



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LIC. QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL

Manejo y reproducción de ratones CD1 para pruebas de letalidad en venenos y neutralización de antivenenos provenientes de serpientes *Bitis arietans*, *Echis ocellatus* y *Naja haje*

Prestador de Servicio Social:
Karina Citlali Saucedo Durán
Matricula: 2132034909

Asesores:
Dra. Ivonne Michelle Heuze de Icaza
No. Económico: 11261
Dr. Miguel Ángel Zavala Sánchez
No. Económico: 17767

Lugar de realización:
Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio-Bioterio.
Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud,
Delegación Coyoacán, C.P. 04960, Ciudad de México.

Fecha de inicio y término: 15 de octubre 2020 al 15 de abril 2021

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	3
2. JUSTIFICACIÓN	4
3. MARCO REFERENCIAL	4
3.1 UBICACIÓN	4
3.2 CONDICIONES AMBIENTALES	4
4. MARCO TEORICO	5
4.1 Aspectos epidemiológicos	5
4.1.1 <i>Bitis arietans</i> , <i>Echis ocellatus</i>	5
4.1.2 <i>Naja haje</i>	5
4.2 Ratones CD-1	6
4.2.1 Manejo y bienestar animal	6
4.2.2 Sistema de apareo	7
5. OBJETIVOS	7
5.1 OBJETIVO GENERAL	7
5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	7
6. METODOLOGIA	7
7. Resultados y discusión	12
7.1 Letalidad	12
7.1.2 <i>Echis ocellatus</i>	14
7.2 Neutralización	16
7.2.1 <i>Bitis arietans</i>	16
7.2.2 <i>Echis ocellatus</i>	21
8. Conclusiones	25
Cronograma de actividades	26
Bibliografía	27

1. INTRODUCCIÓN

Cada año en el mundo se producen al menos 421 000 envenenamientos y 20 000 muertes, algunas estimaciones marcan que pueden incluso alcanzar los 1 841 000 y las 94 000, respectivamente. Considerando que el envenenamiento ocurre casi en una de cuatro mordeduras, puede inferirse que anualmente se producen entre 1,2 y 5,5 millones de mordeduras. (Temprano y col., 2017), además, estos estudios estiman que alrededor de 400.000 víctimas más quedan con secuelas permanentes (Gutiérrez, 2015).

Las serpientes venenosas abarcan aproximadamente unas 300 especies en todo el mundo, estando distribuidas en 4 familias: Viperidae, Elapidae, Hydrophiidae y Colubridae, teniendo esta última solo unas pocas especies venenosas. Las serpientes que ocasionan mayor incidencia de envenenamientos pertenecen a las familias Elapidae y Viperidae siendo estas las responsables de más del 90% de los accidentes ofídicos. (Yarlequé y col., 2012) (Roodt y col., 2005),

El accidente ofídico es la mordedura de serpientes, estas pueden inocular veneno dependiendo de la especie involucrada, generando lesiones y alteraciones fisiopatológicas en la víctima. (<https://www.minsalud.gob.co/salud>)

En el caso de los venenos de serpientes de la familia Viperidae, los principales efectos tóxicos que inducen son, a nivel local, hemorragia, mionecrosis y edema y, a nivel sistémico, hemorragia y coagulopatías, especialmente desfibrinogénación. En el caso de las serpientes de la familia Elapidae, el efecto predominante es la neurotoxicidad, la cual se ve reflejada en la prueba de letalidad. (Gene y col., 1989)

Por otra parte, la introducción de un nuevo antiveneno para el tratamiento de accidentes (también denominados terapéuticos) están incluidos en la lista de medicamentos esenciales de la OMS dentro de lo cual se menciona que estos deben ser evaluados en su capacidad neutralizante y de efecto letal. (Otero y col., 2002)

