipasa A2 y serina proteasas la concentración es similar con *C. atrox* y menor para L-amino acido oxidasa y metaloproteasas, donde las metaloproteasas juegan un papel importante en actividades biológicas como desfibrinogenante y coagulante.

También se menciona que estas proteínas son las que originan una mejor respuesta, ya que son potentes estimuladoras de las células T donde es sabido que las proteínas de alto peso molecular frecuentemente resultan buenos inmunógenos; sin embargo, existen moléculas grandes poco complejas y consecuentemente menos potentes. Por el contrario, otras de menor tamaño pero con gran complejidad estructural son más efectivas, el peso molecular de las proteínas pertenecientes a las familias aquí mencionadas oscila entre: 15-30 kDa para fosfolipasa A_2, 20-70 kDa metaloproteasas, 25-30 kDa serina proteasas, 125 kDa L-amino acido oxidasa esto para la especie *B. asper* [Angulo, 2009].

Por otro lado en un artículo se reportó que la baja potencia para algunas especies de *Crotalus* es debido a que el veneno de algunas *Crotalus* (*Crotalus durissus terrificus*, *C.d. cumanensis*) poseen una neurotoxina miotóxica (crotoxina) muy específica haciendo que los antivenenos no presenten títulos neutralizantes adecuados. Lo cual podría explicar los resultados en este estudio [Otero, 2001].

En un artículo se analizó un antiveneno bothrópico-crotálico, se menciona que es una mezcla inmunogénica debido a que posee no solo veneno de *Bothrops* sino también de *C. d. terrificus*, cuya fosfolipasa (crotoxina) aunque cruza inmunoquímicamente con las fosfolipasas de las *Bothrops* es muy diferente a la mayoría de estas, describiéndose una mejor neutralización de la actividad fosfolipasa de los venenos bothrópicos por los antivenenos específicos [de Roodt, 2006].

También se ha visto que *C. simus* es abundante en metaloproteasa y pobre en la neurotoxina dimérica fosfolipasa A2 complejo “crotoxina” pero *C. durissus* presenta bajas cantidades de metaloproteinasas y alta concentración de crotoxina por lo tanto tiene alta toxicidad y provoca diferente fisiopatología comparada con el veneno de *C. simas* [Gutiérrez, 2011].

Con lo anterior podemos decir que al presentar similitud evolutiva entre diferentes Crotalus, el veneno de *Crotalus basiliscus* podría contener baja cantidad de metaloproteasa como el caso de *C. atrox*, además la presencia de una crotoxina específica provocaría los bajos títulos.

Finalmente queda el cuestionamiento si la neutralización del suero antiviperino hacia los venenos de ambas especies pudiera estar dada principalmente por el suero de *B. asper.*

5. CONCLUSIONES

- ✓ En base a los resultados se concluye que pudiera existir una sustancia no descrita hasta el momento (molécula o proteína) en el veneno de *Bothrops asper* que desencadena una reacción cruzada cuando se inocula mezclado con *Crotalus basiliscus* en ratones.

- ✓ Con fundamento a los resultados del análisis estadístico NO se acepta Ho ya que SÍ se encontraron diferencias significativas entre inocular veneno de serpientes del género *Crotalus basiliscus* sólo *y Crotalus basiliscus* mezclado con *Bothrops asper* en un modelo murino.

- ✓ La técnica de ELISA indirecta es útil para la determinación de IgG contra los venenos estudiados.

- ✓ Se aprecia una tendencia hacia el incremento de la producción de IgG cuando se utiliza el veneno de *Crotalus basiliscus mezclado* que cuando se aplica sólo.

- ✓ No hay diferencia aparente entre aplicar veneno de *Bothrops asper* de forma individual que cuando se aplica mezclado con *Crotalus basiliscus* en un modelo murino.

6. PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar pruebas de western blot en una y dos dimensiones encaminadas a buscar y purificar una sustancia no descrita hasta el momento (molécula o proteína) del veneno de *Bothrops asper* la cual esta propoiciando una reacción cruzada cuando se inocula mezclado con *Crotalus basiliscus* en ratones.

- ✓ Con base en los efectos de adyuvante de *Bothrops asper* con respecto a *Crotalus basiliscus* se propone que a esta proteína o conjunto de proteínas se le realicen estudios para poderse utilizar como adyuvante en la formulación de vacunas o medicamentos.

- ✓ Con base en los resultados del presente estudio se propone un escalamiento en caballos.

- ✓ Se propone la técnica de ELISA indirecta como una prueba de control de calida alterna para evidenciar la adecuada producción de anticuerpos de los equinos durante los esquemas de inmunización.

- ✓ Realizar las pruebas de protección con el suero problema para determinar si los anticuerpos producidos son protectores.

