



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTÉCNIA**

**Comparación de sueros hiperinmunes de equino y  
bovino contra el veneno de *Agkistrodon bilineatus***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A**

**Oscar Germán Jiménez Román**

**Director de Tesis: Dr. Alejandro Alagón Cano**

**ASESOR: M. en C. Lemuel León Lara**



**Toluca, México, Enero de 2018**

## AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento profuso al Dr. Alejandro Alagón Cano por el apoyo y la oportunidad de desarrollar mi proyecto de tesis en su laboratorio, por todos los conocimientos compartidos, el apoyo económico y el financiamiento del ganado bovino destinado a las inmunizaciones.

Al M. C. Lemuel León Lara por la asesoría, los consejos y el apoyo en la realización del trabajo escrito.

Agradecimiento profuso a la Dra. Hilda Vázquez López por la capacitación y apoyo técnico en experimentos bioquímicos, asesoría y consejos en el trabajo escrito.

Agradecimientos a los fondos:

-2014                                      CONACyT                                      INFR-2014-224494  
“Actualización de equipo para el consorcio de investigación y desarrollo de péptidos, y proteínas terapéuticas”

-2014                      Ciencia                      Básica-CONACyT                      CB-2013-221343  
“Caracterización funcional de venenos de *Agkistrodon bilineatus*, así como la respuesta inmune en caballos a los mismos”

-2018-2020.                                      IN207218                                      PAPIIT-DGAPA  
“Investigación de venenos de serpientes para el mejoramiento de antivenenos”

Al Dr. Iván Arenas Sosa por los consejos en el tema de citas en el trabajo escrito.

A la M. C. Melisa Benard Valle y M. B. Edgar Enrique Neri Castro por la ayuda y asesoría sobre *Agkistrodon bilineatus*.

Al M. C. Alejandro Olvera Rodríguez por el apoyo en la revisión del trabajo escrito.

Al Biol. Felipe Olvera Rodríguez por el apoyo técnico y consejos en experimentos de electroforesis.

Al Biol. Luis Román Domínguez y M.V.Z. Oscar Aguayo Avalos por la asesoría en temas de inmunología.

Al Biol. Irving Giovanni Archundia Jiménez por la capacitación para la obtención de dosis letal media y dosis efectiva media.

A Angélica Linares Labastida y Ricardo Mondragón Cortés en el apoyo administrativo y logístico para la elaboración de la tesis.

Al Dr. Andrés Alagón Cano por la hospitalidad en el rancho y la confianza para la realización del trabajo.

Al Ing. Jesús Adalberto Pulido Carballo por la capacitación en el proceso de la preparación del veneno con adyuvante para las inmunizaciones.

A Jesús Pulido Hernández por la capacitación en la inmunización y manejo del ganado bovino.

A Eulalio Amaya Pulido, Alberto Mohedano Omaña, Moisés Pelcastre Peñafiel y al resto del personal del rancho Ojo de Agua por el apoyo en la manipulación del ganado.

**Agradecimiento personal:**

Al Dr. Alejandro Alagón Cano por toda la confianza, paciencia y por creer en mí y en mi proyecto. Por todo el apoyo y las oportunidades que me ha brindado desde el momento en el que llegue al laboratorio.

A la Dra. Hilda por las divertidas platicas, por los “rides” que me daba para que me ahorrara un poco de dinero en transporte público, por la paciencia y los tips.

A doña Irma por la deliciosa comida y las agradables platicas.

A Vianey por la amabilidad y hospitalidad en el rancho.

A mis tíos Hector, Samuel, Samuel hijo, Celene y Robe por la hospitalidad, la alimentación y los buenos ratos que hicieron de mi estancia en Cuernavaca un momento feliz.

A mi tía Ana por creer en mí y el constante apoyo que me brindó desde que inicié mi tesis.

A mi mamá y mis hermanas, por el infinito apoyo y amor que me brindaron.

## Resumen

Los antivenenos son la única herramienta terapéutica efectiva para neutralizar las toxinas durante un envenenamiento. Para su producción se han utilizado diferentes especies pero a lo largo de los años se ha elegido al caballo como modelo por sus características de docilidad, adaptación y a las cantidades de plasma que pueden producir.

En el presente trabajo se estudió a la vaca como modelo de producción y se comparó con el caballo, debido a que éste ha sido el animal de elección para la producción de antivenenos. Para ello se sometió a tres vacas a un protocolo de inmunización idéntico al que se había usado en un caballo. Se hicieron pruebas *in vitro* a cada uno de los sueros obtenidos a lo largo de las inmunizaciones para determinar el nivel de reconocimiento (títulos de anticuerpos determinados por ELISA) y se encontró que había reconocimiento de todos los sueros hacia el veneno. Los ensayos de potencia neutralizante ( $DE_{50}$ ) mostraron que los sueros de la última muestra de las tres vacas fueron capaces de neutralizar la letalidad del veneno. Sin embargo, al comparar su potencia neutralizante con el del suero del caballo se vio que eran menores. Se concluye que las vacas no son un modelo para la producción de antivenenos.

## ÍNDICE

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisión de literatura.....</b>	<b>4</b>
<b>    Incidencia de mordeduras de serpientes.....</b>	<b>4</b>
<b>    Género <i>Agkistrodon</i>.....</b>	<b>5</b>
<b>    Sintomatología.....</b>	<b>5</b>
<b>    Diagnóstico.....</b>	<b>6</b>
<b>    Tratamiento.....</b>	<b>6</b>
<b>    Sistema inmune humoral.....</b>	<b>9</b>
<b>    Vacas como modelo de producción de antivenenos.....</b>	<b>10</b>
<b>3. Justificación.....</b>	<b>12</b>
<b>4. Hipótesis.....</b>	<b>13</b>
<b>5. Objetivos.....</b>	<b>14</b>
<b>6. Material y Método.....</b>	<b>15</b>
<b>7. Límite de espacio.....</b>	<b>26</b>
<b>8. Límite de tiempo.....</b>	<b>27</b>
<b>9. Resultados.....</b>	<b>28</b>

<b>Inmunización del ganado bovino.....</b>	<b>28</b>
<b>Cuantificación del nivel de reconocimiento de los anticuerpos por inmunoensayo enzimático ligado a enzimas (ELISA-i).....</b>	<b>28</b>
<b>Dosis letal media (DL<sub>50</sub>).....</b>	<b>33</b>
<b>Dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>).....</b>	<b>34</b>
<b>10. Discusión.....</b>	<b>36</b>
<b>Cuantificación del nivel de reconocimiento de los anticuerpos por inmunoensayo enzimático ligado a enzimas (ELISA-i).....</b>	<b>36</b>
<b>Dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>).....</b>	<b>39</b>
<b>Reacción de hipersensibilidad en ratón.....</b>	<b>40</b>
<b>11. Conclusiones.....</b>	<b>42</b>
<b>Sugerencias.....</b>	<b>43</b>
<b>12. Literatura citada.....</b>	<b>44</b>

## 1. Introducción

La inmunidad humoral es aquella mediada por inmunoglobulinas y proteínas de complemento (Brandan, 2007). Las inmunoglobulinas secretadas circulan en la sangre, donde actúan como efectores de la inmunidad humoral al unirse a antígenos y marcarlos para su eliminación (Owen *et al*, 2014). Las inmunoglobulinas son proteínas compuestas por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Posen una región constante (Fc) que determina su clase y funciones biológicas, y una región variable (Fab) de unión al antígeno (Toche, 2012).

Existen tratamientos basados en la transferencia de inmunoglobulinas, como es el caso de los antivenenos que contienen anticuerpos contra venenos de serpientes o escorpiones (Owen *et al*, 2014).

Los antivenenos o suero hiperinmune purificado son la única herramienta terapéutica efectiva para neutralizar las toxinas durante un envenenamiento, lo que ha ayudado a disminuir la tasa de mortalidad de los individuos que han sido víctimas de un accidente ofídico (Rojas, 2011).

Para la producción de antivenenos se han utilizado diferentes especies en varias escalas de la producción (caballos, ovejas, burros, cabra y conejo) y con fines experimentales (camello, llama, perro y gallina). La selección de la especie animal productora de plasmas hiperinmunes se basa en varias consideraciones, como la prevalencia de enfermedades locales, disponibilidad de la región, adaptación al ambiente local y costo de mantenimiento (WHO, 2016).

El concepto de antivenenos fue acuñado por primera vez por Henry Sewall en 1887, cuando demostró que las palomas pueden ser inmunizadas contra los efectos del veneno de la cascabel pigmea, mediante inoculaciones en dosis crecientes de veneno (Sewall, 1895). En 1895, Albert Calmette mostró que el suero proveniente de conejos inoculados con veneno, puede proteger contra los efectos del veneno cuando se inyecta a conejos sanos después de ser envenenados. En el mismo año, Calmette usó suero de un caballo inmunizado, para tratar a un humano mordido por una cobra. Gracias a estos hallazgos en



1898, Calmette produjo el primer antiveneno comercial producido en equinos para su uso en Vietnam (Lallo and Theakston, 2003).

En la actualidad, la gran mayoría de los antivenenos son producidos de acuerdo a los mismos principios, en donde un animal, comúnmente el caballo, es inoculado por vía parenteral a lo largo de varios meses con dosis crecientes de veneno junto con algún adyuvante (Lallo y Theakston, 2003). Los adyuvantes son sustancias que administradas simultáneamente con el inmunógeno, en este caso el veneno, potencian la respuesta inmune. Al usarlos se pueden usar menores cantidades de inmunógeno y la respuesta de anticuerpos deseada puede ser alcanzada en menor tiempo (Morris *et al*, 1999). Los adyuvantes más empleados en la producción de antivenenos son el adyuvante incompleto de Freud (IFA) y el hidróxido de aluminio (Alum).

El IFA es un aceite mineral, que al ser mezcladas con el inmunógeno en fase acuosa forma emulsiones, incluyendo la formación de un depósito en el sitio de la inyección, para una lenta liberación del inmunógeno y así estimular la producción de anticuerpos (Aguilar and Rodríguez, 2007). Además provocan una inflamación en el sitio de inoculación que promueve la llegada de células dendríticas y macrófagos, los cuales son responsables de la capacitación, procesamiento y presentación de inmunógenos a los linfocitos (Calderón, 2011).

Por su lado, los adyuvantes que contienen sales de aluminio inducen una inmunorreacción innata en el sitio de inyección, activando células dendríticas, monocitos y macrófagos, mejorando la expresión de moléculas de adhesión y co-estimuladoras, que a su vez modulan la aparición de células proinflamatorias, cruciales en la estimulación de la respuesta inmune (Aimanianda, 2009).

Después de inmunizaciones repetidas, la afinidad de los anticuerpos en sangre aumenta dramáticamente con el tiempo, con un aumento de tres hasta cuatro órdenes de magnitud; a este proceso se le conoce como maduración de la afinidad (Owen, 2014).

Sin embargo, tener altos niveles de anticuerpos en sangre por sí solos no son un indicativo de calidad, debido a que, aunque exista una población de anticuerpos capaces de reconocer los componentes del veneno, sólo una porción de estos, son capaces de reconocer o unirse a partes moleculares

responsables de la toxicidad y letalidad del veneno (Calderón, 2011), es por esto que se tiene que evaluar la capacidad neutralizante mediante inoculaciones en ratones para poder asegurar la eficacia del suero destinado a la producción de antiveneno.

