



Instituto Nacional  
de Salud Pública



**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA  
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD CON  
ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN VACUNOLOGÍA**

**Evaluación cinética de la producción de anticuerpos IgG de origen equino contra el veneno de serpientes *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper* a través de un método inmunoenzimático.**

**T E S I S**

**Que para obtener el Grado de Maestro en Ciencias  
de la Salud presenta:**

**QBP. José Alfredo Uscanga Reynell**

**Director de Tesis: Dr. Samuel Ponce de León Rosales**

**Para Axel y Alan, mis dos grandes amores.**

El presente trabajo se realizó en la Gerencia de Producción de Sueros en colaboración con el Área de Investigación del Instituto Nacional de Higiene de los Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S.A. de C.V., bajo la dirección del Dr. Samuel Ponce de León Rosales y la asesoría del M. en C. Francisco Reta Mares y del Dr. Carlos Rubén Ortega Sánchez.

# ÍNDICE

	Página
Índice.....	2
Lista de tablas.....	4
Lista de gráficas.....	5
Lista de esquemas.....	7
Lista de fotografías.....	7
Lista de abreviaturas.....	8
Resumen.....	9
Abstract.....	11
1. Introducción.....	13
1.1 Antecedentes.....	14
1.2 Venenos.....	12
1.3 Origen del plasma.....	16
1.4 Esquema de inmunización.....	17
1.5 Respuesta inmune.....	17
1.6 Anticuerpos.....	19
1.6.1 Determinación de anticuerpos.....	21
1.6.1.1 ELISA.....	21
1.6.1.2 Inmunoturbidimetría.....	22
1.6.1.3 Radioinmunoensayo.....	23
2. Justificación.....	24
3. Planteamiento del problema.....	24
4. Objetivo.....	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos específicos.....	25
5. Hipótesis.....	26
6. Materiales y Métodos.....	27
6.1 Materiales.....	27
6.1.1 Equipo.....	27
6.2 Reactivos.....	27
6.3 Material diverso.....	27
6.4 Material biológico.....	28
7. Metodología.....	29
7.1 Monitoreo al estado de salud de los equinos.....	29
7.2 Obtención de muestras.....	30
7.3 Preparación de inóculo.....	30
7.4 Esquemas de inmunización.....	30

	Página
7.5 Aplicación del inóculo.....	31
7.6 Plasmaféresis.....	31
7.7 Determinación de proteínas de los venenos.....	32
7.8 Técnica de ELISA indirecto.....	32
7.9 Prueba estadística.....	33
8. Resultados.....	34
8.1 Monitoreo al estado de salud de los equinos.....	34
8.1.1 Hemograma.....	34
8.1.2 Perfil bioquímico.....	37
8.2 Tratamiento de muestras.....	40
8.3 Determinación de proteínas de los venenos.....	40
8.4 Técnica de ELISA indirecto.....	40
8.4.1 Títulos de anticuerpos en el plasma equino.....	41
9. Manejo de Resultados.....	44
9.1 Hemograma.....	44
9.2 Perfil bioquímico.....	47
9.3 Cinética de producción de anticuerpos.....	49
9.4 Cinética comparativa de producción de anticuerpos.....	52
9.5 Cinética de producción de anticuerpos para los tres esquemas.....	54
10. Análisis Estadístico.....	55
11. Discusión de Resultados.....	60
12. Conclusiones.....	68
13. Perspectivas.....	69
14. Bibliografía.....	70

## LISTA DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1 Distribución de equinos por esquema de inmunización.....	28
Tabla 2 Programa de toma de muestras.....	30
Tabla 3 Esquemas de inmunización.....	31
Tabla 4 Hemograma basal del grupo PVB1. ....	34
Tabla 5 Hemograma día 20 del grupo PVB1.....	34
Tabla 6 Hemograma basal del grupo PVB2.....	35
Tabla 7 Hemograma al día 20 del grupo PVB2.....	35
Tabla 8 Hemograma basal del grupo PVB3.....	36
Tabla 9 Hemograma al día 20 del grupo PVB3.....	36
Tabla 10 Perfil bioquímico basal del grupo PVB1.....	37
Tabla 11 Perfil bioquímico al día 20 del grupo PVB1.....	37
Tabla 12 Perfil bioquímico basal del grupo PVB2.....	38
Tabla 13 Perfil bioquímico al día 20 del grupo PVB2.....	38
Tabla 14 Perfil bioquímico basal del grupo PVB3.....	39
Tabla 15 Perfil bioquímico al día 20 del grupo PVB3.....	39
Tabla 16 Valores de absorbancia de la determinación de anticuerpos IgG en los equinos pertenecientes al esquema PVB1 para <i>Bothrops asper</i> .....	41
Tabla 17 Valores de absorbancia de la determinación de anticuerpos IgG en los equinos pertenecientes al esquema PVB1 para <i>Crotalus basiliscus</i> .....	41
Tabla 18 Valores de absorbancia de la determinación de anticuerpos IgG en los equinos pertenecientes al esquema PVB2 para <i>Bothrops asper</i> .....	42
Tabla 19 Valores de absorbancia de la determinación de anticuerpos IgG en los equinos pertenecientes al esquema PVB2	

para <i>Crotalus basiliscus</i> .....	42
Tabla 20 Valores de absorbancia de la determinación de anticuerpos IgG en los equinos pertenecientes al esquema PVB3 para <i>Bothrops asper</i> .....	43
Tabla 21 Valores de absorbancia de la determinación de anticuerpos IgG en los equinos pertenecientes al esquema PVB3 para <i>Crotalus basiliscus</i> .....	43

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Niveles de hematocrito para las concentraciones basales y posterior a los 20 días en los tres grupos PVB1, PVB2 y PVB3.....	44
Gráfica 2 Niveles de hemoglobina para las concentraciones basales y posterior a los 20 días en los tres grupos PVB1, PVB2 y PVB3.....	44
Gráfica 3 Cantidad de eritrocitos para las concentraciones basales y posterior a los 20 días en los tres grupos PVB1, PVB2 y PVB3.....	45
Gráfica 4 Niveles de hemoglobina globular para las concentraciones basales y posterior a los 20 días en los tres grupos PVB1, PVB2 y PVB3.....	45
Gráfica 5 Niveles de fibrinógeno para las concentraciones Basales y posterior a los 20 días en los tres grupos PVB1, PVB2 y PVB3.....	46
Gráfica 6 Niveles de proteínas, albúmina y globulinas para las concentraciones basales y posterior a los 20 días en los tres grupos PVB1, PVB2 y PVB3.....	47
Gráfica 7 Niveles de CK para las concentraciones basales Y posterior a los 20 días en los tres grupos PVB1, PVB2 y PVB3.....	47
Gráfica 8 Niveles de Calcio y Urea para las concentraciones basales y posterior a los 20 días en los tres grupos PVB1, PVB2 y PVB3.....	48

Gráfica 9	Cinética de producción de anticuerpos para los equinos estimulados con el esquema PVB1 con veneno de <i>Bothrops asper</i> .....	49
Gráfica 10	que representa la cinética de producción de anticuerpos para los equinos estimulados con el esquema PVB1 con veneno de <i>Crotalus basiliscus</i> .....	49
Gráfica 11	Cinética de producción de anticuerpos para los equinos estimulados con el esquema PVB2 con veneno de <i>Bothrops asper</i> .....	50
Gráfica 12	Cinética de producción de anticuerpos para los equinos estimulados con el esquema PVB2 con veneno de <i>Crotalus basiliscus</i> .....	50
Gráfica 13	Cinética de producción de anticuerpos para los equinos estimulados con el esquema PVB3 con veneno de <i>Bothrops asper</i> .....	51
Gráfica 14	Cinética de producción de anticuerpos para los equinos estimulados con el esquema PVB3 con veneno de <i>Crotalus basiliscus</i> .....	51
Gráfica 15	Cinética de producción promedio de anticuerpos para los equinos estimulados con el esquema PVB1 con veneno de <i>Crotalus basiliscus</i> y <i>Bothrops asper</i> .....	52
Gráfica 16	Cinética de producción promedio de anticuerpos para los equinos estimulados con el esquema PVB2 con veneno de <i>Crotalus basiliscus</i> y <i>Bothrops asper</i> .....	52
Gráfica 17	Cinética de producción promedio de anticuerpos para los equinos estimulados con el esquema PVB3 con veneno de <i>Crotalus basiliscus</i> y <i>Bothrops asper</i> .....	53
Gráfica 18	Cinética de producción promedio de anticuerpos para los equinos estimulados con veneno de <i>Bothrops asper</i> para los tres esquemas de inmunización.....	54
Gráfica 19	Cinética de producción promedio de anticuerpos para los equinos estimulados con veneno de <i>Crotalus basiliscus</i> para los tres esquemas de inmunización.....	54

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 Actividad biológica de venenos de serpiente.....	15
Esquema 2 Anticuerpo clase IgG.....	19
Esquema 3 Reacción de ELISA.....	22

## LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1 Serpiente <i>Crotalus basiliscus</i> .....	28
Fotografía 2 Serpiente <i>Bothrops asper</i> .....	28
Fotografía 3 Equino criollo usado en los esquemas de inmunización.....	29
Fotografía 4 Extracción de sangre (plasmaferesis).....	31
Fotografía 5 Regreso del paquete globular (plasmaferesis).....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

DL <sub>50</sub>	Dosis letales al 50%
F(ab') <sub>2</sub>	Fracción Fab de los anticuerpos digeridos con pepsina
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
RIA	Radio inmunoensayo
PVB1	Esquema de inoculación basado de cuatro dosis
PVB2	Esquema de inoculación basado de tres dosis
PVB3	Esquema de inoculación basado de dos dosis
CGMH	Concentración Globular Media de Hemoglobina
VGM	Volumen Globular Medio
CK	Creatincinasa
fL	Femtolitro
g	Gramos
L	Litros
mg	Miligramos
dL	Decilitros
mL	Mililitro
mmol	Milimoles
μL	Microlitro
M	Molar
N	Normal
nm	Nanómetro
rpm	Revoluciones por minuto
CMH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
BCR	Receptor de antígenos del linfocito B
TCR	Receptor de antígenos del linfocito T
SMAC	Supramolecular activation cluster
IgG	Inmunoglobulina Isotipo G
IgM	Inmunoglobulina Isotipo M
IgA	Inmunoglobulina Isotipo A
IgD	Inmunoglobulina Isotipo D
IgE	Inmunoglobulina Isotipo E
OMS	Organización Mundial de la Salud

## RESUMEN

La necesidad de mejorar los productos y los procesos para la producción de antivenenos con mayor pureza y efectividad, nos ha motivado a abordar líneas de investigación en el establecimiento de nuevos esquemas de inmunización, toda vez que la calidad y cantidad del plasma obtenido de los equinos de producción depende estrechamente del estado de salud de estos y de los inmunógenos empleados. Es por esta razón que hemos decidido estudiar el comportamiento que sigue la producción de anticuerpos de clase IgG en los equinos utilizados en la producción de plasma hiperinmune, después de ser estimulados con veneno de serpientes *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper* con la finalidad de establecer nuevos programas para la obtención de sangrías de cosecha que se deberán realizar a los equinos sin afectar su estado general de salud y obtener mayores rendimientos.

Se evaluó el estado de salud de los equinos a través de la observación clínica, el perfil proteico y el hemograma, antes y después de los procesos de inoculación y plasmaféresis, así mismo se ensayaron tres esquemas de inmunización (PVB1, PVB2, PVB3) para evaluar la respuesta inmune a través de la técnica de ELISA. La evaluación del estado de salud mostró una ligera caída del hematocrito, la hemoglobina y los eritrocitos ocasionados por los procesos de extracción sanguínea, sin embargo los niveles alcanzados en esta disminución no comprometen el estado de salud. El contenido de fibrinógeno disminuyó para los esquemas de inmunización PVB1 y PVB2, toda vez, el veneno de estas serpientes genera desórdenes de la coagulación sanguínea atribuibles a enzimas de tipo trombinas. El estado general de salud de los equinos posterior a los procesos de inoculación y plasmaféresis fue adecuado, el perfil hematológico basal y posterior a los procesos de inoculación y plasmaféresis permanecieron dentro de parámetros de referencia, lo que nos permitió realizar una cuarta sangría de cosecha para la obtención de plasma que resultó en un aumento del 33% de la productividad a nivel de plasma obtenido por equino.

El perfil bioquímico mostró que las proteínas totales se encuentran por arriba del nivel superior de referencia como resultado de los procesos de producción a los cuales son sometidos de forma constante. Los niveles de albúmina se encuentran por debajo de los límites normales debido a los altos niveles de globulinas presentes en el plasma, estas alteraciones son resultado del desequilibrio que se produce en las proteínas plasmáticas, ya que al incrementarse los niveles de anticuerpos (globulinas) por los procesos de hiperinmunización a los que son

sometidos estos equinos tienen que disminuir la concentración de albúmina para mantener la relación A/G estable.

Los niveles de proteínas plasmáticas totales posteriores a los procesos de inmunización y plasmaféresis permanecieron prácticamente inalterables para los diferentes esquemas de inmunización, pero no así de las globulinas, que incrementaron para todos los esquemas de inmunización.

La evaluación de la respuesta inmune humoral por la determinación de anticuerpos de la clase IgG, mostró que las sangrías de cosecha pueden realizarse a partir del día trece, en el cual el título de los anticuerpos es más estable para todos los esquemas de inmunización aplicados para ambos venenos, así mismo se demostró que se requiere de cuatro dosis de veneno de serpiente *B. asper* para obtener una respuesta inmune que dé como resultado mayor contenido de anticuerpos y mejores rendimientos y no se requiere de cuatro dosis de veneno de serpiente *C. basiliscus* ya que la respuesta inmune para todos los casos fue prácticamente igual.

## ABSTRACT

The need to improve products and processes for the production of antivenoms with higher purity and effectiveness, has motivated us to address areas of research in developing new immunization schedules, since the quality and quantity of plasma obtained from horses production depends heavily on the health status and these immunogens. It is for this reason that we decided to study the behavior that follows the production of IgG antibodies in horses used in the production of hyperimmune plasma, after being stimulated with snake venom *Crotalus basiliscus* and *Bothrops asper* in order to establish new programs to obtain harvest indents to be carried out without affecting the horses overall health and higher yields.

We assessed the health of horses through clinical observation, the protein profile and blood count before and after inoculation processes and plasmapheresis, also tested three immunization schemes (PVB1, PVB2, PVB3) for assess immune response through ELISA. The assessment of health status showed a slight drop in hematocrit, hemoglobin and red blood cells caused by bleeding processes, however the levels reached in this decrease does not compromise the health status. The fibrinogen content decreased to PVB1 immunization schemes and PVB2, since, these snake venom generates blood clotting disorders attributable to thrombin-like enzymes. The overall health of horses after inoculation processes and plasmapheresis was adequate baseline hematologic profile and after inoculation processes and plasma parameters remained within the reference, allowing us to make fourth bleeding harvest obtaining plasma that resulted in a 33% increase in productivity level obtained by equine plasma.

The biochemical profile showed that total proteins are higher above the reference level as a result of the production processes which are subjected to steadily. Albumin levels are below normal limits due to high levels in the plasma globulins, these changes are the result of imbalance that occurs in plasma proteins, and that increasing levels of antibodies (globulins) by hyperimmunization processes are subjected to these horses have to decrease the concentration of albumin to keep the A / G stable. The total plasma protein levels after immunization processes and plasma remained materially unchanged for different immunization schedules, but not of the globulins, which increased for all immunization schedules.

The evaluation of the humoral immune response for the determination of IgG class antibodies showed that the indentations can be harvested from day thirteen, wherein the antibody titer is stable for all immunization schemes applied to both venoms, also demonstrated that it requires four snake venom inoculum *B. asper* to elicit an immune response that results in higher antibody content and higher yields

and does not require four snake venom inoculum *C. basiliscus* since the immune response in all cases was almost the same.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

### 1.1 ANTECEDENTES.

En 1888, Roux y Yersin identificaron la toxina diftérica, en el mismo año Faber identificó la toxina tetánica, poco tiempo después, en 1890 Emil von Behring y Shibasaburo Kitasato reportaron las propiedades protectoras del suero de conejos inmunizados con las toxinas diftérica o tetánica y sugirieron el uso de estos antisueros para el tratamiento de dichas enfermedades. La seroterapia nace cuando Roux utiliza con éxito la antitoxina de von Behring para salvar a niños que presentaban difteria severa. (Rojas, E. 2007; WHO 2010; Ramos 2009.). Con este trabajo, Behring se hace merecedor al primer Premio Nóbel concedido en Medicina y Fisiología en 1901.

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

En América, Vital Brazil inicia la producción de sueros hiperinmunes contra venenos de ofidios, en el Instituto Butantan de São Paulo Brasil, esta experiencia sirve de motivación a Carlos León de la Peña e Isauro Venzor, ciudadanos de Durango (México), quienes hacia el año 1926 inician la producción de sueros contra veneno de alacrán (*Centuroides suffusus suffusus*) inmunizando caballos con dosis crecientes del veneno. Posteriormente, transfirieron la tecnología desarrollada al Sector Salud de México de aquel entonces y es hasta 1930 cuando la seroterapia inicia en nuestro País con un suero polivalente contra las especies ponzoñosas de alacranes (Vega-Franco 2007).

La utilización de sueros para el tratamiento de enfermedades infecciosas y envenenamientos por plantas, animales o insectos se hizo muy popular hasta la década de los cincuenta y una vez reconocidos los efectos secundarios del suero (enfermedad del suero) y sobre todo, una vez obtenido el conocimiento sobre las inmunoglobulinas, se inicia la utilización de gammaglobulinas hiperinmunes, con una reducción considerable en las reacciones secundarias (Vega-Franco 2007).

Sin embargo, la enfermedad del suero se seguía presentando, y por esto surge la tercera generación de sueros, en donde la inmunoglobulina IgG específica es tratada con pepsina obteniéndose los fragmentos  $F(ab')_2$ , evitándose así las reacciones tempranas adversas, debidas principalmente por la activación de

complemento; por utilizarse esta forma del anticuerpo, ahora se conoce en México como “faboterapia” al tratamiento con esta preparación (Otero, R. 2002).

El tratamiento de los pacientes mordidos por víperidos requiere atención inmediata, la cual debe incluir la administración del antiveneno. La dosis adecuada se debe establecer de acuerdo al grado de envenenamiento y este se estima de acuerdo a los signos y síntomas que el paciente presente, como son el grado del edema, las características de la fasciotomía, la cantidad de hemólisis, las características de la orina etc. Además para prevenir secuelas se deben evitar las infecciones, mediante la administración de antibióticos de amplio espectro y de toxoide tetánico y gammaglobulina hiperinmune antitetánica. Paralelamente se deben administrar analgésicos (Otero, R. 2002). Una vez administrado el antiveneno, la neutralización del veneno dependerá de varios factores desarrollados todos ellos en el organismo y consecuentemente de difícil predicción, lo cual hace que la eficacia del tratamiento antiveneno sea muy eficiente en unos casos y en otros, muy pobre (Otero, R. 2002).

