

Instituto Nacional
de Salud Pública



Instituto Nacional de Salud Pública
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA

Maestría en Ciencias de la Salud con Área de
Concentración en Vacunología

“Caracterización de la reactividad cruzada del
faboterápico polivalente antivipireno
contra el veneno de serpientes mexicanas
del género ***Crotalus***, especies ***C. basiliscus***,
C. atrox, ***C. ravus*** y ***C. molossus***”.

para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD CON ÁREA
DE CONCENTRACIÓN EN VACUNOLOGÍA

presenta
QBP. MA. GUADALUPE GALLEGOS FLORES

director
M. EN C. NELSON JESÚS ÁLVAREZ ANELL

asesores
M. EN C. FRANCISCO RETA MARES
M.V.Z. ALEJANDRO PÉREZ GROVAS ROBLES GIL

A Dios por todo lo que me ha dado.

A Brianda e Ilse por ser mi motor y fuente de inspiración.

A mi familia que siempre está conmigo, apoyándome.

A Birmex por haberme dado la oportunidad de realizar un sueño, proporcionando el tiempo y los insumos necesarios para llevar a cabo el presente trabajo.

A mi director y asesores por el apoyo brindado.

Al personal técnico que colaboró conmigo durante la ejecución de la parte experimental:

QBP. Fernando Vázquez Tapia.

QFB. Hortensia Nolasco Soriano.

Téc. Francisco Ruíz Uribe.

Índice

	Página
Introducción	12
Historia de los Faboterápicos en México	13
Características generales de los faboterápicos	15
Aspectos epidemiológicos de la mordedura de serpientes en México	19
Distribución geográfica del género <i>Crotalus</i> en México	21
Composición química del veneno del género <i>Crotalus</i>	24
Características de los antivenenos	27
Justificación	30
Planteamiento del Problema	32
Objetivos	34
Hipótesis	36
Metodología	38
Materiales y métodos	39
Material Biológico	39
Reactivos	39
Venenos de Prueba	40
Obtención del veneno	40
Formulación de los venenos	41
Determinación de la actividad letal	41
Determinación de la neutralización de la actividad letal	42
Determinación de la actividad hemorrágica	43
Determinación de la neutralización de la actividad hemorrágica	44
Determinación de la actividad necrosante	45
Determinación de la neutralización de la actividad necrosante	46
Determinación de la actividad coagulante	47
Determinación de la neutralización de la actividad coagulante	48
Resultados	49
Discusión	61
Conclusiones	69
Perspectivas	71
Referencias bibliográficas	73

Índice de figuras

NO. DE FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Proceso de Producción de los Faboterápicos	16
2	Estructura de la unidad monomérica de las inmunoglobulinas	18
3	Casos de mordedura de serpiente del 2004 al 2011 en México	20
4	Distribución de <i>Crotalus atrox</i> en México	21
5	Distribución de <i>Crotalus basiliscus</i> en México	22
6	Distribución de <i>Crotalus ravus</i> en México	22
7	Distribución de <i>Crotalus molossus</i> en México	23
8	Obtención del veneno de las cuatro especies	40
9	Determinación de la actividad letal	42
10	Determinación de la neutralización de la actividad letal	43
11	Determinación de la dosis mínima hemorrágica (DMH)	44
12	Determinación de la neutralización de la DMH	45
13	Determinación de la dosis mínima necrosante (DMN)	46
14	Determinación de la neutralización de la DMN	47
15	Determinación de la actividad coagulante	48
16	Determinación de la neutralización de la actividad coagulante	48
17	Lesión necrosante ocasionada por el veneno de <i>C. basiliscus</i> . Lesión necrosante ocasionada por el veneno de <i>C. molossus</i> .	55
18	Neutralización de la actividad hemorrágica por el Faboterápico polivalente	55
19	antiviperino contra el veneno de <i>C. basiliscus</i> .	
20	Neutralización de la actividad hemorrágica por el Faboterápico polivalente antiviperino contra el veneno de <i>C. ravus</i>	56

Índice de tablas

NO. DE TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Productores de Antivenenos en América Latina	18
2	Principales componentes del veneno de serpiente	26
3	Serpientes utilizadas	40
4	Contenido de proteína en los cuatro venenos analizados	50
5 y 5a	Ejemplos de las diluciones	50
6	Actividad letal de los venenos en DL ₅₀ /mL	51
7	Neutralización de la actividad letal de los venenos de <i>Crotalus basiliscus</i> , <i>Crotalus ravus</i> , <i>Crotalus atrox</i> y <i>Crotalus molossus</i> con el Faboterápico Polivalente Antiviperino	53
8	Actividad Hemorrágica de los venenos	54
9	Actividad Necrosante de los venenos	54
10	Neutralización de la Actividad Hemorrágica y Necrosante	58
11	Actividad Coagulante de los venenos.	59
12	Actividades tóxicas de los venenos	60
13	Resumen de la neutralización de las actividades tóxicas de los venenos.	60

Índice de gráficas

NO. DE TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Actividad letal de los venenos	50
2	Neutralización de la actividad letal de los venenos.	52
3	Actividad Hemorrágica y Necrosante	54
4	Actividad neutralizante del faboterápico antiviperino contra la actividad hemorrágica del veneno de <i>C. molossus</i> .	56
5	Actividad neutralizante del faboterápico antiviperino contra la actividad necrosante del veneno de <i>C. atrox</i>	56
6	Neutralización de las actividades Hemorrágica y Necrosante	58

Resumen

La caracterización de los faboterápicos producidos por los Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S.A. de C.V. (Bírmex), es parte medular en el conocimiento del biológico que se está fabricando, para fundamentar su capacidad terapéutica contra la mordedura de serpientes, debido a su importancia como un problema de Salud Pública en México y con la finalidad de seguir las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, referente a proporcionar información bioquímica y biológica de los antivenenos utilizados.

La aplicación de este biológico es el tratamiento de elección en caso de mordedura de serpiente. La caracterización del faboterápico se realizó en función de la neutralización cruzada contra actividades biológicas del veneno (letalidad, hemorrágica, necrosante y coagulante) de especies diferentes a *Crotalus basiliscus*, (cuyo veneno es empleado en la producción del faboterápico polivalente antiviperino) como son *C. atrox*, *C. molossus* y *C. ravus*, la elección de estas especies fue en primer término, tomando en cuenta su distribución geográfica que abarca la mayor parte del territorio mexicano, y en segundo término, por ser las especies con que contaba el herpetario del Instituto Nacional de Higiene.

La primera parte del trabajo consistió en estandarizar los lotes de veneno para cada especie y determinar las actividades biológicas mencionadas en el párrafo anterior, con la finalidad de disminuir la variabilidad en los ensayos biológicos.

Los venenos de las especies mencionadas mostraron actividades hemorrágica, necrosante y letal, no así, actividad coagulante bajo las condiciones en las que se llevó a cabo el estudio.

El veneno con mayor actividad letal fue *C. ravus*, seguido en orden decreciente de *C. atrox*, *C. basiliscus* y *C. molossus*; en el caso de la actividad hemorrágica presentan actividad similar siendo *C. atrox*, el veneno con menor actividad.

C. molossus presentó mayor actividad necrosante que el resto de los venenos, los cuales presentan similar actividad.

Ninguno de los cuatro venenos presenta actividad coagulante, en las condiciones en las que se llevó a cabo el ensayo.

El faboterápico polivalente antiviperino, presenta reactividad cruzada para las actividades hemorrágica y necrosante de los venenos de *C. basiliscus*, *C. ravus*, *C. molossus* y *C. atrox* analizados.

Cuando se evaluó el faboterápico producido por Bírmex, neutralizó la actividad letal de los venenos de *C. basiliscus*, *C. ravus* y *C. atrox*, pero no así, la de *C. molossus*, por lo que presenta actividad cruzada para dos especies adicionales a la utilizada en la producción del mismo, lo cual abre la posibilidad de considerar un rediseño en la mezcla del veneno utilizada para inmunizar los caballos.

Abstract

The characterization of antivenoms manufactured by Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S.A. de C.V. (Bírmex), is one of the most important issues to understand the capability of the biological product to neutralize venom's toxic activities due to its importance as a relevant public health hazard in Mexico and to follow the recommendations. This biologic is used to treat the envenomation in case of venom's bite. The characterization of the antivenom (faboterápico polivalente antiviperino) was performed in function of the cross-neutralization against venom's toxic activities (lethal, hemorrhagic, necrotizing and coagulant) of other species different from *Crotalus basiliscus* (whose venom is used in the production of polyvalent antivenom (faboterápico) such as *C. atrox*, *C. molossus* and *C. ravus*). The first part of the investigation was to standardize venom's lots of each species and determine the toxic activities previously mentioned in order to reduce the variability in biological assays. The mentioned species activities poisons showed hemorrhagic, necrotizing and lethal but not so coagulant activity. The poison with the highest lethal activity was *C. ravus*, in decreasing order followed by *C. atrox*, *C. basiliscus* and *C. molossus*; in the case of hemorrhagic the four species exhibit similar activity *C. atrox* being the lowest activity. *C. molossus* necrotizing presents greater activity than the rest, which have similar activity. None of the four venoms has coagulant activity. The lethal activity of venom's *C. basiliscus*, *C. ravus* and *C. atrox* were neutralized by the antivenin (faboterápico), but didn't happen with *C. molossus*. The interspecific cross-neutralization has been demonstrated by the faboterápico polivalente antiviperino manufactured by Bírmex, for other snakes of the genus *Crotalus* included in the study, also it's possible a new designer in the mix of the venom is used in the inoculation of the horses.

ABREVIATURAS

NTD	Enfermedades Tropicales Desatendidas (por sus siglas en inglés, Neglected Tropical Diseases)
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
Arg	Arginina
Gly	Glicina
Asp,	Aspartico
DL50	Dosis Letal al cincuenta por ciento
DE50	Dosis Efectiva al cincuenta por ciento
DP50	Dosis Protectora al cincuenta por ciento
kDa	kilo Daltons
ADN	Acido desoxirribonucleico

Introducción

Historia de los antisueros

La historia de la primera inmunización con un veneno de serpiente, *Crotalophorus tergeminus* en palomas por Sewall se remonta a 1887, en la Universidad de Michigan. En aquellos experimentos, él concluyó que, las repetidas inoculaciones de las palomas con dosis subletales del veneno de la serpiente, producía un incremento de su resistencia a sus efectos (Sewall, 1887).

Serían Emile Roux y Alesandre Yersin en 1888, quienes demostraron que la sangre de un animal inmunizado contra la toxina diftérica era capaz de protegerlo cuando se le ponía en contacto con la toxina (Roux & Yersin, 1888).

En 1890 Emil Behring y Shibasaburo Kitasato, acuñaron el término seroterapia al confirmar la transferencia pasiva de inmunidad, mediante el empleo del suero de conejos inmunizados contra las toxinas diftérica y tetánica, un año después inician la aplicación del antisuero para el tratamiento de la difteria (Von Behring, 1890).

Fueron Guido Tizzoni y Guiseppina Cattani en 1891, quienes llamaron antitoxina a una sustancia (una globulina) que precipitaba con sal. Además en este mismo año en Saigón, el Dr. Albert Calmette investigó la manera de incrementar la protección contra el veneno de cobra, y en 1895, en la ciudad de Lille, Francia, produjo el suero anticobra para uso terapéutico, el cual revolucionó el tratamiento de la mordida por serpiente en el mundo, no obstante sin un estudio clínico formal (Hawgood & Calmette, 1999). El mismo año, Phisalix y Bertand, en paralelo con Calmette, pero de manera independiente, presentaron los resultados de las propiedades antitóxicas del suero obtenido en conejos y cobayos inmunizados contra venenos de cobra (Espino-Solís et al, 2009).

El primer suero de antiveneno producido en caballo por Albert Calmette, se utilizó en el tratamiento de envenenamiento por mordedura de serpiente en 1895 por Haffkine en India y por Lépinay en Vietnam (OMS, 2010).

En diferentes partes del mundo investigadores desarrollaron antivenenos siguiendo el protocolo de Calmette, entre ellos podemos mencionar a McFarland en USA y Tidswell en Australia, en 1898; Vital Brazil desarrollo el primer suero polivalente en el Instituto Butantan en 1901 (Espino-Solís et al, 2009).

Paul Erlich introdujo el término anticuerpo y en 1900 logró establecer los métodos para estandarizar las toxinas y las antitoxinas, y así aseguró que estos materiales fueran consistentes en cuanto a sus componentes, como a su efectividad.

Los pioneros Calmette, Vital Brazil y otros, utilizaron el suero separado de la sangre de caballos hiperinmunizados para la preparación de antivenenos (seroterapia). Sin embargo, pocos años después del comienzo de su utilización se hicieron más evidentes los problemas clínicos consecuentes a las reacciones inmunológicas contra los componentes proteínicos del antisuero, lo que hizo que se buscaran alternativas en su fabricación. Más tarde, se demostró que los anticuerpos (inmunoglobulinas) son las moléculas responsables de la acción terapéutica del suero contra el veneno.

Desde 1907 cuando Arrhenius aplicó la inmunología en el estudio de los anticuerpos, a lo largo del siglo XX, los avances en la tecnología hicieron posible caracterizar a los anticuerpos desde el punto de vista fisicoquímico y funcional, fue en 1960 cuando Alfred Nisonoff caracterizó el fragmento $F(ab')_2$ mediante la digestión de anticuerpos con pepsina (Ramos-Bello et. al, 2009).

Al uso inicial del suero crudo de equino inmune, siguió la producción de los antivenenos a partir del plasma o suero de los caballos o borregos inmunizados, la mayoría de los productores usa protocolos basados en la digestión con pepsina a pH bajo, el cual remueve la fracción Fc de la molécula IgG resultando los fragmentos $F(ab')_2$ (Guidolin, et. al, 2010) o el uso de la digestión con papaína para obtener fragmentos Fab, seguido de una precipitación con sulfato de amonio, lo cual permitió reducir la incidencia de las reacciones anafilácticas (Morais & Massaldi, 2009).

Se han investigado modificaciones a esta tecnología básica como es la purificación por cromatografía, para eliminar los anticuerpos no específicos y la estabilización con ácido caprílico para precipitar las proteínas que no son IgG del plasma hiperinmune o la termocoagulación (Theakston, et. al, 2003; El-Rashdy, 2006).

También a nivel de la obtención del plasma se han implementado modificaciones, actualmente se utiliza el sistema de plasmaféresis, con el cual se obtiene el plasma que servirá como materia prima para purificar las inmunoglobulinas o sus fragmentos, regresando el resto de los componentes celulares de la sangre al equino (Thierry, et al, 2004).

Cabe mencionar que en México los primeros sueros equinos hiperinmunes fueron fabricados por Isauro Venzor en 1927 y en 1938 por los Laboratorios M y N, seguidos por los Laboratorios del Dr. Zapata, también privados, y fue después que se inició su elaboración en el Instituto Nacional de Higiene en los 70's (Espino-Solís et al, 200).

En un futuro cercano, los antivenenos podrían reemplazarse por vacunas, anticuerpos humanizados y/o compuestos que neutralicen específicamente los componentes del veneno causante del envenenamiento (Wagstaff, et al 2006). El mejoramiento en la calidad de éstos debe enfocarse a obtener productos de alta pureza y libres de agregados, desafortunadamente la tecnología de purificación incrementa el costo en su producción (Morais & H. Massaldi, 2009).

Características generales de los Faboterápicos.

De acuerdo al artículo de Sewal, fueron Mitchell y Reichert en 1886 quienes reportaron que el principio activo de los venenos eran proteínas (Sewall, 1887).

Los antivenenos se han utilizado con éxito por más de un siglo y constituyen el único tratamiento efectivo contra el envenenamiento por mordedura de serpiente. Estos productos son compuestos de anticuerpos preparados del suero o plasma de animales inmunizados, por consiguiente el uso de proteínas heterólogas para el tratamiento en humanos conlleva la posibilidad de que ocurran reacciones adversas debido a la activación del sistema inmune (Morais VM & Massaldi H, 2009).

La tecnología para la producción de los antivenenos varía de acuerdo al laboratorio productor, el biológico purificado consiste principalmente de IgG, dependiendo del proceso de producción, puede contener componentes del suero diferentes de las inmunoglobulinas y una mezcla de diferentes anticuerpos pero enriquecidos con los anticuerpos específicos contra el veneno en particular con el que fueron inmunizados los animales (Chippaux et al, 1998).

Dependiendo del tipo de molécula neutralizante como componente de los antivenenos, estos pueden ser: preparaciones de inmunoglobulinas IgG completas o fragmentos de ellas $F(ab')_2$ o Fab, con un peso molecular de 150 kDa, 100 kDa y 50 kDa respectivamente, consecuentemente estos tres tipos de inmunosueros tienen diferente perfil farmacocinético. Los fragmentos Fab tienen el volumen de distribución mayor, llegan al compartimento extravascular más rápido y son catabolizados principalmente en el riñón; las moléculas de IgG tienen el menor volumen de distribución a través del espacio intersticial y se eliminan por mecanismos extra renales en un tiempo mayor (Gutiérrez et al, 2003).

Los faboterápicos (como se denominan en México, debido a la fracción de molécula que predomina es $F(ab')_2$, corresponden a los digeridos de pepsina de las inmunoglobulinas IgG que dan como producto estos fragmentos $F(ab')_2$, seguidos del fraccionamiento con sulfato de amonio; después del tratamiento enzimático, los fragmentos Fc son coagulados y los fragmentos $F(ab')_2$ son purificados (Ortega, 2006).

Los antivenenos han demostrado en la práctica ser efectivos a nivel sistémico, cuando se administran a tiempo.

Los antivenenos se producen siguiendo complejos procesos de producción, los cuales involucran varias etapas con sus respectivos controles de calidad, Figura 1 (OMS, 2010).