Una vez que ya se tiene un suero o plasma con una buena potencia neutralizante, éstos son tratados con pepsina en pH ácido, para remover los fragmentos Fc y después, los fragmentos F(ab)<sub>2</sub> son purificados mediante precipitación de sulfato de amonio o sulfato de sodio. Por último, la sal es removida por diálisis o ultrafiltración. Algunos laboratorios producen antivenenos Fab usando digestión con papaína, seguido de cromatografía de intercambio de iones y cromatografía de afinidad; otros laboratorios producen antivenenos de moléculas completas de IgG y precipitación por ácido caprílico, seguido de una ultrafiltración (Theakston *et al*, 2002).

Una vez conocido el proceso de producción de los antivenenos, para este fin, se ha elegido al caballo a través de los años como modelo para la producción comercial de antivenenos por ser dóciles, su adaptación en la mayoría de los climas y producir un gran volumen de plasma (WHO, 2016). Por otro lado, es importante explorar otros modelos animales de talla grande que permitan tener volúmenes de sueros grandes; por lo que nació el interés utilizar el modelo de vacas, dado que estas cuentan con las mismas características de adaptabilidad, volumen sanguíneo (aproximadamente de 6 a 8% de peso vivo [Köning y Liebich, 2002]) y docilidad, agregando que los costos de mantenimiento son más baratos en los bovinos. De aquí surge el interés sobre si las vacas pudieran ser una alternativa para la producción de plasmas hiperinmunes para la producción de antivenenos.

## 2. Revisión de literatura

### **Incidencia de mordeduras de serpientes**

Aproximadamente 15% de las 3,000 especies de serpientes que se encuentran en todo el mundo, son consideradas peligrosas para el ser humano. En México, se calcula la existencia de 416 especies de las cuales el 20% son venenosas y agrupadas en dos grandes familias: La Viperidae (*Bothrops* [nauyaca], *Bothriopsis*, *Porthidium*, *Crotalus* [cascabel], *Agkistrodon* [cantiles]) y la Elapidae (*Micrurus* y *Leptomicrurus* [coralillos] y *Pelamis platurus* [serpiente marina]). Los vipéridos tienen mayor importancia para la salud pública en nuestro país, debido a que son la causa de la mayor frecuencia de accidentes ofídicos en nuestro país (González *et al*, 2009; Uetz *et al*, 2016; Gold *et al*, 2002); dentro de las especies de vipéridos implicadas se encuentran el género *Agkistrodon* (Román, 2015).

La mordedura de serpiente o accidente ofídico se caracteriza por una lesión cutánea, seguida de la inoculación de la sustancia tóxica (veneno) que lesiona los tejidos y condicionan las alteraciones fisiopatológicas de gravedad variable (Zúñiga y Caro, 2013). En México, el grupo etario con mayor riesgo de afección es entre los 15 y los 44 años de edad (48.75%), predominando el género masculino con 64%. Las actividades relacionadas al riesgo de afección son: el trabajo de campo (44%), estudiantes (22%), labores del hogar (17%), otras actividades (8%), obreros (2%), causas desconocidas (7%) (SSA, 2010).

En general del 2003 al 2006 existieron 15,319 casos de mordedura por serpiente a nivel nacional con un promedio anual de 3,830 casos. El grupo más afectado fue el de 25 a 44 años con 27.7% de los casos, seguido por el de 10 a 14 años con 10.5% y el de 15 a 19 años de edad con 10.2%. En el periodo de revisión las entidades federativas con mayor frecuencia de accidentes por mordedura de serpiente fueron Oaxaca, Veracruz, San Luis Potosí, Hidalgo y Puebla, con 11.88%, 11.57%, 7.25%, 6.98% y 6.97%, respectivamente. El Estado de México ocupó el octavo lugar con 3.55% y el Distrito Federal el lugar 23 con 1.54% (González *et al*, 2009). La distribución de los sitios anatómicos de

las mordeduras de serpientes suele ser: 72% en pies y tobillos, 14% muslos, 13% en manos y 1% en cabeza (SSA, 2010).

Por otro lado, en animales domésticos también se han reportado casos de mordedura de serpiente, se estima que en Estados Unidos ocurren alrededor de 150,000 mordidas a perros y gatos al año (Peterson, 2006).

### **Género *Agkistrodon***

En México son conocidas comúnmente como “cantiles” (*A. bilineatus*, *A. taylori* y *A. russeolus*). Son serpientes de cuerpo ancho con una cabeza gruesa y una cola larga y delgada con un patrón de líneas transversas ubicadas dorsalmente. La cabeza está adornada con cinco líneas pálidas conspicuas, una verticalmente enfrente de la nariz y dos en cada lado. Existe un amplio rango en las variaciones en los patrones de color en *Agkistrodon* y estas características han sido usadas para la identificación de las tres subespecies de *A. bilineatus*. El cantil común (*Agkistrodon bilineatus*) es una especie polifacética de México cuya distribución se extiende desde el extremo suroeste de Chihuahua y sur de Sonora hasta la península de Yucatán, habitan principalmente lugares con un tipo de vegetación de selva seca, selva baja caducifolia, sabanas y zonas con baja perturbación. Normalmente se asocian a cuerpos de agua. Se distribuyen en el nivel del mar hasta los 1,500 m sobre el nivel del mar (Porrás *et al*, 2013).

### **Sintomatología**

Muchas personas creen que una mordida de serpiente podría resultar en una inevitable muerte, en consecuencia, las víctimas podrían parecer emocionalmente inestables y exhibir letargia extrema. El miedo puede causar síntomas como náusea, vómito, diarrea, desmayo y taquicardia. Es por eso que es importante diferenciar estas reacciones autonómicas de los síntomas sistémicos y signos por envenenamiento (Gold *et al*, 2004).

En general, los daños que causa el veneno de *A. bilineatus* son locales; en el sitio de la mordedura se presentan hemorragias, dolor, equimosis y miotoxicidad. En todos los casos se observa la generación de un importante

edema que puede complicarse hasta generar un síndrome compartimental (Chaves *et al*, 1995). Estos efectos pueden ser explicados por los componentes principales del veneno de esta serpiente: fosfolipasas A<sub>2</sub>, serinoproteasas y metaloproteasas. Las fosfolipasas A<sub>2</sub> se caracterizan por generar daño al tejido muscular, hemorragias y edema, las serinoproteasas afectan diversas funciones fisiológicas, incluyendo a la coagulación sanguínea, presión arterial, agregación plaquetaria y fibrinólisis y las metaloproteasas son una de las principales proteínas causantes de hemorragias locales y sistémicas (Román, 2015).

## **Diagnóstico**

Para el diagnóstico de la intoxicación por veneno de serpiente se requiere la identificación de las características morfológicas de la serpiente venenosa y la correlación de las manifestaciones clínicas del envenenamiento. Los signos del envenenamiento pueden variar dependiendo de la cantidad de veneno inoculado, tiempo de evolución, región afectada y número de mordidas. Muchas personas creen que una mordida de cualquier serpiente resultará en un envenenamiento pero, lo cierto es que el 25% de las mordidas se reportan como frías o secas, es decir, que no hubo inoculación de veneno (SSA, 2010; Gold *et al*, 2002).

## **Tratamiento**

Después de una mordedura de serpiente, la víctima deberá mantenerse relajada y ser transportada al centro médico más cercano lo más pronto posible, el área afectada deberá inmovilizarse en una posición funcional debajo del nivel del corazón, se removerán los anillos, relojes y ropa que pueda provocar constricción. Los signos y síntomas pueden no aparecer de inmediato por lo cual el transporte hacia el centro médico más cercano, es esencial para asegurar una rápida evaluación y la aplicación del tratamiento en caso de que sí haya envenenamiento. No se recomienda el uso de torniquetes, incisión o succión en la zona de la mordida, crioterapia o electroshocks (Gold *et al*, 2004).

Se deberá hacer un examen físico completo, priorizando los sistemas cardiovascular, respiratorio y neurológico. Se examinará el sitio de la mordida

buscando marcas de colmillos y rasguños, magnitud del edema (medir cada 15 o 30 minutos), compromiso del tronco, cara o cuello, necrosis, hemorragia local y compromiso sistémico (Gold *et al*, 2004; Castrillón *et al*, 2007).

Antes de aplicar un antiveneno es necesario determinar la gravedad clínica y evaluar la evolución del tratamiento, en el caso de mordeduras de serpiente la evolución puede variar, dependiendo los grados de afección basados en los criterios de Christopher y Rodning:

- 0 No envenenamiento: Presencia de heridas por colmillos pero sin signos locales o sistémicos.
- 1 Envenenamiento ligero: Presencia de heridas por colmillos con dolor y edema local pero sin signos sistémicos.
- 2 Envenenamiento moderado: Presencia de heridas por colmillos, dolor severo y edema de 15 a 30 cm con algunas anomalías sistémicas o hallazgos de laboratorio.
- 3 Envenenamiento severo: Presencia de heridas por colmillos, dolor severo, edema mayor de 30 cm, petequias, reacción sistémica severa, sangrado y/o coagulación intravascular diseminada y hallazgos en laboratorio con anomalías severas.
- 4 Envenenamiento grave: Sangrado por los orificios de la mordedura, equimosis y petequias extensas, insuficiencia renal aguda, dificultad respiratoria, hipotensión y falla orgánica múltiple (Gonzales *et al*, 2009; SSA, 2010; Luna-Bauza *et al*, 2004).

Se debe realizar una rápida clasificación de la severidad del evento y evaluar las manifestaciones sistémicas que permitan un abordaje terapéutico temprano, sin olvidar que un accidente inicialmente clasificado como leve, puede progresar a severo en un lapso de horas. Igualmente se debe clasificar la gravedad clínica, tomando en cuenta el tiempo transcurrido desde la mordedura, tamaño de la serpiente, tiempo de evolución de los síntomas, el lugar afectado y la edad del paciente (González *et al*, 2009; Castrillón *et al*, 2007).

El accidente ofídico constituye un importante problema de salud que debe ser tratado rápido y eficazmente. Se debe tener en cuenta que la entrada masiva al organismo de agentes muy tóxicos, como los venenos de serpientes, no le

permiten al sistema inmune de un individuo desarrollar una respuesta rápida y protectora. Es por ésto que la administración de los antivenenos es la única herramienta terapéutica efectiva y específica para neutralizar las toxinas durante un envenenamiento (WHO, 2016; ICP, 2009).

En los comienzos de la seroterapia, los tratamientos para mordeduras de serpientes o infecciones toxico-infecciosas como la difteria o tétanos consistían en la inyección de suero hiperinmune completo de equino. Luego de éste periodo inicial, la presentación farmacéutica de los antivenenos y antitoxinas se fue modificando para disminuir el alto número de reacciones adversas producidas por el suero entero, tales como reacciones de hipersensibilidad y anafilácticas causadas por la inoculación de gran cantidad de proteínas extrañas en el torrente sanguíneo. Estas modificaciones consistieron en la eliminación de la albúmina, las globulinas no inmunes y otras proteínas no inmunes en el suero (de Roodt et al, 2010).

A pesar de estas modificaciones, la administración de inmunoglobulinas de origen equino causaba con frecuencia una reacción de hipersensibilidad mediada por complejos inmunes tipo III, ya que los caballos inmunizados tienen niveles de IgG (T) (Montilla et al, 2007), un isotipo altamente glucosilado y muy antigénico, debido a las características químicas de las glicoproteínas (de Roodt et al, 2010).

El problema de no contar con un tratamiento adecuado para los pacientes sensibles al suero equino condujo al desarrollo de técnicas de inmunización utilizando animales alternativos de producción (Montilla et al, 2007), tales como ovejas, burros, cabras y conejos, o con motivos experimentales el camello, llama, perro y gallina (WHO, 2016).