- ✓ Se propone este tipo de estudio para la posibilidad de producir faboterápicos monovalente antiviperino en relación a las diferentes especies y géneros de cada uno de los Estados de la República Mexicana.

- ✓ Con base en los resultados obtenidos se sugiere inocular ratones con venenos de *B. asper* y llevar a cabo un análisis mediante la técnica de wenstern blot para determinar si existe protección cruzada contra el veneno de otras especies ya que en este estudio se demostró que Ba es

un excelente inmunógeno aun sin mezclarlo con el veneno de *C. basiliscus.*

- ✓ Determinar capacidad neutralizante de sueros inmunizados con antivenenos orientado hacia las actividades biológicas de los venenos como hemorrágica, necrosante, coagulante y desfibrinogenizante.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Angulo Y, Lomonte, 2009. B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake Bothrops asper.. Toxicon 54, 949–957.

Barraviera B, Sartori A, Pereira D, Kaneno R, Peracoli S. 1996. Use of na ELISA ASSAY to evaluate venom, antivenom, IgG and IgM human antibody levels in serum and cerebrospinal fluid from patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* in Brazil. Journal of Venomous Animals and Toxins. Vol. 2 n. Botucatu, 2-4.

Calvete J, Sanz E, Angulo Y, Lomonte B, Gutierrez J, 2009. Venoms, venomics, antivenomics. FEBS Letters 583 1736-1743.

Campbell J, Lamar W, 2004. The venomous reptiles of the western hemisphere. Cornell univ. . México herpetology. Press Ithaca, New York, 870 pp.

De Roodt, Alagón A, 2004. toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. Gaceta médica de México.

De Roodt, Rafael A, 2006. Características biológicas e inmunológicas del veneno de *Bothrops* cotiara.. Re. Biol. Trop. Vol. 54 (3):889-901.

Frayre T, Sevilla G, Orozco V, Armas J, Celis A. 2006. Mortalidad por contacto traumático con serpiente y lagarto venenosos. México, Gac. Méd. Mex. 142:209-213.

González A, 2009. Salud pública de México / Mordeduras por serpiente venenosa: panorama epidemiológico en México vol. 51, no. 2.

Gutiérrez J, León G. Thierry Burnouf, 2011. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road and ahead. Biologicals 1-14.

Kohn D, Armugan A, Jeyaseelan K. 2006. Snake venom components and their applications in biomedicine. Cell Mol. Life Sci. 63: 3030-3041.

Menezes M, Furtado M, Travaglea- Cardoso S, Camargo A, Serrano S. 2006. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen Bothrops jararaca siblings., Toxicon, 47:304-312.

Monroy V. 1961. Historia de la preparación del suero antialacrán en México. Rev Mex Cien Med Biol; 2: 21-27.

NOM062 “NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

Ortega S. 2008. Tesis de maestría Instituto Nacional de Higiene, Gerencia de Producción de Sueros. BIRMEX. México.

Otero R. 2002. Seroterapia antivenenosa, ventajas del uso de antivenenos del tipo IgG F(ab’)2 ó Fab en picaduras de escorpiones y mordeduras de serpientes. Pediatría. 37:1-20.

Otero R., Mesa M. 2001. Mordeduras Serpientes In: Fundamentos de Pediatría CIB. Primera edición: 571-578.

Ramírez B, 1991. UNAM. Instituto de geográfia, Herpetofauna (anfibios y reptiles).

Rodríguez J. 2009. Comunicación personal. Gerencia de Producción de Sueros. Instituto Butantán. Brasil.

Rojas E. 2007. Inmunología de Memoria. Interamericana, . México, 2da. Edición.

Russell F, Walter F. 2000. Snakes and snakebite in Central America, Toxicon, 10(35):1469-522.

Siria G, Arellano A. 2009. Mordeduras por serpiente venenosa: panorama epidemiológico en México; carta al editor, salud pública de México / vol. 51, no. 2.

Sistema único de información ISSN 1405-2636 epidemiología 2007. “Aspectos clínicos y epidemiológicos de la mordedura de serpientes”. Volumen 24 Semana 8.

Solano L, 2012. Antivenenos, Boletín Birmex No. 16, Nov. Pág. 11.

Sotelo C. 2003. Envenenamiento por mordedura de serpiente de cascabel, daños a la salud y su tratamiento en edad pediátrica. Gac. Méd. Méx. 139:317-324.

Tay-Zavala J, Díaz-Sanchez J, Sánchez-Vega J, Ruiz-Sánchez D, Castillo L. 2002. Serpientes y reptiles de importancia médica en México. Rev. Fac. Med. UNAM, 45: 212-219.

Third edition of the WHO 2005. Laboratory biosafety manual, Geneva, Switzerland.

Vega-Franco L. 2007, Faboterapia ¿será este el fin de la seroterapia.Rev. Mex. Pediatría. 72:26-60.