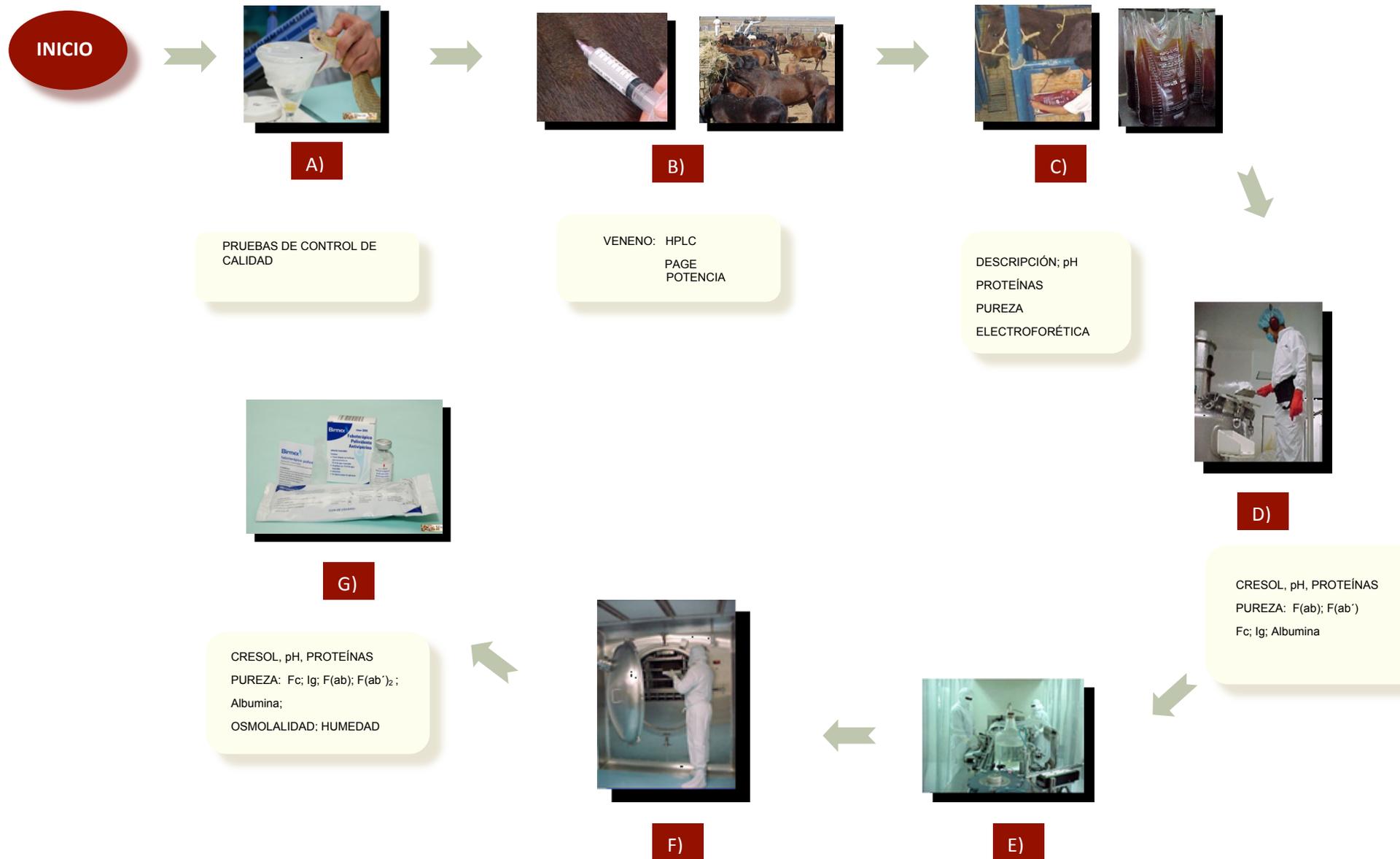


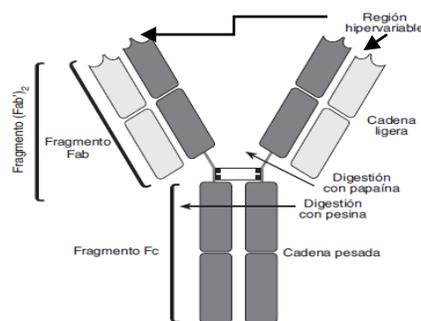
Fig. 1 Diagrama de flujo de las principales etapas en el proceso de producción de los Faboterápicos. A) Ordeña de las serpientes; B) Preparación de las mezclas para inmunización de los caballos; C) Recolección del plasma; D) Fraccionamiento: digestión, precipitación, diálisis, filtración, formulación; E) Envase; F) Liofilización; G) Acondicionamiento: engargolado y empaque.

Como sabemos, las inmunoglobulinas son glicoproteínas, cuya estructura básica está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas unidas por enlaces disulfuro y otras uniones de tipo no covalente. Las cadenas polipeptídicas se componen de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras idénticas unidas por enlaces disulfuro intra e intercatenarios. La porción amino terminal de cada cadena posee un dominio variable que enlaza al antígeno a través de tres regiones hipervariables. La región carboxilo terminal de las cadenas ligera y pesada forman la región constante Fc, existen dos tipos antigénicos de cadenas ligeras kappa (κ) y lambda (λ) Figura 2.

Todas las inmunoglobulinas contienen de 3 a 13 % de carbohidratos dependiendo de la clase de anticuerpo, el carbohidrato es esencial para mantener su estructura. En el anticuerpo la “unidad monomérica” es bivalente, capaz de unirse a dos determinantes antigénicos, otra parte de la molécula de inmunoglobulina es la fracción Fc (Ramos-Bello et. al, 2009).

La estructura básica de las inmunoglobulinas puede ser fraccionada mediante la utilización de enzimas como la pepsina. Las preparaciones $F(ab')_2$ se obtienen por tratamiento de la IgG a un pH de 3.5. Cerca del 20% de los sitios de enlace se destruyen durante la digestión enzimática (Theakston et. al, 2003). Este tratamiento agresivo además de disminuir la actividad, incrementa la presencia de agregados de proteína, una etapa adicional en el proceso es necesaria para eliminarlos, ya que inducen la activación del sistema de complemento (Morais VM & Massaldi H, 2009).

Debido al peso molecular de estos fragmentos (aproximadamente 100 kDa), no son eliminados por vía renal y por lo tanto tiene un tiempo de eliminación de entre 2 y 4 días. La fracción $F(ab')_2$ tiene dos sitios de enlace, por lo que forman complejos estables con los antígenos.



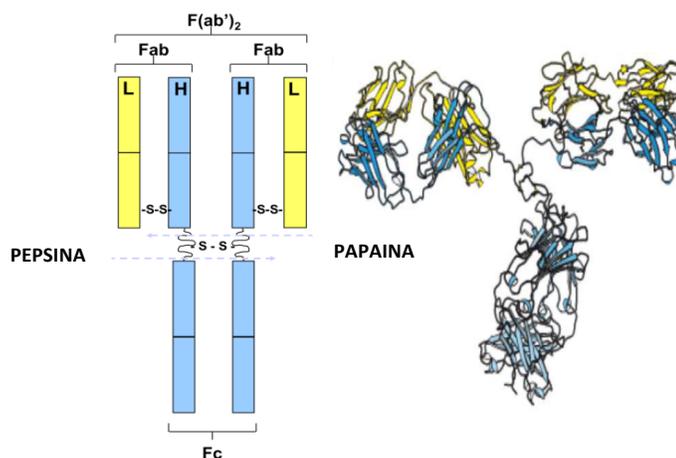


Fig. 2 Esquema de la estructura de la unidad monomérica y estructura molecular de una inmunoglobulina IgG. Ramos & Llorente, 2009.

Con la idea de crear una red entre los países de América Latina, la Organización Panamericana de la Salud (OPS), reunió en 2007 a los principales productores de antivenenos en la región y a las agencias regulatorias, con el objetivo de contribuir con los países cuya producción fuera insuficiente o que no dispongan de laboratorios productores, en la tabla 1 se mencionan los países productores en América. (Consulta Técnica, OPS, 2007).

PAIS	PRODUCTOR	FABOTERÁPICO
México	Bírmex (Instituto Nacional de Higiene) y el Instituto Bioclon	Polivalente
Brasil	Instituto Butantan, Fundación Ezequiel Dias y el Instituto Vital Brasil	Polivalente y Monovalente
Argentina	INPB, Laboratorio Central de Salud Pública, Laboratorio Biol, Immunovet, Atom- Gulcos	Bivalente y Tetravalente Monovalente
Bolivia	Laboratorio de Producción de Antiveninas	Bivalente
Colombia	Instituto Nacional de Salud	Monovalente y Polivalente
Costa Rica	Instituto Clodomiro Picado	Polivalente
Ecuador	Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical	Monovalente
Perú	Instituto Nacional de Salud	Monovalente y polivalente
Venezuela	Centro de Biotecnología	Polivalente

Tabla 1. Principales Productores de Antivenenos en América Latina Se enlistan los países y tipos de antivenenos que fabrican. Consulta Técnica, OPS 2007.

Aspectos epidemiológicos de la mordedura de serpientes en México.

Las mordeduras de serpiente son un problema de Salud Pública en muchos países tropicales y subtropicales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha caracterizado al envenenamiento por mordedura de serpiente entre las Enfermedades Tropicales Desatendidas (NTD, por sus siglas en inglés) y entre aquellas asociadas con la pobreza.

La verdadera incidencia de las mordeduras de serpientes, envenenamiento y la muerte asociada a ésta es difícil de estimar, los registros que se tienen son de los hospitales pero la mayoría de las víctimas no asisten a ellos, sino prefieren los remedios tradicionales (Harrison et al, 2009), existe un sub registro, debido a que ocurren en áreas rurales de países pobres.

El número de mordeduras de serpiente varía de acuerdo al área geográfica, a la estación del año, alimentación, edad, sexo, entre otros factores; la mayor incidencia se encuentra ligada al trabajo en el campo (agricultura, ganadería, minería) y se reportan mayor número durante la época de las actividades en la agricultura.

La mordedura por serpientes venenosas puede ocasionar, paro respiratorio (las que poseen veneno neurotóxico), trastornos de sangrado que pueden llevar a una hemorragia fatal; daño en riñones irreversible; destrucción local del tejido ocasionando una incapacidad permanente como resultado de la amputación de algún miembro (serpientes que poseen veneno proteolítico); lo anterior trae como consecuencia implicaciones socioeconómicas importantes (Pereira et al, 2005).

Aun cuando el número exacto de mordeduras de serpiente se desconoce, la Organización Mundial de la Salud reporta un estimado que va desde un mínimo de 421,000 envenenamientos y 20,000 muertes anuales, hasta 1,841,000 envenenamientos y 94,000 muertes, siendo el número de mordeduras por serpiente de 1,200,000 a 5,500,000 por año. La mayoría de estos ocurre en el sur y sureste de Asia, África sub-Sahariana y Centro y Sur América, el número de personas que queda con alguna secuela permanente como resultado del envenenamiento es similar al número de muertes (Kasturiratne et al, 2008; OMS, 2010).

A pesar de que a nivel mundial se reconoce la importancia de este problema, en México es poco lo que se conocía al respecto por lo que Frayre Torres y su grupo se dieron a la tarea de recabar información correspondiente al periodo 1979 a 2003, durante el cual observaron que la mortalidad disminuyó en un 76% y la mayor mortalidad se observó en los estados del sureste del país, como son Quintana Roo, Oaxaca, Veracruz, Chiapas, Campeche y Yucatán, que son los estados que por sus características geográficas y climáticas favorecen la presencia de serpientes. El grupo de edad que ellos reportan con mayor mortalidad fue el de 60 años y más (Frayre-Torres et al, 2006).

El accidente ofídico se presenta a menudo en mujeres, niños y campesinos de comunidades rurales, de acuerdo a los datos del 2009 de Siria Hernández, el

género masculino es el más afectado, hasta un 66% de los casos reportados debido a su trabajo en el campo, con edades que fluctúan entre 20-49 años (Hernández, 2009). En los niños es más grave el accidente por su baja masa corporal con respecto a los adultos (García-Willis et al, 2009). En México, en el periodo comprendido entre el año 2004 y 2011, la Dirección General de Epidemiología reportó en promedio 3,771 accidentes por mordedura de serpiente, siendo los estados de Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Hidalgo, San Luis Potosí, Puebla y Estado de México los que presentan mayor número de casos reportados representados a continuación en la Figura 3.

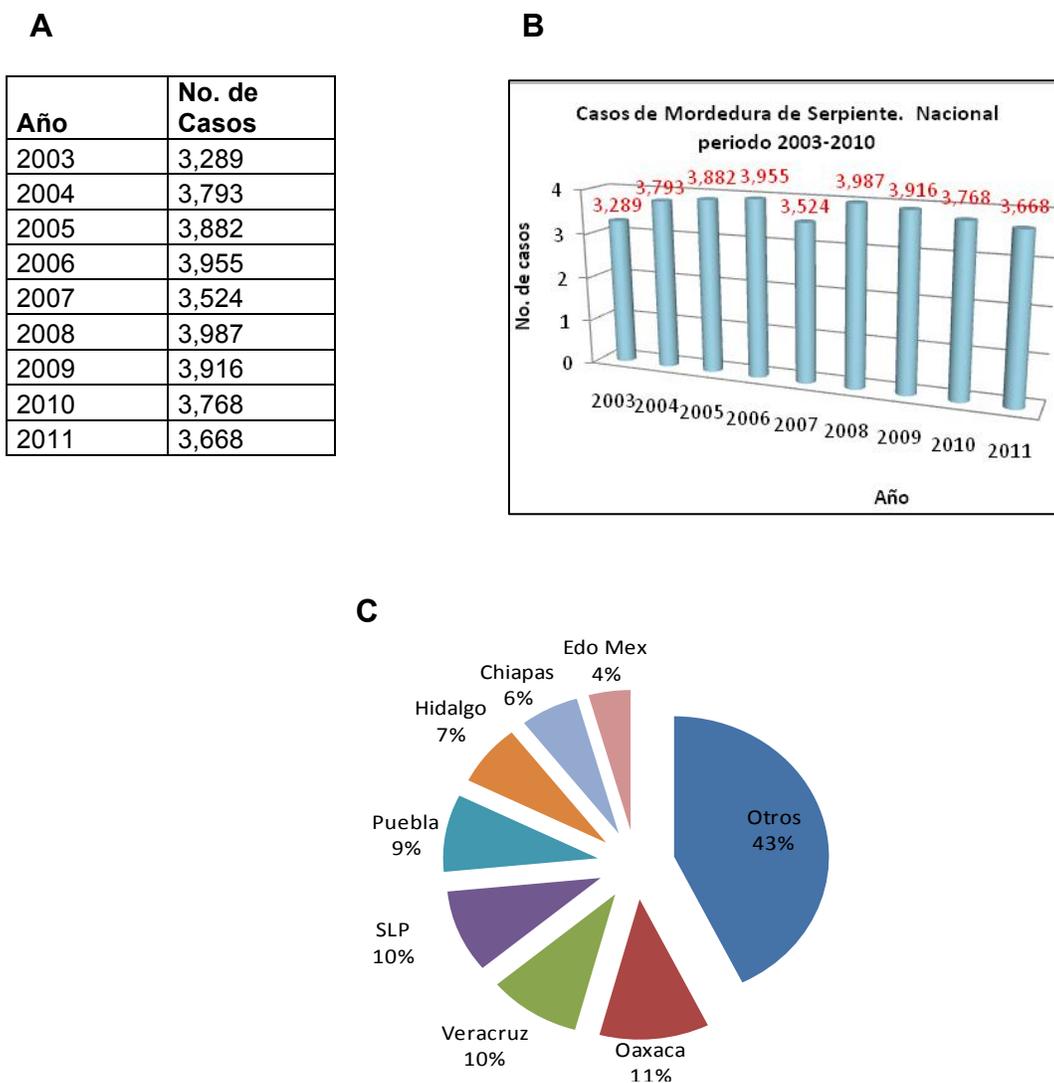


Fig. 3 **Casos de Mordedura de serpiente en México, reportados durante el periodo del 2004 al 2011.** A) No. de casos; B) Gráfica de incidencia; C) Casos por entidad federativa. CENAVECE 2011. Anuarios de morbilidad DGEPI, SSA. Boletín de Vigilancia Epidemiológica CONABIO 2011.

Distribución geográfica del género *Crotalus* en México.

Las serpientes venenosas están presentes en la mayoría de las regiones del mundo y son una amenaza para la Salud Pública, especialmente en los trópicos rurales donde son más abundantes. De las 3,000 especies de serpientes en el mundo, 600 son venenosas y de éstas más de 200 se consideran de importancia médica.

Campbell reporta un total de 190 especies de serpientes venenosas en Norte, Centro y Sur América, de estas 67 se encuentran en México. (Alvarado & Campbell, 2004; Campell & Lamar, 2004)

En América existen dos familias de serpientes venenosas, la *Viperidae* representada por las “víboras” y la *Elapidae* representada por las “corales” o “coralillos”, las especies de Vipéridos pertenecientes a los géneros *Bothrops* y *Crotalus* son las responsables de la mayoría de los accidentes ofídicos en México.

Las especies del género *Crotalus* del presente estudio, fueron seleccionadas por su amplia distribución geográfica, ya que abarcan gran parte del territorio de nuestro país, como a continuación se menciona:

- *Crotalus atrox*. Ampliamente distribuida en la parte occidental y norte de la República mexicana a lo largo del oeste a través de Nuevo León, Coahuila y Chihuahua por una amplia extensión de Sonora al extremo noreste de Baja California; de allí hacia Baja California Sur, al norte de Sinaloa y gran parte del norte de la meseta, la Sierra Madre Oriental (exclusivamente en la región más alta), la llanura costera del norte del Golfo. También incluye el noreste de Durango y Zacatecas, la mayor parte de San Luis Potosí y el norte de Veracruz, Hidalgo y Querétaro, también se ha encontrado en las montañas al noroeste de Oaxaca, Campeche y Yucatán. Figura 4.



Fig. 4 *Crotalus atrox*. Distribución de esta especie de serpiente en México. Ochoa et al. Catálogo de metadatos geográficos. CONABIO 2009.

- *Crotalus basiliscus*. En el occidente de México, de la desembocadura del río Fuerte en el extremo sur de Sonora hacia el sur a través de la llanura costera, estribaciones y valles de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima y noroeste de Michoacán, incluyendo la mitad del valle Río Tepalcatepec. Figura 5.



Fig. 5 *Crotalus basiliscus*. Distribución de esta especie de serpiente en México. Ochoa et al. Catálogo de metadatos geográficos. CONABIO 2009.

- *Crotalus ravus*. En regiones montañosas a través de la planicie del Nevado de Toluca en el Estado de México a las tierras altas del occidente central de Veracruz hacia el sur a través de Sierra de Acatepec en Puebla y extremo norte de Oaxaca, la Mesa del sur en Oaxaca, Chiapas y la Sierra Madre del Sur en Guerrero. Figura 6.