Actualmente se utilizan fracciones digeridas con proteasas, de las inmunoglobulinas para terapia, lo que disminuye las reacciones de hipersensibilidad en las personas tratadas con antivenenos.

### **Sistema inmune humoral**

Para la producción de antivenenos es necesario contar con suero hiperinmune de animales inmunizados en dosis crecientes con un veneno o

(combinación de estos) un “pool” de venenos específicos. Este proceso está mediado por el sistema inmune humoral que funciona cuando sucede la interacción de las células B con antígeno y su proliferación y diferenciación subsecuentes en células plasmáticas que secretan anticuerpo (Owen, 2014).

Las células B residen y circulan en los linfonodos y bazo, al encontrar su antígeno, al cual es específico, se une a través de su receptor e induce la activación del linfocito B y, posterior producción de anticuerpos inicialmente IgM y luego IgG, IgE o IgA. Traduciéndose inicialmente en la internalización del antígeno, procesamiento y posterior presentación antigénica por el linfocito B como célula presentadora de antígeno al linfocito T cooperador específico quien secreta citocinas. La presencia de moléculas co-estimuladoras como el CD40 ligando y CD40L respectivamente, así como la secreción de citocinas inducen un cambio de isotipo en el linfocito B. Este cambio de clase depende del tipo de citocina secretada por el linfocito. Los linfocitos T cooperadores tipo 2 (Th2) secretan IL-4 que induce la secreción por parte del linfocito B de IgE y los linfocitos Th1 secretan INF $\gamma$  e IL-12 que inducen la secreción de IgG (Tochep, 2012).

El anticuerpo como efector de la respuesta humoral, se une al antígeno, lo neutraliza y facilita su eliminación. Un antígeno cubierto de anticuerpo puede eliminarse de varias maneras. Por ejemplo, el anticuerpo puede enlazar en forma cruzada varios antígenos y formar agregados que las células fagocíticas ingieren con mayor facilidad. La unión de anticuerpo a antígeno en un microorganismo también puede activar el sistema de complemento, que tiene como resultado la lisis del microorganismo. El anticuerpo también puede neutralizar toxinas o partículas virales y recubrirlas, lo que impide que se unan a células del hospedador (Owen, 2014).

Las principales funciones efectoras de los anticuerpos son:

**Opsonización:** En las superficies de macrófagos y neutrófilos se encuentran moléculas proteínicas llamadas receptores Fc (FcR), que pueden unir la región constante de moléculas de inmunoglobulinas. Esta unión forma un complejo con el mismo antígeno blanco y produce una unión que fija el agente patógeno a la membrana de fagocito que inicia una vía de transducción de



señales que desemboca en la fagocitosis del complejo antígeno y anticuerpo (Kindt, 2007).

Activación del Complemento: La IgM y en el ser humano casi todas las subclases de IgG, pueden activar un conjunto de glucoproteínas séricas llamado sistema del complemento, que incluye un grupo de proteínas capaces de perforar membranas celulares (Kindt, 2007).

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo: El enlace de anticuerpo unido a células blanco con los receptores Fc de varios tipos celulares, en particular las células asesinas naturales NK, pueden dirigir su actividad citotóxica efectora contra la célula blanco. El anticuerpo actúa como receptor recién adquirido que permite que la célula atacante reconozca y destruya la célula blanco (Kindt, 2007).

### **Vacas como modelo de antivenenos**

De todos los animales domésticos, y desde hace aproximadamente 1,500 años, la vaca fue de los primeros animales útiles al humano, probablemente por la cantidad de productos alimenticios útiles que proveía como leche, sangre, grasa y carne además de productos secundarios tales como ropa y herramientas hechas del pelo, piel, cuernos, pezuñas y huesos (Hirst, 2017).

En la actualidad no hay estudios sobre el uso de los bovinos como modelo animal para la producción de antivenenos tomando en cuenta que poseen las características ideales para su uso en este modelo de producción. Según la WHO en 2016 la selección de especies animales para la producción de antivenenos deberá ser basada en varias consideraciones, como la prevalencia de enfermedades locales, disponibilidad de la región, adaptación al ambiente local y costo de mantenimiento (WHO, 2016). Además si las comparamos con las características que poseen los caballos por las cuales se ha convertido en el animal de elección de los antivenenos como son la docilidad, gran volumen sanguíneo y buena adaptabilidad al ambiente, características que también poseen las vacas además de unos bajos costos de mantenimiento en comparación con el caballo.

Existe muy poca información respecto al uso de vacas como modelo para la producción de antivenenos, entre ellos Jean-Philippe Chippaux dice que aunque el caballo es el animal de elección por la cantidad de suero que se puede obtener en una sangría, el buen manejo y la fácil alimentación, también pueden usarse burros, mulas, vacas o bueyes por razones similares pero extrañamente muy pocos productores los usan (Chippaux, 1992). En 1991 Theakson y Warrell hicieron una lista de los sueros hiperinmunes disponibles para el tratamiento de mordeduras y piquetes de animales venenosos, con 200 venenos listados, de los cuales el Central Research Institute de Kasauli, menciona que la India producía un antiveneno contra *Naja sp* y *Vipera russelii* usando a la vaca como modelo de producción (Theakson and Warrell, 1991).

Las vacas presentan las mismas clases y subclases de inmunoglobulinas que la mayoría de los mamíferos, identificados por su cadena pesada en 4 clases: IgM, IgG, IgA e IgE, con tres sub clases de IgG: IgG1, IgG2 e IgG3 y, por su cadena ligera pudiendo ser  $\lambda$  o  $k$  (Pastoret, 1998).

Las dos clases mayores de IgG difieren principalmente en su habilidad para unirse con el complemento e inducir su adherencia y fagocitosis por neutrófilos y macrófagos. En el caso de la IgM bovina, es 10-20 veces más efectiva en la unión al complemento que la IgG, esto puede ser explicado por la gran concentración en suero, comparándolo con las otras especies (Pastoret, 1998).

### 3. Justificación

En general es muy conocido por los productores, que el mantenimiento de una vaca es más económico que un caballo de la misma talla, principalmente porque sus requerimientos nutricionales en condiciones de mantenimiento son menores y gracias a la habilidad de la vaca de convertir celulosa y hemicelulosa en energía, además de producir proteínas de gran calidad nutricional a partir de nitrógeno no proteico, tomando en cuenta que la alimentación suele representar entre el 50% y 60% de los gastos en una producción estabulada.

Por otro lado, la producción de antivenenos en caballos, pueden presentar una reacción muy agresiva a la inoculación del veneno, apareciendo la formación de grandes abscesos, fístulas y fibrosis en el lugar de la inoculación y dolor, por otra parte los gastos por parte del propietario en el cuidado y recuperación del área inoculada (Montilla *et al*, 2007), en cambio las vacas al tener una piel más gruesa podrían ser más resistentes y no presentar este tipo de lesiones.

Sin embargo, el volumen sanguíneo obtenido en ambas especies no representaría diferencias ya que esta cantidad está sujeta al peso vivo del animal. De esto, surge la inquietud de obtener un antiveneno en un modelo alternativo como la vaca y evaluar su eficacia *in vitro* e *in vivo*.

Es importante mencionar que la producción de farmacéuticos y artículos sanitarios procedentes de bovinos para uso en humanos, deberán sujetarse a los requisitos de la OIE, de acuerdo al artículo 11.4.3. del código sanitario para los animales terrestres (OIE, 2016<sub>2</sub>), como ejemplo el riesgo de transmisión del agente de la encefalopatía espongiforme bovina, el riesgo que estos productos representarían sería insignificante si proceden de una población bovina de un país, si se ha realizado una evaluación del riesgo para identificar los factores de riesgo, previos y existentes ante agentes específicos (OIE, 2016<sub>1</sub>). Así mismo, de acuerdo a la resolución N° 26 Reconocimiento del estatus sanitario de los Países Miembros, respecto al riesgo de encefalopatía espongiforme bovina, México se encuentra bajo un estado insignificante (OIE, 2017); por otro lado la transmisión de priones a través de la producción de biológicos como los antivenenos en México es mínima ya que su producción se realiza bajo estrictas normas de calidad.

#### **4. Hipótesis**

Las inmunoglobulinas sintetizadas por la vaca contra el veneno *Agkistrodon bilineatus* muestran igual o mayor eficacia que las inmunoglobulinas sintetizadas por el equino.

## 5. Objetivo

### General

- Comparar la potencia neutralizante entre los sueros de ganado bovino y equinos inmunizados con el veneno de *Agkistrodon bilineatus*.

### Específicos

- Aplicar un esquema de inmunización con veneno de *A. bilineatus* en 3 vacas cruza de raza Holando-Brahman.
- Determinar y comparar el título de anticuerpos específicos de los sueros hiperinmunes del ganado bovino y equino mediante análisis de inmunoensayo.
- Determinar y comparar la potencia neutralizante DE<sub>50</sub> de los sueros hiperinmunes producidos en ganado bovino y equino contra los venenos de *Agkistrodon bilineatus*.

## 6. Material y Método

### Material Biológico:

- Bovinos cruce Holando-Brahman
- Mezcla de veneno de varios ejemplares de *Agkistrodon bilineatus* (hecho el 5 de septiembre de 2012) y mantenido liofilizado y a -10 °C.
- Ratones de laboratorio de 18 a 20 g, cepa ICR-CD1.
- Suero preinmune de vaquillas
- Suero hiperinmune de vaquillas
- IgG de cabra (Anti IgG de vaca) conjugado a HRP
- IgG de cabra (Anti IgG de caballo) conjugado a HRP

### Instalaciones específicas

- Potrero y Corral de alojamiento para bovinos
- Manga de manejo
- Cuarto de alojamiento para ratones
- Cajas para ratones con rejilla
- Comederos
- Bebederos
- Aserrín

### Equipo de laboratorio

- Congelador
- Refrigerador
- Rotulador
- Hielera
- Vórtex
- Centrifuga
- Lavador de microplacas
- Lector de ELISA
- Incubadora

### **Material de laboratorio**

- Placa de ELISA de 96 pocillos, Nunc MaxiSorp®
- Micropipetas de 10, 50, 200 y 1000 µL calibradas
- Pipeta multicanal 300 µL
- Puntas amarillas para micropipeta de 10-200 µL
- Puntas azules para micropipeta de 200-1000 µL
- Tubos falcon de 15 y 50 mL
- Tubos eppendorf de 1.5 y 2 mL
- Matraz de 250 y 500 mL
- Probetas de 2 L, 1 L y 50 mL
- Vaso de precipitado 1 L
- Barra magnética

### **Material diverso**

- Jeringas estériles de 3 mL
- Agujas estériles 18G y 21G
- Torundas de algodón en alcohol al 70%
- Pipetas Pasteur estériles
- Overol
- Botas de Caucho
- Cinta adhesiva
- Lámpara de mesa
- Guantes y cubrebocas desechables
- Lentes de seguridad
- Toallas de papel

### **Reactivos**

- Adyuvante incompleto de Freud (IFA)
- Adyuvante ALUM

### **Soluciones**

- Buffer de sensibilización 100 mM Carbonato/Bicarbonato pH 9.5
- Solución de bloqueo 50 mM Tris/HCl pH 8 + 5 mg/mL gelatina + 0.2% Tween 20

- Solución vehículo 50mM Tris/HCl pH 8 + 0.5 M NaCl + 1 mg/mL gelatina + 0.05% Tween 20
- Solución de lavado 50mM Tris/HCL pH 8 + 150mM NaCl + 0.05% Tween 20
- ABTS 10 mL de buffer ABTS casero + 2  $\mu$ L de peróxido de hidrogeno + 75  $\mu$ L de sustrato ABTS
- SDS
- Amortiguador de fosfatos PBS
- Hielo.