Se ha estimado que las presentaciones actuales de antiveneno en nuestro País, cada frasco ampola de antiveneno polivalente contiene suficiente anticuerpo para neutralizar 30 mg de veneno de nauyaca y 15 mg de veneno de cascabel o sea 790 DL<sub>50</sub> y 780 DL<sub>50</sub> respectivamente (FEUM 2008). Cabe señalar que algunas serpientes pueden producir hasta 500 mg de veneno y que en una mordedura pueden inocular hasta el 90% del mismo (Winger, WA. 1998. Davidson, TM. 1996), de esta manera, para lograr neutralizar 400 mg o más de veneno de nauyaca o cascabel se requieren dosis iniciales de 10 a 15 frascos ampola aplicados por vía intravenosa y deberán administrarse en dosis iguales en las siguientes 8-12 horas, dependiendo del edema, estado clínico y mionecrosis (Sotelo, CN. 2003).

## **1.2. VENENOS.**

En América existen dos Familias de serpientes venenosas, la Viperidae representada por las “víboras” y la Elapidae representada por las “corales” o “coralillos”. Los responsables de más de 90% de los accidentes ofídicos en América pertenecen a la Familia Viperidae. Las especies de Vipéridos pertenecientes a los Géneros *Crotalus* y *Bothrops* pueden encontrarse a lo largo de todo el continente. Las principales serpientes responsables de los accidentes ofídicos en México son especies de los Géneros *Bothrops* y *Crotalus*, por lo que

los antivenenos utilizados para el tratamiento de las mordeduras de las mismas debe neutralizar venenos de serpientes de estos dos Géneros (De Roodt, 2005)

El veneno es una mezcla compleja de sustancias, principalmente proteínas, producidas en las serpientes por una glándula sero-mucosa especializada e inoculada a través de un aparato especializado, que contempla dientes modificados (colmillos) los cuales le permiten la inyección del veneno a presión en los tejidos (Chippaux, JP 1997; Segura, A. 2012). El veneno de serpientes puede ser clasificado dentro de tres grupos de acuerdo a sus efectos tóxicos: a) Actividad proteolítica y de coagulación sanguínea (*Bothrops* y *Lachesis*), b) Actividad hemolítica y neurotóxica (*Crotalus durissus terrificus*); c) Actividad neurotóxica (*Micrurus*, *Hydrophidae*). (Garcia-Willis, C.E. 2009)

Los venenos representan un gran e inexplorado reservorio de componentes bioactivos. La caracterización proteómica del veneno de serpiente tiene un número de potenciales beneficios en investigación básica, y diagnóstico clínico, toda vez que incluye en gran número de enzimas con actividades biológicas distintas, como se puede observar en el siguiente esquema.

Enzima	Acción
Enzimas proteolíticas: (Proteasas, Peptidasas, Hidrolasas y Proteinasas)	Digestión de proteínas tisulares
Fosfolipasas A y B	Citotoxicidad, mionecrosis, hemólisis intravascular. Neurotoxicidad
Calicreinas	Aumento de la permeabilidad capilar, edema, síndrome compartamental y necrosis. Relajación del músculo liso, hipotensión arterial, shock y muerte. Dolor.
Tromboserpentinas	Genera trombina anómala, coágulo inestable.
Miotoxinas tipo crotamina	Produce cambios histológicos profundos, inclusive muerte celular en las fibras musculares. Inducen parálisis de los miembros.
Fibrinogenasas activadoras del factor X	Consumo de fibrinógeno. Coagulación intravascular diseminada.
Hialuronidasa	Degrada el tabique intercelular. Favorece la difusión de las demás enzimas. Favorece la progresión del edema.
Metaloproteinasas	Degradan el tejido conectivo, necrosis, infección, sepsis y pérdida del miembro afectado.
Acetilcolinesterasa	Altera la transmisión neuromuscular.
Fosfodiesterasa	Desnaturaliza DNA y RNA
Crotoxinas	Neurotóxica. Cardiotóxica.

Esquema 1 Actividad biológica de venenos de serpiente tomado de Manuel Emiliano Luna-Bauza. Rev Fac Med UNAM Vol.50 No.5 Septiembre-Octubre, 2007

Sin embargo, la especificidad y la eficacia de los antivenenos debe ser discutido por causa de la gran amplitud de actividades biológicas a neutralizar, las cuales se encuentran presentes en los venenos de serpientes y estos difieren dependiendo del género, especie, hábitat, edad, estación del año, sexo y no es menos importante la variabilidad genética de especies (Chippaux, 1991b). Esto sugiere que los venenos usados para la producción de antivenenos debe ser una mezcla de diferentes serpientes, cubriendo las consideraciones antes mencionadas

### **1.3. ORIGEN DEL PLASMA**

Numerosas especies de animales han sido utilizadas para la obtención del plasma en diferentes escalas de producción (caballos, ovejas, monos, cabra y conejos) o para propósitos experimentales (camellos, llamas, perros y gallinas). Sin embargo la producción de grandes cantidades de antivenenos son obtenidos de animales denominados grandes especies, como los equinos, dada las ventajas que tiene sobre las especies pequeñas (WHO, 2007). La selección de las especies animales debe ser basada sobre diversas consideraciones y estas deben principalmente evitar hipersensibilidad en el individuo tratado por el alto contenido de IgG (Chippaux, JP. 1997).

El caballo es el animal ampliamente utilizado para la producción comercial de antivenenos por su productividad y altos volúmenes de plasma producidos. Las ovejas también han sido utilizadas como una alternativa para la producción de antivenenos, ya que también soportan los adjuvantes a base de aceites como los caballos, dando una buena respuesta al estímulo antigénico y sus anticuerpos pueden ser utilizados en pacientes que son hipersensibles a las proteínas de caballo (WHO, 2010). Las gallinas también son animales con cualidades potenciales para utilizar su plasma en la producción comercial de antivenenos, ya que sus anticuerpos no activan al complemento y pueden resultar en una disminución de las reacciones adversas ocasionadas por la terapia con anticuerpos; sin embargo la IgG de estos animales produce reacciones de hipersensibilidad y se produce en mucho menor cantidad que con el caballo (Chippaux, JP. 1997).

Las grandes especies son preferidas sobre las pequeñas especies por su alto volumen de sangre. Cualquier animal utilizado para la producción de antivenenos debe tener supervisión veterinaria. Cuando se utilizan ovejas o cabras, los productores deben cumplir con las recomendaciones regulatorias para minimizar

los riesgos de transmisión de encefalopatías espongiformes a humanos (WHO, 2007).

#### **1.4. ESQUEMAS DE INMUNIZACIÓN.**

Uno de los pasos más importantes en la producción de antivenenos involucra la inmunización de los animales con el veneno para producir una alta concentración de anticuerpos y que ésta se mantenga respecto al tiempo (WHO, 2010). La inoculación de veneno crudo en los equinos provee de altos títulos, sin embargo el veneno crudo es regularmente mal tolerado por el animal (Chippaux, JP. 1997). Con la finalidad de alcanzar los objetivos en la producción de anticuerpos se deben tomar en cuenta las siguientes consideraciones: El inmunógeno y los programas de inmunización utilizados no deben afectar la salud del animal, se debe definir de forma apropiada la dosis, la selección de los adyuvantes, los sitios de inmunización, los programas de sangría, para que se pueda generar una adecuada respuesta inmune y una alta producción de plasma mientras que se asegure la integridad del animal. La mayoría de los adyuvantes utilizados durante los procesos de inmunización de los equinos son el adyuvante de Freund, la bentonita, el hidróxido de aluminio y el alginato de sodio. El protocolo de inmunización depende de la toxicidad y de la inmunogenicidad del veneno, del modelo animal utilizado y de la calidad de la respuesta inmune de dicho animal. Las dosis óptimas para la inmunización es generalmente obtenida por ensayo y error hasta obtener un título de anticuerpos suficiente (WHO, 2010, Chippaux, JP. 1997. Chippeaux 1991b)

#### **1.5. RESPUESTA INMUNE.**

Entre las principales dificultades que se presentan en el desarrollo de un antiveneno están la cantidad de material necesario para inmunizar a los caballos, el tiempo que tarda el procedimiento de inmunización y los efectos secundarios en la salud del caballo, sobre todo cuando es tratado con el veneno de serpientes no inactivado.

El sistema inmune puede describirse como una maquinaria de defensa del organismo que se encarga de eliminar agentes potencialmente patógenos al huésped, estos agentes potencialmente patógenos pueden desencadenar una respuesta T-dependiente ó T-independiente, para nuestro caso las proteínas del

veneno de las serpientes que son inoculadas al equino vía subcutánea van a desencadenar una respuesta T-dependiente y por ende el sistema inmunológico lo procesará como un antígeno de tipo exógeno, los antígenos proteicos no pueden inducir por si solos la activación de los Linfocitos B, si no que requieren la estimulación de los Linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

#### Reconocimiento del antígeno por los Linfocitos B

El procesamiento de proteínas exógenas ocurre en varios pasos. Primero, el receptor para el antígeno son moléculas de IgM e IgD, estas no pueden enviar señales al interior de la célula, es por esto que junto a ellas se encuentran otro tipo de Ig llamadas Ig $\alpha$  e Ig $\beta$ . Este complejo se denomina “Complejo receptor del Linfocito B” Este complejo receptor después de la unión al antígeno inicia una cascada de fosforilaciones con el fin de activar a factores de transcripción para inducir la expresión de nuevos genes necesarios para la activación del Linfocito B (Abbas 2005). Una vez que se reconoció al antígeno y se expresaron los genes necesarios, las células B se preparan para la proliferación y diferenciación a través de un proceso denominado “expansión clonal”, las células que se encontraban en G<sub>0</sub> del ciclo celular, pasan a G<sub>1</sub>, se expresan las moléculas de clase II del “Complejo principal de histocompatibilidad” MHCII (Medzhitov, 2000; Tizard 2009), y se introduce el antígeno por fagocitosis y se incorpora al fagosoma, el cual se va a fusionar con los lisosomas que contienen proteasas inespecíficas, las cuales hidrolizan las proteínas fagocitadas y las convierten en pequeños péptidos de 10 a 30 aminoácidos que serán ensamblados a las moléculas del MHC clase II (Delves 2000, Abbas 2005), a través de la fusión del lisosoma y los endosomas que contienen a las MHC clase II, una vez que el fragmento antigénico y la molécula del MHC se combinan, las vesículas fusionadas se desplazan hacia la superficie celular y el complejo péptido-MHC II es presentado en la superficie de las células (Tizard 2009).

#### Activación de los Linfocitos T CD4<sup>+</sup>

Durante la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, los receptores (TCR) del linfocito deben unirse a los péptidos antigénicos asociados con las moléculas del MHC clase II del linfocito B y recibir la coestimulación de las citocinas y de otras moléculas de coestimulación. Las señales de activación que se producen desde la célula presentadora de antígeno al linfocito T transcurren a través de una zona de contacto y comunicación denominada sinapsis inmunológica “SMAC” (Delves, P., 2000). El linfocito T comienza a producir diferentes citocinas entre las cuales se encuentran las IL-2, IL-4 y IL-6 que han mostrado ser estimuladoras de la producción de anticuerpos por parte del linfocito B, esta estimulación activa los factores de transcripción y aumenta la transcripción de los genes Ig dando como

consecuencia la diferenciación de la célula en la producción de anticuerpos específicos (Abbas, 2005, Delves, 2000, Karin, 2006).

#### Diferenciación de Linfocitos B

Parte de las células B que han proliferado en respuesta al antígeno y a la colaboración de los T CD4<sup>+</sup>, se diferencia a células plasmáticas. En consecuencia a las citoquinas liberadas y a los coestimuladores, los Linfocitos B llevan a cabo tres procesos: a) El cambio de isotipo (clase) de cadena pesada b) La maduración de la afinidad y c) Diferenciación a células de memoria.

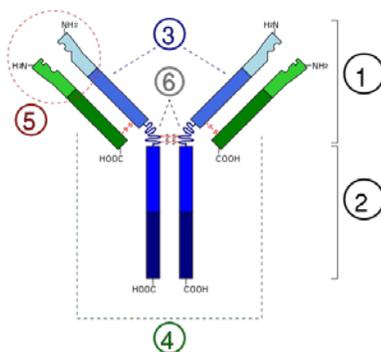
Una vez que el Linfocito es activado puede cambiar de isotipo de cadena pesada *m* o *d* por cualquier otra (*a*, *g*, *e*), lo que determinará el tipo de Ig que se producirá. Hay que aclarar dos cosas. Uno, lo que se cambia es el isotipo de la cadena pesada y no el segmento variable, por lo tanto cambia el tipo de Ig pero no la afinidad. La maduración de la afinidad es un proceso por el cual las Ig aumentan su afinidad por un antígeno determinado por el mecanismo denominado hipermutación somática de los genes Ig V que son los responsables de este fenómeno a través de la supervivencia de las células B que presentan mayor afinidad al antígeno, este cambio se produce solo frente a los Ag proteicos. (Abbas, 2005; Tizard 2009). El otro camino que pueden seguir las células B activadas es evolucionar a “células de memoria “. Este tipo celular adquiere la capacidad de sobrevivir largos periodos de tiempo (mas de 10 años). Estas células ya han madurado su afinidad y cambiado los isotipos de cadena pesada, pero no secretan Ig, el fin de ellas es crear una “memoria inmunológica” que sea capaz de reconocer más rápido y eficazmente al mismo antígeno en una reexposición (Abbas, 2005).

### 1.6. ANTICUERPOS.

Las moléculas de anticuerpo son glucoproteínas denominadas gamaglobulinas, las cuales comparten casi las mismas bases estructurales (dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras), sin embargo, presentan una variabilidad muy marcada en la región que se une al antígeno. Hay cinco clases diferentes o isotipos (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE), que se diferencian por la conformación de las cadenas pesadas, así, cuando se trata de cadenas y la inmunoglobulina resultante es IgG, la IgM contiene cadenas  $\mu$ , la IgA cadenas  $\alpha$  y así sucesivamente. La que se encuentra en concentraciones más elevadas en el suero es la IgG, siguiéndole la IgM, la IgA (sin embargo esta última es predominantemente encontrada en secreciones), la IgD es principalmente un BCR y por tanto raramente se encuentra en fluidos

corporales y por último la IgE es la de menor concentración en el suero (Tizard, 2009).

Una molécula de anticuerpo tiene una simetría estructural compuesta de dos cadenas ligeras idénticas con un peso de 24 kD y dos cadenas pesadas idénticas entre los 55 y 70 kD. Las cadenas ligeras se unen covalentemente a través un puente de disulfuro a una cadena pesada. Ambas cadenas consisten de una región amino-terminal denominada región variable la cual participa en el reconocimiento del antígeno y las cadenas pesadas tienen una región carboxi-terminal que tiene las funciones efectoras (Abbas, 2005).



- 1.- Región Fab
- 2.- Región Fc
- 3.- Cadena pesada con un dominio variable (V<sub>H</sub>) seguido de un dominio constante CH<sub>1</sub>, una región bisagra y dos más constantes los dominios CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>.
- 4.- Cadena ligera con un dominio variable (V<sub>L</sub>) y uno constante (C<sub>L</sub>)
- 5.- Lugar de unión del antígeno
- 6.- Regiones bisagra

Esquema 2 Anticuerpo clase IgG

En el plasma del caballo la inmunoglobulina IgG alcanza valores de 1,000 a 1,500 mg/dL, siendo esta la inmunoglobulina de mayor concentración, por esta razón juega un papel primordial en los mecanismos de defensa mediados por anticuerpos. El caballo tiene siete subclases de IgG: IgG<sub>1</sub> (IgGa), IgG<sub>2</sub> (IgGc), IgG<sub>3</sub> (IgG[T]), IgG<sub>4</sub> (IgGb), IgG<sub>5</sub>, IgG<sub>6</sub> (IgG[B]) e IgG<sub>7</sub>. La IgG<sub>3</sub> no activa el complemento de cobayo y da una reacción de precipitado con una floculación característica (Tizard 2009).

Una de las aplicaciones de los anticuerpos de caballo es la producción del suero antiviperino, que se obtiene de los anticuerpos modificados por digestión enzimática del plasma de caballos hiperinmunes y se usa como el único tratamiento específico contra los accidentes por mordedura de serpiente (Glenn, 1983, WHO, 2010; Segura, 2012); la eficacia de este suero en el tratamiento, depende de su capacidad para la neutralización de las diferentes actividades biológicas de los componentes del veneno de serpientes (Chippaux, JP. 1997. Tay, 1982).

Dependiendo de la naturaleza de las moléculas neutralizantes, hay tres tipos principales de estas preparaciones:

Preparaciones de IgG completa, preparaciones F(ab')<sub>2</sub> y preparaciones de Fab (Morais, 2005. Theakston, 1983).

El primero corresponde a los biológicos conformados por la IgG total purificada del plasma equino de caballos hiperinmunes; la IgG es obtenida mediante fraccionamiento con sulfato de amonio o con ácido caprílico. El primero precipita directamente a las IgGs, mientras que el segundo precipita las globulinas no inmunes del plasma como son la albúmina, fibrinógeno, alfa y beta proteínas, este procedimiento permite la obtención de mayor cantidad de IgG en menor tiempo y con mayor pureza (Rojas, 1994).

El segundo biológico corresponde a los digeridos de pepsina de las IgGs de equinos que dan como producto a los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, después del tratamiento enzimático, los fragmentos Fc son coagulados por calentamiento a 57°C y los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> son purificados, a este antiveneno se le conoce como faboterápico (Morais, 2004).

El tercer tipo corresponde al biológico proveniente de ovinos hiperinmunes, el anticuerpo es digerido con papaína para obtener los fragmentos Fab, los cuales son purificados por cromatografía de afinidad (Otero, 2002).

En el 2001, la Organización Mundial de la Salud (OMS), en su taller sobre la estandarización y control de los antivenenos, concluyó que la vasta mayoría de la producción de los antiseros comerciales, se realiza todavía siguiendo las tecnologías tradicionales, haciendo evidente la necesidad de mejorar los métodos de producción, el control de calidad y el perfil de seguridad de estos productos; la OMS recomendó, a través de este taller, que no se deben escatimar esfuerzos para mejorar los protocolos de producción de estos antivenenos, con el objetivo de aumentar su pureza y minimizar así el contenido de proteínas contaminantes y de sus agregados (Theakston, 2003).

## **1.6.1. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS.**

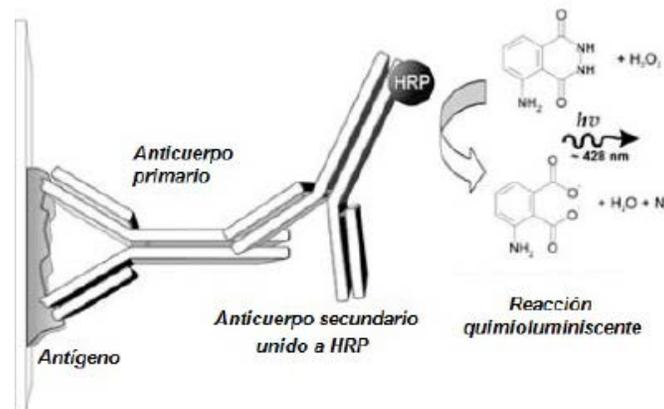
### **1.6.1.1 ELISA.**

ELISA es el acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay, el cual podemos traducir como un Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas el cual es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color o algún otro tipo de luminiscencia (Engvall 1971).