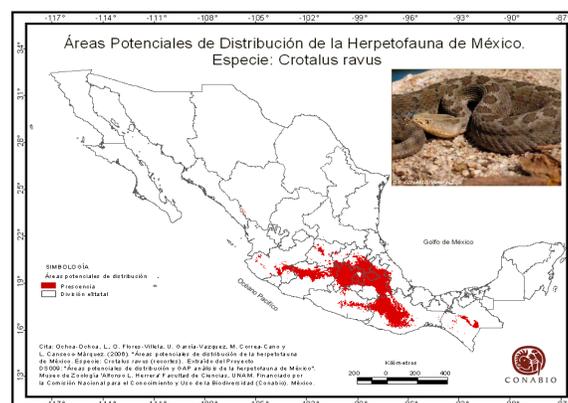


Fig. 6 *Crotalus ravus*. Distribución de esta especie de serpiente en México. Ochoa et al. Catálogo de metadatos geográficos. CONABIO 2009.

- *Crotalus molossus*. Dentro de la región que habita se le haya en una gran diversidad de hábitats, en los estados de Sonora, Chihuahua, Coahuila y Nuevo León. Aunque se considera una especie de montaña, también se encuentra en lugares de menor altitud y humedad, *C.m. nigrescens* está distribuida en el extremo sureste de Sonora, Baja California, Baja California Sur, sur de Chihuahua y Coahuila, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, este de Jalisco, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Michoacán, Edo. de México, Distrito Federal, norte de Morelos y Guerrero, oeste del centro de Veracruz, Puebla, norte y centro de Oaxaca y Chiapas.
- Figura 7

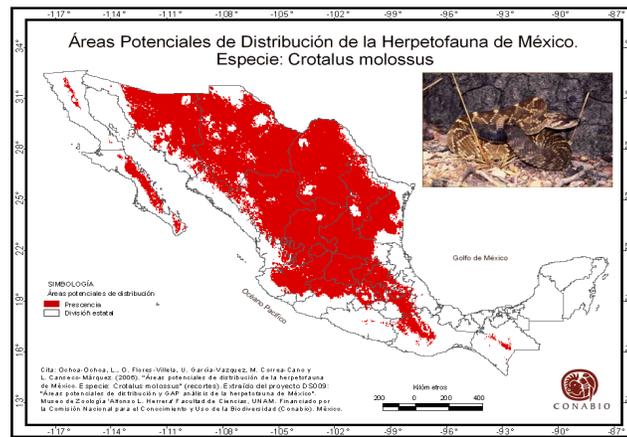


Fig. 7 *Crotalus molossus*. Distribución de esta especie de serpiente en México. Ochoa et al. Catálogo de metadatos geográficos. CONABIO 2009.

Composición química del veneno de *Crotalus*

Los venenos de las serpientes representan uno de los más sofisticados sistemas de defensa en el mundo natural, son mezclas complejas de polipéptidos y proteínas farmacológicamente activas, las cuales juegan un importante papel en la inmovilización y digestión de su presa.

La composición de los venenos se ve influenciada por numerosos factores incluyendo la filogenia, dieta, edad, geografía y aún el sexo (Chippaux et al, 1991; Bryan, 2005).

Las investigaciones reportan que es más potente el veneno de ofidios jóvenes en sus diferentes actividades tóxicas (Zeinsteger et al, 1999-2000).

En el diseño de los antivenenos para el tratamiento del envenenamiento por mordedura de serpiente, es esencial, conocer cuáles son las mezclas de veneno apropiadas para los esquemas de inmunización de los caballos, tomando en cuenta tanto las especies de relevancia epidemiológica en la región o país, así como, la caracterización de los venenos de dichas especies; en la última década la proteómica basada en espectrofotometría de masa y secuenciación, ha sido una herramienta importante para este último punto (Gutiérrez et al, 2010). Aproximadamente 26 familias de toxinas han sido caracterizadas a través de la proteómica del veneno de serpiente.

En la tabla 2, se mencionan las características de los principales componentes de los venenos, entre los cuales se encuentran las serina proteasas, relacionadas a la afectación de factores de coagulación de la sangre. El endotelio vascular sobre el que actúan las desintegrinas, waglerinas, dipeptidil peptidasa IV y crotamina se encuentran en el veneno de la familia *Viperidae*.

El envenenamiento por serpientes vipéridas involucra efectos hipotensivos provocados por hemorragias de manera directa e indirecta por la activación del sistema calicreína-bradiquinina, así también, efectos inflamatorios debido a la acción de serina proteinasas, metaloproteinasas y lectinas tipo C (Susanta Pahari et al, 2007). Las metaloproteinasas del veneno de serpiente comprenden una subfamilia de enzimas zinc dependientes, y se pueden dividir en cuatro clases en base a su diferente tamaño, de PI a PIV. Las metaloproteinasas del veneno de serpiente (SVMPs) pertenecen a PI y son las responsables de la patogénesis de las hemorragias al causar daño directo a los vasos sanguíneos (Baldo et al, 2010).

Los sistemas circulatorio y neuromuscular son los más afectados por estas toxinas, el veneno contiene toxinas que actúan sobre la circulación sanguínea afectando la agregación de plaquetas o la coagulación, estas últimas se clasifican como pro-coagulantes o coagulantes en base a su capacidad de prolongar o acortar la coagulación sanguínea. Las proteínas pro-coagulantes son serina proteinasa y metaloproteinasas actúan activando zimógeno o convirtiendo el fibrinógeno soluble en fibrina insoluble. Los venenos que prolongan la coagulación sanguínea son proteínas o glicoproteínas que tienen actividad enzimática como las fosfolipasas A2 (Dos Santos et al, 2011) y proteinasas. Dichas alteraciones, asociadas con cuadros de desfibrinación, coagulación intravascular diseminada y

trombocitopenia, resultan de la acción de proteínas que afectan diversos componentes del sistema hemostático.

Dentro del género *Crotalus* hay especies que producen un veneno fuertemente neurotóxico y miotóxico, siendo su componente mayor una β -neurotoxina (crotoxina) que posee actividad miotóxica. En otras especies se puede encontrar la mojavetoxina (Gutiérrez, 2002; De Roodt et al, 2005; Luna, 2007; Glenn & Straight, 1985). En el caso del envenenamiento por *Crotalus*, son menores las lesiones locales y predominantemente se presentan efectos sistémicos, como neurotoxicidad y miotoxicidad. Estos no sólo son los venenos más complejos, en comparación con los de otras familias, sino también contienen las proteínas de mayor peso molecular. El cuadro clínico manifestado resulta de la combinación de los diferentes efectos producidos por los componentes proteicos presentes en el veneno (Pirela et al, 2006).

ENZIMAS	CARACTERÍSTICAS
METALOPROTEINASAS	Enzimas endoproteolíticas dependiente de iones Zn^{+} . Enzimas que degradan proteínas de matriz extracelular y componentes del sistema hemostático, tiene efecto citotóxico en las células del endotelio. La mayoría son fibrinogenasas y algunas inhiben la coagulación sanguínea.
FOSFOLIPASAS PLA_2	Proteínas de aprox. 13 kDa. Neurotoxina presináptica, enzimas intra y extra celulares que hidrolizan gliceropfosfolípidos, son responsables de la inflamación local. Inducen efectos neurotóxicos, cardiotoxico, miotóxico, hemolítico, convulsivo, anticoagulante, antiplaquetario y daño de tejido.
SERINA PROTEINASAS	Afectan la agregación plaquetaria, coagulación sanguínea, fibrinólisis, sistema de complemento, presión sanguínea y sistema nervioso.
L- AMINOACIDO OXIDASAS	Cataliza la deaminación de L-aminoácidos y genera peróxido de hidrógeno. Afecta la hemostasis a través de la inhibición de la actividad de Factor X.
PROTEÍNAS ANTICOAGULANTES NO-ENZIMÁTICAS	Inhiben los procesos de coagulación por interacción directa con un factor de coagulación específico, interfieren con la formación del complejo o inhiben la actividad de una de las proteinasas.
LECTINAS Tipo-C	Aglutinan glóbulos rojos o en ocasiones forman parte integral de proteínas pro-coagulantes como el activador Factor X actúa como subunidad reguladora.
DESINTEGRINAS	Son proteínas de bajo peso molecular (4-15 kDa) inhiben la agregación plaquetaria. Enlazan a las integrinas que se encuentran sobre la superficie de las células y actúan como inhibidores competitivos de sus ligandos de preferencia. Son un grupo de péptidos que contienen un sitio de reconocimiento a la célula Arg-Gly-Asp, en el carboxilo terminal, actúan como antagonistas de los receptores del fibrinógeno.

Tabla 2. **Principales componentes del veneno de serpiente.** Resumen de los componentes que pueden estar presentes en la mezcla compleja que constituyen los venenos de las serpientes, así como, algunas de las características de estos componentes. (Panfoli et al, 2010; Manjunatha, 2006).

Características de los antivenenos

Las serpientes que pertenecen a las especies de los géneros *Crotalus* y *Bothrops* son las principales responsables de los accidentes ofídicos en México, la administración parenteral de los inmunosueros es el único tratamiento científicamente validado en el envenenamiento por mordedura de serpiente, uno de ellos es fabricado en México por Birmex, su producción emplea una plataforma basada en el uso de caballos para los cuales se tiene un esquema de inmunización ya establecido (García, 2001).

Es cierto que los inmunosueros monovalentes, cuando los animales reciben el veneno de una sola especie, son el tratamiento de elección para la mordedura de serpiente, siempre y cuando se tenga la certeza de la especie que causó el accidente, cuestión que por lo regular no ocurre, ante esta situación lo más recomendable es contar con un antiveneno polivalente, cuando se inoculan dos o más especies del veneno de las serpientes (Gutiérrez et al, 2011a).

Las manifestaciones patofisiológicas inducidas por el género *Crotalus*, se caracterizan por ser alteraciones locales menores y efectos sistémicos mayores, principalmente neurotoxicidad, miotoxicidad sistémica, falla renal aguda y coagulopatías.

Debido a la gran vascularización del riñón, es un órgano particularmente vulnerable a la toxicidad del veneno, por lo que la falla renal aguda es una de las complicaciones importantes del envenenamiento por mordedura de serpiente causada por la necrosis tubular aguda, sin embargo todas las estructuras renales pueden estar involucradas, como resultado del daño puede presentarse hipotensión, colapso circulatorio, coagulación intravascular diseminada, sepsis, alteraciones hemodinámicas y daño celular ocasionado por la liberación de citocinas proinflamatorias y mediadores vasoactivos.

En el envenenamiento por el género *Crotalus*, es común la falla renal aguda provocada por la liberación de grandes cantidades de mioglobina del músculo dañado, después del trauma mecánico, sigue la liberación en forma masiva de moléculas que actúan como señales de daño, activando la respuesta del huésped, el ATP es el prototipo de estas moléculas, y al ser liberado del tejido dañado al espacio extracelular actúa vía enlace a una matriz de receptores purinérgicos, al mismo tiempo se induce la liberación de ADN y proteínas N-formiladas de las mitocondrias del tejido dañado, estas moléculas conocidas como alarminas y activan neutrófilos (Zornetta et al, 2012).

De manera ideal el volumen de distribución de un antisuero debería ser lo más cercano posible al volumen de distribución del veneno, sin embargo, esto no sucede. Los venenos dependiendo de la especie pueden contener compuestos de

bajo o alto peso molecular, de acuerdo a esta característica, los primeros se absorben rápidamente en el torrente sanguíneo y se distribuyen al espacio extravascular donde se localizan las células a las que se dirige el veneno y así también, son eliminados en pocas horas.

Por el contrario, en los venenos de alto peso molecular, generalmente los de mayor importancia clínica, con actividad procoagulante, de neurotoxina presináptica o que actúan intravascularmente provocando hemorragias y desórdenes en la coagulación; el tiempo que tarda el veneno en distribuirse a los espacios extravasculares es largo, por lo que este tipo de veneno puede permanecer en el cuerpo durante días. Debido a que el faboterápico está compuesto de fracciones $F(ab')_2$ su tiempo de eliminación es de dos a cuatro días, su manera de actuar es formar complejos veneno-faboterápico en la sangre y esto da como resultado una redistribución del veneno que se encuentra en el espacio extravascular hacia el torrente sanguíneo. Siempre que exista la dosis adecuada del antiveneno, el resultado es la neutralización del veneno que llega al torrente sanguíneo tanto en la fase temprana como tardía del envenenamiento (Gutiérrez et al, 2003).

La actividad del antiveneno para neutralizar las toxinas del veneno se basa en su capacidad de enlazar y neutralizar la mayor parte de las toxinas más importantes. Se han propuesto al menos cuatro mecanismos para que se lleve a cabo la neutralización:

- Unión de los paratopes del anticuerpo a los epítopes que se encuentran en la región molecular farmacológicamente importante, es decir, el sitio catalítico de las enzimas como la fosfolipasa A2 y las metaloproteinasas.
- Unión de los anticuerpos a los epítopes localizados muy cerca al sitio activo, y así ejercer inhibición por efecto estérico.
- Unión de los anticuerpos a sitios alejados del sitio activo de los componentes del veneno, la neutralización se produce por cambios alostéricos inducidos en la toxina, lo que resulta en la falta de unión al tejido o célula blanco.
- Formación de inmunocomplejos entre los anticuerpos y las toxinas, con la posterior remoción de éstos por las células fagocíticas, este último no aplica a las antivenenos cuyo componente son los fragmentos Fab, ya que no forman complejos (Gutiérrez & León, 2009).

La respuesta inflamatoria que sigue al envenenamiento ha sido poco estudiada, los macrófagos son una parte crítica de la respuesta inmune y juegan un papel fundamental tanto en la respuesta humoral como celular, éstos funcionan como células efectoras ya que son capaces de reconocer, internalizar y destruir a un gran número de patógenos o pueden actuar como células accesorias, reclutando y activando otras células inmunes. La presentación de antígenos a los linfocitos

modula funciones de la célula T y secreta un gran número de mediadores inflamatorios, los cuales amplifican tanto la respuesta celular como humoral (Hernández-Cruz et al, 2005).

Ha sido ampliamente documentado que tanto la variación inter e intra específica en la composición del veneno puede afectar la capacidad neutralizante de los antivenenos, aunado al uso de una sola prueba selectiva de la toxicidad del veneno y su eficacia como es la actividad letal.

El debate acerca de la eficacia de los antivenenos empezó desde el primer antiveneno fabricado por Calmete, a finales del siglo diecinueve, para su producción utilizó veneno de cobra *Naja kaouthi*, sin embargo cuando lo probaron contra dos serpientes australianas, no protegió. En 1989 cuando probaron un antiveneno producido con el veneno de *Bothrops jararacá*, no protegió contra el veneno de *Crotalus durissus terrificus*; este y otros trabajos en India, Australia y Norte América sustentaron la especificidad de los antivenenos. Finalmente estos resultados llevaron a los diferentes países a crear antivenenos regionales utilizando los venenos de las especies endémicas de importancia clínica en la región (Fry et al, 2003).

Justificación

Desde hace más de 20 años los Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S. A. de C. V.-Bírmex empresa paraestatal dependiente de la Secretaría de Salud, antes Gerencia General de Biológicos y Reactivos, ha fabricado antiveneno (hoy día faboterápico) antiviperino partiendo de una mezcla de venenos de los géneros *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper*, mismo que por experiencia en campo ha demostrado ser capaz de proteger del veneno de *Crotalus sp*, sin embargo se desconoce el espectro de acción que tiene contra las diferentes especies de dicho género particularmente aquellas que habitan en México, motivo por el cual es importante una caracterización de la reactividad cruzada del faboterápico antiviperino de Bírmex a través de la determinación de su capacidad neutralizante de las actividades biológicas del veneno de estas especies, siendo este aspecto la parte medular del presente trabajo.

Los resultados a obtener permitirán a mediano plazo validar la acción del faboterápico , cuyo impacto será el de tener una mayor distribución del producto no solo a nivel nacional sino también a aquellos países en donde habiten especies de *Crotalus sp*.

Tal vez esto permitirá a Bírmex tomar decisiones de incluir en la producción otras especies además de *Crotalus basiliscus*.

Planteamiento del Problema

El tratamiento de elección contra la mordedura de serpiente se basa en el uso de antivenenos, con la finalidad de prevenir los efectos como resultado del envenenamiento como amputación del miembro afectado, graves trastornos neurológicos e inclusive la muerte. El empleo en campo de los antisueros ha demostrado la efectividad de estos biológicos, sin embargo se plantea la siguiente interrogante:

¿El faboterápico polivalente antiviperino producido en Birmex, presenta una eficiente protección cruzada contra la actividad letal y otras actividades biológicas del veneno de otras especies diferentes a *C. basiliscus* como son *C. atrox*, *C. ravus* y *C. molossus*?

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la protección cruzada del faboterápico polivalente antiviperino Birmex contra los venenos de las especies *C. basiliscus*, *C. atrox*, *C. ravus* y *C. molossus* a través de la neutralización de las actividades biológicas empleando un modelo animal y un modelo *in vitro*.

Objetivos específicos

A) Determinar la actividad letal, hemorrágica, necrosante y coagulante de los venenos de las especies de *C. basiliscus*, *C. atrox*, *C. ravus* y *C. molossus*.

B) Determinar la actividad neutralizante del faboterápico polivalente antiviperino Birmex contra la actividad letal del veneno de las especies *C. basiliscus*, *C. atrox*, *C. ravus* y *C. molossus*

C) Determinar la neutralización de la actividad hemorrágica de los venenos de las especies *C. basiliscus*, *C. atrox*, *C. ravus* y *C. molossus* del faboterápico polivalente antiviperino Birmex.

D) Determinar la neutralización de la actividad necrosante de los venenos de las especies *C. basiliscus*, *C. atrox*, *C. ravus* y *C. molossus* del faboterápico polivalente antiviperino Birmex.

D) Determinar la neutralización de la actividad de coagulación de venenos de las especies *C. basiliscus*, *C. atrox*, *C. ravus* y *C. molossus* del faboterápico polivalente antiviperino Birmex.