World Health Organization. WHO 2010. guidelines for the production, control and regulation of antivenom immunoglobulins. WHO, Geneve.

Secretaría de salud Boletín 2011 consultado en: http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2011/sem52/pdf/cua12.pdf

8. APÉNDICE

8.1 Numerales de la NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.” que aplican al bioterio de ratones donde se trabajó con los ratones.

4.3.2. Usuarios dentro de la institución.

Es obligación de la institución donde se realiza investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza, con animales de laboratorio, asegurar que el personal profesional, técnico y estudiantil, esté capacitado para realizar los procedimientos con animales de laboratorio.

4.6. Identificación y registro.

Las tarjetas.- Se colocan en las jaulas o cajas y los datos que en ella figuran corresponden a la identificación que llevan los animales que contienen. Se pueden asentar datos sobre la procedencia, método de reproducción, inoculaciones, cirugías a que han sido sometidos y nombre del responsable el proyecto de investigación.

5.1. Roedores: Rata, ratón, cobayo, hámster y jerbo.

5.1.6. Manipulación e inmovilización.

Las técnicas de sujeción, manipulación e inmovilización que se realicen en el bioterio deben estar acordes con los principios humanitarios internacionales aceptados, aprobados por el Comité y supervisadas por el Médico Veterinario responsable.

8.2. Administración de fluidos y sustancias.

La administración parenteral de fluidos y sustancias deberá hacerse conforme a las prácticas clínicas y científicas generalmente aceptadas en el animal sujeto o inmóvil. Si la técnica causa estrés o dolor, se usarán sedantes, analgésicos o anestésicos, a menos que esté contraindicado en el protocolo experimental, en

cuyo caso deberá contar con la aprobación del Comité Interno Para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).

9.0 Eutanasia

9.4.1.3. Bióxido de carbono (CO_2).

9.4.1.3.1. Es el método más recomendable para la eutanasia de varias especies de mamíferos tales como: ratas, ratones, cobayos, perros, hámsteres, conejos y gatos debido a su rápido efecto depresivo y anestésico que conduce a la muerte por hipoxia en pocos minutos, está fácilmente disponible en cilindros de gas comprimido, es barato, no inflamable, no explosivo, y seguro de operar por el personal, no se acumula en los tejidos y no deforma la arquitectura celular.

9.4.1.3.3. Sólo se permite que la fuente de CO_2 sean cilindros de gas comprimido liberado en una cámara cerrada; es preferible que la cámara se gasifique, previo a la introducción de los animales a una concentración mínima de 70%. Con el animal en la cámara, el flujo de CO_2 debe reemplazar por lo menos el 20% del volumen total de aire por minuto.

10. Medidas de bioseguridad y salud ocupacional para el personal involucrado con la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

10.3.8. El acceso a las diversas instalaciones de la unidad de cuidado animal estará restringido al personal autorizado.

10.4.5. La utilización de guantes desechables, cubrebocas, cofia, batas, overoles, botas o cubiertas para zapato es deseable y dependerá de las circunstancias especiales de cada unidad.

10.4.6. El uso de prendas externas como batas, overoles, botas, gorros, que se utilicen dentro del área de mantenimiento, no deben ser utilizadas fuera de esta área.

10.4.7. La ingestión de comida o líquidos, así como el uso de tabaco y la aplicación de maquillaje dentro del área de los animales estará prohibida. Puede haber un área especialmente diseñada para tal fin en la unidad.

10.4.9. Deben existir contenedores especiales para manejo de material cortante.

10.5.4. Todo el personal será sometido a evaluación médica periódica de acuerdo a las circunstancias particulares de la unidad de cuidado animal.

10.6. Disposición finales de productos biológicos, excretas y cadáveres.

10.6.1 El manejo con respecto a la disposición final de productos biológicos, excretas y cadáveres será determinado de acuerdo con lo establecido en la NOM-087-ECOL-1995, y cualquier otra disposición aplicable en la materia.

8.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS

- Solución de carbonatos 0.1 M a un pH de 9.6 para sensibilizar los pozos de las placas de ELISA.
- 1.25 g de leche descremada Svelty en 25 mL de PBS 10 X.
- Sueros problema como anticuerpo primario.
- Conjugado (Anti IgG de cabra antiratón conjugado con peroxidasa, con 38 961 µL de diluyente y 39 µL de anticuerpo secundario con una dilución final 1:1 000
- Sustrato 20.56 mL.
- Solución reguladora de fosfatos 0.2 M.
- Solución reguladora de citrato 0.1 M.
- Ortofenilendiamina 6 mg.
- Solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2 M.
- NaCl, 800 mg.
- Fosfato de potasio monobásico anhidro 20 mg.
- Fosfato de sódio dibásico anhidro, 115 mg.
- Solución de PBS-T al 0.05 %.
- Tween 20.
- PBS 10 X, 100 mL.
- Agua destilada.