La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno o los anticuerpos en la muestra. Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten desde la cuantificación de un antígeno en solución, la detección de un anticuerpo en una solución o la determinación del isotipo de un anticuerpo.

La ELISA Indirecto consta de las siguientes etapas:

Fijación al soporte insoluble del antígeno específico (veneno de serpiente) para los anticuerpos objeto de estudio (plasma equino). Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados. Adición del suero problema (plasma equino), de tal forma que sus anticuerpos reaccionen específicamente con los antígenos fijados al soporte (veneno de serpiente). Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado. Adición de anti-anticuerpos conjugados con una enzima (anticuerpos anti IgG equino), los cuales reaccionan con los anticuerpos específicos añadidos en el paso anterior y que se encuentran fijados a los antígenos. Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado. Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Detener la reacción. Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.



Esquema 3 Reacción de ELISA

### 1.6.1.2. INMUNOTURBIDIMETRÍA

Inmunoturbidimetría es una prueba para la determinación cuantitativa de inmunoglobulinas en sueros y se basa en la reacción entre cada inmunoglobulina y su anticuerpo específico. Esta reacción produce un complejo antígeno-anticuerpo insoluble, que genera una turbidez medible por fotometría a 365 nm.

La cantidad de inmunocomplejos formados es proporcional a la concentración de inmunoglobulinas presentes en la muestra (Alonso,V,. 2004).

### **1.6.1.3. RADIOINMUNOENSAYO**

El Radioinmunoensayo (o abreviado RIA del inglés Radioimmunoassay) es un tipo de inmunoensayo o método radioinmunométrico que se basa en la formación específica de los complejos Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac) lo que le dota de una gran especificidad unido a la sensibilidad de los métodos radiológicos (García-Segura 2002).

## 2.0 JUSTIFICACIÓN

En atención a la recomendación emitidas por la OMS (Theakston, 2003), acerca de la necesidad urgente de mejorar tanto los productos, como los procesos para la producción de antivenenos, con mayor pureza, seguridad, y que induzcan menos hipersensibilidad en los pacientes de mordedura de serpiente (Theakston, 1983, Rojas 1994), es que diversos grupos han abordado diversas líneas de investigación como lo son, el diseño de nuevos esquemas de inmunización, nuevos métodos de purificación, estudio de la patogénesis de las reacciones anafilactoides inducidas por la administración de antivenenos, el perfil farmacocinético y la estabilidad de las moléculas que constituyen los principios activos, así como la remoción o inactivación de virus presentes en los plasmas animales durante el proceso de manufactura. Es por esa razón que se decidió estudiar el comportamiento que sigue la producción de anticuerpos IgG en los equinos utilizados en la producción de plasma hiperinmune, después de ser estimulados con veneno de serpientes de los géneros *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper* con la finalidad de establecer nuevos programas para la obtención de sangrías de cosecha (plasmaferesis) que se deberán realizarse a los equinos sin afectar su estado general de salud y obtener mayor rendimiento de plasma por equino con la finalidad de mejorar los procesos de generación de plasma.

## 3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El programa actual de producción de plasma equino que tiene la Gerencia de Producción de Sueros permite obtener entre 9 y 12 litros de plasma por equino realizando para ello tres cosechas de plasma, precedido tras la administración de cuatro dosis con veneno de serpientes de los géneros *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper* y en concordancia a la recomendación emitida por la OMS acerca de la necesidad de mejorar tanto los productos, como los procesos para la producción de antivenenos, es necesario estudiar la cinética de producción de anticuerpos tras la estimulación de los equinos con los venenos anteriormente mencionados, para así poder obtener mayor cantidad de plasma con mejores títulos de anticuerpos, haciendo uso de menores cantidades de venenos inoculados, aunado con esto un mayor bienestar de los animales de producción.

## 4.0 OBJETIVO

### 4.1 Objetivo General.

Evaluar el estado de inmunidad de 18 equinos pertenecientes al grupo viperino IV mediante la cinética de producción de anticuerpos de clase IgG contra el veneno de serpientes *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper* evaluando tres esquemas de inmunización, con la finalidad de establecer el tiempo y cantidad de sangrías de cosecha, para aumentar la cantidad producida de plasma hiperinmune de origen equino.

### 4.2 Objetivos Específicos.

4.2.1. Evaluar el estado de salud de los equinos al inicio de los esquemas de inmunización y posterior a la tercer plasmaféresis.

4.2.2. Determinar el contenido de anticuerpos a través de inmunoensayos (ELISA) en los plasmas equinos expresados como la absorbancia a 492 nm.

4.2.3. Determinar la cinética de producción de anticuerpos en el plasma equino, en los tres esquemas de inmunización, que nos permita establecer la cantidad de sangrías de cosecha y el momento de máxima producción.

4.2.4. Comparar los tres esquemas de inmunización utilizando inóculos que contengan veneno bivalente de serpientes *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper*.

4.2.5. Analizar estadísticamente los títulos de anticuerpos obtenidos en cada uno de los esquemas de inmunización para establecer el esquema que ofrezca mejor respuesta inmune.

## 5.0 HIPÓTESIS

Nuestro enfoque se basa en la idea de estimular equinos hiperinmunizados realizando la reducción del material biológico inoculado, ya que la concentración de inmunoglobulinas específicas obtenidas contra el veneno de serpientes de los géneros *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper*, depende de la cantidad del veneno inoculado y del estado inmune de los equinos, así como del tiempo en el cual se realiza la sangría de cosecha para la obtención del plasma; por lo cual pretendemos establecer la máxima productividad de inmunoglobulinas con el menor número de dosis de veneno inoculado, a través de una prueba de Hipótesis (prueba de t-Student) en donde se compare las medias poblacionales estableciendo una hipótesis de investigación  $H_a: (\mu_1 \neq \mu_2)$ .

## 6.0 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6. MATERIALES

#### 6.1 Equipo

- Lector de ELISA marca TECAN modelo Sunrise
- Centrífuga para microtubos marca Thermocientific
- Lavadora de Microplacas marca TECAN modelo hydroflex
- Contador de células marca Coulter Modelo T-980
- Espectrofotómetro automatizado Global Automatic Analyzer BPC-Biosed
- Micropipetas

#### 6.2. Reactivos

- Adyuvante Incompleto de Freund.
- Venenos de serpientes *Crotalus basiliscus*, *Bothrops asper* para sensibilización de placas e inoculaciones.
- Sueros equinos.
- Conjugado anti IgG de caballo hecho en cabra marcado con peroxidasa.
- Sustrato para peroxidasa (orto-fenilendiamina sigma).
- Reactivos para determinación de proteínas totales y albúmina sérica.

#### 6.3. Material diverso

- Microplacas inmunosorb de 96 pozos.
- Puntas para micropipeta.
- Tubos eppendorf.
- Jeringas desechables con capacidad para 10 mL.
- Bolsas de plasmaféresis para equinos de 8 litros.

#### 6.4. Material biológico

- **Veneno Viperino.** El veneno a emplear se obtuvo de las especies: *Crotalus basiliscus* (lote VCb0903 11/Sep/09 Potencia 177.58 DL<sub>50</sub>/mL) *Bothrops asper* (lote VBa0701 20/May/09 Potencia 878.45 DL<sub>50</sub>/mL).



Fotografía 1 Serpiente *Crotalus basiliscus*



Fotografía 2 Serpiente *Bothrops asper*

- **Equinos.** Se emplearon 18 equinos de la raza criolla, que pertenecen al grupo viperino IV, los cuales serán subclasificados en tres grupos de seis individuos y se inocularán con veneno bivalente de serpientes *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper*.

Esquema	Equinos	Edad Promedio	Peso Promedio
PVB1	4 machos 2 hembras	19 años	485Kg
PVB2	4 machos 2 hembras	17 años	450Kg
PVB3	4 machos 2 hembras	18 años	460Kg

Tabla 1 Distribución de equinos por esquema de inmunización

Los equinos que se utilizaron en el estudio son dedicados a la producción de plasma y se encuentran sometidos a procesos de estimulación continua con los venenos de las serpientes *B. asper* y *C. basiliscus* por lo que se debe tomar en cuenta el estado hiperinmunizado que estos animales Al inicio del programa de

inoculación tenían un periodo de descanso de tres meses. La edad promedio de los animales de estudio es de 17 a 19 años lo que los ubica en una edad madura.



Fotografía 3 Equinos criollos utilizados para los esquemas de inmunización

## 7.0. METODOLOGÍA

### 7.1. Monitoreo al estado de salud de los equinos.

El estado de salud de los caballos se monitoreará de acuerdo al siguiente procedimiento:

Realizar la inspección física de cada equino haciendo énfasis en los siguientes aspectos:

- Estado de carnes (las masas musculares deben ser lo suficientemente voluminosas para evitar que se aprecien salientes óseas).
- Actitud del animal (se debe encontrar en estado de alerta y reaccionar adecuadamente a los estímulos del medio).
- Expresión de los ojos (no se debe apreciar manifestación de dolor o angustia).
- Integridad de la piel (no se deben apreciar laceraciones o áreas sin pelo).
- Estado del pelo (debe ser brillante y suave).
- Tomar muestras de sangre para evaluar el perfil bioquímico y hemograma equino.

## 7.2. Obtención de Muestras.

Para la evaluación del estado inmune de los equinos a través del inmunoensayo (ELISA) se obtuvieron muestras de sangre con la finalidad de obtener el suero en el que se hicieron las determinaciones de los anticuerpos de la clase IgG, de acuerdo a siguiente protocolo.

Actividad	Día
Estado de Salud	-5
Primer inóculo	0
Segundo inóculo	2
Tercer inóculo	4
Cuarto inóculo	8
Sangría de prueba	13
Primer plasmaféresis	16
Segunda plasmaféresis	17
Tercer plasmaféresis	18
Sangría de prueba	20
Cuarta plasmaféresis	22
Sangría de prueba	29
Sangría de prueba	36

Tabla 2 Programa de toma de muestras.

## 7.3. Preparación de Inóculo (dosis).

Los inóculos (dosis) se prepararon empleando una mezcla de 100 DL<sub>50</sub> del veneno de *C. basiliscus* y 16 DL<sub>50</sub> del veneno de *B. asper*.

La formulación de los cuatro inóculos (dosis) es diferente; al primer inóculo se le añade Adyuvante Incompleto de Freund y solución salina 85%, los inóculos restantes no llevan adyuvante, solo llevan solución salina al 85 %.

## 7.4. Esquemas de inmunización.

Se emplearon tres esquemas de inmunización, tomando como referencia el tradicional (PVB1; tabla 3) para comparar con dos nuevos esquemas derivados de éste, las principales diferencias son el empleo de tres y dos dosis respectivamente a diferencia del tradicional que emplea cuatro dosis, aunado a lo anterior en los tres esquemas se continuará la cinética hasta el día 36, realizando una sangría de prueba el día 20, ya que si la salud del animal y el título de anticuerpos lo permiten, se procedería a una nueva plasmaféresis el día 22 (tabla2).

Esquema	Dosis (días)	Sangrías (días)
PVB1	0, 2, 4 y 8	16,17,18 y 22
PVB2	0, 2 y 8	16,17,18 y 22
PVB3	0 y 8	16,17,18 y 22

Tabla 3 Esquemas de inmunización.

### 7.5. Aplicación del inóculo.

Se aplicó la mezcla de venenos formulados en los espacios intercostales de los equinos, por vía subcutánea, aplicando 2.5 mL en cada uno de cuatro diferentes puntos de acuerdo a la siguiente descripción. Introducir la aguja en forma inclinada por debajo de la piel formando un ángulo entre 30° y 45° con el cuerpo del equino. Depositar la cantidad de 2.5 mL correspondiente del inóculo. Realizar las punciones necesarias hasta concluir con el volumen total del inóculo por equino. Aplicar pomada ruborante para sellar el orificio de la punción y favorecer el aporte sanguíneo.

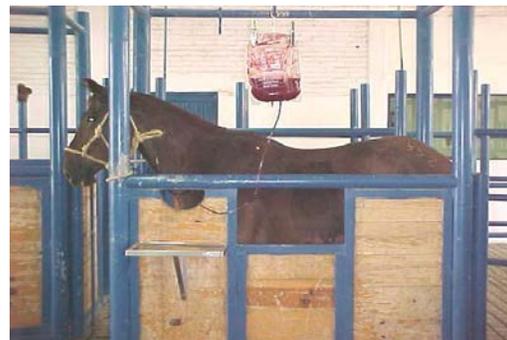
### 7.6. Plasmaféresis.

Se canalizó la vena yugular del equino con la aguja estéril del sistema Hipo - Sys que en su extremo de acoplamiento tiene una manguera que conduce a una bolsa de plástico estéril aforada, se extrajo de 6 a 8 litros de sangre e identificarla con el número del caballo.

Se realizó la separación del plasma por sedimentación de 4 a 6 horas a temperatura ambiente, coleccionar el plasma en la bolsa satélite del sistema Hipo-sys y reconstituir el paquete celular con solución salina isotónica y regresar los eritrocitos al caballo del cual se extrajo.



Fotografía 4 Extracción de sangre



Fotografía 5 Regreso de paquete globular

### **7.7. Determinación de proteínas de los venenos de *C. basiliscus* y *B. asper*.**

La concentración de proteínas de los venenos de las serpientes de los géneros *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper*, para la sensibilización de las placas de ELISA se determinaron empleando el método del ácido bicinconínico de acuerdo al boletín técnico de Sigma, toda vez que se requiere del conocimiento de la concentración del antígeno, contra el cual se realizará la determinación de anticuerpos.

### **7.8. Técnica de ELISA indirecto.**

Los sueros de los caballos serán titulados para determinar el contenido de anticuerpos de clase IgG contra el veneno de *C. basiliscus* y *B. asper*.

La titulación se realizará mediante el inmunoensayo de ELISA indirecto de acuerdo a Theakston, en el cual se sensibilizarán las microplacas (Immunosorb) con 100  $\mu$ L del veneno de *C. basiliscus* ó *B. asper* en solución de carbonatos 0.2 M y pH de 7.4.

Las placas se lavarán con solución de PBS-tween 20 al 0.05 %, pH 7.4 utilizando un lavador de microplacas (marca TECAN, modelo hydroflex); la solución de bloqueo será leche descremada al 5 % en PBS. Las muestras (plasma) y los controles positivo (suero control) y negativo (leche descremada) se adicionarán por triplicado con una dilución 1:4000 en PBS-Tween.

Como anticuerpo secundario se utilizará el conjugado anti-IgG de caballo hecho en cabra marcado con peroxidasa. (Marca Sigma, No cat A9292) diluido 1:8000 en PBS. Se adicionará el sustrato enzimático (peróxido de hidrogeno y ortofenilendiamina) en regulador de citrato 0.1 M pH 5.2. Después de la incubación de las placas la reacción se detendrá por la adición de 50  $\mu$ L de ácido sulfúrico 8N. Los valores de absorbancia se determinaron a 492 nm utilizando un lector de ELISA (Marca TECAN, modelo sunrise).

La cantidad de antígeno para la sensibilización de las placas, así como las diluciones del anticuerpo primario y secundario, fueron estandarizadas previo a la titulación de los sueros problemas. Los antígenos que se utilizaron para sensibilizar las microplacas, fueron las mismas preparaciones de veneno utilizadas en la inmunización de los caballos, sin la adición de los adyuvantes.

Los títulos de anticuerpos serán definidos como la absorbancia a 492 nm del suero diluido 1:4000.

### **7.9 Prueba estadística.**

El análisis estadístico está basado en una prueba de Hipótesis en donde se compara dos medias poblaciones para muestras pequeñas e independientes, con la finalidad de conocer cuál de los esquemas de inmunización es mejor que otro, o si no existe diferencia significativa entre ellos.

Las muestras se obtuvieron de la siguiente manera: Consisten de  $n_1$  unidades experimentales de la población 1 (Equinos con el esquema de inmunización PVB1) con media  $\mu_1$ , y varianza  $\sigma^2_1$ , y de  $n_2$  unidades de la población 2 (Equinos con el esquema de inmunización PVB2 ó PVB3), con media  $\mu_2$ , y varianza  $\sigma^2_2$ . Los datos que se van a examinar consisten de las mediciones de las respuestas, de los ( $n_1 + n_2$ ) esquemas, los que se han dividido de forma aleatoria en dos grupos. Cada miembro del primer grupo recibe el tratamiento 1 (esquema PVB1) y cada uno del segundo grupo, el tratamiento 2 (esquema PVB2 ó PVB3).

El objetivo es demostrar a través de una prueba de hipótesis de la diferencia entre dos medias poblacionales ( $\mu_1 - \mu_2$ ).

La significancia de las diferencia entre las medias de la concentración anticuerpos IgG de los tres grupos de equinos será determinada por la prueba de t-Student.

Valores de  $P < 0.05$  serán considerados estadísticamente significativos.

## 8.0 RESULTADOS

### 8.1. Monitoreo al estado de salud de los equinos.

Se realizó una valoración médica de cada uno de los equinos que forman parte del grupo viperino IV para determinar su estado de salud, encontrándose sanos 17 de los 18 equinos toda vez que el equino 730 no cumplió con criterios de inclusión de animal sano, por lo que se excluye del presente protocolo.

#### 8.1.1 Hemograma.

Las muestras para la realización de los hemogramas se tomaron en el día del estado de salud y en el día 20 del protocolo de inmunización y se realizaron utilizando el Contador de Células Coulter Modelo T-890 (William, 1990).

Analito	unidad	referencia	730	940	941	942	945	947	μ
Hematocrito	L/L	0.32-0.52	-	0.43	0.46	0.37	0.49	0.38	0.43
Hemoglobina	g/L	111-190	-	147	146	133	155	135	143
Eritrocitos	10 <sup>12</sup> /L	6.5-12.5	-	9.2	9.3	8.0	10.4	7.6	8.9
VGM	fL	34-58	-	47	49	46	47	50	48
CGMH	g/L	310-370	-	342	317	359	316	355	338
Fibrinógeno	g/L	<5	-	3	2	2	4	1	2

Tabla 4 Hemograma basal del grupo PVB1. Los números 730, 940, 941, 942, 945 y 947 representan el número de equino.

Analito	unidad	referencia	730	940	941	942	945	947	μ
Hematocrito	L/L	0.32-0.52	-	0.44	0.45	0.35	0.42	0.33	0.40
Hemoglobina	g/L	111-190	-	151	156	119	145	114	137
Eritrocitos	10 <sup>12</sup> /L	6.5-12.5	-	9.4	9.3	7.7	9.3	6.7	8.5
VGM	fL	34-58	-	47	48	45	45	49	47
CGMH	g/L	310-370	-	343	347	340	345	345	344
Fibrinógeno	g/L	<5	-	1	2	2	4	1	2

Tabla 5 Hemograma día 20 del grupo PVB1. Los números 730, 940, 941, 942, 945 y 947 representan el número de equino.