Hipótesis

Siendo especies similares, los venenos son antigénicamente similares por lo cual el faboterápico polivalente antiviperino de Birmex tendrá actividad neutralizante contra los venenos de diferente origen. Al ponerlo en contacto con los venenos de *C. atrox*, *C. ravus* y *C. molossus*, será capaz de neutralizar sus actividades letal, hemorrágica, necrosante y coagulante.

Metodología

El presente trabajo corresponde a un estudio de tipo experimental realizado en el Departamento de Control Biológico del Instituto Nacional en Birmex, en colaboración con el área de Investigación y Bioterios, el cual a través de una serie de bioensayos en el laboratorio empleando un modelo animal y un método *in vitro*, permitió evaluar la protección que presenta el faboterápico polivalente antiviperino fabricado por Birmex, contra la acción de venenos provenientes de diferentes especies del género *Crotalus*. Se realizó en un laboratorio de Bioseguridad nivel II, bajo campana de flujo laminar. Cumpliendo con lo establecido en las Buenas Prácticas de Laboratorio y en la norma NMX-EC-17025-IMNC 2006. El protocolo de investigación fue autorizado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de Birmex.

Materiales y métodos

Material biológico

- Animales de experimentación: Ratones albinos, cepa INH, de 18 a 20 gramos de peso, de sexo indistinto y cobayos albinos, cepa Hartley, peso de 250 a 300 g de peso, de sexo indistinto. (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, FEUM, 2011). El manejo de los animales se realizó de acuerdo a los procedimientos PNOPO414, Birmex 2012 "Uso de roedores para procesos de Investigación, Producción y Control de Calidad de Biológicos.
- Veneno de *C. basiliscus*, *C. atrox*, *C. ravus* y *C. Molossus*.
- Faboterápico polivalente antiviperino producido por Birmex con fecha de caducidad vigente.
- Plasma humano normal citratado.

Reactivos

- Solución salina estéril al 0.85 % p/v, pH 7.2.
- Agua para Fabricación de Inyectables.
- Timerosal 0.01 % p/v.
- Reactivo ABC (binciconitato disódico), carbonato de sodio monohidratado, tartrato de sodio hidróxido de sodio y bicarbonato de sodio.
- Solución de referencia de proteína.
- Sulfato de cobre al 4 % p/v.

Venenos de prueba.

Los venenos utilizados en este estudio provienen de ejemplares sanos, jóvenes y adultos, de las especies *C. basiliscus*, *C. atrox*, *C. ravus* y *C. molossus* que forman parte del Herpetario del Instituto Nacional de Higiene, de Birmex (Tabla 3). El cual se rige por los procedimientos internos de Birmex, mismos que se basan en la NOM-062-ZOO-1999; “Especificaciones técnicas para la producción cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

Los ofidios se mantuvieron alojados en cajas individuales a una temperatura de 24°C– 30°C. Los Vipéridos antes mencionados se alimentaron con ratas o ratones en periodos de 15 días. Todos los ofidios recibieron agua *ad libitum*.

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	EDAD Y No. DE EJEMPLARES
<i>Crotalus basiliscus</i>	Cascabel del pacífico	8 adultos
<i>Crotalus atrox</i>	Cascabel diamantada	1 adulto
<i>Crotalus molossus</i>	Cascabel cola negra	6 juveniles
<i>Crotalus ravus</i>	Cascabel pigmea	3 adultos 9 juveniles

Tabla 3. **Serpientes utilizadas.** Ejemplares de serpientes de las diferentes especies del género *Crotalus* proporcionadas por el Herpetario de Birmex, de acuerdo a su edad.

Obtención del veneno

La obtención del veneno se realizó mediante la “ordeña” de los ejemplares, la cual consistió en estimular el vaciamiento de las glándulas productoras de veneno a través de la mordedura de una copa colectora del veneno cubierta con una membrana, Figura 8.

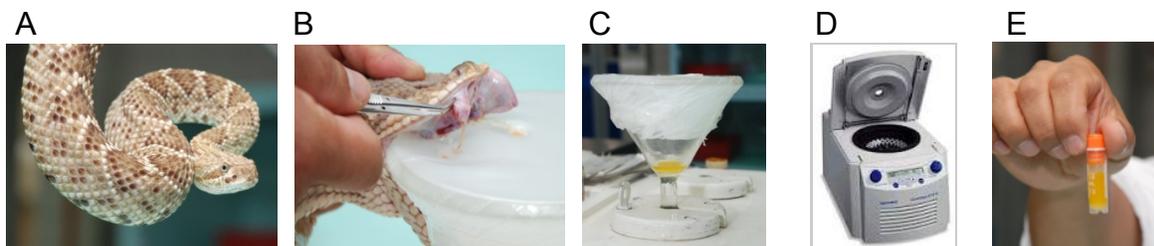


Fig. 8 **Obtención del veneno.** A) Serpiente del género *Crotalus*. B) “Ordeña” de los ejemplares. C) Recolección del veneno. D) Separación de detritos celulares por centrifugación. E) Conservación a – 20°C.

Una vez obtenido el veneno, se determinó el volumen de cosecha y conservó a una temperatura de 4°C-8°C. Se separaron los detritos celulares mediante centrifugación, se determinó la concentración de proteínas empleando el método del ácido bicinónico (FEUM, 2011) y se conservaron congelados a una temperatura de -20°C hasta el momento en que se realizaron los ensayos que se describen más adelante.

Formulación de los venenos.

Una vez que se contó con los venenos y con la finalidad de tener controlado uno de los factores que pudiera dar mayor variabilidad a la prueba, inherente a cualquier bioensayo, se preparó un lote de los diferentes venenos, de acuerdo al procedimiento que a continuación se detalla:

Cada uno de los venenos se diluyó con solución salina estéril al 0.85% adicionada de timerosal al 0.01% p/v. Todos los venenos se ajustaron de tal manera que la dosis de reto inoculada a cada ratón en 0.5 mL contenían 3 DL₅₀.

Para la titulación de cada uno de los venenos, se realizaron varios ensayos en los que se probaron diferentes series de diluciones, hasta encontrar aquel intervalo en el que se obtuviera dosis-respuesta.

Determinación de la actividad letal.

Se utilizó el método descrito en la FEUM, el cual consistió en inocular grupos de seis ratones con diferentes diluciones de cada uno de los venenos, para preparar las diluciones se utilizó solución salina estéril. Se probaron diferentes series de diluciones de veneno, así como el factor de dilución, hasta encontrar aquellas en las que existiera dosis-repuesta. Se inoculó 0.5 mL de cada dilución, por vía endovenosa en la vena caudal de cada ratón, después del periodo de observación (24 h), se registró el número de ratones muertos y vivos. Al final del ensayo, se practicó la eutanasia mediante cámara de CO₂ a los ratones sobrevivientes. La dosis letal al 50% (DL₅₀) se calculó por el método de Sperman y Karber (FEUM, 2011).

Con la finalidad de conocer el título de cada veneno y poder utilizarlo en la determinación de la neutralización de la actividad letal, este método se realizó por triplicado para cada uno de los venenos, Figura 9.

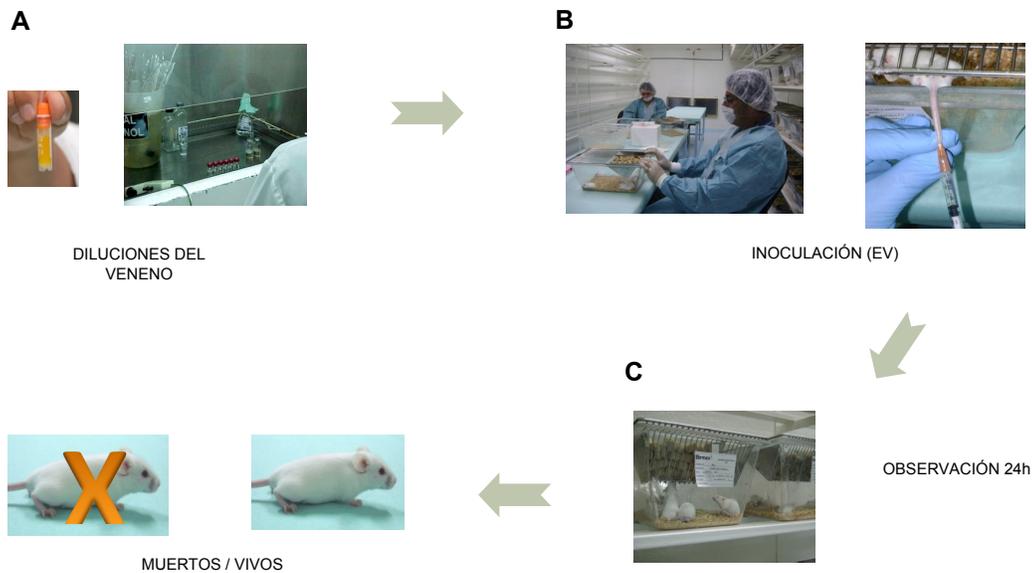


Fig. 9 **Determinación de la Dosis Letal al cincuenta % (DL₅₀/mL) de los venenos.** A) Preparación de las diluciones de veneno con solución salina. B) Inoculación de los ratones por vía endovenosa (ev), con 0.5 mL de la dilución del veneno. C) Observación de los animales a las 24 h de inoculación, registro de muertos y vivos. FEUM, 2011.

Determinación de la neutralización de la actividad letal.

El contenido de anticuerpos se expresa en DL₅₀ de veneno neutralizadas, es decir, la neutralización de la actividad letal por parte del antiveneno.

La neutralización de la actividad letal de cada uno de los cuatro venenos en estudio, por el faboterápico polivalente antiviperino de Birmex, se determinó mediante un ensayo en el cual se prepararon diferentes diluciones del faboterápico polivalente antiviperino a analizar, utilizando solución salina estéril como diluyente, y se mezclaron con una cantidad constante de veneno el cual debe contener entre 10 a 14 DL₅₀/mL (3 DL₅₀/ratón). Se realiza en paralelo una prueba del veneno para verificar la cantidad de DL₅₀/mL con la que fue desafiado el antiveneno.

Se inocularon grupos de seis ratones con 0.5 mL de cada una de las mezclas, por vía endovenosa, al cabo de 24 horas se registró el número de ratones vivos y muertos, como se observa en la Fig. 10 (FEUM, 2011).

Al finalizar el ensayo, a los ratones sobrevivientes se les practicó la eutanasia empelando cámara de CO₂. Con los datos registrados se calculó la dosis protectora al 50 % del faboterápico (DP₅₀) por el método de Sperman y Karber (FEUM, 2011)

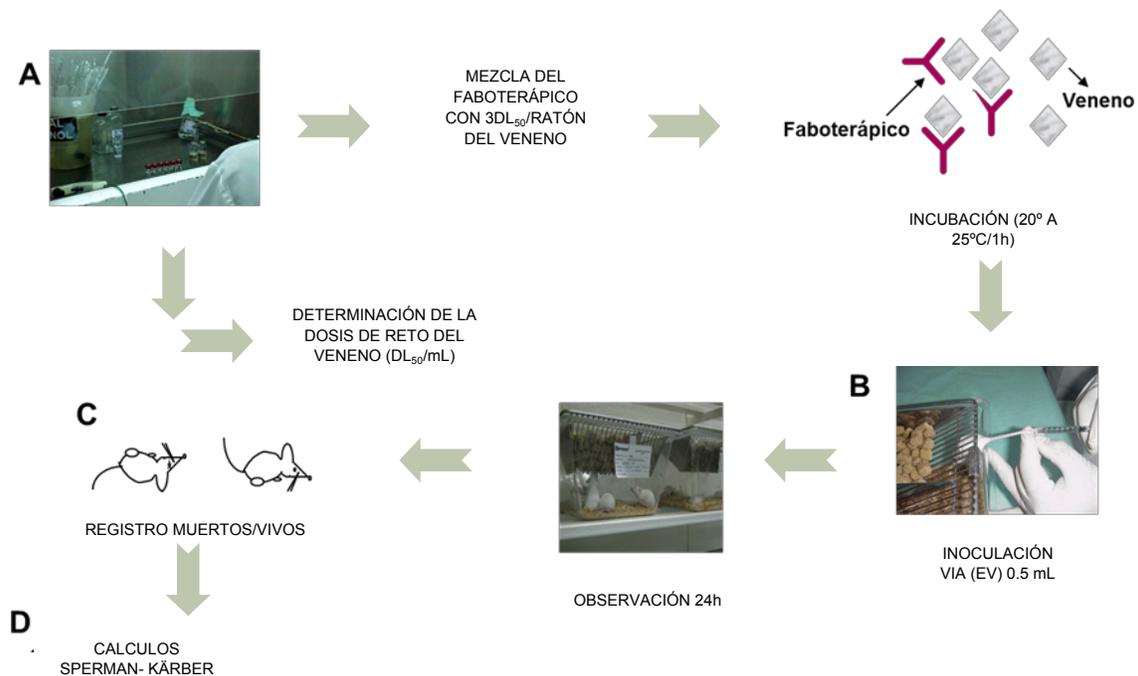


Fig. 10 **Determinación de la neutralización de la actividad letal por el lote de faboterápico polivalente antiviperino.** A) Preparación de las mezclas de veneno/antiveneno con solución salina; B) Inoculación de los ratones por vía endovenosa (ev), con 0.5 mL de la dilución del veneno; C) Observación de los animales a las 24 h de inoculación, registro de muertos y vivos; D) Cálculo de resultados. FEUM, 2011.

Determinación de la actividad hemorrágica.

La actividad se expresa como la Dosis Mínima Hemorrágica (DMH), que corresponde a la dosis mínima de veneno que produjo una lesión hemorrágica con diámetro mayor perpendicular de 10 mm promedio, como se esquematiza de 10 mm de diámetro, dos horas después de la inyección.

Se modificó el método utilizado en el Instituto Clodomiro Picado (Reta F. Datos no publicados), en lugar de utilizar la piel de ratón, la actividad hemorrágica se determinó en la piel de cobayos. Luego de dos horas, se sacrificaron los animales, se removió su piel y se midió el área hemorrágica en la superficie interna de la piel.

La cantidad de proteína presente en el veneno, se determinó por el método del ácido bicinónico (FEUM, 2011), de acuerdo al resultado obtenido, se prepararon soluciones con diferente concentración de proteína, utilizando solución salina como diluyente, y se hicieron varios ensayos hasta encontrar el intervalo en el que se presentó dosis-respuesta.

Se utilizaron cobayos de 250 a 300 g de peso, a quien después de rasurar la región dorsal se les inoculó 0.1 mL de cada una de las diferentes concentraciones

del veneno por vía intradérmica (id), como control negativo se inoculó solución salina.

Las lesiones se miden en la superficie interna de la piel, con ayuda de un calibrador, tras el sacrificio de los animales en cámara de CO₂ a las dos horas de la inoculación y después de remover la piel, Figura 11 (Theakston & Reid, 1983; De Roodt et al, 2005; Manual de métodos de Laboratorio, Instituto Clodomiro Picado, 2007).



Fig. 11 **Determinación de la Dosis Mínima Hemorrágica (DMH) en los venenos.** A) Preparación de las diluciones del veneno; B) Inoculación en el cobayo por vía intradérmica (id) de 0.1 mL de la dilución del veneno; C) Lectura de la lesión hemorrágica en la piel del cobayo. Theakston & Reid, 1983; De Roodt et al, 2005; Manual de métodos de Laboratorio, Instituto Clodomiro Picado, 2007.

Como la lesión no era una circunferencia, lo que se hizo fue dibujarla en una mica transparente, pasarla a papel milimétrico para tener el área de la lesión y posteriormente se determinó el diámetro de la misma, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Diámetro} = 2x(\sqrt{\text{área hemorrágica}/\pi})$$

Se construyó una curva dosis respuesta colocando el diámetro de la lesión calculada en el eje de las y, la concentración de veneno expresada en mg, en el eje de las x. La dosis mínima hemorrágica se determinó mediante regresión lineal.

Determinación de la neutralización de la actividad hemorrágica.

La neutralización de la actividad hemorrágica de los venenos por los antivenenos se determinó mediante un ensayo Figura 12, en el que se incuban durante 30 min a una temperatura de 37°C, las mezclas de una cantidad constante de veneno 5 DMH (dosis de reto) y diversas diluciones del faboterápico de manera que se obtuvieron las siguientes razones de µL de antiveneno/ mg de veneno: 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.25. Se inoculó por vía intradérmica, 0.1 mL de cada una de las mezclas en la piel del cobayo; posteriormente se evaluó la actividad hemorrágica de las mezclas utilizando el procedimiento en piel de cobayos, como se describió en el inciso anterior (De Roodt et al, 2005).

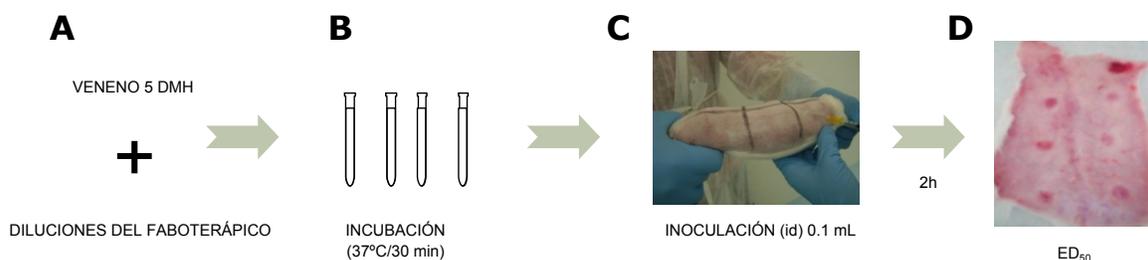


Fig. 12 **Determinación de la neutralización de la actividad hemorrágica del lote de faboterápico polivalente antiviperino.** A) Preparación de la mezcla veneno (5 dosis mínimas hemorrágicas/ dilución del antiveneno; B) Incubación de la mezcla a una temperatura de 37°C durante 30 min; C) Inoculación en la piel del cobayo por vía intradérmica de 0.1 mL de la mezcla; D) Después de 2h registrar el diámetro de la reacción hemorrágica. Theakston & Reid, 1983; De Roodt et al, 2005; Manual de métodos de Laboratorio, Instituto Clodomiro Picado, 2007.