### **Equipo de Cómputo**

- Software: GraphPad Prism V.6.01

### **Método**

#### **Inmunización del ganado bovino**

Se aplicó un esquema de inmunización a dos vaquillas de aproximadamente cuatro años de edad con un peso promedio de 400kg con 3 meses de gestación identificadas como 01-3 y 31-4 y a una novillona identificada como 10-3, todas de cruce Holando-Brahman, nunca antes expuestas al veneno de *Agkistrodon bilineatus*. Los animales fueron desparasitados con ivermectina y vacunadas contra la rabia previamente, y se mantuvieron bajo el cuidado del personal específico en las instalaciones del Rancho Ojo de Agua, ubicado en Venustiano Carranza, Puebla, bajo condiciones de pastoreo y en condiciones óptimas de bienestar. A cada animal se inyectó el veneno de *A. bilineatus* en dosis crecientes como se señala en el cuadro No. 1, el mismo que se ha utilizado para la inmunización en caballos (Román, 2015).



Día de aplicación	No. inmunización	Veneno por vaca (µg)	Veneno (µl)	S S (ml)	Tipo Adyuv	Adyuv (ml)	Vol. Total (ml)	Vol. por vaca (ml)	Vía aplicación	No. de sitios
0	1	100	30	1.6	IFA	2.3	3.9	1.2	ID	10
7	2	100	30	1.4	IFA	2.0	3.4	1.0	SC	4
21	3	200	60	2.9	ALUM	0.4	3.4	1.0	SC	4
35	4	250	75	1.3	IFA	1.9	3.3	1.0	SC	4
49	5	500	150	1.6	ALUM	1.5	3.3	1.0	SC	4
63	6	1000	300	3.0	NO	0.0	3.3	1.0	SC	2
77	7	2000	600	0.8	IFA	2.0	3.4	1.0	SC	4
91	8	4000	600	0.0	ALUM	3.0	3.6	1.1	SC	4
105	9	5000	750	2.5	NO	0.0	3.3	1.0	SC	2
119	10	6000	900	0.5	IFA	2.0	3.4	1.0	SC	4
133	11	6000	900	0.0	ALUM	3.0	3.9	1.2	SC	4
147	12	6000	900	2.4	NO	0.0	3.3	1.0	SC	2
157	Toma de muestra de sangre									

**Cuadro No. 1.** Esquema de inmunización con veneno de *A. bilineatus* para la obtención de sueros.

IFA\*= Adyuvante incompleto de Freud.

ALUM\*\*= Alúmina (40µg/mL de Hidróxido de aluminio y 40µg/mL de hidróxido de magnesio).

S S= Solución salina

Nota: Previo a la inmunización se tomó obtuvo una muestra de sangre.

De una mezcla de venenos obtenido de distintos ejemplares como se muestra en el cuadro No. 2., y caracterizados (Roman, 2015), y conservados por liofilización, se obtuvo una muestra la cual se solubilizó en PBS manteniéndose en congelación hasta antes de la inmunización, se agregó el adyuvante minutos antes y se conservó a temperatura de refrigeración antes de realizar la inoculación para evitar la desnaturalización de las proteínas.

<i>Agkistrodon bilineatus</i>	
Procedencia	Estado
IBT-UNAM	Colima
IBT-UNAM	Sinaloa
"La Nauyaca"	Nayarit
"La Nauyaca"	Chiapas
IBT-UNAM	Chiapas

**Cuadro No. 2.** Venenos utilizados para hacer la mezcla utilizada en este proyecto.

Al veneno se le adicionó adyuvante incompleto de Freund, usando una jeringa y aguja 18G, en agitación con vórtex hasta obtener una mezcla homogéneo en el vial, en el caso del ALUM no fue necesario agitar en vórtex pues se obtiene fácilmente el homogeneizado.

El ganado se manejó en una manga y se utilizó un nariguero para tener mejor control de los animales al momento de la inoculación. Previo a esta, de cada animal se extrajeron 100 mL de sangre de la vena yugular y fue depositada en un matraz de 200 mL, se dejó reposar a temperatura ambiente por una hora aproximadamente para permitir la coagulación y la obtención del suero sanguíneo, el cual se clarificó por centrifugación durante 7 minutos a 3,000 rpm y se distribuyó en alícuotas de 50 mL en tubos de plástico y conservándose en congelación a 0°C en las instalaciones del rancho hasta que concluyó el protocolo de inmunización y para su uso posterior en las pruebas *in vitro* e *in vivo*. Es importante hacer notar que en cada fecha de inoculación se obtuvo una muestra de sangre de cada animal y fue tratada como se mencionó arriba con la finalidad de tener una muestra representativa de cada fecha de inmunización en los tres animales.

La tabla del cuello se desinfectó con torundas de algodón sumergidas en cloruro de benzalconio al 1% en dirección cráneo-caudal y se inyectó el veneno de *A. bilineatus* mezclado con IFA por vía intradérmica, procurando inocular en más de 10 sitios en la primera inmunización. En las inmunizaciones posteriores se inculó el veneno vía subcutánea en 4 sitios, y en el lado opuesto a la primera

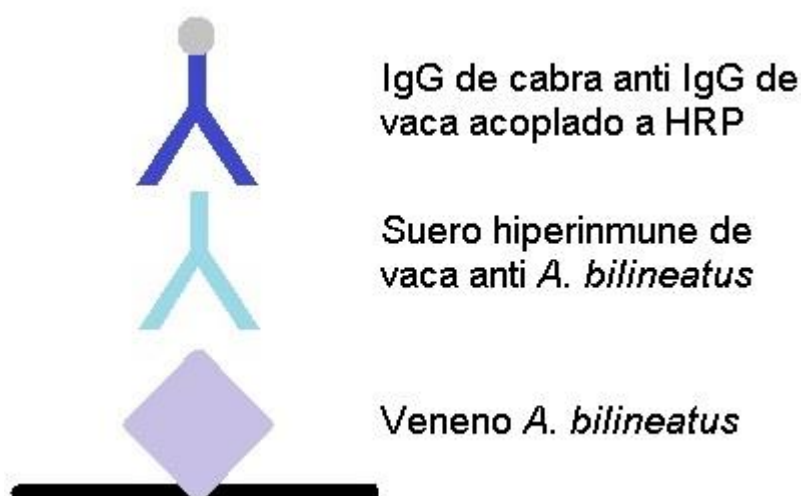
aplicación, alternando así la inoculación y para tipo de adyuvante, así mismo cuando se inoculaba únicamente el veneno.

Después de cada inoculación, los animales regresaban al potrero y bajo observación durante una semana para descartar efectos adversos en los sitios de aplicación del veneno.

Adicionalmente y al término de la gestación de las vaquillas 01-3 y 31-4, el 18 y 28 de marzo fecha de nacimiento del becerro (10 y 20 días después de la última inmunización, respectivamente), se obtuvo una muestra de 50 mL de calostro, las muestras se identificaron y se mantuvieron en congelación para su uso posterior en las pruebas *in vitro*.

### **Cuantificación del nivel de reconocimiento de los anticuerpos por inmunoensayo enzimático ligado a enzimas (ELISA-i)**

Al terminar el tiempo de inmunización, se cuantificó el título de anticuerpos mediante la técnica indirecta de inmunoensayo enzimático ligado a enzimas ELISA-i en el suero y en plasma. El ELISA indirecto consta del uso de un anticuerpo conjugado con HRP (Horse Radish Peroxidase) que detecta a los anticuerpos unidos al antígeno o veneno de *A. bilineatus*, adherido a la placa, para determinar el nivel de producción de anticuerpos generados contra los componentes presentes en el veneno, figura No.1.



**Figura No. 1.** Esquema de ELISA indirecto para la cuantificación de anticuerpos en suero de vaca.

Se realizó una mezcla de sueros de los tres animales en partes iguales “pool” 1:1:1 por cada fecha de inmunización y de esta forma obtener finalmente 13 muestras representativas de los tres animales y que corresponden a las 13 inmunizaciones practicadas. Durante la realización de las pruebas, también se evaluaron las muestras del suero del caballo 203 inmunizado previamente en otro protocolo de investigación (Román, 2015).

Se colocaron en dos placas repitiendo la muestra uno y la ocho en las primeras dos filas de la placa dos, ya que la muestra uno es el suero preinmune que cumple la función de blanco, mientras que en la fila ocho los resultados se utilizaron para calcular el factor entre las dos placas.

### **Preparación de las placas**

#### **Etapa 1. Sensibilizado**

A una placa y en cada pozo, se agregó 100  $\mu$ L de solución con veneno de *A. bilineatus* a una concentración de 5  $\mu$ g/mL, en buffer de sensibilización 100 mM Carbonato/Bicarbonato pH 9.5. La placa se incubó por dos horas a 37°C y se lavó 4 veces en el lavador de microplacas con 300  $\mu$ L/pozo con solución de lavado 50 mM Tris/HCL pH 8 + 150 mM NaCl + 0.05% Tween 20, para remover proteína antigénica no adsorbida a la placa.

#### **Etapa 2. Bloqueo**

Se agregaron 200  $\mu$ L de solución de bloqueo 50 mM Tris/HCl pH 8 + 5 mg/mL gelatina + 0.2% Tween 20, a cada pozo con la finalidad de bloquear los espacios en los que no se haya unido el veneno y así evitar resultados inespecíficos. La placa se incubó por dos horas a 37°C y se lavó 4 veces.

#### **Etapa 3. Incubación con el suero de bovino**

Se colocaron 150  $\mu$ L de suero de cada vaca y el “pool” correspondiente en la primera columna de la placa de ELISA en una dilución 1:10 en solución vehículo (50 mM Tris/HCl pH 8 + 0.5 M NaCl + 1 mg/mL gelatina + 0.05% Tween 20), añadiendo siempre en la primera fila el suero preinmune. En los demás

pozos se les agregó 100  $\mu$ L de solución vehículo, posteriormente se hicieron diluciones seriadas 1:3, tomando 50  $\mu$ L de los pozos de la primera columna y, mezclando ambos reactivos diez veces, se transfieren 50  $\mu$ L y así sucesivamente hasta la columna 11 donde se descartaran 50  $\mu$ L de la última dilución. La columna 12 corresponde al blanco. La placa se incubó durante una hora a 37°C y se lavó 5 veces. En el caso de las muestras del caballo 203, se hizo el mismo proceso excepto que la dilución inicial fue 1:300.