Analito	unidad	referencia	953	956	957	964	965	967	μ
Hematocrito	L/L	0.32-0.52	0.37	0.49	0.35	0.40	0.41	0.35	0.40
Hemoglobina	g/L	111-190	135	164	117	137	135	119	135
Eritrocitos	10 <sup>12</sup> /L	6.5-12.5	7.6	9.6	7.0	7.9	8.7	7.8	8.1
VGM	fL	34-58	49	51	50	51	47	45	49
CGMH	g/L	310-370	365	335	334	343	329	340	341
Fibrinógeno	g/L	<5	2	2	2	1	2	1	2

Tabla 6 Hemograma basal del grupo PVB2. Los números 553, 956, 957, 964, 965 y 967 representan el número de equino.

Analito	unidad	referencia	953	956	957	964	965	967	μ
Hematocrito	L/L	0.32-0.52	0.33	0.46	0.32	0.34	0.45	0.35	0.38
Hemoglobina	g/L	111-190	117	162	112	118	158	118	131
Eritrocitos	10 <sup>12</sup> /L	6.5-12.5	7.1	9.2	6.6	7.0	9.6	7.4	7.8
VGM	fL	34-58	46	50	48	49	47	47	48
CGMH	g/L	310-370	355	352	350	347	351	337	349
Fibrinógeno	g/L	<5	1	2	1	1	2	2	2

Tabla 7 Hemograma al día 20 del grupo PVB2. Los números 553, 956, 957, 964, 965 y 967 representan el número de equino.

Analito	unidad	referencia	971	973	977	980	985	987	μ
Hematocrito	L/L	0.32-0.52	0.42	0.43	0.41	0.51	0.48	0.54	0.47
Hemoglobina	g/L	111-190	132	143	132	172	153	193	154
Eritrocitos	10 <sup>12</sup> /L	6.5-12.5	9.1	8.5	8.0	10.8	10.2	12.9	9.9
VGM	fL	34-58	46	51	51	47	47	42	47
CGMH	g/L	310-370	314	333	322	337	319	357	330
Fibrinógeno	g/L	<5	2	2	2	2	1	3	2

Tabla 8 Hemograma basal del grupo PVB3. Los números 971, 973, 977, 980, 985 y 987 representan el número de equino.

Analito	unidad	referencia	971	973	977	980	985	987	μ
Hematocrito	L/L	0.32-0.52	0.35	0.44	0.39	0.46	0.44	0.48	0.43
Hemoglobina	g/L	111-190	115	159	139	156	150	165	147
Eritrocitos	10 <sup>12</sup> /L	6.5-12.5	7.6	9.3	8.3	9.9	9.6	10.2	9.2
VGM	fL	34-58	46	47	47	46	46	47	47
CGMH	g/L	310-370	329	361	356	339	341	344	345
Fibrinógeno	g/L	<5	4	2	2	3	3	2	3

Tabla 9 Hemograma al día 20 del grupo PVB3. Los números 971, 973, 977, 980, 985 y 987 representan el número de equino.

### 8.1.2 Perfil Bioquímico.

Las muestras para la realización de los perfiles bioquímicos se tomaron en el día del estado de salud y en el día 20 del protocolo de inmunización y se realizaron utilizando el Espectrofotómetro automatizado Global Automatic Analyzer BPC BIOSED (William, 1990).

Analito	unidad	referencia	730	940	941	942	945	947	μ
Proteínas T.	g/L	53-71	-	70	71	69	76	72	72
Albúmina	g/L	31-39	-	28	30	27	28	29	28
Globulinas	g/L	20-35	-	42	41	42	48	43	43
Calcio	mmol/L	2.7-3.2	-	2.98	2.97	3.09	2.91	3.14	3.02
CK	U/L	<425	-	202	214	153	268	142	196
Urea	mmol/L	4.1-7.2	-	6.2	6.4	5.7	7.8	7.2	6.7

Tabla 10 Perfil bioquímico basal del grupo PVB1. Los números 730, 940, 941, 942, 945 y 947 representan el número de equino.

Analito	unidad	referencia	730	940	941	942	945	947	μ
Proteínas T.	g/L	53-71	-	70	70	62	80	74	71
Albúmina	g/L	31-39	-	23	24	24	23	23	23
Globulinas	g/L	20-35	-	47	46	38	57	51	48
Calcio	mmol/L	2.7-3.2	-	3.08	2.96	2.85	2.86	3.07	2.96
CK	U/L	<425	-	158	129	96	125	191	140
Urea	mmol/L	4.1-7.2	-	7.5	5.3	5.2	6.8	6.5	6.3

Tabla 11 Perfil bioquímico al día 20 del grupo PVB1. Los números 730, 940, 941, 942, 945 y 947 representan el número de equino.

Analito	unidad	referencia	953	956	957	964	965	967	μ
Proteínas T.	g/L	53-71	76	77	66	70	70	70	72
Albúmina	g/L	31-39	26	28	27	25	27	23	26
Globulinas	g/L	20-35	50	49	39	45	43	47	46
Calcio	mmol/L	2.7-3.2	2.87	3.07	3.09	2.93	2.93	2.93	2.97
CK	U/L	<425	303	484	142	268	169	174	257
Urea	mmol/L	4.1-7.2	8.6	8.4	9.0	8.4	7.8	8.3	8.4

Tabla 12 Perfil bioquímico basal del grupo PVB2. Los números 953, 956, 957, 964, 965 y 967 representan el número de equino.

Analito	unidad	referencia	953	956	957	964	965	967	μ
Proteínas T.	g/L	53-71	84	72	72	76	70	70	74
Albúmina	g/L	31-39	19	24	22	19	25	19	21
Globulinas	g/L	20-35	65	48	50	57	45	51	53
Calcio	mmol/L	2.7-3.2	3.02	3.21	2.96	2.89	3.14	2.91	3.02
CK	U/L	<425	154	136	95	105	146	123	127
Urea	mmol/L	4.1-7.2	8.6	7.8	7.7	10.2	6.2	7.4	8.0

Tabla 13 Perfil bioquímico al día 20 del grupo PVB2. Los números 953, 956, 957, 964, 965 y 967 representan el número de equino.

Analito	unidad	referencia	971	973	977	980	985	987	μ
Proteínas T.	g/L	53-71	72	70	78	74	78	70	74
Albúmina	g/L	31-39	25	28	27	25	28	31	27
Globulinas	g/L	20-35	47	42	51	49	50	39	46
Calcio	mmol/L	2.7-3.2	3.07	3.13	3.16	2.97	2.83	3.0	3.03
CK	U/L	<425	183	161	195	130	120	161	158
Urea	mmol/L	4.1-7.2	9.9	6.1	8.0	6.9	8.0	7.6	7.8

Tabla 14 Perfil bioquímico basal del grupo PVB3. Los números 971, 973, 977, 980, 985 y 987 representan el número de equino.

Analito	unidad	referencia	971	973	977	980	985	987	μ
Proteínas T.	g/L	53-71	70	66	78	74	74	62	71
Albúmina	g/L	31-39	20	26	20	23	22	26	23
Globulinas	g/L	20-35	50	40	58	51	52	36	48
Calcio	mmol/L	2.7-3.2	2.96	3.04	3.09	2.99	3.21	2.87	3.03
CK	U/L	<425	135	171	528	114	92	164	201
Urea	mmol/L	4.1-7.2	9.6	7.9	7.7	8.5	7.0	8.2	8.2

Tabla 15 Perfil bioquímico al día 20 del grupo PVB3. Los números 971, 973, 977, 980, 985 y 987 representan el número de equino.

## **8.2. Tratamiento de Muestras.**

Se obtuvieron 13 muestras por cada equino de acuerdo al punto 7.2, las cuales fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos con la finalidad de separar el suero. El suero fue almacenado en tubos eppendorf y congelado a -70°C hasta su uso.

## **8.3. Determinación de proteínas de los venenos de serpientes de los géneros *C. basiliscus* y *B. asper*.**

La concentración de proteínas fue determinada por medio del método del ácido bicinconínico, encontrando una concentración de 12.85 g/L de proteína para el veneno de *Bothrops asper* y una concentración de 11.89 g/L de proteína para el veneno de *Crotalus basiliscus*.

Una vez conocida la concentración de proteínas en estos venenos, se ajustó a una concentración de 4 mg/ml de proteína con solución salina isotónica, y se congeló a -70 °C hasta su uso.

## **8.4. Técnica de ELISA indirecto.**

La titulación se realizó mediante el inmunoensayo de ELISA indirecto de acuerdo a Theakston, sensibilizando las microplacas (Inmunosorb) con 100 µL del veneno de *C. basiliscus* ó *B. asper* conteniendo 1.0 microgramos/mL de proteína en solución de carbonatos 0.2 M y pH de 7.4.

Los valores de absorbancia se determinaron a 492 nm utilizando un lector de ELISA (Marca TECAN, modelo sunrise) de acuerdo a la metodología propuesta, cada uno de los resultados representa el promedio de tres lecturas.

Los títulos de anticuerpos fueron definidos como la absorbancia a 492 nm del suero equino diluido 1:4000.

#### 8.4.1 Títulos de anticuerpos en el plasma equino por esquema de inmunización.

<b>Equinos PVB1 <i>B. asper</i></b>					
Muestra	940	942	945	941	947
PVB1-ES	0.334	0.188	0.557	0.197	0.222
PVB1-0	0.317	0.117	0.388	0.199	0.190
PVB1-2	0.304	0.099	0.398	0.171	0.180
PVB1-4	0.289	0.093	0.330	0.179	0.315
PVB1-8	0.607	0.342	0.780	0.597	0.362
PVB1-13	0.726	0.410	0.791	0.596	0.459
PVB1-16	0.736	0.434	0.858	0.609	0.480
PVB1-17	0.644	0.316	0.855	0.533	0.426
PVB1-18	0.539	0.295	0.845	0.459	0.399
PVB1-20	0.621	0.341	0.845	0.507	0.294
PVB1-22	0.568	0.294	0.836	0.437	0.321
PVB1-29	0.632	0.359	0.811	0.470	0.326
PVB1-36	0.419	0.288	0.740	0.525	0.309

Tabla 16 que representa los valores de absorbancia de la determinación de anticuerpos IgG en los equinos pertenecientes al esquema PVB1 para *Bothrops asper*.

<b>Equinos PVB1 <i>C. basiliscus</i></b>					
Muestra	940	942	945	941	947
PVB1-ES	0.353	0.388	0.696	0.235	0.292
PVB1-0	0.328	0.285	0.512	0.233	0.251
PVB1-2	0.318	0.144	0.510	0.200	0.253
PVB1-4	0.296	0.142	0.419	0.202	0.102
PVB1-8	0.612	0.487	0.937	0.602	0.498
PVB1-13	0.659	0.551	0.997	0.593	0.555
PVB1-16	0.654	0.541	1.007	0.577	0.548
PVB1-17	0.548	0.453	1.008	0.489	0.522
PVB1-18	0.519	0.394	1.032	0.462	0.503
PVB1-20	0.595	0.478	1.025	0.520	0.388
PVB1-22	0.534	0.445	0.987	0.455	0.438
PVB1-29	0.600	0.512	1.006	0.503	0.426
PVB1-36	0.415	0.426	0.950	0.420	0.403

Tabla 17 que representa los valores de absorbancia de la determinación de anticuerpos IgG en los equinos pertenecientes al esquema PVB1 para *Crotalus basiliscus*.

<b>Equinos PVB2 <i>B. asper</i></b>						
<b>Muestra</b>	<b>953</b>	<b>956</b>	<b>957</b>	<b>964</b>	<b>965</b>	<b>967</b>
<b>PVB2-ES</b>	0.524	0.485	0.349	0.274	0.385	0.512
<b>PVB2-0</b>	0.493	0.347	0.332	0.285	0.341	0.512
<b>PVB2-2</b>	0.481	0.347	0.322	0.275	0.338	0.515
<b>PVB2-4</b>	0.512	0.368	0.284	0.253	0.330	0.523
<b>PVB2-8</b>	0.688	0.596	0.742	0.372	0.497	0.687
<b>PVB2-13</b>	0.697	0.559	0.744	0.457	0.480	0.676
<b>PVB2-16</b>	0.682	0.555	0.737	0.466	0.666	0.664
<b>PVB2-17</b>	0.753	0.560	0.685	0.530	0.524	0.652
<b>PVB2-18</b>	0.662	0.497	0.688	0.491	0.478	0.605
<b>PVB2-20</b>	0.603	0.380	0.715	0.481	0.517	0.633
<b>PVB2-22</b>	0.549	0.485	0.651	0.445	0.485	0.623
<b>PVB2-29</b>	0.582	0.478	0.657	0.452	0.484	0.649
<b>PVB2-36</b>	0.679	0.320	0.588	0.430	0.463	0.614

Tabla 18 que representa los valores de absorbancia de la determinación de anticuerpos IgG en los equinos pertenecientes al esquema PVB2 para *Bothrops asper*.

<b>Equinos PVB2 <i>C. basiliscus</i></b>						
<b>Muestra</b>	<b>953</b>	<b>956</b>	<b>957</b>	<b>964</b>	<b>965</b>	<b>967</b>
<b>PVB2-ES</b>	0.317	0.504	0.399	0.251	0.463	0.515
<b>PVB2-0</b>	0.581	0.388	0.400	0.257	0.436	0.530
<b>PVB2-2</b>	0.484	0.320	0.364	0.252	0.428	0.523
<b>PVB2-4</b>	0.570	0.347	0.354	0.248	0.432	0.528
<b>PVB2-8</b>	0.744	0.650	0.817	0.429	0.586	0.701
<b>PVB2-13</b>	0.725	0.610	0.763	0.443	0.585	0.707
<b>PVB2-16</b>	0.765	0.625	0.808	0.449	0.746	0.693
<b>PVB2-17</b>	0.785	0.661	0.771	0.497	0.589	0.687
<b>PVB2-18</b>	0.694	0.557	0.766	0.465	0.566	0.623
<b>PVB2-20</b>	0.639	0.182	0.527	0.456	0.590	0.637
<b>PVB2-22</b>	0.712	0.295	0.692	0.427	0.580	0.651
<b>PVB2-29</b>	0.596	0.294	0.682	0.418	0.567	0.652
<b>PVB2-36</b>	0.686	0.186	0.586	0.401	0.543	0.634

Tabla 19 que representa los valores de absorbancia de la determinación de anticuerpos IgG en los equinos pertenecientes al esquema PVB2 para *Crotalus basiliscus*.

<b>Equinos PVB3 <i>B. asper</i></b>						
<b>Muestra</b>	<b>971</b>	<b>973</b>	<b>977</b>	<b>980</b>	<b>985</b>	<b>987</b>
<b>PVB3-ES</b>	0.729	0.253	1.206	0.531	0.751	0.340
<b>PVB3-0</b>	0.675	0.180	1.106	0.577	0.784	0.295
<b>PVB3-2</b>	0.694	0.222	1.133	0.585	0.817	0.337
<b>PVB3-4</b>	0.772	0.330	1.215	0.653	0.910	0.410
<b>PVB3-8</b>	0.923	0.357	1.333	0.738	1.012	0.618
<b>PVB3-13</b>	0.857	0.326	1.244	0.872	1.033	0.660
<b>PVB3-16</b>	0.908	0.365	1.371	0.884	1.039	0.659
<b>PVB3-17</b>	0.890	0.243	1.352	0.883	1.068	0.687
<b>PVB3-18</b>	0.874	0.224	1.418	0.884	1.071	0.537
<b>PVB3-20</b>	0.931	0.444	1.340	0.869	1.160	0.627
<b>PVB3-22</b>	0.938	0.231	1.346	0.879	0.980	0.546
<b>PVB3-29</b>	0.914	0.378	1.343	0.835	1.056	0.676
<b>PVB3-36</b>	0.956	0.340	1.338	0.809	0.956	0.592

Tabla 20 que representa los valores de absorbancia de la determinación de anticuerpos IgG en los equinos pertenecientes al esquema PVB3 para *Bothrops asper*.

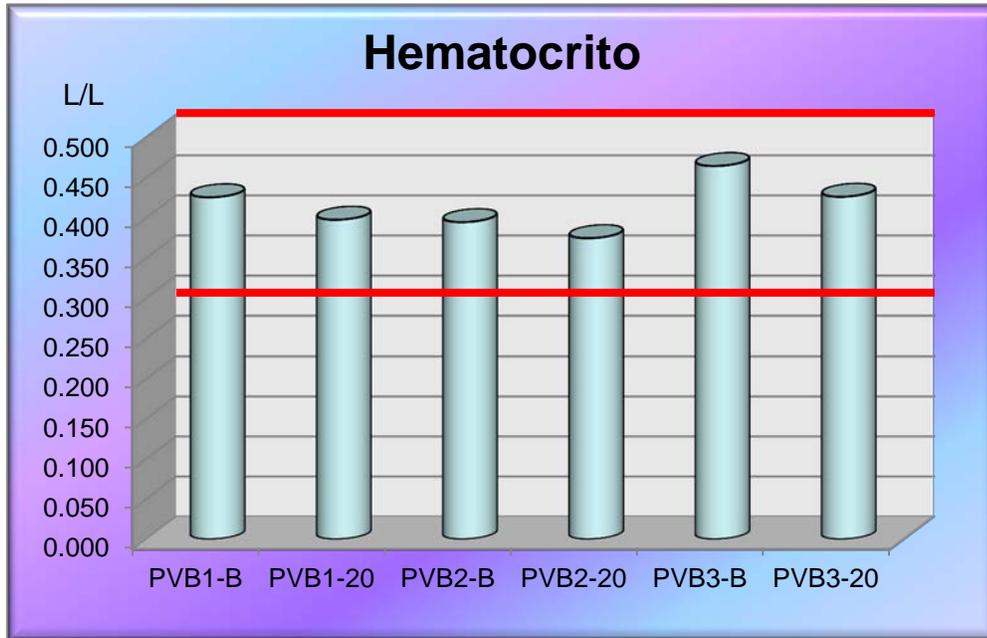
<b>Equinos PVB3 <i>C. basiliscus</i></b>						
<b>Muestra</b>	<b>971</b>	<b>973</b>	<b>977</b>	<b>980</b>	<b>985</b>	<b>987</b>
<b>PVB3-ES</b>	0.865	0.345	1.084	0.708	1.020	0.349
<b>PVB3-0</b>	0.819	0.258	1.062	0.665	1.054	0.366
<b>PVB3-2</b>	0.873	0.315	1.073	0.672	1.047	0.380
<b>PVB3-4</b>	0.930	0.429	1.208	0.717	1.119	0.447
<b>PVB3-8</b>	1.110	0.551	1.303	0.809	1.239	0.748
<b>PVB3-13</b>	1.041	0.504	1.213	0.908	1.259	0.755
<b>PVB3-16</b>	1.061	0.522	1.296	0.899	1.250	0.735
<b>PVB3-17</b>	1.066	0.359	1.296	0.849	1.267	0.796
<b>PVB3-18</b>	1.050	0.325	1.512	0.828	1.280	0.644
<b>PVB3-20</b>	1.102	0.584	1.368	0.891	1.257	0.716
<b>PVB3-22</b>	1.191	0.349	1.384	0.932	1.288	0.618
<b>PVB3-29</b>	1.121	0.505	1.492	0.853	1.313	0.773
<b>PVB3-36</b>	1.199	0.466	1.406	0.841	1.230	0.680

Tabla 21 que representa los valores de absorbancia de la determinación de anticuerpos IgG en los equinos pertenecientes al esquema PVB3 para *Crotalus basiliscus*.