Como la lesión no era una circunferencia, lo que se hizo fue dibujarla en una mica transparente, pasarla a papel milimétrico para tener el área de la lesión y posteriormente se determinó el diámetro de la misma, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Diámetro} = 2x(\sqrt{\text{área hemorrágica}/\pi})$$

Se construyó una curva dosis respuesta colocando el diámetro de la lesión calculada en el eje de las y, los μL de antiveneno en el eje de las x. La dosis mínima hemorrágica se determinó mediante regresión lineal.

La dosis efectiva al 50 % (DE_{50}), correspondiente a la cantidad en μL de antiveneno, que neutralizara el cincuenta por ciento de la lesión, se calculó tomando como punto de referencia el valor del diámetro de la lesión hemorrágica inducida por la solución del veneno (control positivo), el cual se dividió entre dos para tener el diámetro de la lesión al 50 %, despejado de la fórmula de la recta obtenida por regresión lineal.

Determinación de la actividad necrosante.

La dosis mínima necrosante (DMN) es la mínima cantidad de veneno que al ser inoculada por vía intradérmica, produce una lesión necrótica de 5 mm de diámetro a las 72 h después de su aplicación.

Se determinó la cantidad de proteína presente en el veneno por el método del ácido bicinonínico (FEUM, 2011), de acuerdo al resultado obtenido, se prepararon soluciones con diferente concentración, utilizando solución salina como diluyente, hasta encontrar el intervalo en el que se presentó dosis-respuesta. con las mismas determinar la dosis mínima necrosante (Theakston & Reid, 1983; De Roodt et al, 2005; Manual de métodos de Laboratorio, Instituto Clodomiro Picado, 2007).

Se inocularon cobayos por vía intradérmica (id), con 0.1 mL de cada una de las diferentes concentraciones del veneno, utilizando solución salina como diluyente, como control negativo se inoculó solución salina. Las lesiones se miden en la superficie interna con ayuda de un calibrador, tras el sacrificio de los animales empleando cámara de CO₂ a las 72 horas, después de remover la piel, Figura 13.



Fig. 13 **Determinación de la dosis mínima necrosante (DMN) en los venenos.** A) Preparación de las diluciones del veneno; B) Inoculación en la piel del cobayo por vía intradérmica de 0.1 mL; C) Después de las 72h registrar la lectura de la lesión necrosante. Manual de métodos de Laboratorio, Instituto Clodomiro Picado, 2007.

Como la lesión no era una circunferencia, lo que se hizo fue dibujarla en una mica transparente, pasarla a papel milimétrico para tener el área de la lesión y posteriormente se determinó el diámetro de la misma, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Diámetro} = 2x \left(\sqrt{\frac{\text{área necrosante}}{\pi}} \right)$$

Se construyó una curva dosis respuesta colocando el diámetro de la lesión calculada en el eje de las y, la concentración de veneno expresada en mg, en el eje de las x. La dosis mínima necrosante se determinó mediante regresión lineal.

Determinación de la neutralización de la actividad necrosante.

La neutralización de la actividad necrosante de los venenos por el antiveneno se determinó mediante un ensayo en el que se incuban durante 30 min a una temperatura de 37°C, las mezclas de una cantidad constante de veneno 3 DMN (dosis de reto) y diversas diluciones del faboterápico de manera que se obtuvieron las siguientes razones µL antiveneno/ mg veneno: 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.25. Se inoculó por vía intradérmica 0.1 mL de las mezclas en la piel del cobayo Posteriormente se evalúa la actividad necrosante de las mezclas utilizando el procedimiento en piel de cobayos, como se describe en el inciso anterior Figura 14.

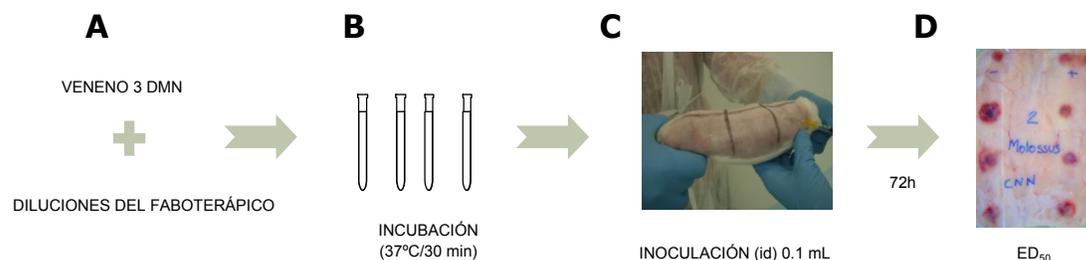


Fig. 14 Neutralización de la actividad necrosante del lote de faboterápico polivalente antiviperino. A) Preparación de la mezcla veneno (3 dosis mínimas necrosantes/ dilución del antiveneno; B) Incubación de la mezcla a una temperatura de 37°C durante 30 min; C) Inoculación en la piel del cobayo por vía intradérmica de 0.1 mL de la mezcla; D) Después de 72h registrar el diámetro de la reacción necrosante. Manual de métodos de Laboratorio, Instituto Clodomiro Picado, 2007.

Como la lesión no era una circunferencia, lo que se hizo fue dibujarla en una mica transparente, pasarla a papel milimétrico para tener el área de la lesión y posteriormente se determinó el diámetro de la misma, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Diámetro} = 2x \left(\sqrt{\frac{\text{área necrosante}}{\pi}} \right)$$

Se construyó una curva dosis respuesta colocando el diámetro de la lesión calculada en el eje de las y, los μL de antiveneno en el eje de las x. La dosis mínima necrosante se determinó mediante regresión lineal.

La dosis efectiva al 50 % (DE_{50}), correspondiente a la cantidad en μL de antiveneno, que neutralizara el cincuenta por ciento de la lesión, se calculó tomando como punto de referencia el valor del diámetro de la lesión necrosante inducida por la solución del veneno (control positivo), el cual se dividió entre dos para tener el diámetro de la lesión al 50 %, despejado de la fórmula de la recta obtenida por regresión lineal.

Determinación de la actividad coagulante

Una dosis coagulante mínima en plasma humano (DCM-P) se define como la dosis mínima de veneno que produce la formación de un coágulo evidente en 60 segundos y se expresa en mg/L. La actividad se determinó midiendo los tiempos de coagulación del plasma luego de agregar diversas concentraciones de veneno. Para lo cual se agregó en tubos de vidrio 0.2 mL de plasma humano normal citratado, estos se incubaron durante 3-5 min en baño de agua a una temperatura de 37°C. Después se adicionaron 50 μL de las diluciones de veneno disueltas en PBS, en los controles negativos se agregó sólo plasma con PBS. Se determinó el

tiempo de coagulación con un cronómetro. Figura 15 (De Roodt et al, 2005; Manual de métodos de Laboratorio, Instituto Clodomiro Picado, 2007).

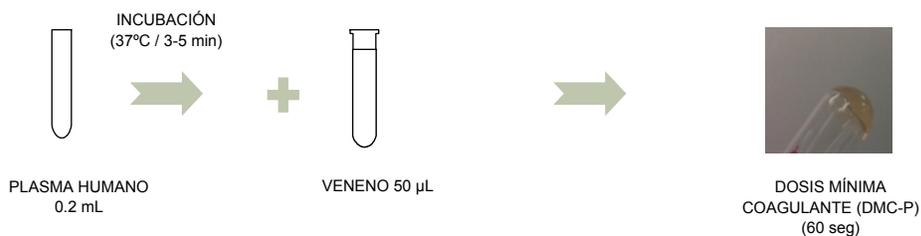


Fig. 15 **Determinación de dosis mínima coagulante (DMC-P) en los venenos.** Se observa la formación de un coágulo evidente en 60 seg. Manual de métodos de Laboratorio, Instituto Clodomiro Picado, 2007.

Determinación de la neutralización de la actividad coagulante

La neutralización de la actividad coagulante de venenos por antivenenos se determina mediante el análisis en el que se incuba una cantidad constante de veneno (dosis de reto) y varias diluciones del antiveneno, de manera que se obtenga una concentración de veneno de 2 DMC-P (Dosis Mínima Coagulante). Posteriormente se determinan los tiempos de coagulación al agregar alícuotas de estas mezclas a plasma citratado, Figura 16 (Manual de métodos de Laboratorio, Instituto Clodomiro Picado, 2007; J. Gutierrez, 2004).



Fig. 16 **Determinación de la neutralización de la actividad coagulante de los lotes de faboterápico polivalente antiviperino.** Se observa la formación de un coágulo evidente en 60 seg. Manual de métodos de Laboratorio, Instituto Clodomiro Picado, 2007.

No se llevó a cabo la determinación de la neutralización de la actividad coagulante de los venenos, debido a que los estos no la presentaron.

Resultados

Se determinaron las actividades letal, coagulante, hemorrágica y necrosante en los venenos de las especies *C. basiliscus*, *C. atrox*, *C. ravus* y *C. molossus*, para caracterizar primero los venenos y después desafiar al faboterápico polivalente antiviperino y determinar si existe neutralización de las actividades analizadas, es decir, actividad cruzada del antiveneno contra las especies del género *Crotalus* diferentes a la utilizada para su fabricación.

Debido a la variabilidad intrínseca de los bioensayos es necesario partir de venenos caracterizados y estandarizados, para eliminar o disminuir la variabilidad en los ensayos biológicos, por esta razón, primero se determinó el contenido de proteínas en los venenos.

En la tabla 4 se pueden observar los resultados del contenido de proteína en los cuatro venenos analizados, el contenido de proteína osciló en el intervalo de 166 a 256 miligramo por mililitro.

Estos datos sirvieron de base para determinar algunas de las actividades tóxicas de los venenos.

VENENO	LOTE	CONTENIDO DE PROTEÍNAS mg/mL
<i>Crotalus basiliscus</i>	Vcb01-11	166.16
<i>Crotalus molossus</i>	Vcm01-11	239.35
<i>Crotalus atrox</i>	Vca01-11	233.72
<i>Crotalus ravus</i>	Vrs01-11	255.87

Tabla 4. **Contenido de proteína en los venenos.** Concentración de proteína contenida en los cuatro venenos analizados, estas oscilan entre 166 y 256 miligramos por mililitro.

En paralelo se estandarizó un lote de cada uno de los venenos, para poder utilizarlos en las diferentes metodologías, con base en su título de actividad letal y así evitar un factor más de variabilidad en el bioensayo, para lo cual, se realizaron una serie de ensayos preparando diluciones con diferente factor de dilución, hasta encontrar aquellas en las que se presentara dosis-respuesta, es decir, se obtuviera el cero y el cien por ciento de respuesta en los animales de prueba. Se encontró una mejor respuesta utilizando el factor de dilución de 2, ejemplos de los resultados obtenidos en algunos ensayos pueden observarse en las tablas 5 y 5a.

DILUCIÓN	VIVOS	MUERTOS	TOTAL
1: 50	6	0	6
1:100	6	0	6
1:200	6	0	6
1:400	6	0	6
1:800	6	0	6

DILUCIÓN	VIVOS	MUERTOS	TOTAL
1: 6.25	0	6	6
1:12.5	0	6	6
1:25	4	2	6
1:50	6	0	6
1:100	6	0	6

Tablas 5 y 5a. **Ejemplos de las series de diluciones de veneno probadas hasta encontrar aquellas en las que existiera dosis-repuesta.**

ACTIVIDAD LETAL

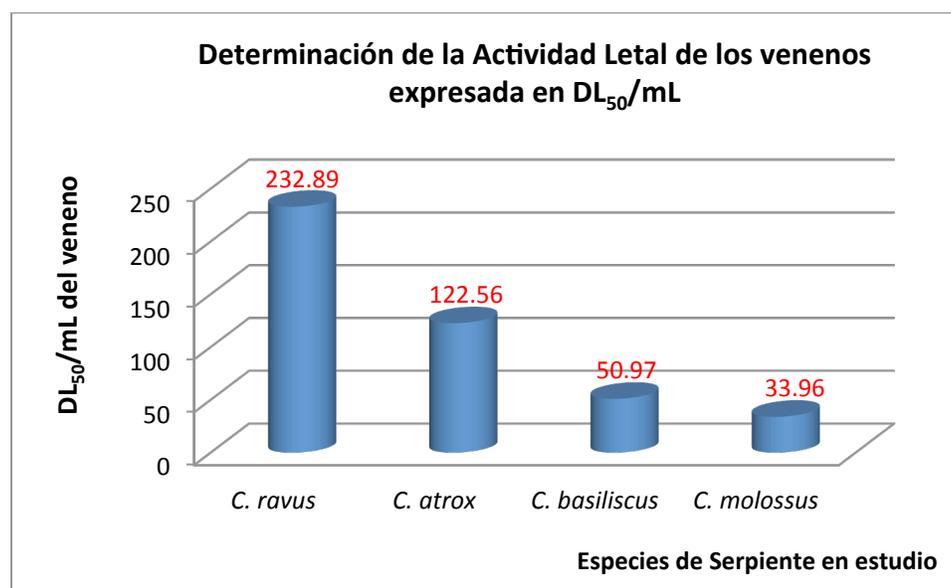
La actividad letal de cada uno de los venenos se diseñó para realizarla por triplicado en tres días diferentes de prueba, el resultado se reporta calculando la media geométrica de estos ensayos.

La tabla 6 y la gráfica 1 muestran comparativamente la actividad letal de los cuatro venenos analizados, podemos observar en el caso de *C. basiliscus* fue de 50.97 DL₅₀/ mL, 33.96 DL₅₀/mL para *C. molossus*, 232.89 DL₅₀/ mL para *C. ravus* y 122.56 DL₅₀/ mL para *C. atrox*.

VENENO	1ª PRUEBA DL ₅₀ /mL	2ª PRUEBA DL ₅₀ /mL	3ª PRUEBA DL ₅₀ /mL	MEDIA GEOMETRICA DL ₅₀ /mL	D.S.
<i>C. basiliscus</i>	44.54	49.98	59.5	50.97	7.57
<i>C. molossus</i>	33.96	37.06	31.12	33.96	2.97
<i>C. ravus</i>	232.89	232.89	232.89	232.89	0
<i>C. atrox</i>	141.39	114.26	122.25	122.56	13.94

D.S. Desviación estándar

Tabla 6. **Actividad letal de los venenos en DL₅₀/mL.** Resultados de la actividad letal realizada por triplicado a cada uno de los cuatro venenos analizados expresada en la dosis de veneno que al ser inoculada en ratones, mata al cincuenta % de los animales (DL₅₀/mL).



Grafica 1. **Actividad letal de los venenos de *C. basiliscus*, *C. atrox*, *C. ravus* y *C. molossus*.**

NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD LETAL

Para determinar la neutralización de la actividad letal del veneno, se analizó el lote de faboterápico polivalente antiviperino producido por Birmex, poniéndolo en contacto con cada uno de los cuatro venenos de las especies del género *Crotalus*, los ensayos se realizaron por triplicado. La actividad neutralizante se reporta en base a las DL_{50}/mL de veneno que neutraliza el faboterápico polivalente antiviperino. A continuación se muestra un ejemplo del cálculo que se realizó para determinar la potencia por el método de Sperman y Kärber.

Dosis	X_i	Ratones (Vivos)	Total de ratones	P_i	
		r_i	n_i		
0.006	-2.2218	0	6	0.00000	
0.011	-1.9586	0	6	0.00000	
0.017	-1.7696	4	6	0.66667	
0.02	-1.6990	6	6	1.00000	
0.04	-1.3979	6	6	1.00000	
F.D.	1.6	0.204119983			
	M	-1.8402000			
	DP50	0.01445	69.21495982		
	r_i	$n_i - r_i$	$r_i(n_i - r_i)$		
	0	6	0		
	0	6	0		
	4	2	8		
	6	0	0		
	6	0	0		
s^2	0.0001024			$s =$	0.01011929
LIC	-1.86003	0.013803	ml		72.4492304
LSC	-1.82037	0.01512	ml		66.1250732

Donde:

x_i = log. de la dosis

r_i = ratones vivos

n_i = total de ratones

$n_i - r_i$ = ratones muertos

F.D. = factor de dilución

LIC = Límite inferior de confianza

LSC = Límite superior de confianza

Ejemplo del cálculo para determinar la potencia del faboterápico polivalente antiviperino.

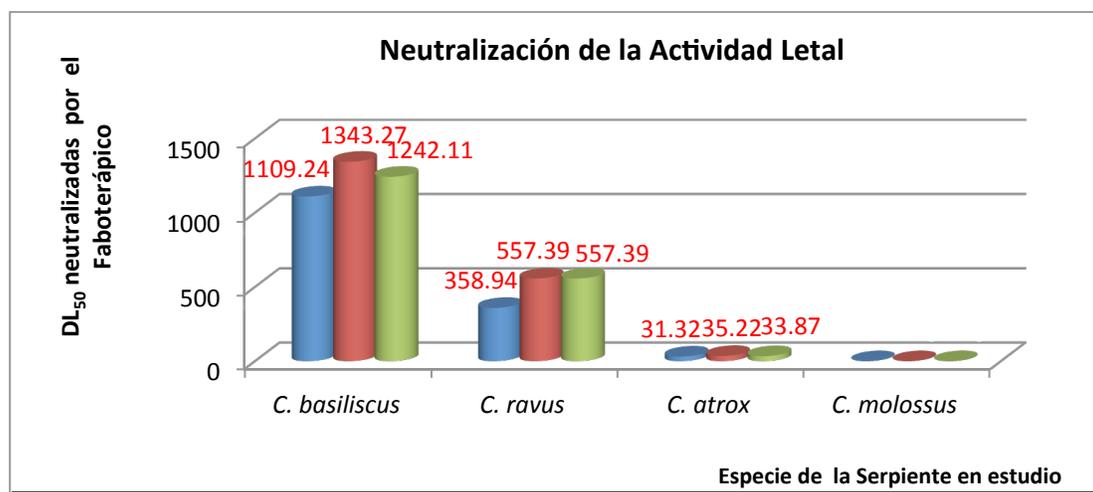
En la tabla 7 y en la gráfica 2 se muestran los resultados de neutralización obtenidos en los ensayos contra cada uno de los venenos.