#### Etapa 4. Conjugado

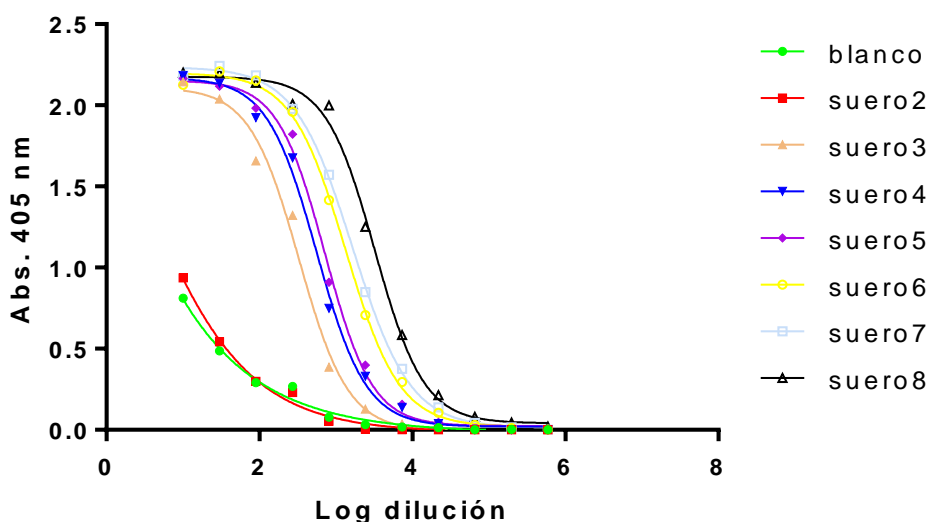
Se empleó un anticuerpo unido covalentemente a una enzima que permite generar una señal colorida al transformar el sustrato, un anticuerpo de cabra anti IgG de vaca acoplado a HRP (Cat. 14-12-06 marca KLP), a una dilución de 1:1000 en solución vehículo depositando a cada pozo 100  $\mu$ L de esta solución. La placa se incubó durante una hora a 37°C y se lavó 5 veces.

En el caso de las muestras del caballo se utilizó un anticuerpo cabra anti IgG de caballo acoplado a HRP marca Gene Tex Lot 821201431.

#### Etapa 5. Revelado

Se agregaron 100  $\mu$ L de solución de revelado (10 mL de buffer ABTS casero + 2  $\mu$ L de peróxido de hidrogeno + 75  $\mu$ L de sustrato ABTS [ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)]. Se dejó en incubación por 10 minutos y se detuvo la reacción con 25  $\mu$ L de SDS 25%. El ABTS como sustrato del HRP origina una reacción colorida verde-azul que absorbe a 405 nm.

La lectura de la placa se realizó en el lector de ELISA para determinar las absorbancias de cada pozo a una longitud de onda de 405 nm y el análisis de datos se realizó con una regresión no lineal para la cual, la absorbancia de cada muestra de suero es graficada en función del logaritmo de dilución, utilizando el software GraphPad Prism Versión 6.01. gráfica No. 1.



**Gráfica No. 1.** Representación de la curva de reconocimiento de los anticuerpos hacia el veneno de *A. bilineatus*. En el eje de las X se presenta el logaritmo de las diluciones seriadas de los sueros y en el eje de las Y se presenta la absorbancia obtenida por el lector del ELISA.

También se realizó la prueba de ELISA para evaluar la presencia de inmunoglobulinas contra el veneno de *A. bilineatus* en calostro. Las muestras de calostro se colocaron en tubos de 2 mL, y se centrifugaron por 5 minutos a 14,000 rpm a una temperatura de 4°C para separar la grasa y por decantación se obtuvo el calostro en los tubos respectivos.

Los pasos para realizar el ELISA-i del calostro fueron muy similares a los descritos anteriormente, excepto que solo se sensibilizaron con veneno las filas A-D y, las filas G y D se sensibilizaron sin veneno para poder descartar si el calostro daba reacción falsa positiva, por lo tanto las muestras se colocaron por cuatuplicado, dividiendo dos en las filas sensibilizadas con veneno y dos en las filas sensibilizadas sin veneno.

### **Dosis letal media (DL<sub>50</sub>)**

Se define como la cantidad de veneno expresada en µg necesaria para matar al 50% de una población de animales experimentales. Se utilizaron ratones de la cepa CD1, entre 18 y 20 g de peso. La potencia letal de los venenos se determinó previamente inyectando por vía intravenosa en la vena caudal, diferentes cantidades de veneno en seis grupos, tres ratones por grupo, en un volumen final de 0.5 mL de NaCl 150 mM. Los resultados de mortalidad se registraron 24 horas post inoculación para determinar el porcentaje de esta (Casasola *et al*, 2009). El análisis de datos se realizó con una regresión no lineal para la cual, el porcentaje de mortalidad en cada grupo experimental es graficado en función del logaritmo de la dosis inoculada, utilizando el software GraphPad Prism Versión 6.01. El origen de los ratones utilizados procedieron del bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM y fueron mantenidos en las mismas instalaciones bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, con comida y agua *ad libitum* de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999.

### **Potencia neutralizante (DE<sub>50</sub>)**

Se define como el volumen de suero capaz de salvar a la mitad de una población experimental de ratones inoculados con 3 dosis letales medias (DL<sub>50</sub>) de veneno. Para su determinación, se utilizaron grupos de 3 ratones de la cepa CD1, con un peso entre 18 y 20 g. los ratones fueron inoculados por vía intravenosa con diferentes volúmenes de suero de vaca preincubado a 37°C por 30 minutos más 3 DL<sub>50</sub> de veneno de *A. bilineatus* en un volumen final de 0.5 mL de NaCl 150 mM por ratón; primeramente se obtuvo un 0% y 100% de supervivencia, y posteriormente se obtuvieron los valores intermedios de 33% y 66% (Casasola *Et al*, 2009). El porcentaje de supervivencia se registró 24 horas post inoculación.

El análisis de datos se realizó mediante una regresión no lineal, graficando el porcentaje de supervivencia en función del logaritmo del volumen de suero utilizando con el software GraphPad Prism Versión 6.01 y los resultados se expresaran en mgV/mL (miligramos de veneno neutralizados por mililitro de suero) y DL<sub>50</sub>/mLS (Dosis letal media neutralizada por mililitro de suero). Para el

grupo control positivo al veneno se utilizó un grupo de ratones inoculados vía intravenosa con 3DL<sub>50</sub> del veneno de *A. bilineatus* y para el grupo control positivos se inoculo únicamente suero de vaca.

Para esta prueba se evaluaron las muestras del día 157 de las vacas, el “pool” y el caballo 203. Sin embargo, al evaluar la potencia neutralizante del caballo, fue necesario hacer una dilución 1:5 del suero, debido a que aún con volúmenes muy bajos había 100% de supervivencia y por lo tanto se incrementaba el margen de error.



## **7. Límite de espacio**

El Protocolo de inmunización se realizó en el rancho Ojo de Agua, ubicado en Venustiano Carranza, Puebla, situado en las siguientes coordenadas 20.505842, -97.654001 y bajo los factores ambientales de temperatura media anual de 22°C, con precipitación pluvial de 2000 mm al año aproximadamente, presión atmosférica de 1006 hPa, humedad promedio de 60% y a una altura media de 136 metros sobre el nivel del mar.

La evaluación del suero hiperinmune de los bovinos inmunizados se realizó en el Centro de Investigación del Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad #2001, Col. Chamilpa C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos, México.

## 8. Límite de tiempo

Las actividades se realizaron bajo el siguiente cronograma:

Año 2017								
Actividad	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
Revisión de literatura/aprobación de protocolo	X							
Inmunización		X	X	X	X	X		
Evaluación de sistema inmune mediante ELISA						X	X	
Evaluación de animal de laboratorio							X	
Análisis de resultados							X	X
Estructura del documento							X	X

## 9. Resultados

### Inmunización del ganado bovino

La reacción post inoculación en los bovinos fue la presentación de pequeñas nodulaciones provocadas por el adyuvante, en comparación con las lesiones habituales que presentan los caballos durante las primeras inmunizaciones como son principalmente la formación de abscesos, fístulas y fibrosis en el lugar de la inmunización, figura No. 2.



**Figura No. 2.** Comparación de la reacción subcutánea en el proceso de inmunización en equinos y bovinos ante el veneno de *Agkistrodon bilineatus* inoculado por vía subcutánea.

### Cuantificación del nivel de anticuerpos por inmunoensayo enzimático ligado a enzimas (ELISA-i)

Se evaluaron las muestras de suero de cada inmunización de las tres vacas, el “pool” y el caballo. Debido a que los títulos de anticuerpos de las muestras 9 - 13 se hicieron en una placa diferente, se realizó un factor de

corrección en el que se multiplicó el valor de la muestra 8 de la placa 1 por el valor de la muestra 9 entre el valor de la muestra 8 de la placa 2 (se hizo lo mismo con el intervalo de confianza). El resultado obtenido para la primera muestra de suero o sea la muestra preinmune de las vacas y del caballo, no se detectaron anticuerpos capaces de reconocer los componentes de los venenos.

El títulos de anticuerpos en cada uno de los sueros de vaca muestran un comportamiento ascendente contra el veneno de *A. bilineatus*, como se muestran en la figura 4, así, la vaca 10-3 fue la que tuvo una mejor respuesta, dando resultados 4 veces más altos en la muestra 13 comparados con las otras vacas como se muestra en el Cuadro No. 3.

Día	Número de sangría	Vaca 01-3	Vaca 10-3	Vaca 31-4	"Pool"
		Título (I.C.)	Título (I.C.)	Título (I.C.)	Título (I.C.)
0	1	0 (ND)	19.9 (17.03-23.4)	173 (98.8-303.1)	11.9 (5.9-23.7)
7	2	0 (ND)	37.6 (32.54-43.5)	66.3 (53.95-81.60)	16.5 (14.1-19.3)
21	3	328.8 (249.1-433.9)	1,263 (1,178-1,353)	1,028 (904.8-1,167)	822.9 (766-884)
35	4	559 (455.6-685.9)	8,325 (7,948-8,719)	1,773 (1,545-2,034)	4,155 (3,868-4,463)
49	5	716.2 (588.1-872.3)	15,248 (14,475-16,062)	2,435 (2,226-2,664)	6,385 (5,749-7,090)
63	6	1,338 (1,181-1,515)	11,610 (10,805-12,476)	2,386 (2,166-2,629)	4,305 (4,071-4,552)
77	7	1,648 (1,489-1,824)	10,668 (10,154-11,207)	2,153 (1,998-2,320)	4,445 (4,197-4,708)
91	8	3,212 (2,651-3,892)	11,066 (10,143-12,074)	4,259 (3,787-4,789)	5,972 (5,662-6,299)
105	9	7,198 (5,747-9,018)	18,170 (16,837-19,610)	3,092 (2,719-3,517)	7,908 (7,766-8,053)
119	10	6,338 (4,996-8,011)	12,294 (11,272-13,409)	2,160 (1,866-2,501)	5,353 (5,641-5,080)
133	11	11,214 (9,349-13,454)	18,680 (17,383-20,074)	5,139 (4,423-5,971)	10,074 (10,601-9,574)
147	12	7,399 (6,139-8,921)	24,779 (22,539-27,240)	3,739 (3,102-4,509)	10,811 (11,027-10,600)
157	13	5,121 (4,162-6,303)	22,953 (20,845-25,275)	5,076 (4,341-5,937)	9,396 (9,646-9,153)

**Cuadro No. 3.** Título de anticuerpos contra *A. bilineatus* de las vacas, tomados a diferentes tiempos. I.C.= Intervalo de confianza 95% obtenido en GraphPad Prism mediante el método modificado de Wald. ND= no determinado.

Los títulos de anticuerpos de la vaca 10-3 en comparación con el título detectado en el caballo 203 se muestran en el cuadro No. 4 y Gráfica No. 2, observándose la diferencia en 12 veces mayor de los resultados en la última muestra.