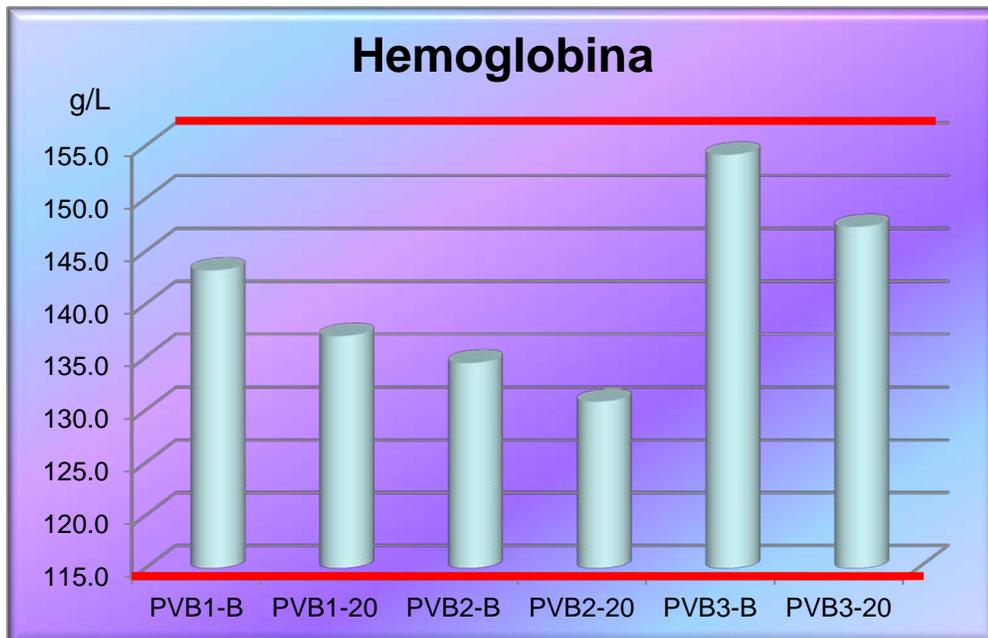
## 9.0 MANEJO DE RESULTADOS

### 9.1 Hemograma.

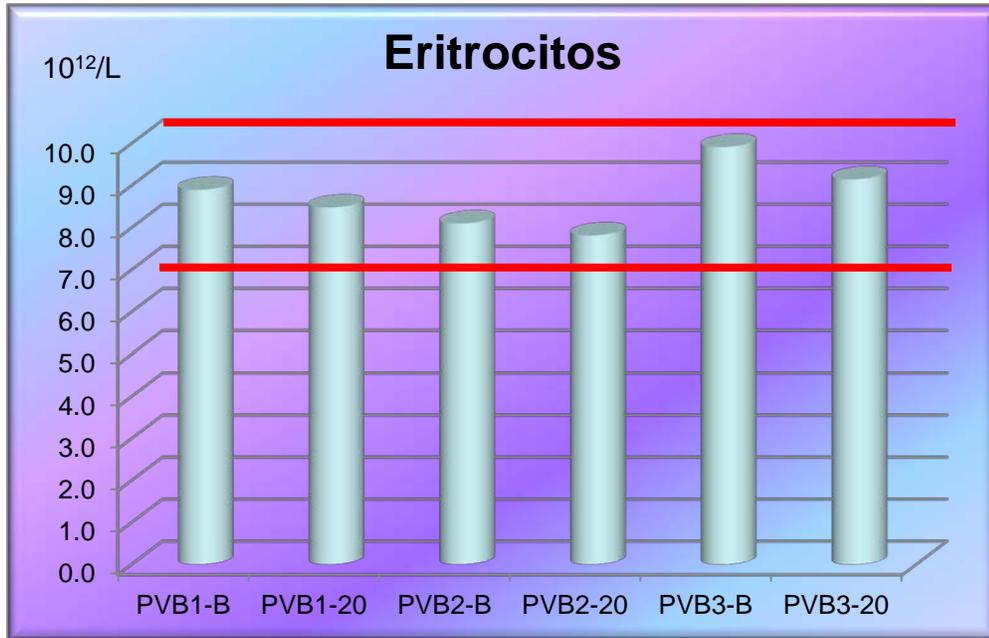
Gráficos que representan el comportamiento del hemograma de los equinos, antes de los inóculos y después de la tercer plasmaféresis, la línea roja representa el valor de referencia mínimo y máximo.



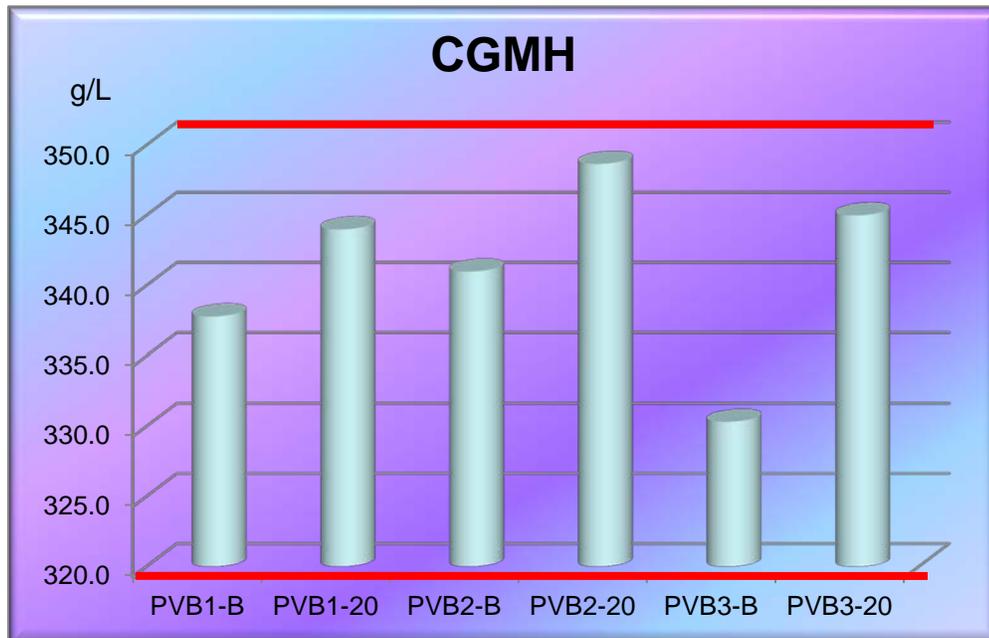
Gráfica 1 que representa los niveles promedio de hematocrito para las concentraciones Basales (-B) y posterior a los 20 días (-20) en los tres grupos PVB1, PVB2 y PVB3.



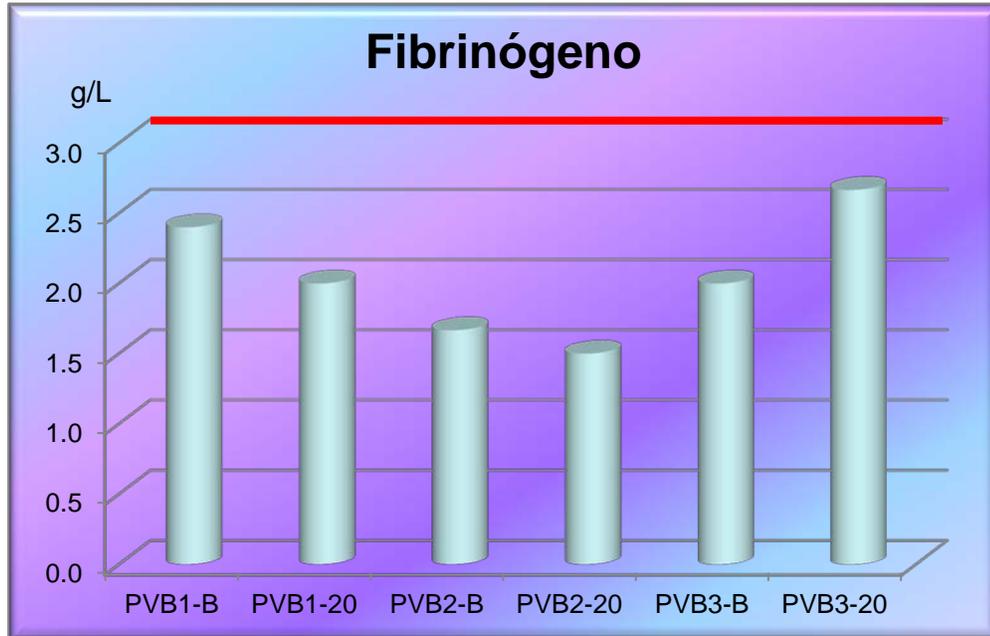
Gráfica 2 que representa los niveles promedio de hemoglobina para las concentraciones Basales (-B) y posterior a los 20 días (-20) en los tres grupos PVB1, PVB2 y PVB3.



Gráfica 3 que representa la cantidad promedio de eritrocitos para las concentraciones basales (-B) y posterior a los 20 días (-20) en los tres grupos PVB1, PVB2 y PVB3.



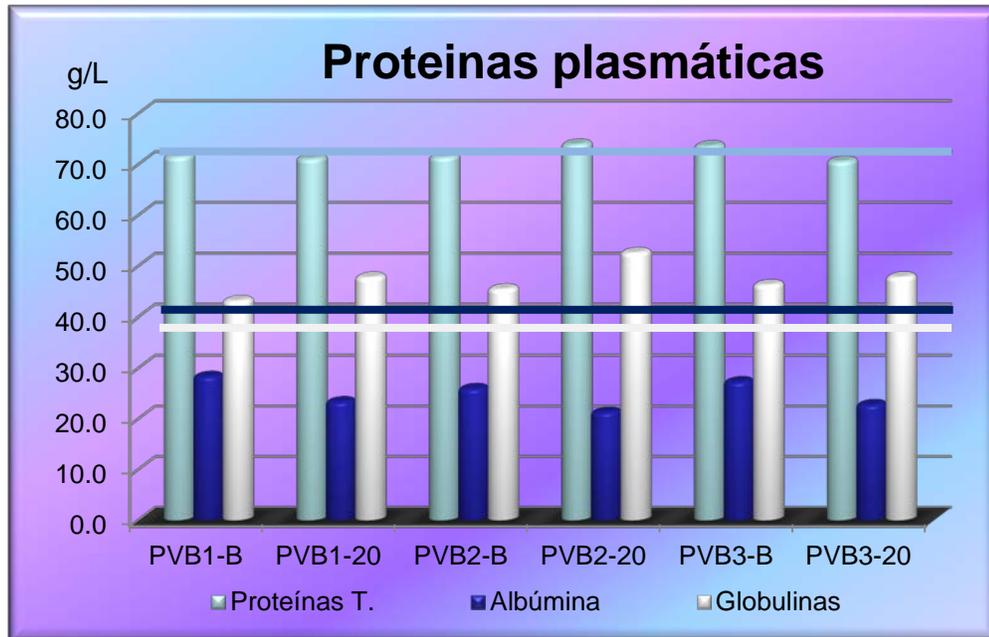
Gráfica 4 que representa los niveles promedio de hemoglobina globular para las concentraciones basales (-B) y posterior a los 20 días (-20) en los tres grupos PVB1, PVB2 y PVB3.



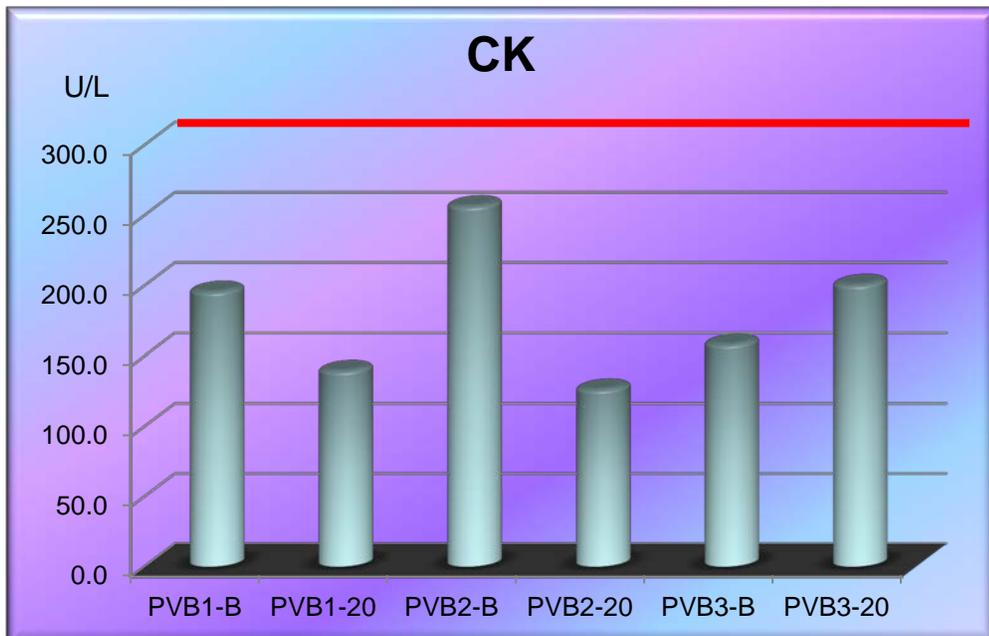
Gráfica 5 que representa los niveles de fibrinógeno para las concentraciones Basales (-B) y posterior a los 20 días (-20) en los tres grupos PVB1, PVB2 y PVB3.

## 9.2 Perfil Bioquímico.

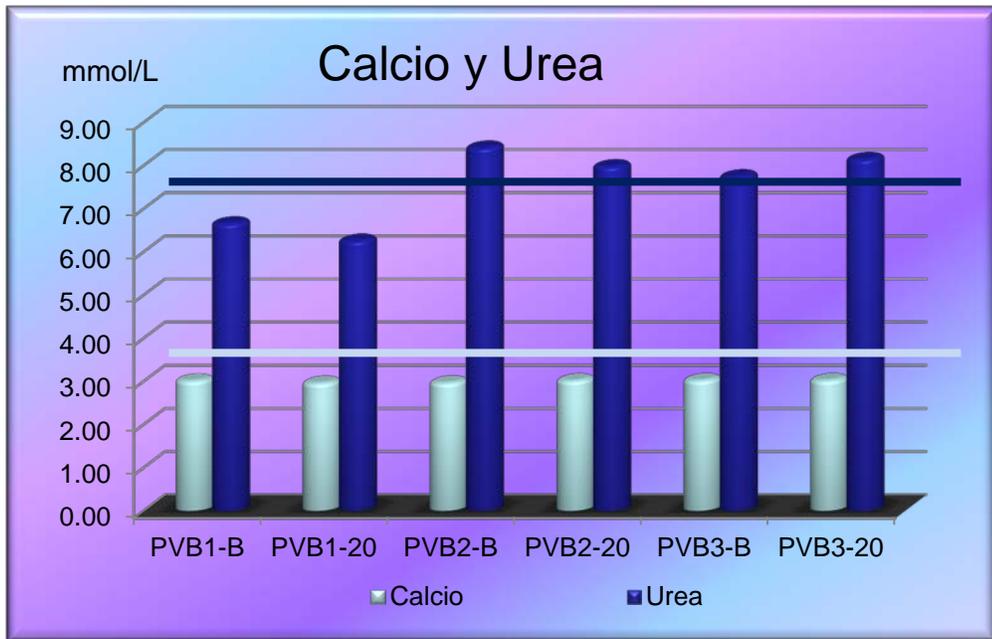
Gráficos que representan el comportamiento del perfil bioquímico de los equinos, antes de los inóculos y después de la tercer plasmaféresis, la línea representa el valor de referencia máximo.



Gráfica 6 que representa los niveles de proteínas, albúmina y globulinas para las concentraciones basales (-B) y posterior a los 20 días (-20) en los tres grupos PVB1, PVB2 y PVB3.



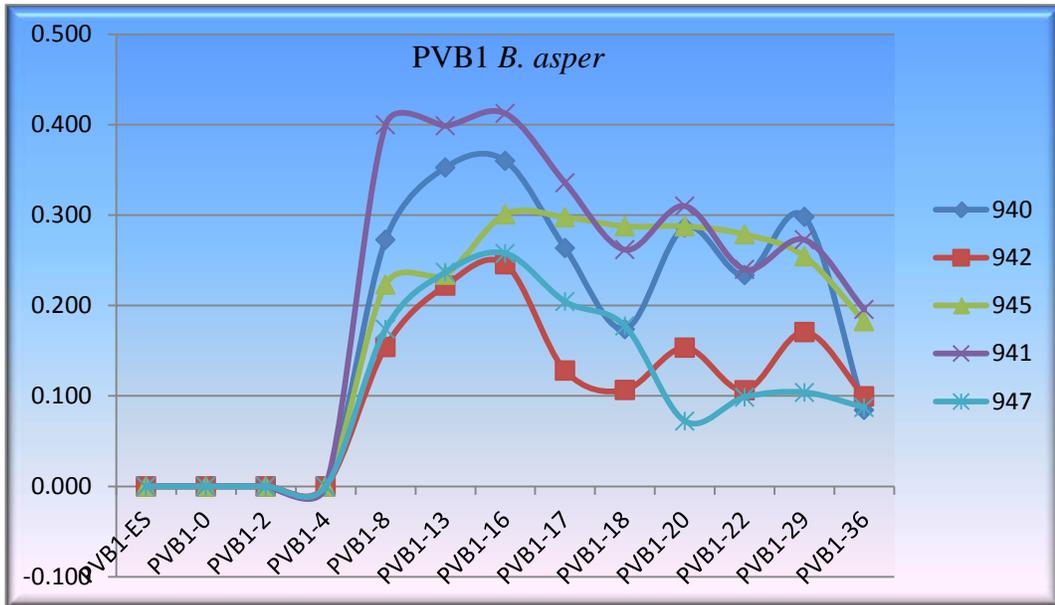
Gráfica 7 que representa los niveles de CK para las concentraciones basales (-B) y posterior a los 20 días (-20) en los tres grupos PVB1, PVB2 y PVB3.