VENENO DE SERPIENTE	DL ₅₀ /mL NEUTRALIZADAS *	DL ₅₀ /mL NEUTRALIZADAS	DL ₅₀ /mL NEUTRALIZADAS	MEDIA GEOMÉTRICA DL ₅₀ /mL NEUTRALIZADAS
<i>C. basiliscus</i>	1109.24 (1064.75 – 1155.47)	1343.27 (1295.18 – 1392.16)	1242.11 (1197.60 -1287.27)	1227.77 (1182.03 -1274.59)
<i>C. ravus</i>	358.94 (345.15 -370.99)	557.39 (533.71 – 573.67)	557.39 (533.71 – 573.67)	481.33 (461.53 – 496.09)
<i>C. atrox</i>	31.32 (30.21 -32.47)	35.22 (33.98 -36.52)	33.87 (32.67 -35.12)	33.43 (32.24 -34.66)
<i>C. molossus</i>	ND*	ND*	ND*	ND*

Tabla 7. **Neutralización de la actividad letal.** Resumen de los resultados de potencia del Faboterápico Polivalente Antiviperino contra los venenos de las cuatro especies del género *Crotalus*.

ND* No detectable bajo las condiciones del trabajo experimental, no hubo neutralización de la actividad letal del veneno de *C. molossus* por parte del faboterápico polivalente antiviperino.

* La potencia se expresa como DL₅₀ de veneno neutralizadas por mL del faboterápico.



Gráfica 2. **Resultados obtenidos de la neutralización de la actividad letal de tres lotes de faboterápico polivalente antiviperino contra *C. basiliscus* y *C. ravus***

El faboterápico polivalente antiviperino neutralizó la actividad letal de los venenos, presentando distinta potencia dependiendo del veneno a neutralizar, los resultados muestran que el antiveneno neutralizó 1,227.77 DL₅₀/mL del veneno de *C. basiliscus*, 481.33 DL₅₀/ mL del veneno de *C. ravus* y 11.23 DL₅₀/mL del veneno de *C. atrox*. Bajo las condiciones en las que se llevó a cabo el presente estudio, no

hubo neutralización del veneno de *C. molossus* por parte del faboterápico polivalente antiviperino producido por Birmex.

ACTIVIDAD HEMORRÁGICA Y NECROSANTE

La actividad hemorrágica de los diferentes venenos se expresó como DMH (dosis mínima hemorrágica) Figura 17. Los resultados fueron: 16.05 µg para el veneno de *C. basiliscus*, 17.25 µg para *C. molossus*, 12.07 µg para *C. ravus* y 23.97 µg para *C. atrox* como se observa en la tabla 8 y en la gráfica 3.

VENENO	DMH µg	5 DMH µg	φ	50%
<i>C. basiliscus</i>	16.05	80.25	22.68	11.34
<i>C. molossus</i>	17.25	86.25	18.78	9.39
<i>C. ravus</i>	12.07	60.35	11.82	5.91
<i>C. atrox</i>	23.97	119.85	25.16	12.58

DMH. DOSIS MINIMA HEMORRÁGICA

Tabla 8. Determinación de la Actividad Hemorrágica de veneno de serpiente.

La actividad necrosante determinada se expresó como DMN (dosis mínima necrosante) Figura 18. Los resultados fueron: 30.25 µg para *C. basiliscus*, 18.16 µg para *C. molossus*, 34.24 µg para *C. ravus* y 26.39 µg para *C. atrox*, estas actividades se pueden comparar en la tabla 9 y en la gráfica 3.

VENENO	DMN µg	3 DMN µg	φ	50%
<i>C. basiliscus</i>	30.25	90.75	23.12	11.56
<i>C. molossus</i>	18.16	54.48	25.14	12.57
<i>C. ravus</i>	34.24	102.72	24.96	12.48
<i>C. atrox</i>	26.39	79.17	19.96	9.98

DOSIS MINIMA NECROSANTE (DMN)

Tabla 9. Determinación de la Actividad Necrosante de veneno de serpiente.

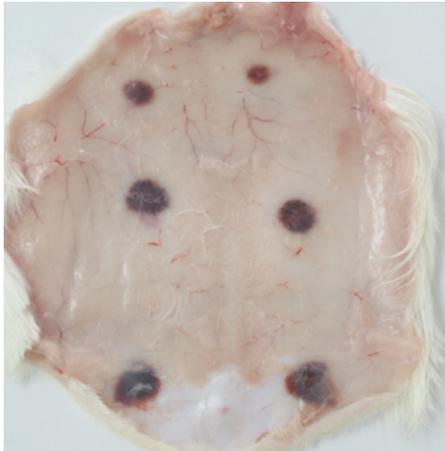
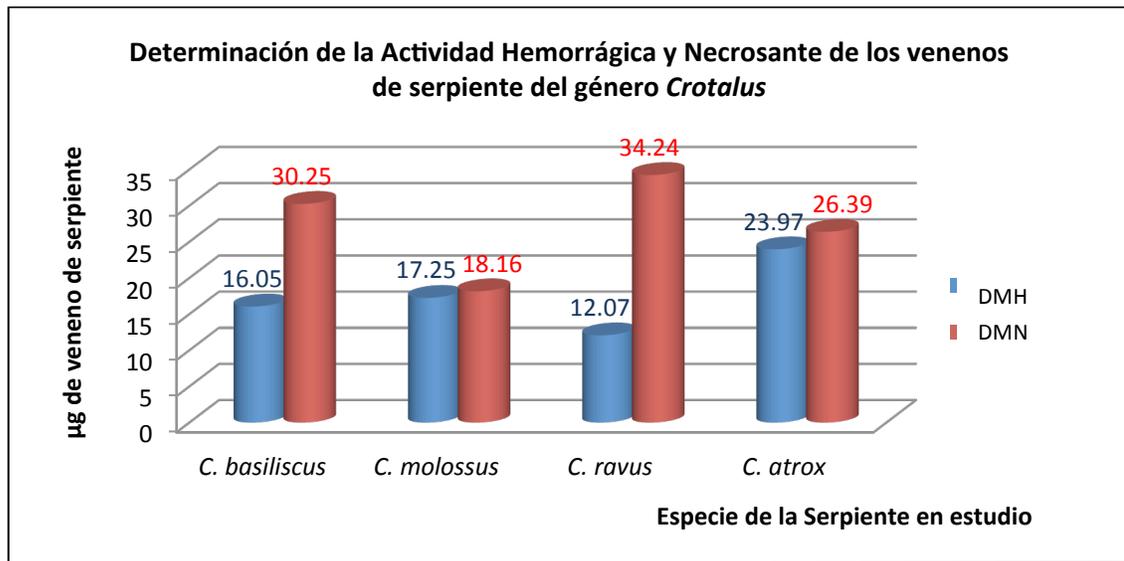


Fig. 17 Lesión hemorrágica en la piel de cobayo ocasionada por el veneno de *C. basiliscus*.



Fig. 18 Lesión necrosante en la piel de cobayo ocasionada por el veneno de *C. molossus*.



DMH Dosis Mínima Hemorrágica
 DMN Dosis Mínima Necrosante

Gráfica 3. Comparativo de las actividades hemorrágica y necrosante de los venenos analizados.

NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMORRÁGICA Y NECROSANTE.

En las Figuras 19 y 20 podemos observar la neutralización de las lesiones hemorrágica y necrosante respectivamente, al inocular en la piel del cobayo las mezclas de diferentes diluciones del faboterápico polivalente antiviperino, con una cantidad constante de veneno de *C. basiliscus* en el primer caso y *C. ravidus* en la segunda figura.

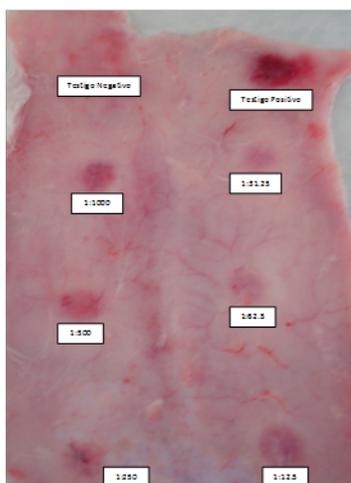


Fig. 19 Neutralización de la actividad hemorrágica del Faboterápico polivalente antiviperino contra el veneno de *C. basiliscus*.

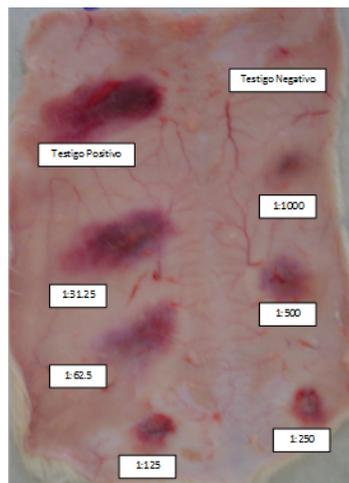
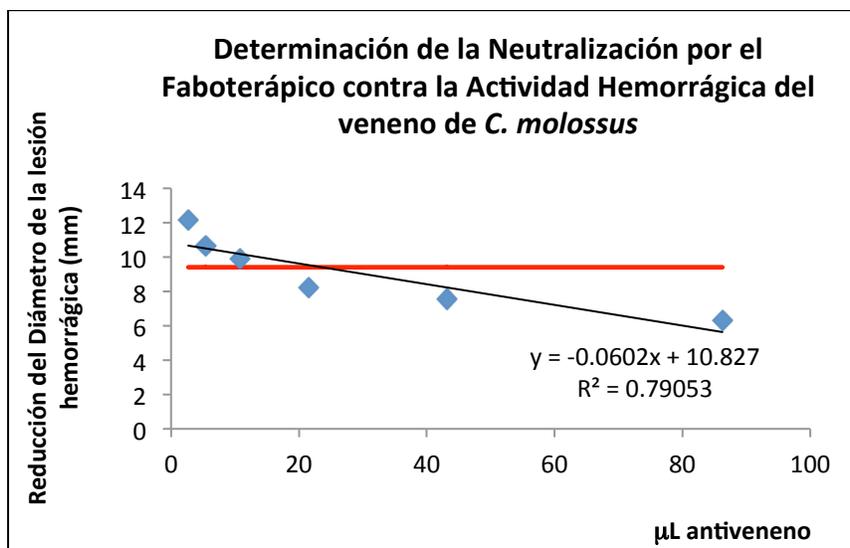


Fig. 20 Neutralización de la actividad necrosante del Faboterápico polivalente antiviperino contra el veneno de *C. ravidus*.

La gráfica 4 muestra un ejemplo del cálculo de la dosis efectiva al cincuenta por ciento para la neutralización de la actividad hemorrágica, del faboterápico polivalente antiviperino, por regresión lineal, en este caso contra el veneno de *C. molossus*, cabe mencionar que lo mismo se realizó para cada veneno en estudio.

Del mismo modo, en la gráfica 5 se presenta el ejemplo del cálculo de la DE_{50} del faboterápico, para la neutralización de la actividad necrosante, contra el veneno de *C. atrox*.



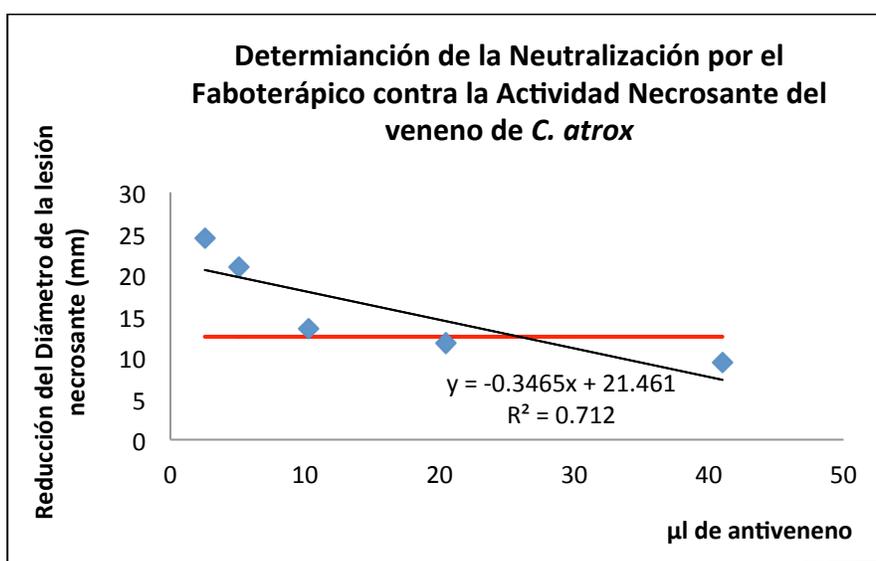
µl antiv.	Diámetro (mm)	50% de la lesión
2,69	12,15	9,39
5,39	10,64	9,39
10,78	9,9	9,39
21,56	8,21	9,39
43,13	7,56	9,39
86,25	6,28	9,39

$$y = -0.0602x + 10.83$$

$$9.39 - 10.83 / 0.0602$$

DE50 = 23.83 µL

Gráfica 4. Cálculo de la actividad neutralizante del faboterápico polivalente antiviperino contra la actividad hemorrágica del veneno de *C. molossus*.



µl antiv.	Diámetro (mm)	50% de la lesión
2,56	24,43	12,48
5,13	20,89	12,48
10,25	13,44	12,48
20,5	11,72	12,48
41	9,3	12,48

$$y = -0.3465x + 21.46$$

$$\frac{12.48 - 21.46}{-0.3465}$$

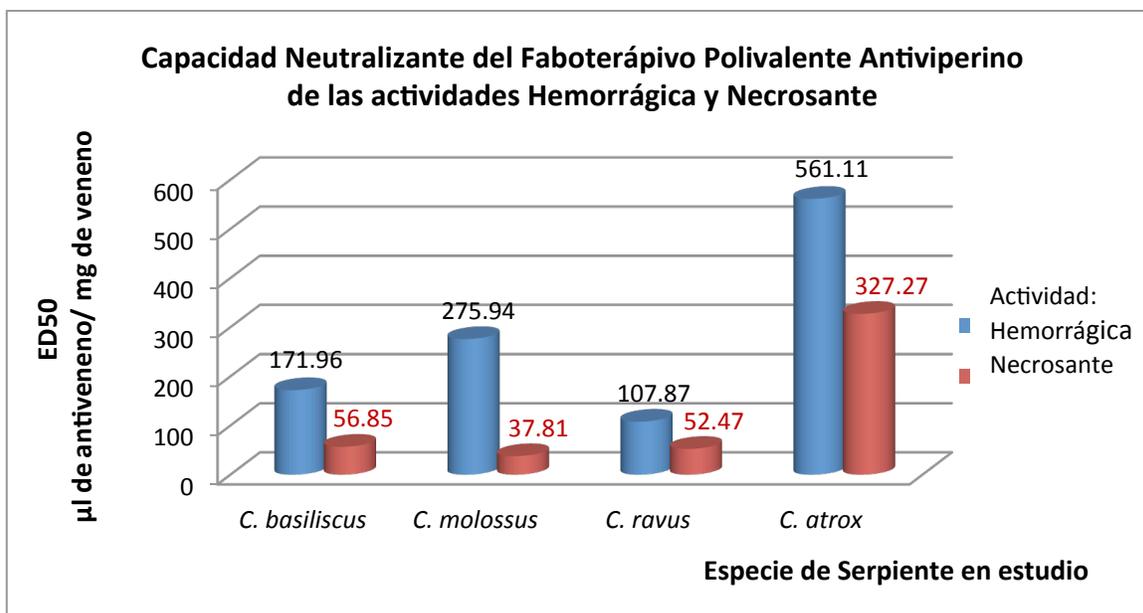
$$DE_{50} = 25.91 \mu L$$

Gráfica 5. Cálculo de la actividad neutralizante del faboterápico antiviperino contra la actividad necrosante del veneno de *C. atrox*.

En la tabla 10 y en la gráfica 6, se muestran los resultados obtenidos en la neutralización de las actividades hemorrágica y necrosante. Para el veneno de *C. ravus* se necesitó la menor cantidad de antiveneno para neutralizar la actividad, seguida de *C. basiliscus*, *C. atrox* y *C. molossus*. En el caso de la actividad necrosante se obtuvo un comportamiento distinto, la menor cantidad de antiveneno se utilizó para neutralizar el veneno de *C. basiliscus*, seguida de *C. atrox*, *C. ravus*, donde se utilizó mayor cantidad de faboterápico fue para el veneno de *C. molossus*.

VENENO DE SERPIENTE	HEMORRÁGICA	NECROSANTE
	DE ₅₀ µl de antiveneno/ mg de veneno	DE ₅₀ µl de antiveneno/ mg de veneno
<i>C. basiliscus</i>	171.96	56.85
<i>C. ravus</i>	107.87	52.47
<i>C. molossus</i>	275.94	37.81
<i>C. atrox</i>	561.11	327.27

Tabla 10. Neutralización por el Faboterápico de las Actividades Hemorrágica y Necrosante de los venenos de: *C. basiliscus*, *C. molossus*, *C. ravus* y *C. atrox*.



Gráfica 6. Capacidad Neutralizante del Faboterápico polivalente antiviperino de las actividades hemorrágica y necrosante en los venenos analizados.

ACTIVIDAD COAGULANTE

La actividad coagulante de los venenos se expresa como dosis mínima coagulante (DMC), por definición es aquella dosis que induce la coagulación del plasma humano en 60 seg. Los venenos de *C. basiliscus*, *C. molossus*, *C. ravus* y *C. atrox* se diluyeron a diferentes concentraciones en un intervalo de 1µg /100mL hasta 50 µg /100mL y se analizaron por triplicado, para determinar su DMC. Los venenos de las diferentes especies del género *Crotalus* analizadas, fueron incapaces de producir un coágulo evidente antes de un minuto. La tabla 11 muestra el resumen de los resultados para esta actividad.

VENENO	DMC
<i>C. basiliscus</i>	Ausente
<i>C. molossus</i>	Ausente
<i>C. ravus</i>	Ausente
<i>C. atrox</i>	Ausente

Dosis Mínima Coagulante (DMC)

Tabla 11. **Actividad Coagulante.** Resumen de la actividad coagulante de los cuatro venenos analizados.

NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE

No se llevó a cabo la determinación de la neutralización de la actividad coagulante de los venenos, debido a que no se detectó formación de coágulos bajo las condiciones en que se llevó a cabo el trabajo experimental.

En las tablas 12 y 13 se resumen tanto las actividades tóxicas de los venenos en las cuatro especies estudiadas: *C. basiliscus*, *C. molossus*, *C. ravus* y *C. atrox* como la actividad neutralizante que presentó el faboterápico polivalente antiviperino producido por Birmex ante las actividades tóxicas del veneno de la especie arriba mencionadas.