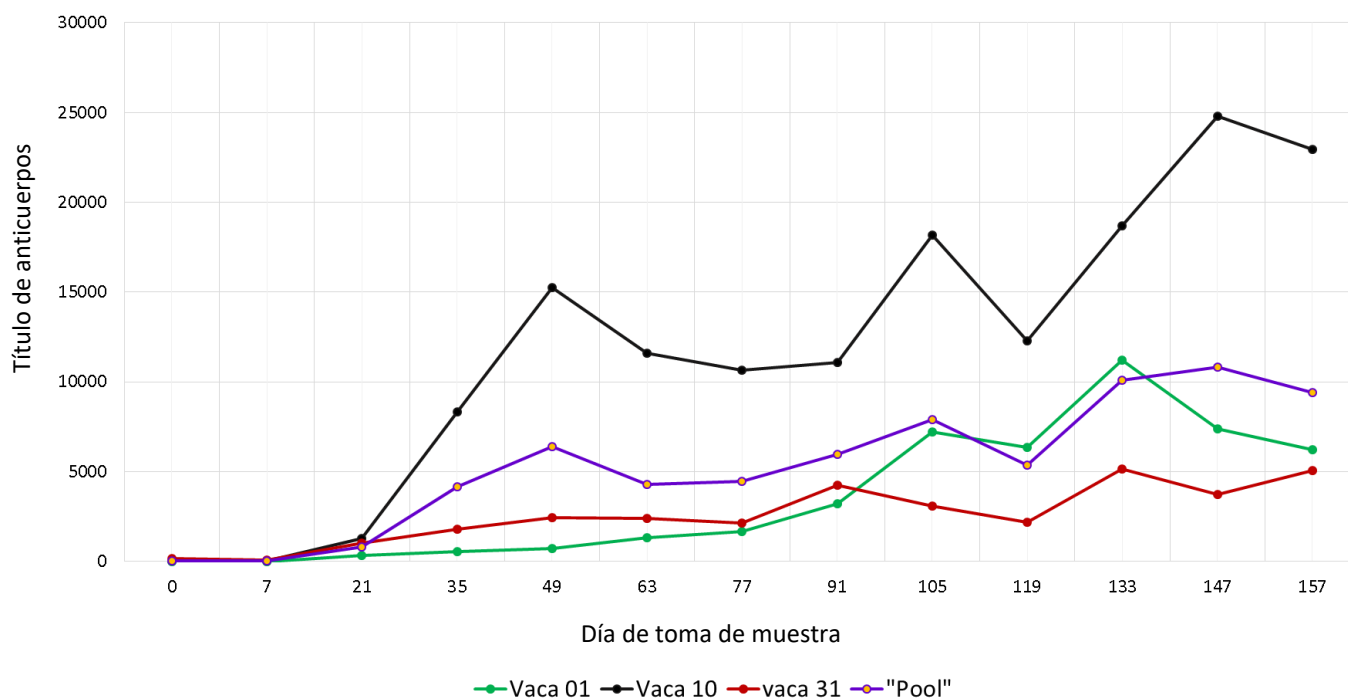
Título de anticuerpos hacia venenos (I.C. 95%)			
Número de sangría	Día	Caballo 203	Vaca 10-3
		Título (Intervalo de confianza)	Título (Intervalo de confianza)
1	0	0 (ND)	19.9 (17.03-23.4)
2	7	0 (ND)	37.6 (32.54-43.5)
3	21	39,414 (33,085-46,952)	1,263 (1,178-1,353)
4	35	123,196 (109,336-138,813)	8,325 (7,948-8,719)
5	49	197,728 (151,044-258,839)	15,248 (14,475-16,062)
6	63	166,067 (137,892-199,999)	11,610 (10,805-12,476)
7	77	177,137 (161,232-194,610)	10,668 (10,154-11,207)
8	91	234,661 (214,159-257,126)	11,066 (10,143-12,074)
9	105	175,949 (205,014-240344)	18,170 (16,837-19,610)
10	119	180,802 (165,254-195481)	12,294 (11,272-13,409)
11	133	247,453 (226,383-263740)	18,680 (17,383-20,074)
12	147	225,873 (151,790-172884)	24,779 (22,539-27,240)
13	157	281,399 (216,375-263648)	22,953 (20,845-25,275)

**Cuadro No. 4.** Comparación de los títulos de anticuerpos contra *A. bilineatus* de caballo y vaca.

ND= No determinado.

La vaca 10-3 fue la que tuvo una mejor respuesta con títulos más altos desde el día 35, gráfica No. 2 Además podemos observar que hay una disminución de los títulos en las muestras que se tomaron después de haber sido inmunizados únicamente con veneno día 77,119 y 157.

### Título de vacas inmunizadas vs *A. bilineatus*

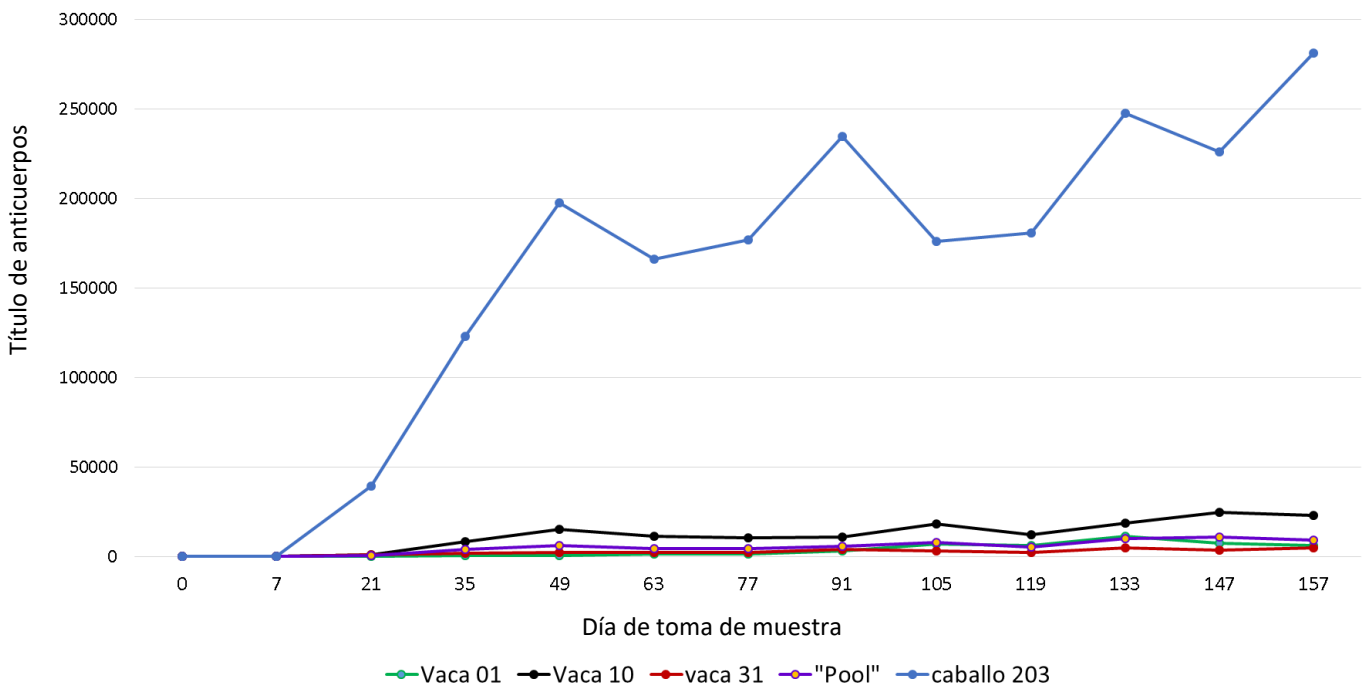


**Gráfica No. 2.** Comparación de los títulos de anticuerpos de los sueros de las tres vacas y el "pool", de las muestras del protocolo de inmunización.

Al evaluar las muestras de calostro que se obtuvieron de las vacas 01-3 y 31-4, se detectaron títulos de anticuerpos de 268.5 y 404.5 respectivamente.

El título de anticuerpos del caballo desde el día 21 supera al de las vacas, incluso comparando este día contra los títulos más altos de la vaca 10-3, gráfica No. 3.

### Título de vacas y caballo inmunizados vs *A. bilineatus*



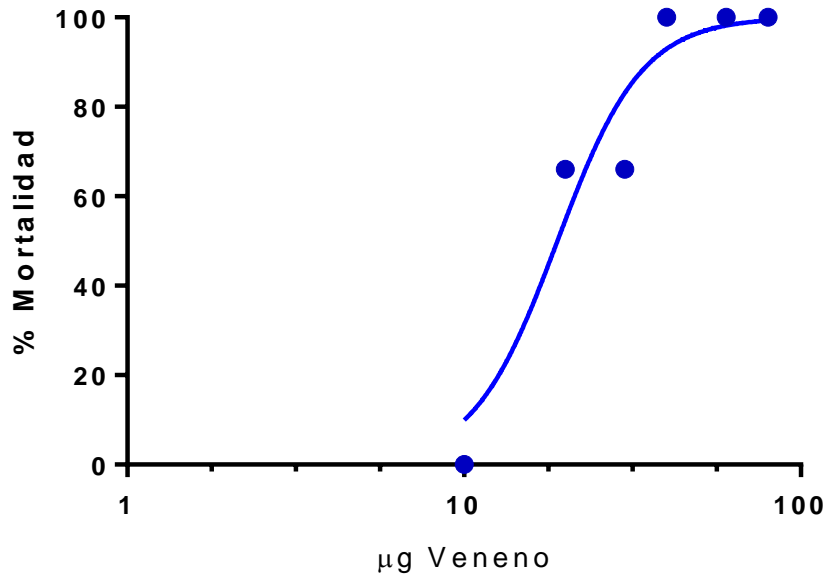
**Gráfica No. 3.** Comparación de los títulos de anticuerpos de los sueros de las vacas, el "pool" y el caballo, contra *A. bilineatus*.

### Dosis letal media (DL<sub>50</sub>)

La dosis letal media determinada en el veneno de *A. bilineatus* por la inoculación intravenosa en seis grupos de ratones de la cepa CD1 fue de 18.93 µg/ratón, con un intervalo de confianza de 13.55 a 26.45, gráfica No. 4.



**Dosis letal media**  
***Agkistrodon bilineatus***



**Gráfica No. 4.** DL<sub>50</sub> de veneno de *Agkistrodon bilineatus*, valores determinados en ratones y fueron obtenidos mediante ajuste sigmoideo dosis-respuesta con el software GraphPad Prism.

**Dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>)**

La dosis efectiva media, es decir, la dosis en la que los sueros son capaces de neutralizar el veneno de *A. bilineatus* en la mitad de la población, y comparando los resultados obtenidos en las vacas, se observa claramente que la vaca 10-3 fue la que tuvo mejor respuesta ya que neutralizó 0.659 mg de veneno por mililitro de suero, el suero de caballo mostro un poder de neutralización ante el veneno 17 veces mayor, Cuadro No. 5.

Modelo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	I.C.	mgV/mL	DL <sub>50</sub> /mL
Vaca 01-3	250.6	65.9 a 952.5	0.227	11.9
Vaca 10-3	87.5	86.9 a 88.04	0.649	34.3
Vaca 31-4	331.6	323.3 a 340	0.171	9
“Pool” de suero de vaca	201.3	ND	0.282	14.9
Caballo 203	5.03	ND	11.30	596.9

**Cuadro No. 5.** Potencia neutralizante de los sueros de vaca, en “pool” y del suero de caballo contra *A. bilineatus*.

I.C= Intervalo de confianza al 95%. “mgV/mL” miligramos de veneno neutralizados por mililitro de suero. “DL<sub>50</sub>/mL”= Dosis Letales Medias neutralizadas por mL de suero, ND: Datos no determinados. Nota: los sueros se retaron con 56.79  $\mu\text{g}$  de veneno de *A. bilineatus*.