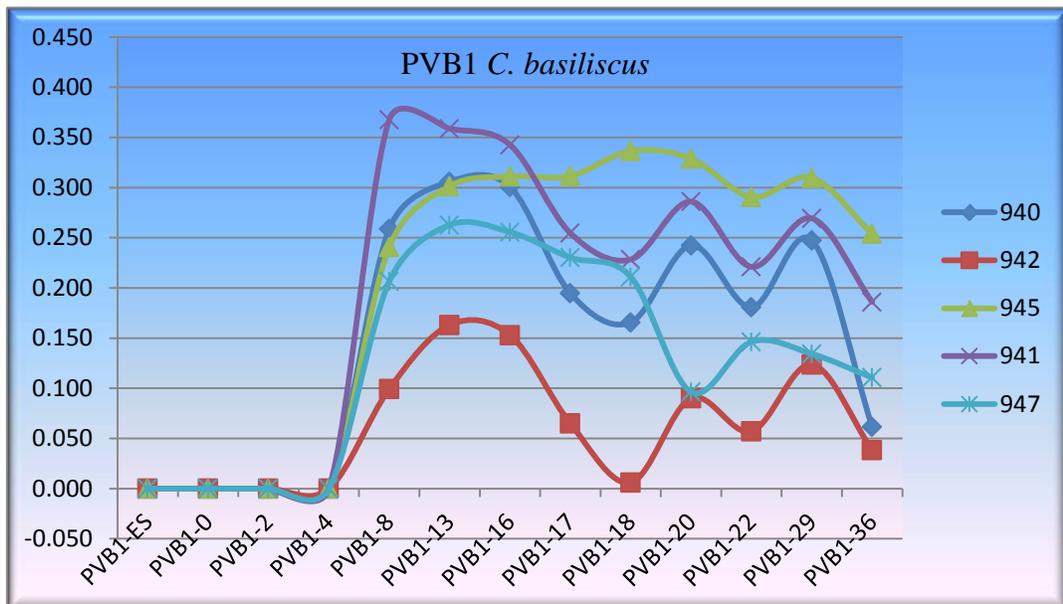
Gráfica 8 que representa los niveles de Calcio y Urea para las concentraciones basales (-B) y posterior a los 20 días (-20) en los tres grupos PVB1, PVB2 y PVB3.

### 9.3 Cinética de producción de anticuerpos.

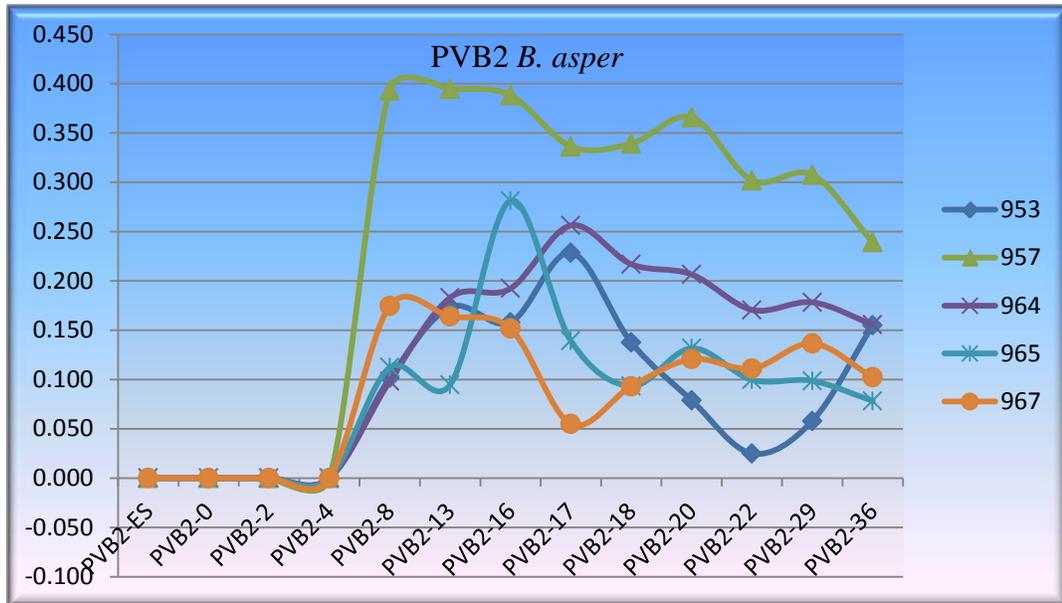
Cinéticas de producción de anticuerpos IgG en el plasma equino evaluados por la técnica de ELISA, durante los 36 días de estudio, expresada como incremento de la concentración basal de anticuerpos.



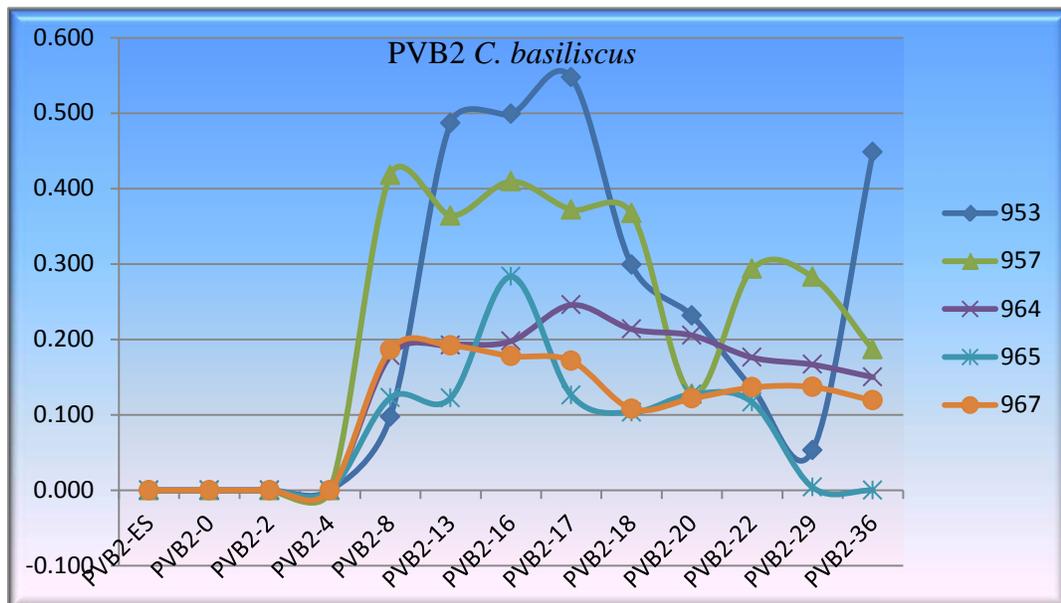
Gráfica 9 que representa la cinética de producción de anticuerpos para los equinos estimulados con el esquema PVB1 con veneno de *Bothrops asper*



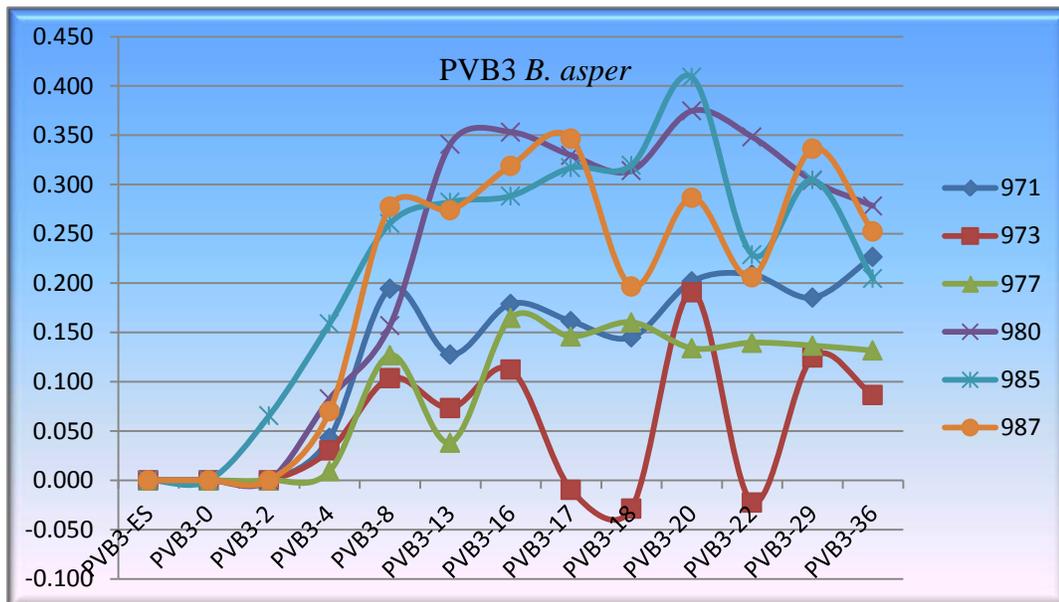
Gráfica 10 que representa la cinética de producción de anticuerpos para los equinos estimulados con el esquema PVB1 con veneno de *Crotalus basiliscus*



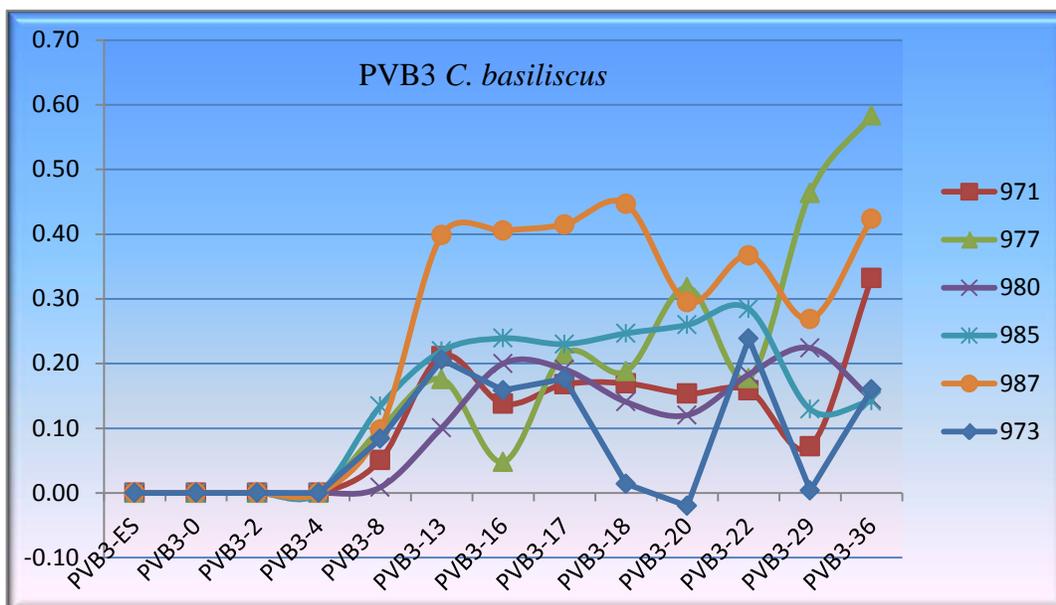
Gráfica 11 que representa la cinética de producción de anticuerpos para los equinos estimulados con el esquema PVB2 con veneno de *Bothrops asper*



Gráfica 12 que representa la cinética de producción de anticuerpos para los equinos estimulados con el esquema PVB2 con veneno de *Crotalus basiliscus*



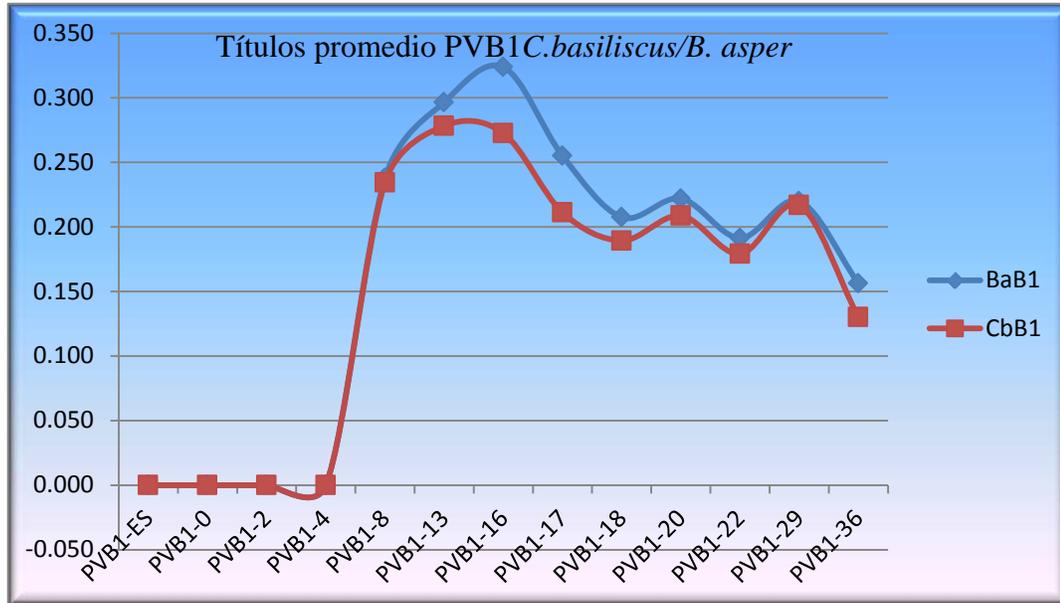
Gráfica 13 que representa la cinética de producción de anticuerpos para los equinos estimulados con el esquema PVB3 con veneno de *Bothrops asper*



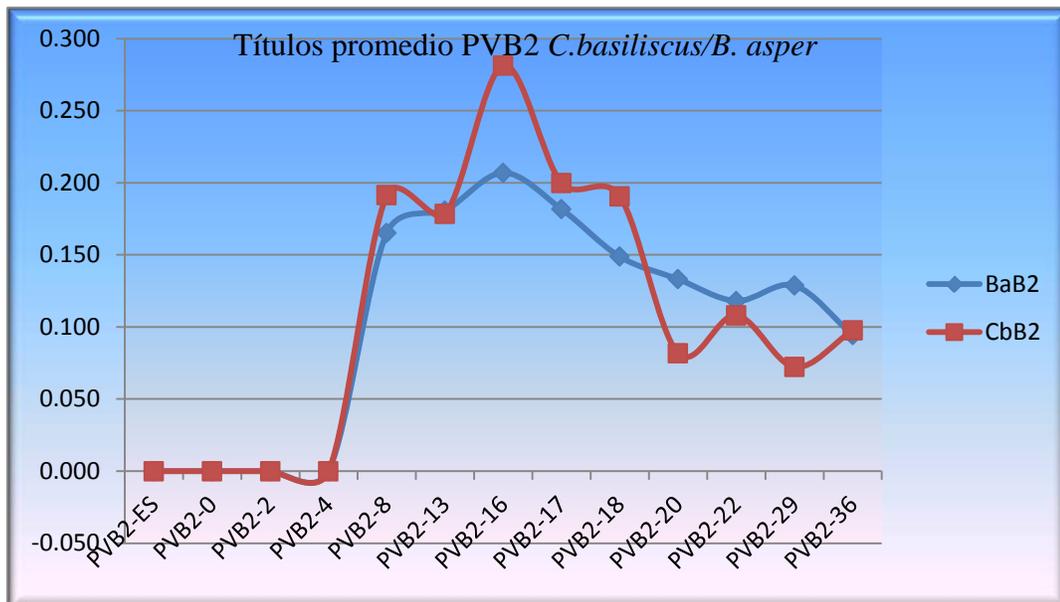
Gráfica 14 que representa la cinética de producción de anticuerpos para los equinos estimulados con el esquema PVB3 con veneno de *Crotalus basiliscus*

#### 9.4 Cinética comparativa de producción de anticuerpos.

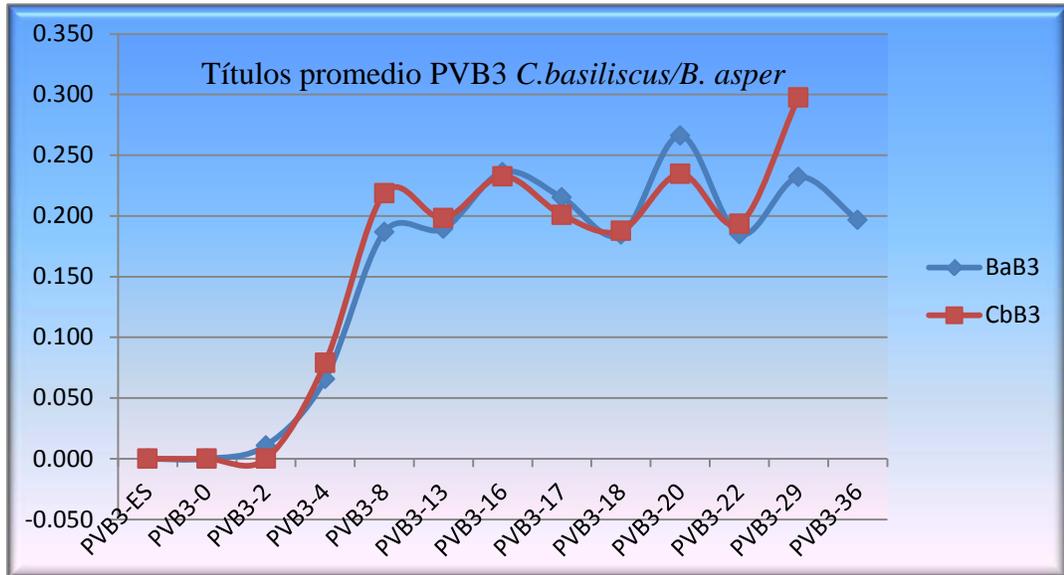
Cinéticas de producción de anticuerpos IgG en el plasma equino expresado como el promedio de los incrementos de la concentración basal de anticuerpos.



Gráfica 15 que representa la cinética de producción promedio de anticuerpos para los Equinos (n=6) estimulados con el esquema PVB1 con veneno de *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper*.

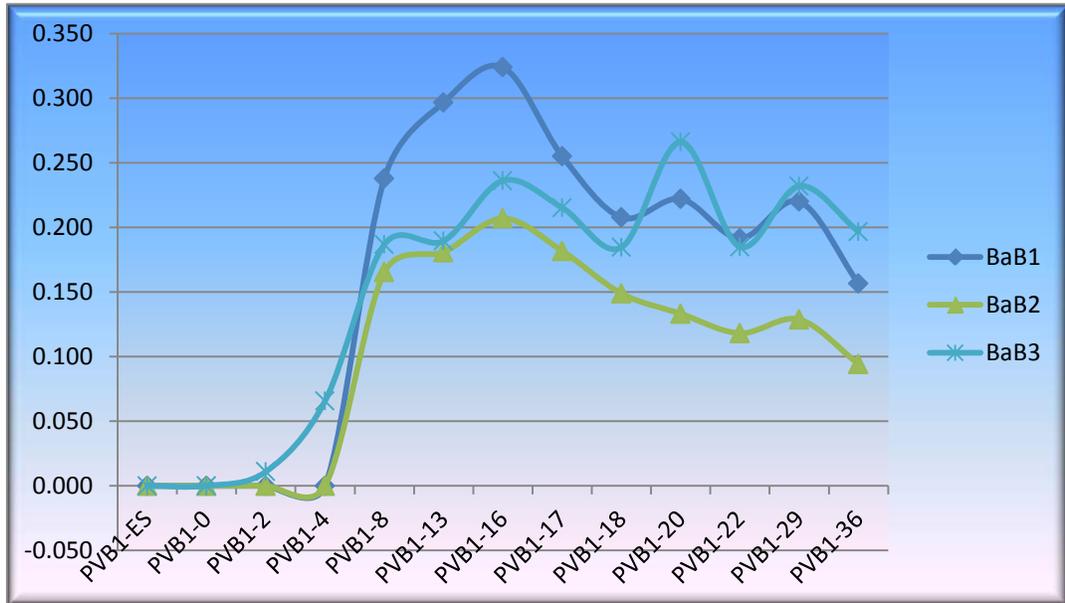


Gráfica 16 que representa la cinética de producción promedio de anticuerpos para los Equinos (n=6) estimulados con el esquema PVB2 con veneno de *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper*.