VENENO	DL ₅₀ / mL	DMH µg	DMN µg	COAGULANTE
<i>C. basiliscus</i>	50.97	16.05	30.25	Ausente
<i>C. molossus</i>	33.96	17.25	18.16	Ausente
<i>C. ravus</i>	232.89	12.07	34.24	Ausente
<i>C. atrox</i>	122.56	23.97	26.39	Ausente

DMH Dosis Mínima Hemorrágica

DMN Dosis Mínima Necrosante

Tabla 12. **Actividades biológicas de los venenos de serpiente del género *Crotalus*.** Cuadro comparativo de las actividades biológicas analizadas en los venenos.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA	<i>C.basiliscus</i>	<i>C. molossus</i>	<i>C. ravus</i>	<i>C. atrox</i>
Letal (DL ₅₀ / mL)	1227.77	ND	481.33	33.43
Hemorrágica (µL de antiveneno/ mg de veneno)	171.96	275.94	107.87	561.11
Necrosante (µL de antiveneno/ mg de veneno)	56.85	37.81	52.47	327.27
Coagulante (seg.)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

ND No detectable bajo las condiciones del trabajo experimental.

Tabla 13. **Neutralización de las actividades biológicas de los venenos de serpiente, por el faboterápico polivalente antiviperino.**

Discusión



El envenenamiento por mordedura de serpiente es un problema de Salud Pública; la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2009 (www.who.int/neglected/diseases/diseases/en/), la incluyó en la lista de las Enfermedades Tropicales Desatendidas. Las recomendaciones que emite no habían sido actualizadas respecto a la producción y control de calidad de los antivenenos, en 2010 se editaron los nuevos requerimientos, en ellos, la OMS menciona la urgente necesidad de contar con antivenenos poliespecíficos para atender las necesidades de varias áreas geográficas en el mundo, hacia aquellas especies de importancia médica, que son comunes o de mayor distribución en áreas muy pobladas y causan un número elevado de envenenamientos, fundamentalmente en población rural, lo que resulta en altos niveles de morbilidad y mortalidad o discapacidad en las víctimas.

En el diseño de los antivenenos y específicamente en la selección de las serpientes, la OMS recomienda contar con la información sobre la actividad cruzada del antiveneno contra los venenos de especies no incluidas en las mezclas de venenos que sirven como inóculo para inmunizar los animales utilizados en la producción (OMS,2010).

Las serpientes venenosas de América Latina y el Caribe se ubican, principalmente, en las familias Viperidae y Elapidae (Campbell & Lamar, 2004) siendo las especies de los géneros *Crotalus* y *Bothrops* pertenecientes a la familia Viperidae, las responsables de más del 90% de los envenenamientos por mordedura de serpiente en México. De acuerdo a lo reportado por Sotelo (Sotelo, 2003), *C. atrox* es la serpiente que más lesiones provoca; además de ésta, existen en México 33 especies de este género que son responsables de los envenenamientos, por el contrario la única especie del género *Bothrops* responsable de los envenenamientos es *Bothrops asper*; por ende, los antivenenos utilizados para el tratamiento de la mordedura de serpiente, deben neutralizar las actividades tóxicas de los venenos de serpientes de estos dos géneros (De Roodt et al, 2005).

En años recientes, se ha despertado un renovado interés por el estudio del envenenamiento debido a la mordedura de serpiente, generando investigaciones a nivel local, regional y mundial, por grupos de diversos países, como son el estudio de la proteómica de los venenos, el aislamiento y caracterización de toxinas, el estudio de su mecanismo de acción y de sus efectos en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*. Estos estudios han evidenciado, por un lado variaciones intra e interespecíficas en los venenos, así como, el hecho que los venenos de Vipéridos en América Latina, están constituidos por más de 100 diferentes proteínas y péptidos que se pueden agrupar en las familias de proteínas, las principales son: fosfolipasas A2, metaloproteinasas dependientes de zinc, serina proteinasas, proteínas tipo lectinas tipo C, desintegrinas, proteínas ricas en cisteína (CRISPs), péptidos potenciadores de bradicinina y L-aminoácidosoxidasas, entre otras, con efectos farmacológicos complejos y diversos (Gutiérrez et al. 2009; Calvete, 2010; D. Warrel, 2010) .

El ejemplo más notorio de variación intraespecífica en América Latina lo constituyen los venenos de serpientes cascabel (género *Crotalus*), los cuales

divergen enormemente en cuanto la expresión de las actividades neurotóxica, hemorrágica y coagulante (Aguilar et al, 2007; Calvete et al, 2010).

Pese a la existencia de importantes diferencias intra e interespecíficas en la composición de los venenos de serpiente de una región, los patrones clínicos de envenenamientos por especies de la familia Viperidae se caracterizan principalmente por manifestaciones locales como dolor, edema, sangrado, necrosis de tejido muscular, dermonecrosis y formación de vesículas. Por otra parte, las alteraciones sistémicas que provocan son hemorragia, alteraciones de la coagulación (desfibrinogénación), alteraciones hemodinámicas que pueden llevar a choque cardiovascular, e insuficiencia renal aguda.

En México se ha estado retomando el tema del accidente ofídico desde el punto de vista epidemiológico, y sobre la implementación del mejor esquema a seguir en el tratamiento del mismo (Zavala, 2002; Sotelo, 2003; De Roodt, 2005; Frayre, 2006); así mismo, a nivel mundial se ha desarrollado y adaptado metodología para el análisis de la capacidad de los antivenenos en la neutralización de los efectos letal, hemorrágico, coagulante, miotóxico, entre otros.

Este último enfoque, fue el utilizado en el presente trabajo para caracterizar la toxicidad de los venenos de las cuatro especies del género *Crotalus* y la capacidad del faboterápico polivalente antiviperino producido por Birmex de neutralizar estas actividades.

Hasta la fecha, no se disponen de datos sobre las características bioquímicas y tóxicas de los venenos crudos de las serpientes de mayor importancia sanitaria en México, sobre todo de aquellas actividades relevantes en los procesos fisiopatológicos en los envenenamientos por Vipéridos, específicamente por el género *Crotalus*, tampoco se cuenta con la evidencia de la capacidad neutralizante de los antivenenos producidos en México por Birmex, contra especies distintas de las utilizadas en el inóculo.

El presente trabajo se dividió en dos partes: la primera, se ocupó en caracterizar los venenos a través de su actividad letal, hemorrágica, coagulante y necrosante; la última parte, se avocó a esclarecer la capacidad neutralizante del faboterápico polivalente antiviperino frente al veneno de cuatro de las principales especies del género *Crotalus* como son: *Crotalus basiliscus*, *C. atrox*, *C. molossus* y *C. ravus*.

Conocemos que existen pruebas adicionales a la actividad letal, entre ellas se encuentran: actividad fibrinolítica, desfibrogenante, protrombínica y fosfolipásica. Sin embargo, seleccionamos la actividad letal, la actividad coagulante, hemorrágica y necrosante, por considerarlas las de mayor importancia en la fisiopatología del envenenamiento causado por metaloproteinasas, fosfolipasas A₂, serinproteasas principalmente, que son los componentes más tóxicos y mayores de todos los venenos de serpiente independientemente de la especie (Theakston & Reid, 1983; De Roodt et al, 2005; Abdel et al, 2003)

Nuestro estudio mostró que los venenos sujetos al estudio poseen actividad letal, hemorrágica y necrosante, no así, actividad coagulante, lo cual concuerda con algunos reportes en la bibliografía. Los venenos mostraron diferencias en el comportamiento respecto a su mayor actividad tóxica, esto debido a la gran

variabilidad que existe entre la composición de los venenos de las diferentes especies respecto a su edad, localización geográfica, alimentación, estación del año y aún el sexo (Francischetti, I., 2000; Gutiérrez, 2008).

El veneno con mayor actividad letal fue *C. ravus* 232.89 DL₅₀/mL, seguido de *C. atrox* 122.56 DL₅₀/mL, *C. basiliscus* 50.97 DL₅₀/mL y *C. molossus* 33.96 DL₅₀/mL respectivamente.

La actividad letal es el efecto toxicológico que más frecuentemente se estudia al caracterizar un veneno, en el caso de la mayoría de los venenos de serpientes de la familia Viperidae, la letalidad tiene una causalidad multifactorial, ya que intervienen diferentes componentes (metaloproteinasas, serina proteinasas, fosfolipasas A2 y otros) que causan sangrado, coagulopatía y alteraciones hemodinámicas que provocan la muerte (Angulo & Lomonte, 2009), en algunos venenos de las serpientes de la familia Viperidae, este efecto es el resultado de la acción de componentes neurotóxicos que interfieren con los procesos de la sinapsis neuromuscular.

Las actividades hemorrágicas halladas expresadas como DMH, ordenadas de mayor a menor actividad fueron: 12.07 µg para el veneno de *C. ravus*, 16.05 µg para *C. basiliscus*, 17.25 µg para *C. molossus* y 23.97 µg para *C. atrox*. La actividad hemorrágica resulta de la acción de metaloproteinasas de los venenos en la membrana basal de capilares y vénulas, lo que ocasiona la ruptura de la integridad de estos microvasos sanguíneos y la consecuente extravasación; este efecto es característico de venenos de serpientes de la familia Viperidae. Nuestros resultados en DMH para el veneno de *C. basiliscus* coincide con lo encontrado por De Roodt et al, 2005 y es dos veces menor de lo que reportan para *C. atrox*. Para el caso de *C. atrox* nuestro resultado coincide con lo que reporta Theakson & Reid, 1983; las diferencias pudieran explicarse en términos de las diferentes cepas de ratón utilizadas BAL-C, CF1 y en otro caso el uso de ratas, nosotros utilizamos la cepa NIH. Las mezclas de venenos empleadas fueron de ejemplares adultos y jóvenes, en su caso ellos los analizaron por separado.

Ownby en 1988, reporta valores de DMH, para diferentes toxinas hemorrágicas en el intervalo de 0.04 µg a 11 µg, los valores que nosotros encontramos están en el rango de 18 µg a 34 µg, una de las causas de esta diferencia pudo ser, que eran toxinas puras en el primer caso y en nuestro estudio se probaron los venenos completos, por lo que pudo haber entre los otros componentes de los venenos alguna interacción que provocara que la misma lesión la ocasionara con mayor cantidad de veneno.

Las actividades necrosantes determinadas se expresaron en DMN y fueron en orden decreciente de actividad: 18.16 µg para *C. molossus*, 26.39 µg para *C. atrox*, 30.25 µg para *C. basiliscus* y 34.24 µg para el veneno de *C. ravus*.

Para el veneno de *C. basiliscus* y *C. atrox* los resultados encontrados para la actividad necrosante, son de tres a cinco veces menores respecto a los obtenidos por De Roodt et al, 2005 y Theakston & Reid, 1983, lo que significa que el veneno utilizado en nuestro estudio presenta mayor actividad necrosante.

La necrosis del músculo esquelético es una manifestación común del envenenamiento por mordedura de serpiente, las moléculas liberadas del músculo dañado actúan como señales de alarma y contribuyen a la reacción inflamatoria activando la inmunidad innata (Zornetta, 2012).

Los venenos de *C. basiliscus*, *C. atrox*, *C. molossus* y *C. ravus* no presentan actividad coagulante, no produjeron la formación de coágulos evidentes por la técnica utilizada, en el plasma humano para las diferentes concentraciones de veneno probadas, corroborando lo reportado en la bibliografía para el mismo género (De Roodt et al, 2005; Barcenás S, 2012); en el caso de *C. durissus cumanensis* Pirela reporta actividad coagulante (Pirela et al, 2006), al igual que Barcenás para *C. molossus* pero no en todos los ejemplares que estudió. Muchos venenos de serpientes contienen enzimas que actúan directamente sobre el fibrinógeno (serina proteinasas 'tipo trombina'), o sobre el factor X (metaloproteinasa) o sobre la protrombina (serina proteinasas o metaloproteinasa). El resultado de la acción de estas enzimas es la coagulación del plasma; en los venenos *C. atrox* y *C. basiliscus* se han reportado la presencia de componentes con fuerte actividad protrombínica y también de componentes fibrinolíticos como es el caso de la basilasa y atroxasa (Willis & Tu, 1988; Markland, 1976; Datta et al, 1995; Ramírez et al, 1999), lo que pudiera explicar que se lisen los coágulos al momento de estarse formando.

Adicionalmente al estudio de la neutralización del efecto letal, en el que actualmente está basada la determinación de potencia de los faboterápicos en la FEUM, 2011 y con la cual son liberados los lotes producidos en nuestro país y en el resto del mundo,

El faboterápico polivalente antiviperino producido por Birmex, neutralizó la actividad letal de los venenos de *C. basiliscus*, *C. ravus*

y *C. atrox*, no así, el veneno de *C. molossus*, en el modelo utilizado no se presentó protección cruzada contra esta especie, sin embargo en el uso clínico no se ha reportado falta de eficacia contra la mordedura de serpiente aun cuando esta especie está ampliamente distribuida en el territorio nacional.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el faboterápico presenta actividad cruzada de las principales actividades biológicas de los venenos de

dos especies diferentes a la utilizada en la producción del mismo, siendo las DL₅₀/mL neutralizadas en orden decreciente de 1,227.77 contra el veneno de *C. basiliscus*, 481.33 contra el veneno de *C. ravus* y de 33.43 contra el veneno de *C. atrox*, resultado esperado en el caso de *C. basiliscus* ya que es el veneno que forma parte del inóculo que se aplica a los caballos para inmunizarlos.

La actividad hemorrágica fue neutralizada por el faboterápico polivalente antiviperino para el veneno de las cuatro especies. La cantidad que se requiere del faboterápico polivalente antiviperino para neutralizar el cincuenta por ciento de la lesión hemorrágica producida por 5 DMH del veneno fue en orden decreciente de 561.11 µl para neutralizar un miligramo de veneno de *C. atrox*, 275.94 µl para *C. molossus*, 171.96 µl para *C. basiliscus* y 107.87 µl para *C. ravus*, lo cual nos indica

que el faboterápico polivalente antiviperino presenta actividad cruzada contra el veneno de estas especies.

Para el caso de la actividad necrosante, ésta fue neutralizada por el faboterápico polivalente antiviperino para el veneno de las cuatro especies, siendo más eficiente contra *C. molossus* ya que sólo se requieren 37.81 µl para neutralizar un miligramo de veneno, seguido por 52.47 µl *C. ravus*, 56.85 µl para *C. basiliscus*, y 327.27 µl para *C. atrox*, lo cual nos indica que el faboterápico polivalente antiviperino presenta actividad cruzada contra la actividad necrosante del veneno de estas especies.

El Faboterápico polivalente antiviperino mostró que inhibe la actividad letal del veneno de *C. basiliscus*, *C. ravus* y *C. atrox*, siendo mayor su actividad neutralizante contra el veneno de *C. basiliscus* que la encontrada para el veneno de *C. ravus* y *C. atrox*, esto demuestra que existe actividad cruzada del faboterápico polivalente antiviperino fabricado por Birmex para esta actividad biológica, como para la actividad hemorrágica y necrosante.

En la literatura internacional, son pocos los reportes acerca de la neutralización de las actividades tóxicas del veneno del género *Crotalus*, no así para el género *Bothrops*, tanto en la caracterización de los componentes del veneno, como estudios a nivel preclínico y clínico (Smalligan et al. 2004, Theakston et al, 1995) entre muchos otros (De Roodt et al, 2004; Otero et al, 2007; Angulo & Lomonte, 2009; Segura et al, 2012). Las investigaciones publicadas sobre el género *Crotalus* se centran en evaluar los venenos de las especies de *Crotalus* endémicos del país donde se realiza el estudio, como es el caso de Hernández-Cruz y colaboradores, quien empleó el veneno de *C. durissus* y *C. cerastes* (Hernández-Cruz et al, 2005); o Pirela y colaboradores quienes caracterizaron el veneno de *C. durissus cumanensis* en Venezuela (Pirela et al, 2006). La mayoría de las investigaciones se enfocaron primero a caracterizar cada uno de los venenos (Theakston & Reid, 1983). Hay muy pocos estudios en los que se investigue la neutralización de las actividades de los venenos, entre ellos se encuentra el de Castrillón-Estrada y colaboradores donde estudiaron a *C. durissus terrificus* (Castrillón-Estrada et al, 2007), en él probaron dos faboterápicos uno mexicano y otro de Costa Rica y ninguno neutralizó el veneno.

En el estudio que se llevó a cabo en 2003 en Estados Unidos (Sánchez, 2003), analizaron la eficacia de dos antivenenos, uno producido en Inglaterra y otro mexicano, contra la actividad hemorrágica, coagulante y letal del veneno; de los 15 venenos de diferentes serpientes, los que coincidieron con nuestro trabajo fueron *C. atrox* y *C. molossus*. En el caso del veneno de *C. molossus*, la actividad hemorrágica que encontramos fue similar a la reportada por ellos que fue de 12.5 µg y nosotros obtuvimos 17.25 µg. No ocurriendo la misma situación con el veneno de *C. atrox* en la que obtuvimos 23.97µg y ellos reportaron 2.5 µg. No podemos comparar sus demás resultados de neutralización ya que ellos reportan la cantidad de veneno en microgramos que neutraliza el 50 por ciento de una DMH. Respecto a la actividad letal, ellos expresan sus resultados en unidades diferentes a las que nosotros reportamos, lo hacen como mg de veneno por Kg de peso del ratón y la ED₅₀ como los mg de antiveneno por Kg de peso del ratón que

neutraliza tres DL_{50} , independientemente de las diferencias coincidimos en que los faboterápicos probados neutralizan las actividades a excepción de la actividad letal de *C. molossus* que no lo neutraliza el antiveneno mexicano, no así el inglés. Encontraron actividad coagulante en tres especies de *Crotalus* diferentes a las de nuestro estudio, pero utilizaron una metodología diferente (Sánchez, 2003), las diferencias pueden explicarse entre otra cosas por la cepa de ratón utilizada, cepa BALB-C, en lugar de la NIH en el caso de la actividad letal, para la actividad hemorrágica emplearon conejos.