## 10. Discusión

Dentro de los adyuvantes más utilizados para potencializar la respuesta inmune están el adyuvante incompleto de Freud (IFA) e hidróxido de aluminio. Ambos son altamente irritantes e incrementan las reacciones adversas en el sitio de inyección ya que tienen una lenta biodegradabilidad y biocompatibilidad (Morris *et al*, 1999; Spickler & Roth, 2003), pero por otro lado dan la ventaja de una lenta y prolongada liberación de antígenos, reclutar células presentadoras de antígeno, principalmente las células dendríticas y consecuentemente provocando la estimulación de linfocitos en los nódulos linfáticos regionales (Batista *et al*, 2014), observándose macroscópicamente la inflamación local que puede ser transitoria a leve o ser duradera e intensa, originando dolor local con eritema y aun hasta la formación de granulomas, y que pueden avanzar hasta la formación de quistes, abscesos, úlceras y necrosis (Batista *et al*, 2014).

Estas reacciones fueron observadas previamente al inmunizar caballos con el toxoide diftérico, estos presentaron, títulos más elevados de antitoxinas comparados con los caballos que no desarrollaban abscesos (Vogel, 2000), por lo que ante tales lesiones existe una respuesta inmunitaria agresiva en la zona de inoculación del adyuvante con el antígeno, consecuentemente una respuesta más eficiente por parte del sistema inmune, en el caso de las vacas, estas presentaron únicamente pequeñas nodulaciones en las zonas de inoculación, hallazgo que podría interpretarse como una baja estimulación del sistema inmune a los componentes del veneno inoculado.

### **Cuantificación del nivel de reconocimiento de los anticuerpos por inmunoensayo enzimático ligado a enzimas (ELISA-i)**

Se sabe que después de la exposición constante a un antígeno, hay una diversificación sustancial de las células B por la inmunización y una selección rigurosa por las variantes de mayor afinidad (Wingren, 2007), por lo que al cuantificar los anticuerpos en la primera (muestra basal) y la segunda muestra, tanto de las vacas como del caballo, indica un nivel bajo de anticuerpos en la primera muestra. De las tres vacas inmunizadas, la vaca 10-3, no gestante,

mostró título de anticuerpos más alto en comparación con las otras dos vacas gestantes desde la segunda inmunización, y desde este momento los valores en los títulos fueron sobresalientes ya que las vacas gestantes en ningún momento pudieron alcanzar los valores de la vaca 10-3 no gestante.

La evolución de los títulos séricos de las vacas y el caballo tuvieron un comportamiento similar aumentando gradualmente hasta el día 63 y 77 (inmunización 5° y 6°) en donde presentan una disminución importante, este comportamiento se repite en los días 119 y 157 (9° y 12° inmunización).

Es importante mencionar que las fechas señaladas en la disminución en los títulos corresponden a la administración de antígeno pero sin adyuvante.

Otro factor a considerar es que cuando se inyecta el veneno sin adyuvante la inoculación se realiza en cada lado del cuello y al inyectar el veneno con adyuvante se inyectan cuatro aplicaciones, facilitando el reconocimiento del antígeno como se mencionó antes, estimulando el sistema inmune y la producción de anticuerpos (Theakston *et al*, 2003).

En el caso de las vacas gestantes 01-3 y 31-4 los títulos son menores casi 4 veces en la última muestra obtenida (día 157) comparados con el de la vaca 10-3, esto podría atribuirse a que al estar en gestación los animales pasan por un proceso de inmunosupresión y ante este estado se evitara el rechazo del embrión o feto en desarrollo (Armenta *et al*, 2011).

Por otro lado, en humanos y en animales domésticos durante la gestación se han observado cambios en el sistema inmunológico, los linfocitos de sangre periférica subtipos T, NK y B se encuentran disminuidos en número al igual que en sus funciones, además en la última semana de gestación en vacas, la estimulación policlonal de células mononucleares se ve reducido al igual que la producción de IFN- $\gamma$  hasta el periodo perinatal, observaciones importantes que explicarían la susceptibilidad de las hembras a presentar infecciones durante la gestación y en el periodo perinatal (Gutiérrez, 2010).

Al inicio del protocolo de inmunización, las vacas estaban en el segundo tercio de gestación, y esto podría ser la causa de la disminución de la respuesta a las inmunizaciones, sin embargo, hubo una evolución gradual en los títulos de

anticuerpos, aunque no fue tan elevada como en el caso de la vaca 10-3 no gestante. En cuanto a la respuesta inmunitaria entre individuos, la probable diferencia existente podrían afectar el grado de esta ante las inoculaciones del veneno entre ellas a pesar de encontrarse en el mismo estado fisiológico, condiciones climáticas, de alimentación y de manejo, si hubo diferencias en los títulos de anticuerpos.

Comparando los títulos de anticuerpos de la vaca no gestante 10-3 entre el título del caballo 203, en este último se incrementaron desde la tercera muestra de suero, y a partir de ese momento, los títulos en la vaca, comparados con los del caballo, se mantuvieron por debajo hasta la última muestra de suero, siendo el título en el suero del caballo 12 veces mayor con respecto al título de anticuerpos de la vaca. Desde un punto de vista fisiológicas de ambas especies, los caballos tienen una mayor concentración de IgG en sangre periférica, con valores entre 60 y 90 mg/mL en cambio las vacas solo llegan a tener un valor entre 11 y 20 mg/mL (Micusan & Bourdas, 1977; Pastoret *et al*, 1998), por lo que el título de anticuerpos estaría condicionado ante tal diferencia resultando más alto en el caballo que en la vaca, no obstante la respuesta al antígeno es muy importante ya que los anticuerpos son altamente específicos

La producción de anticuerpos se beneficia por el uso de adyuvantes y la reacción que se presente en la zona de inoculación, si las lesiones son más agresivas habrá una mejor respuesta por parte del sistema inmune, atrayendo a mayor cantidad de células presentadoras de antígeno, promoviendo una mayor liberación de linfocinas (Tizard, 2004). El que los caballos tengan una reacción más fuerte en las zonas de inoculación del veneno, podría significar una ventaja que lo coloca como un modelo excelente para la producción de anticuerpos.

### **Dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>)**

La calidad de un antiveneno no se mide por el título de anticuerpos, se mide por la cantidad de veneno que es capaz de neutralizar antiveneno por mililitro. Debido a que no todos los anticuerpos que reconocen el veneno en las pruebas *in vitro* son capaces de neutralizar los componentes responsables de la letalidad, es necesario realizar pruebas en las que se enfrente el suero con el

veneno en un modelo *in vivo* y evaluar la eficiencia que existe con diferentes volúmenes de suero.

Para esta prueba los sueros con anticuerpos neutralizantes de las tres vacas y del caballo se desafiaron con el veneno de *A. bilineatus*. Las vacas gestantes mostraron una  $DE_{50}$  más baja, por lo que fue necesario una mayor cantidad de suero para neutralizar los componentes letales del veneno con 0.171 y 0.227 mg de veneno por mL de suero (mgV/mL) para la vacas 31-4 y 01-3 respectivamente, en cambio el suero de la vaca 10-3 mostró un poder neutralizante de 0.649 mgV/mL, diferencias probablemente atribuibles a la fisiología y variabilidad biológica habitual mencionadas arriba.

Comparando el poder neutralizante de la vaca 10-3 no parece ser tan impresionante ante el obtenido con el de caballo 203, ya que se observó que 1 mL de suero de equino fue capaz de neutralizar 11.3 mg de veneno, diferencia 17 veces mayor, lo que nos confirma que el caballo es un mejor modelo para la producción de antivenenos que la vaca.

Así, la diferencia tan grande entre las vacas se puede mencionar que la eficiencia para neutralizar los componentes será por las diferencias entre individuos, y por otro lado, al comparar a las vacas con el caballo podemos sugerir que se debe a las diferencias entre especies y principalmente en el sistema inmune en la rama humoral.

En los caballos se han detectado cuatro subtipos de IgG: IgGa, IgGb, IgGc e IgG (T) (Fernandes *et al*, 1991). Los mismos autores evaluaron los subtipos IgGa e IgG (T), y demostraron que ambos tienen la mayor especificidad para la neutralización de la letalidad y otras actividades importantes del veneno (Fernandes, 2000), observación demostrada en la evolución del sistema inmune del caballo dado que predominan las IgG (T) sobre todas las subclases de IgG al someterse a un protocolo de inmunización con veneno (Aguayo, 2017).

Fernandes en 1997, sugiere que la IgG (T) neutralizan con mayor eficiencia que la IgGa, mostrando mayor afinidad, mayor cantidad de anticuerpos o ambas y aunque no hay una diferencia en la habilidad de los subtipos de IgG para reconocer los antígenos del veneno, la producción de IgG (T) es mayor, seguida de IgGa, IgGb e IgGc (Fernandes, 1997; Fernandes, 2000).

## **Reacción de hipersensibilidad en ratón.**

Durante la obtención de la  $DE_{50}$  en la vaca 01-3, se observó que aumentando el volumen de suero inoculado en más de 300  $\mu$ L, incrementaba la mortalidad del grupo de ratones CD-1. Por esta razón se decidió inocular tres grupos de ratones con 250, 300 y 350  $\mu$ L de suero de la muestra 13 de la vaca 01 en un volumen final de 0.5 mL de NaCl 150 mM por ratón y se mantuvieron dos horas en observación ya que los ratones inoculados presentaron prurito intenso generalizado, 20 minutos después de la inoculación, seguida de letargia, sin embargo ninguno de los ratones inoculados con suero murió debido a esta reacción.

Para descartar que la reacción fue provocada por algún componente propio del suero de las vacas, se inocularon 500  $\mu$ L de suero de las vacas 10-3, 31-4 y el "pool", y a pesar de que se inocularon volúmenes mayores de suero, los ratones no presentaron reacción a la inoculación. Por último se inocularon 500  $\mu$ L de suero preinmune de la vaca 01, para comprobar que la reacción de los ratones no fuera de específica de la muestra de suero 13. Los ratones presentaron prurito intenso generalizado 10 minutos después de la inoculación, confirmando que la reacción que presentan es específica de la vaca 01-3. Por lo tanto, se puede mencionar que el suero de la vaca gestante 01-3 tiene algún componente inespecífico que provocó una reacción de hipersensibilidad tipo III que resultó en la formación de inmunocomplejos, no así con el suero de las otras dos vacas. (Kindt *et al*, 2007).

Este tipo de reacción ocurre cuando los inmunocomplejos activan una serie de moléculas efectoras del sistema del complemento conocidas como C3a y C5a actuando como anafilatoxinas que producen degranulación localizada de los mastocitos y un aumento de la permeabilidad vascular local. Los productos C3a, C5a y C5b67 actúan como factores quimiotácticos para los neutrófilos, que pueden acumularse en grandes números en el sitio de depósito del inmunocomplejo desarrollándose vasculitis (Kindt *et al*, 2007).

## 11. Conclusiones

- El bovino es una especie animal alterna en la producción de antivenenos contra *Agkistrodon bilineatus* comparándola bajo condiciones similares de mantenimiento como el equino.
- Las vacas sometidas a un protocolo de inmunización contra veneno de *A. bilineatus*, generaron anticuerpos capaces de reconocer los componentes del veneno en pruebas *in vitro* e *in vivo* con títulos de 5,121, 22,956 y 5,076, y DE<sub>50</sub> de 0.227 mgV/mL, 0.64 mgV/mL y 0.171 mgV/mL (vacas 01-3, 10-3 y 31-4 respectivamente)
- A pesar de que las vacas tienen los mismos órganos linfoides y una fisiología inmunológica similar a la del caballo, las inmunoglobulinas de vaca no son igual de eficientes a la de los caballos para reconocer y neutralizar el veneno de *A. bilineatus*, ya que los valores detectados en este estudio fueron títulos de 281,339 y DE<sub>50</sub> de 11.30 mgV/mL en comparación con 22,956 y 0.649 mgV/mL de la vaca 10-3.
- El caballo es el modelo de elección para la producción de antivenenos y al hacer la comparación con las vacas se concluye que es el mejor modelo para este propósito, además de los factores de manejo, adaptabilidad y volumen sanguíneo, poseen una mejor eficiencia para la producción de anticuerpos capaces de reconocer y neutralizar los componentes del veneno con valores 17 veces mayores.
- Se desconocen los factores específicos que ocasionaron las reacciones de hipersensibilidad observadas en los ratones ante el suero de la vaca 01-3.