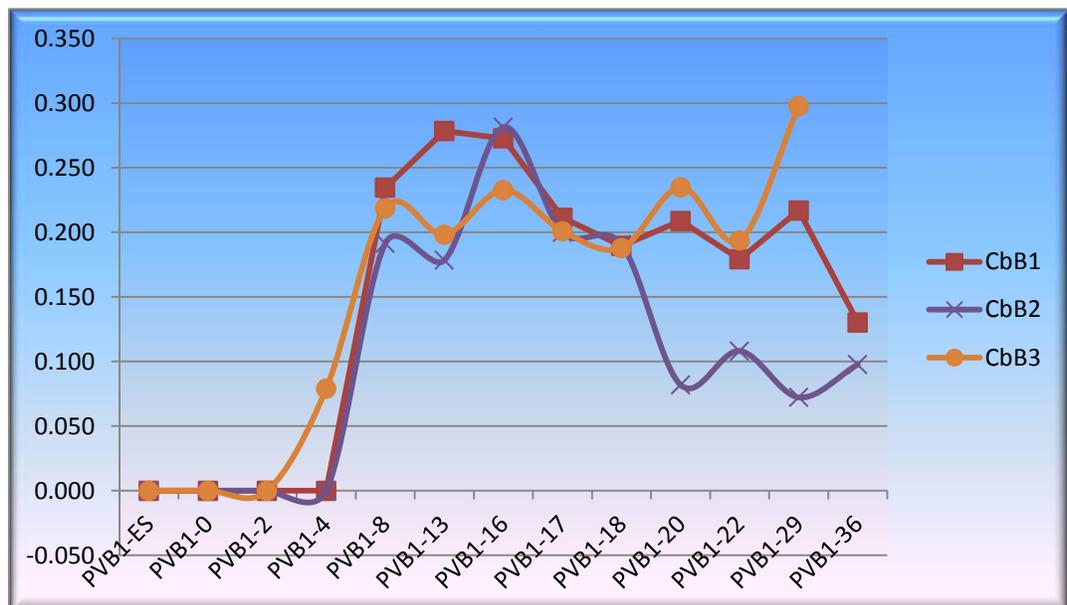


Gráfica 17 que representa la cinética de producción promedio de anticuerpos para los Equinos (n=6) estimulados con el esquema PVB3 con veneno de *Crotalus basiliscus* y *Bothrops asper*.

### 9.5 Cinética de producción de anticuerpos para los tres esquemas de inmunización.



Gráfica 18 que representa la cinética de producción promedio de anticuerpos para los equinos estimulados con veneno de *B. asper* para los tres esquemas de inmunización. BaB1: Equinos estimulados con veneno de *B. asper* usando el esquema PVB1, BaB2: Equinos estimulados con veneno de *B. asper* usando el esquema PVB2, BaB3: Equinos estimulados con veneno de *B. asper* usando el esquema PVB3



Gráfica 19 que representa la cinética de producción promedio de anticuerpos para los equinos estimulados con veneno de *C. basiliscus* para los tres esquemas de inmunización. CbB1: Equinos estimulados con veneno de *C. basiliscus* usando el esquema PVB1, CbB2: Equinos estimulados con veneno de *C. basiliscus* usando el esquema PVB2, CbB3: Equinos estimulados con veneno de *C. basiliscus* usando el esquema PVB3,

## 10.0 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significancia de las diferencia entre las medias de la concentración anticuerpos IgG de los tres grupos de equinos fue determinada por la prueba de t-Student, tal y como se describe en la sección 7.9 de la metodología.

Valores de  $P < 0.05$  serán considerados estadísticamente significativos.

Las muestras son independientes, en el sentido de que las mediciones de la respuesta bajo el primer tratamiento no están relacionadas con las mediciones de respuesta bajo el otro tratamiento.

Estadística de prueba:

$$t_c = \frac{(\tilde{y}_1 - \tilde{y}_2) - D_0}{S_p \sqrt{\frac{1}{\eta_1} + \frac{1}{\eta_2}}}$$

$$S_p^2 = \frac{(\eta_1 - 1)s_1^2 + (\eta_2 - 1)s_2^2}{(\eta_1 + \eta_2 - 2)}$$

$$S_p = \sqrt{S_p^2}$$

Hipótesis nula  $H_0: \mu_1 - \mu_2 = D_0$

Hipótesis alternativa o de investigación:

- a)  $H_a: (\mu_1 > \mu_2)$
- b)  $H_a: (\mu_1 < \mu_2)$
- c)  $H_a: (\mu_1 \neq \mu_2)$

Región de rechazo:

- a) Se rechaza  $H_0$  si  $t_c > t_{\alpha/2}$  o  $t_c < -t_{\alpha/2}$

En donde  $t_{\alpha}$  tiene  $(n_1+n_2-2)$  grados de libertad

Los datos que se tomarán para el estudio estadístico corresponden al día 16 en el cual todos los esquemas presentaron los valores más estables y de mayor magnitud

**Datos de estudio para *B. asper*:**

Esquema	PVB1 ( <i>B. asper</i> )	PVB2 ( <i>B. asper</i> )	PVB3 ( <i>B. asper</i> )
$\eta$	5	6	6
$\bar{y}$	0.315	0.207	0.236
$S^2$	0.004947	0.012589	0.009405
$t_{\alpha/2}$	1.833	1.833	1.833
$-t_{\alpha/2}$	-1.833	-1.833	-1.833

Prueba de hipótesis para:

PVB1 (*B. asper*) Vs PVB2 (*B. asper*) en el día 16

$$S_p^2 = \frac{(5 - 1)0.004947 + (6 - 1)0.012589}{(5 + 6 - 2)}$$

$$Sp = \sqrt{S_p^2}$$

$$t_c = \frac{(0.315 - 0.207) - 0}{0.0091 \sqrt{\frac{1}{5} + \frac{1}{6}}}$$

$$t_c = 19.59$$

Al ser  $T_c > \alpha$  se rechaza la hipótesis nula que dice que los títulos de IgG del PVB1=PVB2, por lo tanto se puede decir que las diferencias entre ellos son significativas estadísticamente y se establece que el esquema PVB1 es mejor que el esquema PVB2

Prueba de hipótesis para:  
PVB1 (*B. asper*) Vs PVB3 (*B. asper*) en el día 16

$$S_p^2 = \frac{(5 - 1)0.004947 + (6 - 1)0.009405}{(5 + 6 - 2)}$$

$$Sp = \sqrt{S_p^2}$$

$$t_c = \frac{(0.315 - 0.236) - 0}{0.0074 \sqrt{\frac{1}{5} + \frac{1}{6}}}$$

$$t_c = 17.63$$

Al ser  $T_c > \alpha$  se rechaza la hipótesis nula que dice que los títulos de IgG del PVB1=PVB3, por lo tanto se puede decir que las diferencias entre ellos son significativas estadísticamente y se establece que el esquema PVB1 es mejor que el esquema PVB3

**Datos de estudio para *C. basiliscus*:**

Esquema	PVB1 ( <i>C. basiliscus</i> )	PVB2 ( <i>C. basiliscus</i> )	PVB3 ( <i>C. basiliscus</i> )
H	5	6	6
$\bar{y}$	0.273	0.286	0.275
$S^2$	0.005440	0.024020	0.008351
$t_{\alpha/2}$	1.833	1.833	1.833
$-t_{\alpha/2}$	-1.833	-1.833	-1.833

Prueba de hipótesis para:

PVB1 (*C. basiliscus*) Vs PVB2 (*C. basiliscus*) en el día 16

$$S_p^2 = \frac{(5-1)0.005440 + (6-1)0.024020}{(5+6-2)}$$

$$Sp = \sqrt{s_p^2}$$

$$t_c = \frac{(0.273 - 0.286) - 0}{0.0157 \sqrt{\frac{1}{5} + \frac{1}{6}}}$$

$$t_c = -1.36$$

Al ser  $T_c < t_{\alpha}$  se rechaza la hipótesis nula que dice que los títulos de IgG del PVB1=PVB2, por lo tanto se puede decir que las diferencias entre ellos son significativas estadísticamente.

Prueba de hipótesis para:  
PVB1 (*C. basiliscus*) Vs PVB3 (*C. basiliscus*) en el día 16

$$S_p^2 = \frac{(5-1)0.005440 + (6-1)0.008351}{(5+6-2)}$$

$$Sp = \sqrt{S_p^2}$$

$$t_c = \frac{(0.273 - 0.275) - 0}{0.0836 \sqrt{\frac{1}{5} + \frac{1}{6}}}$$

$$t_c = -0.0395$$

Al ser  $T_c < \alpha$  se rechaza la hipótesis nula que dice que los títulos de IgG del PVB1=PVB3, por lo tanto se puede decir que las diferencias entre ellos son significativas estadísticamente.

## 11.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El diseño de nuevos esquemas de inmunización, el perfil farmacocinético y la estabilidad de las moléculas que constituyen los principios activos de los antivenenos, así como la cantidad de inmunoglobulinas presentes en los plasmas animales durante el proceso de manufactura son la preocupación permanente de la industria dedicada a la producción de antídotos contra el veneno de animales ponzoñosos.

La calidad y cantidad del plasma obtenido de los equinos de producción depende estrechamente del estado de salud de estos, por lo cual una de las primeras consideraciones que se tomaron en cuenta fue evaluar las masas musculares que resultaron ser lo suficientemente voluminosas y no se apreciaron salientes óseas, la actitud del animal se encontraba en estado de alerta y reaccionaban adecuadamente a los estímulos del medio, la expresión de los ojos no se apreció con manifestación de dolor o angustia característica en los equinos, la integridad de la piel se apreció sin laceraciones o áreas sin pelo y este último se percibía suave y brillante, lo que indicó que el animal goza de un buen estado de salud. Así, también se tomaron muestras de sangre para evaluar el perfil bioquímico y el hemograma, para conocer si existían alteraciones o patologías durante las etapas de inmunización y durante los procesos de plasmaferesis.

Los resultados obtenidos de la evaluación del estado de salud nos indicó que de 18 equinos que ingresaron a los diferentes esquemas de inmunización, solo el equino 730 no cumplía con los criterios de inclusión, los restantes todos gozaron de un adecuado estado de salud y permitió que se pudieran realizar cuatro plasmaferesis a los largo del desarrollo experimental durante los días 16, 17, 18 y 22.

Las muestras de sangre obtenida de los equinos durante la realización del estado de salud (día -5) se utilizaron para establecer el estado basal de los hemogramas (tablas 4, 6 y 8) y del perfil bioquímico (tablas 10, 12 y 14), el hematocrito resultó con un promedio de 0.43 L/L, la hemoglobina dio un promedio de 144 g/L, la concentración de eritrocitos con un promedio de  $8.96 \times 10^{12}/L$ , el volumen globular medio con 48 fL, la concentración globular media de hemoglobina con un promedio de 336 g/L y el contenido de fibrinógeno menor de 2 g/L, los cuales fueron comparados contra las unidades de referencia para cada analito determinado, encontrando que todos los equinos estaban dentro de los parámetros normales y no se encontraban cursando algún cuadro de anemia o alguna patología asociada.

Posterior a los procesos de inmunización y plasmaferesis (día 20) fueron realizados nuevamente el hemograma (tablas 5,7 y 9) y perfil bioquímico (tablas 11,13 y 15) para evaluar las alteraciones que pudieran haberse presentado por efecto de la inoculación de los venenos y de las cosechas continuas de plasma, en la cual fueron retirados de 6 a 8 litros de sangre durante los días 16, 17 y 18 con el consecuente retorno del paquete celular.

Se observó una ligera caída del hematocrito, la hemoglobina y los eritrocitos, de 0.43 L/L promedio de hematocrito en el nivel basal a 0.40 L/L promedio y de 144 g/L de hemoglobina a nivel basal a 138 g/L y de  $8.96 \times 10^{12}/L$  de eritrocitos a nivel basal a  $8.5 \times 10^{12}/L$  respectivamente en todos los grupos, ocasionado por los procesos de extracción sanguínea, sin embargo los niveles alcanzados en esta disminución no comprometen el estado de salud toda vez que no rebasan los niveles mínimos de referencia. Respecto a la CGMH esta aumentó con respecto a los niveles basales, toda vez, que el hematocrito disminuyó en mayor proporción que la hemoglobina, sin significar o tipificar a esta disminución en algún tipo de anemia. El contenido de fibrinógeno disminuyó para los esquemas de inmunización PVB1 y PVB2, toda vez, el veneno de *B. asper* genera desórdenes de la coagulación sanguínea atribuibles a enzimas de tipo trombinas que inducen la transformación del fibrinógeno a fibrina, (Maruñak, S. 2010), para los equinos del esquema de inmunización PVB3 se presentó un aumento ligero de fibrinógeno que se encuentra dentro de las concentraciones normales de referencia.

El estado general de salud de los equinos posterior a los procesos de inoculación y plasmaferesis, no se observaron alteraciones sistémicas y en los sitios de inoculación se observaron daños moderados del tejido como edema y abscesos, los cuales se recuperan de forma natural. El perfil hematológico basal y posterior a los procesos de inoculación y plasmaferesis permanecieron dentro de parámetros de referencia lo que nos permitió realizar una cuarta sangría de cosecha para la obtención de plasma que resultó en un aumento de la productividad a nivel de plasma obtenido por equino, dando como consecuencia que se pudiera obtener de 24 a 32 litros de sangre por cada equino durante los cuatro días de plasmaféresis, dando como resultado que se obtenga entre 12 y 16 litros de plasma por cada uno, lo que representa un aumento del 33% de la producción actual por equino.

Respecto a los niveles basales del perfil bioquímico las muestras analizadas mostraron que para proteínas totales se tiene un promedio de 72.6 g/L el cual se encuentra por arriba del nivel superior de referencia, observándose que el 50% de los equinos están arriba de los parámetros normales como resultado de los procesos de producción a los cuales son sometidos de forma constante. Los

niveles de albúmina se encuentran por debajo de los límites normales de referencia para el 100% de los equinos dando un promedio de 27 g/L que se encuentra a 4 g/L por debajo del nivel inferior de referencia, los valores bajos de albúmina en todos los equinos son compensados por los altos niveles de globulinas presentes en el plasma, ya que el 100% de los equinos presentaron niveles de globulinas de 45g/L en promedio, los cuales son concentraciones mayores al nivel superior de referencia el cual establece que el máximo valor es de 35g/L, estas alteraciones son resultado del desequilibrio que se produce en las proteínas plasmáticas, ya que al incrementarse los niveles de anticuerpos (globulinas) por los procesos de hiperinmunización a los que son sometidos estos equinos tienen que disminuir la concentración de albúmina.

Las concentraciones de calcio basales resultaron en 3.0 mmol/L en promedio, valores que están dentro los parámetros de referencia; respecto a los niveles de la enzima creatinasa estos manifestaron valores promedio de 203 U/L los cuales se encuentran muy por debajo de los niveles máximos de referencia, lo que representa que no existen problemas asociados a daño muscular o disminución de la masa muscular. Los contenidos de urea reflejaron una concentración de 7.6 mmol/L en promedio, estos valores están por encima del nivel superior de referencia lo cual nos indica un posible daño a nivel de riñón.

Los hallazgos encontrados en el perfil bioquímico de los equinos nos indican trastornos renales que pudieran ser clasificados como insuficiencia renal crónica; ocasionado por la excesiva destrucción de proteínas como ocurre en estados de toxicidad o sépsis extensa (William Medway. 1990) propias de la actividad de producción a la que son sometidos dichos equinos.

Los niveles de proteínas totales plasmáticas posteriores a los procesos de inmunización y plasmaferesis permanecieron prácticamente inalterables para los diferentes esquemas de inmunización, pero no así de las globulinas, que incrementaron para todos los esquemas de inmunización de 45g/L en promedio a 49.6 g/L como consecuencia de los incrementos en la síntesis de anticuerpos como respuesta a la presencia de los venenos inoculados, los contenidos de albúmina sufrieron una disminución de los niveles basales de 27 g/L en promedio a 22.3 g/L como respuesta al aumento de las globulinas y tratar de compensar la relación A/G (albúmina/globulina). Observando los valores iniciales de proteínas plasmáticas podemos estar en el inicio de una hiperproteinemia, ya que la mayoría de los equinos tienen valores de proteína plasmática por arriba del límite superior de referencia, la cual representa una concentración elevada de alguna o de todas las fracciones proteicas del plasma. El aumento de las proteínas plasmáticas es relativo, cuando el incremento se debe a una hemoconcentración

provocada por una deshidratación (sangrías de cosecha); o si aumentan las proteínas plasmáticas totales por incremento de las síntesis de globulinas. Esta elevación de las globulinas en general se observa, en estados de defensa contra agentes infecciosos, o como resultado de una estimulación antigénica.

Las concentraciones de calcio permanecieron inalteradas como se puede ver en la gráfica No. 7, no así, para la creatina cinasa (CK), la cual disminuyó de 196 u/L a 140 u/L para el primer esquema de inmunización (PVB1) y de 257 u/L a 157 u/L para el segundo esquema de inmunización (PVB2) y aumentó de 158 u/L a 201u/L para el esquema de inmunización 3 (PVB3), estos datos no eran esperados, toda vez que los venenos inoculados causan daños que conllevan un incremento de la CK (Angulo, Y.R. Estrada & J.M. Gutierrez 1997) como resultado del daño al tejido muscular. Los contenidos de urea prácticamente no sufrieron cambio de los niveles basales y permanecieron por arriba de los niveles máximos de referencia.

La evaluación de la respuesta inmune humoral realizada durante la cinética de producción de anticuerpos IgG por el método de inmunoensayo (ELISA) para los diferentes esquemas de inoculación se puede apreciar en las gráficas 9 a 14 para *B.asper* y *C. basiliscus* respectivamente. Dada las condiciones previas de estimulaciones múltiples en los equinos (procesos de producción), estos contenían anticuerpos basales, los cuales fueron restados de todos los valores de absorbancia para poder analizar los incrementos del título de anticuerpos para cada esquema.