En general, no existe armonización entre los productores o investigadores, ni en el método para realizar cada una de las pruebas, éstas se han ido implementando; en México, el método oficial de liberación de un lote, es la potencia expresada como la neutralización de la actividad letal, como lo establece la FEUM 2011, otras variables son también el material biológico: el veneno o mezcla de venenos empleados en la inmunización de los animales, la cepa de ratón utilizado (resistencia natural de los animales), el antiveneno producido con los venenos provenientes de ejemplares de acuerdo a la(s) especie(s) que causen los envenenamientos en cada país, así como, las diferencias entre el veneno de ejemplares jóvenes o adultos. Muchos investigadores han demostrado diferencias en las características de los venenos aún entre la misma especie (Gutiérrez, 2008).

Como los venenos de las serpientes del mismo género tienen reactividad cruzada con algunas fracciones de los venenos de otras especies del mismo género, los antivenenos aun cuando no son específicos, permiten neutralizar parcialmente las actividades tóxicas de los venenos del género *Crotalus*, como son en nuestro caso las actividades hemorrágica y necrosante para los venenos de las especies de *C. atrox*, *C. molossus* y *C. ravus*; y neutraliza la actividad letal de todos los venenos excepto el veneno de *C. molossus*.

Se han dado situaciones donde determinados antivenenos no neutralizan venenos heterólogos, o sea venenos no empleados en la inmunización, como fue el caso contra serpientes de *Crotalus sp.* producidos en América Central para neutralizar venenos de cascabeles de América del Sur y viceversa (Saravia et al, 2010; Calvete et al, 2010)

Los venenos de las especies se diferencian en la composición y la abundancia de sus componentes tóxicos. Existe similitud antigénica entre las toxinas de especies filogenéticamente relacionadas, por lo que los antivenenos pueden neutralizar los venenos que no son utilizados en los esquemas de inmunización de los caballos, como ha sido ampliamente demostrado en el caso del género *Bothrops* (Segura et al, 2012), aun cuando esta capacidad puede ser afectada entre otras cosas, por las diferencias intraespecie en las diferentes regiones geográficas o la presión ambiental evolutiva que actúa en poblaciones aisladas. La variabilidad observada en los resultados obtenidos, podría tener una explicación parcial en la alta variabilidad descrita para los venenos, ya que los especímenes de serpientes con los que trabajamos provinieron de diferentes regiones geográficas, además de utilizar tanto ejemplares jóvenes como adultos,

diferencias ya reportadas en la bibliografía, siendo el veneno de los animales jóvenes los que presentan mayor actividad tóxica.

A pesar de su eficiencia, los faboterápicos no son medicamentos y no revierten los daños causados por el veneno, por lo que entre más tarde se apliquen, el paciente irremediablemente sufrirá más los efectos del envenenamiento. De acuerdo a los resultados (Espino et al, 2009), los antivenenos disponibles no protegen satisfactoriamente a los pacientes, una de las razones es el hecho que el faboterápico producido no posee anticuerpos que pueda reconocer un componente tóxico particular en el veneno involucrado en el accidente, por esta razón es importante conocer cuáles son las proteínas o péptidos presentes en el veneno de diferentes especies contra los cuales es necesario obtener anticuerpos protectores, de tal manera producir antivenenos con gran especificidad y acción protectora.

Conclusiones

Bajo las condiciones en que se llevó a cabo el presente estudio podemos concluir:

El faboterápico polivalente antiviperino de Birmex, cuyo veneno empleado para su fabricación es el de *C. basiliscus*, es capaz de neutralizar las actividades hemorrágica y necrosante de los venenos de *C. atrox*, *C. ravus* y *C. molossus*, con respecto a la actividad letal únicamente inhibe la de los venenos producidos por *C. atrox* y *C. ravus*. Estos resultados sugieren la posibilidad de modificar la formulación de los venenos empleados en el proceso de fabricación del faboterápico, así como también el poder ampliar las especificaciones terapéuticas del faboterápico indicando que su acción protectora no se limita a *C. basiliscus* sino también a *C. atrox* y *C. ravus*.

Perspectivas

- Completar la caracterización del faboterápico polivalente antiviperino determinando la neutralización de otras actividades biológicas y contra otras especies.
- Hay variación entre ejemplares jóvenes y adultos, por lo que es recomendable realizar las mismas pruebas en venenos por separado de especímenes jóvenes y adultos, con el fin de fundamentar el uso para la preparación de los inóculos, con los que se inmuniza a los caballos, del veneno proveniente de especímenes jóvenes o adultos y demostrar que exista alguna diferencia que pueda ser utilizada para optimizar el proceso.
- Es necesario armonizar la metodología entre los diferentes laboratorios productores y controladores que la utilizan, debido a que en todo el mundo existen diferencias en ella, así como, en la forma de cómo se reportan los resultados.
- Complementar el estudio de proteómica de los venenos con el de las actividades tóxicas para determinar cuáles son los componentes de los venenos que los pudieran hacer más específicos.
- Introducir en la mezcla para inmunizar a los caballos el veneno de *C. atrox* que cruza antigénicamente con el antiveneno producido por Birmex, pero presenta menor actividad neutralizante respecto a *C. basiliscus*, adicionar también el veneno de *C. molossus*, la cual bajo las condiciones del estudio no presentó actividad neutralizante contra la actividad letal, considerando que son especies, de acuerdo a lo reportado por Conabio que tienen una amplia distribución geográfica en el territorio nacional.
- El método empleado en la determinación de la actividad hemorrágica de venenos es sencillo y reproducible, no obstante, presenta el problema de que no evalúa la intensidad de la lesión hemorrágica, sino únicamente su extensión. Ello abre la posibilidad de que se le dé el mismo valor a lesiones hemorrágicas que, presentando la misma área, tengan diferencias importantes en la intensidad de la extravasación. Esta deficiencia se puede corregir mediante una continuación del procedimiento descrito, basada en la extracción de la hemoglobina presente en el área hemorrágica y su cuantificación.

Referencias bibliográficas

- Abdel Latif S, Wanas S, Abdel Malak G and Helmy M. Efficacy of IgG, Fab, and F(ab')₂ fragments of horse antivenom in the treatment of local symptoms after *Cerastes cerastes* (Egyptian snake) bite. African Journal of Biotechnology 2003. Vol. 2(7). 189-193.
- Alvarado-Díaz J. and Campbell, A new montane rattlesnake (viperidae) from Michoacan, Mexico. J. Herpetológica 60(2), 2004, 281–286.
- Angulo Y. y Lomonte B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. Toxicon 54, 2009, 949-957.
- Baldo C, Jamora C, Yamanouye N, Zorn TM, Moura-da-Silva AM (2010) Mechanisms of Vascular Damage by Hemorrhagic Snake Venom Metalloproteinases: Tissue Distribution and In Situ Hydrolysis. PLoS Negl Trop Dis. June 2010, 4(6):727.
- Barcenas S, Venenos de las serpientes de Cascabel de la Ciudad de México: Actividades Biológicas y Neutralización por Antivipmyn, Tesis, 2012.
- Bryan G. Fry. From genome to “venome”: Molecular origin and evolution of snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins Genome Research. 2005. 15:403-420.
- Burnouf Thierry, Griffith Elwyn, Padillac Ana, Seddik Salwa, Stephano Marco Antonio, Gutiérrez José-María. Assessment of the viral safety of antivenoms fractionated from equine plasma. Biologicals 32 (2004).115-128.
- Calvete J.J. Antivenomics and venom phenotyping: A marriage of convenience to address the performance and range of clinical of antivenoms. Toxicon. 2010. 56:1284-1291.
- Calvete J.J., Sanz L., Cid P., de la Torre., Flores-Díaz M., dos Santos M.C. et al. Snake venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as adaptive pedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. J. Proteome Res. 2010. 9:528-544.
- Campbell Jonathan A. and Lamar William W. The Venomous Reptiles of Western Hemisphere. Cornell University Press. 2004 Vol II. Pág. 490-601.
- Chippaux JP., Williams V., White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. Toxicon. 1991; 29(11):1279-1303.
- Chippaux JP., Goyffon M., Venoms, antivenoms and immunotherapy. Toxicon. 1998. 36, 823-846.
- Consulta Técnica sobre accidentes con Animales Ponzosofos en Latinoamérica, Organización Panamericana de la Salud, Brasil, PANAFTOSA, 2007 pag.1-50.
- De Roodt A, Estévez-Ramírez J., Paniagua-Solís J, Litwin S., Carvajal A., Saucedo, Dolab J., Robles L., Alagón A. Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. Gac. Méd. Méx. Vol. 141 No. 1, 2005.
- Dos Santos J., Cintra-Francischinelli M., Borges R., Fernandes C., Pizzo P., Cintra A., Braz A., Soraes A. y Fontes M. Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A₂. Proteins. 2011; 79:61-78.
- El-Rashdy M. Redwan. Comparison Between Therapeutic Antitoxin F(ab)₂ Fractionated with Ammonium Sulfate and Caprylic Acid. Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 1532-4230, Vol. 27 issue 4, 2006 Pages 319-329.

- Espino-Solis GP., Riaño-Umbarila L., Becerril B., Possani L. Antidotes against venomous animals: State of the art and prospectives. *Journal of Proteomics*. 2009. 72, 183-199.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Décima ed. 2011, Vol. I y Vol. II.
- Frayre-Torres JM., Sevilla-Godínez E., Orozco-Valerio Mde J., Armas J. y Celis A. Mortalida por contacto traumático con serpiente y lagarto venenosos. México, 1979-2003. *Ga Med Méx*. 2006 Vol.142 No.3.
- Fry Bg., Winkwl KD., Wickramaratna JC., Hodgson WC. And Wúster W. Effectiveness of Snake Antivenom: Species and Regional venom Variation and Its Clinical Impact. 2003, Vol. 22, No.1, 23-34.
- García Willis CE. Treatment evolution Using Fabotherapics in Patients Suffering from Snakebites at the General Hospital of Tampico, Tamaulipas State. México. *J Venom Anim Toxins* 2001;7:336.
- García-Willis C., Vela-Ortega R. y Maya-Leal M. Epidemiology of acidental snake poisoning in the pediatric population. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. Federico Gómez. 2009. Vol. 66, Issue 3.
- Glenn JL, Straight RC. Venom properties of the rattlesnakes (*Crotalus*) inhabiting the Baja California region of Mexico. *Toxicon* 1985; 23:769-775.
- Guidolin R. G., Marcelino R. M., Gondo H. H., Morais J. F., Ferreira R. A., Silva C. L., Kipnis T. L., J. A. Silva², J. Fafetine³ and W. D. da Silva^{2*} Polyvalent horse F(Ab')₂ snake antivenom: Development of process to produce polyvalent horse F(Ab')₂ antibodies anti-african snake venom. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9 (16), pp. 2446-2455, 19 April, 2010.
- Gutiérrez J.M. Comprendiendo los Venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina *Rev. Biol. Trop.* Jun 2002. V 50. No. 2.377-394
- Gutiérrez J.M., León G., Lomonte B. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships of Immunoglobulin Therapy for Envenomation. *Clinical Pharmacokinetics*. 2003, Vol. 42, issue 8, 721-741
- Gutiérrez J.M., Sanz L, Escolano J. Fernández J., Lomonte B., Angulo R., Warrel D. and Calvete J. Snake Venomics of the Lesser Antillean Pit Vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: Correlation with Toxicological Activities and Immunoreactivity of Heterologous Antivenom. *Journal of Proteome Research* 2008, 7(10), 4396-4408.
- Gutiérrez J.M. and León G. Snake antivenoms. Technological, clinical and public health issues. In: *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*, M.E. de Lima; A.M.C. Pimienta; M.F. Martin-Euclaire; R.B. Zinggali & H. Rochat, (Eds). 2009.393-421. Editora UFMG, ISBN 978-85-7041-735-0, Belo Horizonte , Brasil.
- Gutiérrez J.M., Sanz L, Flores-Díaz M., Figueroa L., Madrigal M., Herrera M, Villalta M., León G., Estrada R., Borges A., Alape-Girón A., and Calvete J. Impact of Regional Variation in *Bothrops asper* Snake Venom on the Design of Antivenoms: Integrating Antivenomics and Neutralization Approaches. *Journal of Proteome Research*. 2010, 9, 564–577.
- Gutiérrez J.M., León G., Burnouf T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenoming: the road ahead. *Biologicals*. 2011a. Vol. 39, No. 3, 129-142.
- Harrison RA, Hargreaves A, Wagstaff SC, Faragher B, Lalloo DG. Snake Envenoming: A Disease of Poverty. *PLoS Negl Trop Dis*. Dec. 2009; 3(12): 569.

- Hernández Cruz A., Mendonca Z R. y Petricevich L. V. *Crotalus durissus terrificus* Venom Interferes with Morphological, Functional, and Biochemical Changes in Murine Macrophage. *Mediators of Inflammation*. 2005;6 (2005) 349-359.
- Hawgood BJ. Doctor Albert Calmette 1863–1933: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination. *Toxicon* 1999; 37:1241–58.)
- Kasturiratne A, Wickremasinghe R, De Silva N, N. Gunawardena K., Pathmeswaran A., Premaratna R. The Global Burden of Snakebite: A Literatura Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. *PLoS Med*. 2008. 5(11).
- Luna-Bauza Manuel Emiliano. Bases para el tratamiento por intoxicación por veneno de serpiente *Rev. Fac. Med. UNAM*. 2007. Vol. 50 No. 5 Septiembre-Octubre.
- Markland FS. Crotalase. *Method of Enzymology* 1976; 45:223-236.
- Manjunatha KINI R.. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *Biochem. J.* (2006) 397, 377–387.
- Manual de métodos de laboratorio. Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos. Instituto Clodomiro Picado. Costa Rica. 2007
- Morais VM(1), Massaldi H (1). Snake antivenoms: adverse reactions and production technology. *J. Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2009. V. 15, n.1, p. 2-18.
- NMX-EC-17025-IMNC-2006. Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. 2010.
- Ortega C. "Evaluación de la actividad adyuvante de triterpenos y saponinas en al producción de suero antiviperino". Tesis de Maestría en Ciencias en Inmunología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. 2008
- Otero-Patiño R, Silva Hadd JJ, Barona M, Toro M, Quintana J, Díaz A, Vázquez I, Rodríguez V, et al, Accidente bothrópico en Colombia: estudio multicéntrico de la eficacia y seguridad de Antivipmyn-Tri, un antiveneno polivalente producido en México, *IATREIA*, Vol. 20, No. 3, 2007, 244-262
- Ownby CL. And Colberg TR. Classification of myonecrosis induced by snake venoms: venoms from the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*), western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) and the Indian cobra (*Naja naja*). *Toxicon* 1988, 26:459-474
- Panfoli I., Calzia D., Ravera S. and Morelli A. Inhibition of Hemorrhagic Snake Venom Components: Old and New Approaches. *Toxins* 2010, 2, 417-427.
- Pereira C, Fernandes , Pavan and Zamuner S. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2005. Vol.100 (Suppl. I): 181-184
- Pirela De las Salas R, López-Jonsthor J & Hernández. Caracterización Toxinológica del Veneno Total de la Serpiente de Cascabel *Crotalus durissus cumanensis* (Viperidae), Presente en la Localidad de Porshoure, Guajira Venezolana. *Revista Científica* 2006, FCV-LUZ/ Vol. XVI, No.3, 232-238.

- Ramos-Bello D., Llorente L. Reumatol Clin. Cincuentenario del Descubrimiento de la Estructura Química de los Anticuerpos. 2009; 5(6):280-284.
- Roux P, Yersin A. Contribution a l'etude de la diphterie. Ann Inst Pasteur 1888; 2:629-49.
- Sánchez E., Galán J, Rodríguez Acosta A, Pérez J, Chase P, Pérez JC. The efficacy of two antivenoms against the of North American snakes. Toxicon, 41: 357-365, 2003.
- Saravia P. Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical. Rev. Biol. Trop. 2002, 50:337-346
- Segura A., Herrera M., Villalta M., Vargas M., Uscanga A., Ponce de León S., Jiménez M., Reta F., Gutiérrez JM. y León G. Venom of *Bothrops asper* from Mexico and Costa Rica: Intraspecific variation and cross-neutralization by antivenoms. Toxicon, 59, 158-162. 2012.
- Sewall H. Experiments on the preventive inoculation of rattlesnake venom. J Physiol 1887; 8:203-10.
- Siria Hernández C. "Mordeduras por serpientes venenosas: panorama epidemiológico en México". Revista de Salud Pública de México - Vol. 51, No. 2, marzo-abril 2009.
- Susanta Pahari, Stephen P. Mackessy and Manjunatha Kini. The venom gland transcriptome of Desert Massasauga Rattlesnake (*Sistrurus catenatus edwardsii*): towards an understanding of venom composition among advanced snakes (Superfamily Colubroidea). BMC Molecular Biology. 2007,8:115.
- Theakston R.D.G, & Reid H.A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. Bulletin of the World Health Organization, 1983. 61(6) 949-956.
- Theakston R.D.G., Laing GD, Fielding CM, Freire Lascano A, Touzet J-M, Vallejo F, et al. Treatment of snake bites by *Bothrops* species and *Lachesis muta* in Ecuador: laboratory screening of candidate antivenoms. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995; 89: 550-554.
- Theakston R.D.G., Warrell D.A., Griffiths E. "Erratum to Report of WHO workshop on the standardization and control on antivenoms". Toxicon 2003, 41 (5) 541-557.
- Von Behring EA, Kitasato S. Über das zustandommen der diphterieimmunität und der tetanusimmunität bei thieren. Dtsch Med Wochenschr 1890;16:1113-34.
- Wagstaff SC, Laing GD, Theakston RDG, Papaspyridis C, Harrison RA (2006) Bioinformatics and multiepitope DNA immunization to design rational snake antivenom. PLoS Med. Jun 2006, 3(6): e184.
- Warrell D.A. Snake bite. Lancet. 2010; 375: 77-88.
- Willis TW, Tu AT. Purification and Biochemical characterization of atroxase, a non hemorrhagic fibrinolytic protease from Western diamondback rattlesnake venom. Biochemistry 1988;27:4769-4777.
- Zeinsteger, P.A.; Maruñak, S.L.; Acosta de Pérez, O. Neutralization of the hemorrhagic and edema-forming activities from venom of *Bothrops alternatus* offsprings from Argentina. Rev. Vet. 1999-2000, 10/11, 1 y 2.
- Zornetta I., Caccin P., Fernández J., Lomonte B., Gutiérrez JM., Montecucco C. Envenomations by *Bothrops* and *Crotalus* snakes induce the Release of Mitochondrial Alarmins. PLOS. 2012. Vol. 6, issue 2 e1526.