## Sugerencias

- Demostrar si en el bovino, el sexo es o no un factor importante en la calidad del suero. Se recomienda utilizar en ese trabajo futuro, novillos castrados.
- Así mismo, demostrar si el estado de gestación o no es otro factor limitante en la calidad del suero contra el veneno de *A. Agkistrodon bilineatus* para evitar reacciones colaterales de hipersensibilidad en la evaluación de la calidad de antivenenos.

## 9. Literatura citada

- Aguayo O. (Comunicación personal 11 de octubre de 2017).
- Aguilar J., Rodríguez E. 2007. *Vaccine adjuvants revisited*. *Vaccine*. 25: 3752-3762.
- Aimanianda V., Haensler J., Lacroix-Desmazes S., Kaveri S., Bayry J. 2009. *Novel cellular and molecular mechanisms of induction of immune responses by aluminum adjuvants*. *Trends in pharmacol. Sci.* 30 (6) 287-295.
- Armenta O., Villaseñor N., Arroyo C., Soto E. 2011. *Modulación de la respuesta inmunológica durante el embarazo*. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 37 (2) pp. 277-287.
- Batista A., Lastre M., Perez O. 2014. *Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas*. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 32:(2) pp. 106-114.
- Brandan N., Aquino E., Codutti A. 2007. *Respuesta inmunitaria*. Catedra bioquímica. Facultad de Medicina. UNNE.
- Calderón A. 2011. *Caracterización de la respuesta inmune humoral en caballos contra el veneno de *Micrurus tener**. Tesis de maestría. Instituto de biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.
- Casasola A., Ramos B., De Roodt A., Carbajal A., Chippaux J., Alagón A., Stock R. 2009. *Paraspecific neutralization of the venom of African species of cobra by an equine antiserum against *Naja melanoleuca*: A comparative study*. *Toxicon*. 53 (6): 602-608.
- Castrillón D., Acosta J., Hernández E. y Alonso L. 2007. *Envenenamiento ofídico*. *Salud Uninorte*. Barranquilla. 23 (1): 96-111.
- Chippaux J. 1992. *Production and use of snake antivenin*. *Handbook of natural toxins* 5 (17): 529-552.
- De Roodt A, Litwin S, Estevez J, Gould E, Dolab J, Gould J. 2010. *Comparación entre dos métodos de producción para la elaboración de antivenenos ofídicos*. *Acta Toxicol. Argent.* 18 (1): 10-20.

Fernandes I., Lima E., Takehara H., Moura-da-Silva A., Tanjoni I. Gutiérrez J. 2000. *Horse IgG isotypes and cross-neutralization of two snake antivenoms produced in Brazil and Costa Rica*. *Toxicon*. 38. pp 633-644.

Fernandes I., Takehara H., Santos A., Cormont F., Latinne D., Bazin H. Mota I. 1997. *Neutralization of bothropic and crotalic venom toxic activities by IgG (T) and IgGa subclasses isolated from immune horse serum*. *Toxicon*. 35 (6): pp. 931-936.

Fernandes I., Takehara A. Mota I. 1991 *Isolation of IgG<sub>T</sub> from hyperimmune horse antislake venom serum: Its protective ability*. *Toxicon*. 29 (11) pp 1373-1379.

Gold B., Dart R., Barish R. 2002. *Bites of venomous snakes*. *The New England J. Med.* 347 (5): 347-357.

Gold B., Barish R., Dart R. 2004. *Nort American snake envenomation: diagnosis, treatment, and management*. *Emerg. Med. Clin. Nort Am.* 22: 423-443.

González A., Chico P., Domínguez W., Iracheta M., López M., Cuellar A., Zamora V. 2009. *Epidemiología de las mordeduras de serpiente*. *Acta pediatria Mex.* 30 (3): 182-191.

Gutiérrez J. 2010. *Inmunología veterinaria*. Editorial Manual moderno, 1a ed.

México, DF. obtenido el 1 junio de 2017 de:

[https://books.google.com.mx/books?id=mEnHCQAAQBAJ&pg=PA26&lpg=PA26&dq=Modulaci%C3%B3n+de+la+respuesta+inmune+en+vacas&source=bl&ots=FCf6JPkhf6&sig=wcLF8e3f3NnHET6ygrav2kmB2EU&hl=es-](https://books.google.com.mx/books?id=mEnHCQAAQBAJ&pg=PA26&lpg=PA26&dq=Modulaci%C3%B3n+de+la+respuesta+inmune+en+vacas&source=bl&ots=FCf6JPkhf6&sig=wcLF8e3f3NnHET6ygrav2kmB2EU&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiky-zlgp3UAhXly1QKHxUyCxoQ6AEIQzAE#v=onepage&q=gestaci%C3%B3n&f=false)

[419&sa=X&ved=0ahUKEwiky-](https://books.google.com.mx/books?id=mEnHCQAAQBAJ&pg=PA26&lpg=PA26&dq=Modulaci%C3%B3n+de+la+respuesta+inmune+en+vacas&source=bl&ots=FCf6JPkhf6&sig=wcLF8e3f3NnHET6ygrav2kmB2EU&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiky-zlgp3UAhXly1QKHxUyCxoQ6AEIQzAE#v=onepage&q=gestaci%C3%B3n&f=false)

[zlgp3UAhXly1QKHxUyCxoQ6AEIQzAE#v=onepage&q=gestaci%C3%B3n&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=mEnHCQAAQBAJ&pg=PA26&lpg=PA26&dq=Modulaci%C3%B3n+de+la+respuesta+inmune+en+vacas&source=bl&ots=FCf6JPkhf6&sig=wcLF8e3f3NnHET6ygrav2kmB2EU&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiky-zlgp3UAhXly1QKHxUyCxoQ6AEIQzAE#v=onepage&q=gestaci%C3%B3n&f=false)

Hirst K. 2017. Cattle (*Bos spp.*) *History of the Domestication of Cows and Yaks*. Consultada el 22 de mayo de 2017, de: <https://www.thoughtco.com/history-of-the-domestication-of-cows-170652>

Instituto Clodomiro Picado. 2009. *Envenenamiento por mordedura de serpiente en Centroamérica*. Universidad de Costa Rica. pp 1-31.

- Kindt T., Goldsby R., Osborne B. 2007. *Inmunología de kuby*. Mc Graw-Hill interamericana. Sexta ed. México, D.F. pp 391-393.
- Köning H., Liebich H. 2002. *Anatomía de los animales domésticos tomo II*. 2da edición. Ed. Médica Panamericana. México, DF.
- Lallo D., Theakston R. 2003. *Snake antivenoms*. *J. Toxicol.* 41: 277-290.
- Luna-Bauza M., Martínez G., Salazar C. 2004. *Mordeduras por serpiente. Panorama epidemiológico de la zona de Córdoba, Veracruz*. *Revista de la Facultad de Medicina*. 47 (4): 149-153.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 1999. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Montilla J., Álvarez M., Díaz E., Urdaneta S. 2007. *Hiperinmunización de ovinos contra veneno de Bothrops asper del Estado Zulia, Venezuela: Estudio preliminar*. *Revista Científica*, 17(6): 632-640.  
Consultada: el 11 de enero de 2017.  
[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592007000600012&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592007000600012&lng=es&tlng=es).
- Morris H., Martínez C., Abdala R., Campos D. 1999. *Adyuvantes inmunológicos*. *Revista Cubana de investigaciones Biomédicas*. 18 (2) pp. 130-137.
- OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. 2016. *Código Sanitario para los Animales Terrestres, Capítulo 11.4, Encefalopatía Espongiforme Bovina*. Paris, Fr. Consultado el 10 de agosto de 2017 de, [http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre\\_bse.htm](http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre_bse.htm)
- OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. 2016. *Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)*. Paris, Fr. Consultado el 27 de junio de 2017, de: [www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media\\_Center/docs/pdf/Disease\\_cards/BSE-ES.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/BSE-ES.pdf).
- OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. 2017. *Resolución N° 26 Reconocimiento del estatus sanitario de los Países Miembros respecto al riesgo de encefalopatía espongiforme bovina*. Paris, Fr.

- Owen, J., Punt, J., Stanford, S., Jones, P. 2014. *Inmunología Kuby*, 7a ed., Ed. Mc-Graw-Hill, México, DF.
- Pastoret P., Griebel P., Bazin H., Govaerts A. 1998. *Handbook of vertebrate immunology*. Academic Press, 1a ed. California, USA. 439-471.
- Peterson M. 2006. *Snake bite: Pit Vipers*. Clinical Techniques in small animal practice. 21(4):174-182.
- Porras L., Wilson L., Schuett G., Reiserer R. 2013. *A taxonomic reevaluation and conservation assessment of the common cantil, Agkistrodon bilineatus (squamata: Viperidae): a race against time*. Amphibian and reptile conservation 7(1): 48-73.
- Rojas A. 2011. *Efecto de la alteridad de los anticuerpos equinos sobre la farmacocinética de los antivenenos ofídicos*. Tesis de licenciatura, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
- Román L. 2015. *Caracterización bioquímica e inmunoquímica de venenos de serpientes del genero Agkistrodon*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos.
- Secretaría de Salud. 2010. *Diagnóstico y tratamiento de las mordeduras de serpientes venenosas*. Catálogo Maestro de guías de práctica clínica: SSA-298-10. México.
- Sewall H. 1895. *Experiments on the preventative inoculation of rattlesnake venom*. J. Physiol. 8:203, 1-8.
- Sprickler A. and Roth J. 2003. *Adjuvants in veterinary vaccines: Modes of action and adverse effects*. J. Vet. Intern. Med. 17. pp. 273-281
- Theakston R., Warrell D., Griffiths E. 2003. *Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms*. Toxicon. 41. pp 541-557.
- Tizard I. 2004. *Inmunología veterinaria*. Mc Graw-Hill Interamericana, 6a ed. México, Baja California. pp. 360-371.
- Toche P. 2012. *Visión panorámica del sistema inmune*. Rev. Med. Clin. Condes. 23 (4) pp 445-457.

Uetz P., Freed P. and Hošek J. 2016. *The reptile database*. Consultada: 24 de agosto de 2017. <http://www.reptile-database.org>

Vogel F. 2000. *Improving vaccine performance with adjuvants*. Clin. Inf. Dis. 30 (3) pp. 266-270.

WHO. 2016. *Guidelines for the production control and regulation of snake antivenoms immunoglobulins*. Consultada el 15 de diciembre de 2016, de: [http://www.who.int/bloodproducts/snake\\_antivenoms/en/](http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/en/)

Wingren C. 2007. *Antibody responses: development*. Encyclopedia of life sciences. pp 1-8.

Zúñiga I. and Caro J. 2013. *Aspectos clínicos y epidemiológicos de la mordedura de serpientes en México*. Evidencia médica e investigación en salud. 6 (4): 125-136.