La cinéticas de producción de anticuerpos para el esquema de inmunización 1 (PVB1) graficas 9 y 10, se puede apreciar que el día cuatro es el momento en el cual comienzan a elevarse los niveles de anticuerpos dirigidos contra ambos venenos y se alcanza un máximo de producción en el día trece, los niveles de anticuerpos permanecen estables hasta el día dieciséis en el que comienzan a disminuir por el efecto producido por las sangrías de cosecha que se realizan los días dieciséis, diecisiete y dieciocho, posterior al día dieciocho los niveles de anticuerpos permanecen estables hasta el día veintidós en el cual comienzan a decaer por efecto de la sangría de cosecha del día veintidós y la eliminación natural de anticuerpos, toda vez que la vida media de las IgG es de 21 a 23 días en sangre periférica y despues de este tiempo comienza a disminuir de forma natural hasta retomar los niveles basales (Tizard, Ian R. 2009).

La cinéticas de producción de anticuerpos para el esquema de inmunización 2 (PVB2) graficas 11 y 12, se puede apreciar que el día cuatro es el momento en el cual comienzan a elevarse los niveles de anticuerpos dirigidos contra ambos

venenos y se alcanza un máximo de producción entre el día ocho y trece, los niveles de anticuerpos permanecen estables hasta el día dieciséis en el que comienzan a disminuir por el efecto producido por las sangrías de cosecha que se realizan los días dieciséis, diecisiete y dieciocho, posterior al día dieciocho los niveles de anticuerpos permanecen disminuyendo hasta el día veintidós en el cual comienzan a decaer por efecto de la sangría de cosecha del día veintidós y la eliminación natural de anticuerpos.

La cinéticas de producción de anticuerpos para el esquema de inmunización 3 (PVB3) gráficas 13 y 14, se puede apreciar que el día dos es el momento en el cual comienzan a elevarse los niveles de anticuerpos dirigidos contra ambos venenos y se alcanza un máximo de producción en el día ocho, los niveles de anticuerpos permanecen estables hasta el día dieciséis en el que comienzan a disminuir por el efecto producido por las sangrías de cosecha que se realizan los días dieciséis, diecisiete y dieciocho, posterior al día dieciocho los niveles de anticuerpos permanecen descendiendo hasta el día veintidós en el cual comienzan a decaer por efecto de la sangría de cosecha del día veintidós y la eliminación natural de anticuerpos.

En general se puede apreciar que las cinéticas para los tres esquemas (gráficas 15,16 y 17) tienen un comportamiento sigmoideal, en el cual existe un periodo inicial de dos a cuatro días para comenzar la producción de anticuerpos de memoria, toda vez que no estamos hablando de respuesta primaria; posterior a este proceso se presenta un aumento súbito que alcanza su máximo en ocho a trece días, el máximo título alcanzado en cada uno de los esquemas depende de la cantidad de inóculo administrado, toda vez que para el PVB1 se alcanzó un título de anticuerpos de 0.325 para veneno de *B. asper* y de 0.275 para veneno de *C. basiliscus* a diferencia de los esquemas PVB2 y PVB3 en los cuales solo se alcanzaron títulos promedios de 0.200 para ambos venenos; estos títulos permanecen estables hasta el día dieciséis en el que para todos los esquemas disminuye por efecto de las sangrías de cosecha y finalmente decaen los títulos debido a la vida media de las IgG. Estos datos nos indican que las sangrías de cosecha pueden realizarse desde el día trece, en el cual el título de los anticuerpos es más estable para todos los esquemas de inmunización aplicados (PVB1, PVB2 y PVB3), y no tener que esperar hasta el día dieciséis para realizar las sangrías de cosecha como se hace actualmente, así mismo se puede realizar una cuarta cosecha seguida de las tres anteriores, toda vez que el título de anticuerpos durante el día 22 es estable e igual al del día dieciocho.

La cinética de producción de anticuerpos pertenecientes a los tres esquemas de inmunización para el veneno de *B. asper* se puede observar en la gráfica 18, en la

cual se realizó la comparación de las medias poblaciones con la finalidad de conocer cuál de los esquemas de inmunización es mejor, o si la diferencia entre ellos no implica una diferencia significativa. Para tal efecto se estableció realizar la comparación de medias poblacionales al día 16 (momento en el cual se obtienen los valores máximos para todos los esquemas y para ambos venenos), utilizando la prueba de  $t$ -Student para conocer si existe diferencia significativa entre los valores obtenidos. Encontrando que el esquema de inmunización PVB1 es mejor que el esquema de inmunización PVB2, toda vez que el esquema PVB1 tiene un título promedio de anticuerpos de 0.315 en comparación al título de anticuerpos del PVB2 que contiene un promedio de 0.207, y la prueba estadística demuestra un valor de  $t_c = 19.59$  cuando se comparan ambos esquemas por lo que se rechaza la hipótesis nula que dice que los títulos de IgG del PVB1=PVB2, por lo tanto se puede decir que las diferencias entre ellos son significativas estadísticamente y se establece que el esquema PVB1 es mejor que el esquema PVB2.

Así mismo se encontró que el esquema de inmunización PVB1 es mejor que el esquema de inmunización PVB3, toda vez que el esquema PVB1 tiene un título promedio de anticuerpos de 0.315 en comparación al título de anticuerpos del PVB3 que contiene un promedio de 0.236, y la prueba estadística demuestra un valor de  $t_c = 17.63$  cuando se comparan ambos esquemas por lo que se rechaza la hipótesis nula que dice que los títulos de IgG del PVB1=PVB3, por lo tanto se puede decir que las diferencias entre ellos son significativas estadísticamente y se establece que el esquema PVB1 es mejor que el esquema PVB3, estos resultados sugieren que la respuesta inmune generada para dos y tres dosis es muy similar, y se requiere de cuatro dosis para obtener una respuesta inmune mayor que dé como resultado en más anticuerpos y mejores rendimientos.

La cinética de producción de anticuerpos pertenecientes a los tres esquemas de inmunización para el veneno de *C. basiliscus* se puede observar en la gráfica 19, en la cual se realizó la comparación de las medias poblaciones con la finalidad de conocer cuál de los esquemas de inmunización es mejor, o si la diferencia entre ellos no implica una diferencia significativa. Para tal efecto se estableció realizar la comparación de medias poblacionales al día 16 (momento en el cual se obtienen los valores máximos para todos los esquemas y para ambos venenos), utilizando la prueba de  $t$ -Student para conocer si existe diferencia significativa entre los valores obtenidos. Encontrando que los esquemas de inmunización PVB1 y PVB2 tienen diferencias significativas estadísticamente, toda vez que el esquema PVB1 tiene un título promedio de anticuerpos de 0.273 en comparación al título de anticuerpos del PVB2 que contiene un promedio de 0.286 y la prueba estadística

demuestra un valor de  $t_c = -1.36$  cuando se comparan ambos esquemas por lo que se rechaza la hipótesis nula que dice que los títulos de IgG del PVB1=PVB2, por lo tanto se puede decir que las diferencias entre ellos son significativas estadísticamente. Así mismo se encontró que los esquemas de inmunización PVB1 y PVB3 tienen diferencias significativas estadísticamente, toda vez que el esquema PVB1 tiene un título promedio de anticuerpos de 0.273 en comparación al título de anticuerpos del PVB3 que contiene un promedio de 0.275 y la prueba estadística demuestra un valor de  $t_c = -0.0395$  cuando se comparan ambos esquemas por lo que se rechaza la hipótesis nula que dice que los títulos de IgG del PVB1=PVB3, por lo tanto se puede decir que las diferencias entre ellos son significativas estadísticamente, estos resultados sugieren que la respuesta inmune generada para tres dosis es mejor que para un esquema de dos o cuatro dosis, y no se requiere de cuatro dosis para *C. basiliscus*, toda vez que la respuesta inmune para todos los casos fue prácticamente igual.

El estudio de la producción de los anticuerpos generados durante los diferentes estímulos (2,3 y 4 dosis) pone de manifiesto que para obtener mayor cantidad de anticuerpos contra el veneno de serpiente *B. asper* es necesario inmunizar a los equinos con cuatro dosis, mientras que para los venenos de serpiente *C. basiliscus* no es necesario utilizar las cuatro dosis, siendo suficiente solo tres de ellas, mas sin embargo la administración de venenos durante los procesos productivos se realiza en conjunto, ya que se ha observado la potencialización de la respuesta inmune de los equinos cuando los venenos van juntos.

Los resultados obtenidos a través de este método de inmunoensayo (ELISA) pone de manifiesto a los anticuerpos totales y no pretende hablar de protección tal y como lo puede establecer una prueba de neutralización de letalidad “*in vivo*”, pero tiene una correlación significativa con los datos obtenidos de potencia de antivenenos en modelos animales “*in vivo*” tal y como lo describe Theakston and Reid en 1979. Los trabajos encaminados a la sustitución de la técnica estándar en ratón por esta técnica de inmunoensayo ha sido abordado por Barbosa en 1995 y Dias et al en 1998 quienes encontraron que la correlación entre la prueba *in vivo* e *in vitro* se acerca al  $r=0.95$  para venenos de crotálidos y no así para venenos de origen botrópico, mas sin embargo en 1998 Heneine encontró una buena correlación para la prueba *in vivo* e *in vitro* para veneno botrópicos fraccionados y purificados, por lo que se sigue que la naturaleza multifactorial de la actividad letal de los venenos botrópicos es responsabilidad de un grupo de moléculas, así mismo es importante considerar que la medida de la reactividad antígeno-anticuerpo de mezclas complejas de venenos y antivenenos polivalentes depende de la avidéz y especificidad de los anticuerpos contra la inmunogenicidad y antigenicidad de las fracciones toxicas o no toxicas de los venenos. Nuestra

recomendación es que este tipo de inmunoensayo (ELISA) es adecuado para seguir el título de anticuerpos durante los procesos de inmunización de equinos y determina la actividad de los anticuerpos *in vitro* de forma satisfactoria durante las etapas del proceso de manufactura, sin pretender sustituir la prueba *in vivo* considerada el estándar de oro en las farmacopeas.

## 12.0 CONCLUSIONES

Es posible realizar una cuarta plasmaféresis para obtener un 33% más de plasma por equino, toda vez, que el perfil hematológico y las proteínas séricas posterior a los procesos de inoculación-plasmaféresis permanecieron dentro de parámetros de referencia sin afectar el estado de salud de los equinos.

Las sangrías de cosecha pueden realizarse a partir del día trece (posterior al punto de inflexión), en el cual el título de los anticuerpos comienza a ser estable para todos los esquemas de inmunización aplicados para ambos venenos (PVB1, PVB2 y PVB3).

Los títulos máximos de anticuerpos se presentaron el día dieciséis, momento en el cual se realiza la primera sangría de cosecha.

El esquema de inmunización PVB1 (cuatro dosis) presentó un título de anticuerpos de 0.315 y es mejor que el esquema de inmunización PVB2 (tres dosis) que obtuvo un título de anticuerpos de 0.207 para el veneno de serpiente *B.asper*,

El esquema de inmunización PVB1 (cuatro dosis) presentó un título de anticuerpos de 0.315 y es mejor que el esquema de inmunización PVB3 (dos dosis) que obtuvo un título de anticuerpos de 0.236 para el veneno de serpiente *B.asper*

Se requiere de cuatro dosis de veneno de serpiente *B. asper* para obtener una respuesta inmune que dé como resultado en más anticuerpos y mejores rendimientos.

El esquema de inmunización PVB2 (tres dosis) presentó un título de anticuerpos contra *C. basiliscus* de 0.286 y es mejor por una diferencia mínima que el esquema de inmunización PVB1 (cuatro dosis) que obtuvo un título de anticuerpos de 0.273 para el veneno de serpiente *C. basiliscus*.

El esquema de inmunización PVB2 (tres dosis) presentó un título de anticuerpos de 0.286 y es mejor por una diferencia mínima que el esquema de inmunización PVB3 (dos dosis) que obtuvo un título de anticuerpos de 0.275 para el veneno de serpiente *C. basiliscus*.

No se requiere de cuatro dosis de veneno de serpiente *C. basiliscus*, toda vez que la respuesta inmune para todos los casos fue prácticamente igual.

El esquema de inmunización PVB1 que incluye cuatro dosis de ambos venenos es el que se recomienda de acuerdo a los resultados de la significancia estadística, ya que se obtienen mejores resultados para la respuesta inmune de ambos venenos.

### **13.0 PERSPECTIVAS**

La perspectiva de este trabajo es implementar esta técnica inmunoenzimática al control del proceso de producción de plasma, para conocer el estado inmune de los equinos frente a los procesos de inmunización con veneno de serpientes y poder evaluar la vida productiva útil de estos animales de producción. Establecer los límites de producción de anticuerpos IgG que un equino debe generar para considerarse apto en los procesos productivos.

## 14.0 BIBLIOGRAFÍA

Abbas Abul., Cellular and Molecular Immunology, fifth edition, Saunders 2005

Angulo, Y., Estrada, R., Gutierrez, J.M. 1997 Effects of bleeding in horses immunized with snake venoms for antivenom production. Rev. Biol. Trop., **45**(3):1215-1221

Angulo, Y., Estrada, R., Gutierrez, J.M. 1997 Clinical and laboratory alteration in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (crotaline) antivenoms. Toxicon, Vol. **35**, No.1, pp. 81-90.

Alonso,V,. 2004. Ensayo inmunturbidimetrico para la cuantificación de IgA, IgG, e IgM en suero humano. Bioquimia. Vol **29** No. 2 abril-junio 2004 pp 45-54

Barraviera, B., Sartoni, A., Pereira da silva, M.F.,Kaneno, R., Peracoli, M.T.S.1996.Use of an ELISA assay to evaluate venom, antivenom, IgG and IgM Human antibody levels in serum and cerebrospinal fluid from patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* in brazil. J venom Anim. Toxins.**2**, (1): original paper

Bush, B. M. Manual del Laboratorio Veterinario de Análisis Clínicos, editorial ACRIBIA Zaragoza, España, 1982.

Chippaux, J.-P and Goyffon, M. (1991b) Production and use of snake antivenin. In Reptile Venoms and Toxins, ed. A.T.Tu, Vol 5, pp 529-555. M.Dekker. New York

Chippaux. J.P. Goyffon, M. 1997. Venoms, Antivenoms and Immunotherapy. Toxicon. 36 (6): 823-846.

Davidson TM., Schafer SF: 1996. Rattlesnake bites. Guidelines for aggressive treatment. Postgrad Med. 96:107-114.

Delves, Peter J. 2000. The Immune System. Advances in Immunology. New England Journal of Medicine. Vol. 343 Number 1 pp 37-49

Delves, Peter J. 2000. The Immune System. Advances in Immunology. New England Journal of Medicine. Vol. 343 Number 2 pp 108-117

De Roodt Adolfo R. 2005 Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México Gac Méd Méx Vol.141 No. 1,

Dias, H., Dutra, C., 1998. Development of an ELISA to assess the potency of horse therapeutic polyvalent antiothopic antivenom. Toxicom Vol. 36 No. 10 pp 1363-1370.

Engvall, E., Perlman, P., 1971 "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): quantitative assay for IgG". Immunochemistry. **8**:871-874

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2008. Novena edición. MPB050. Potencia de sueros antiponzoñosos: Vol 2 : 2190-2191.

García-Segura, J. M. y col. (2002). Métodos Radioinmunométricos. Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica. Madrid: Síntesis. 84-7738-429.

Garcia-Willis, C. E., Ricardo Vela-Ortega, and Maria Elena Maya Leal Epidemiology of accidental snake poisoning in the pediatric population Bol Med Hosp Infant Mex Vol. **66**, May-June 2009

Glenn.J.A, Straight. R.C, Wolfe. M.C, Hardy.D.L.1983. Geographical variation in *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) venom properties. Toxicon. 21 (21):119-130.

Luna-Bauza, M. E., 2007., Bases para el tratamiento por intoxicación por veneno de serpiente Rev. Fac. Med. UNAM Vol.50 No.5 Septiembre-Octubre, 2007

Maruñak, S.; Nuñez, S.; Fernandez, C.; Leiva, L.; Acosta de Pérez, O.: Effect of venom of *Bothrops diporus* from northeast Argentina on hemostatic system in different mammals. Rev. vet. 21: 1, 43–47, 2010.

Michael Karin,. 2004. Innate immunity gone awry. Cell 124, 823-835

Morais, V., Massaldi, H. 2005. Effect of pepsin digestion on the antivenom activity of equine immunoglobulins. *Toxicon*.**46**:876-882.

Morais JF., De Freitas MCW, Yamaguchi IK., Dos Santos MC., Diaz Da Silva W. 2004. Snake antivenoms from hyperimmunized horses: comparison of the antivenom activity and biological properties of their whole IgG and F(ab')<sub>2</sub> fragments. *Toxicon*. **36**:725-734.

Otero, R. 2002. Seroterapia antivenenosa, ventajas del uso de antivenenos del tipo IgG, F(ab')<sub>2</sub> o Fab en picaduras de escorpiones y mordeduras de serpientes. *Pediatría*. **37**:1-20.

Ramos-Bello, D., 2009., Cincuentenario del descubrimiento de la estructura química de los anticuerpos. *Reumatol Clin*. **5** (6):280-284.

Rial, A., Morais, V., Rossi, S., and Massaldi, H., 2006. A new ELISA for determination of potency in snake antivenoms. *Toxicon*, doi:10.1016/j.toxicon.2006.07.004

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

Rojas G., Jiménez JM., Gutiérrez JM. 1994. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma. Description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon*. **32**:351-363.

Rusland Medzhitov and et. al. 2000. *Advances in Immunology*. New England Journal of Medicine. Vol. 343 Number 5 pp 338-344

Segura, A., Herrera, M., Villalta, M., Vargas, M., Uscanga-Reynell, A., Ponce de Leon, S., Jimenez-Corona, M., Reta-Mares, j., Gutierrez, J., León, G., 2012 Venom of *Bothrops asper* from México and Costa Rica: Intraespecific variation and cross-neutralization by antivenoms. *Toxicon* 59, 158-162.

Sigma. Technical bulletin. Bicinchoninic acid protein assay. Product code BCA and B9643.

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

Tay, Z., J., Castillo, A. L., Julia Z. J., Romero, C. R., Velazco-Castrejón, O.1982. Accidentes por mordedura de animales ponzoñosos. Rev. Fac. Med. Mex. 23 (7):457-472.

Theakston, R.D.G., Reid, H.A. 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. Bull. WHO. 61: 949-956

Theakston, R.D.G, Warrell, D.A., Griffiths, E. 2003. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. Toxicon. 41: 541-557.

Theakston, R.D.G. and Reid, H.A. 1979. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in assessing antivenom potency. Toxicon 17, 511-515.

Tizard Ian R. Introducción a la inmunología veterinaria. Octava edición Editorial ELSEVIER España 2009

Vega-Franco L. 2007. Faboterapia ¿será éste el fin de la seroterapia?. Rev Mex Pediatría. 72:59-60.

William Medway, D.V.M., ph.d., James E. Prier, John S. Wilkinson, Patología Clínica Veterinaria, editorial UTEHA, México, 1990.

Winger WA, Chan L. 1988. Rattlesnake bites in Southern California and rationale for treatment. West J Med. 148:37-44

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