Dentro de los principales componentes activo está compuesto por inmunoglobulinas o fragmentos de ellas obtenidos a partir de sueros de animales hiperinmunizados con venenos, usualmente requiere de una validación preclínica, la cual involucra, entre otros análisis, una demostración de su eficacia neutralizante. Tradicionalmente, la eficacia de un antiveneno se ha establecido mediante la prueba de neutralización de la actividad letal de los venenos, también denominada prueba de potencia y letalidad, la cual fue realizada en ratones provenientes de Unidades de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL-Bioterio). (Gene y col., 1989)

Sin embargo, estudios efectuados por diversos grupos durante las últimas décadas han demostrado que una evaluación más completa y rigurosa de la capacidad neutralizante de los antivenenos debe basarse en el análisis de la neutralización no sólo de la letalidad, sino además de otras actividades toxicológicas relevantes que participan en la fisiopatología de estos envenenamientos.

2. JUSTIFICACIÓN

La Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, en conjunto con la UPEAL-Bioterio, mantiene convenios con laboratorios que requieren animales con alta calidad genética y microbiológica, y se encuentra certificado para realizar proyectos de investigación.

En la UPEAL-Bioterio existe un área de bioseguridad nivel 2 (BSL2) la cual es de vital importancia debido a sus características para la realización de las pruebas con anti venenos y personal que labora en la misma está capacitado para realizar actividades propias de un espacio de bioseguridad previamente descrito.

Para la realización de todo estudio dentro de las instalaciones de la UPEAL- Bioterio debe existir una aprobación de un Comité Interno para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio CICUAL-UAMX.

Tomando en cuenta todas las consideraciones anteriores es que se puede optar por realizar los estudios con anti venenos inherentes del presente proyecto de servicio social.

3. MARCO REFERENCIAL

UPEAL-Bioterio (Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio).

3.1 UBICACIÓN

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA. UNIDAD XOCHIMILCO, Calzada del Hueso # 1100 Col. Villa Quietud 04960 Del. Coyoacán. México D.F. TEL 54 83 71 95

La unidad de producción de experimentos de animales de laboratorio está constituida por tres áreas perfectamente establecidas y ubicadas en tres plantas:

- Planta 1: Recepción, banco genético y área de producción de animales, área de lavado, equipos de esterilización, bodegas y cuarto de máquinas.
- Planta 2: bioseguridad e investigación.
- Planta 3: docencia.

3.2 CONDICIONES AMBIENTALES

La UPEAL-Bioterio cuenta con un sistema de ventilación, aire acondicionado y calefacción con extractores e inyección de aire filtrado mediante filtro HEPA.

Temperatura con rangos establecidos entre 19- 22° C, humedad relativa del 45-75%, ciclos de luz 12 horas de luz y 12 de oscuridad, planta de ozono y un sistema automatizado de bebedero.

Este Bioterio cumple con las exigencias tecnológicas y las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y uso de Animales de Laboratorio” y de las internacionales como la “La Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” del National Research Council USA. (<https://www.xoc.uam.mx/bioterio>)

4. MARCO TEORICO

4.1 Aspectos epidemiológicos

El accidente ofídico es la mordedura de serpientes, éstas pueden inocular veneno dependiendo de la especie involucrada, generando lesiones y alteraciones fisiopatológicas en la víctima. Las serpientes venenosas con mayor importancia médica pertenecen a dos familias: Viperidae representadas por las “víboras” y Elapidae representadas por las “corales” o “coralillos”, donde más del 95% de los accidentes ofídicos son ocasionados por serpientes de la familia Viperidae. (Yarleque y col., 2012)

4.1.1 *Bitis arietans*, *Echis ocellatus*

Las serpientes *Bitis arietans*, *Echis ocellatus* pertenecen a la familia *Viperidae* en el cual su veneno consiste en una mezcla de componentes, que incluyen hemorraginas, trombinas y fosfolipasas A2(PLA2). Estas últimas son responsables de muchos signos clínicos, los cuales son generalmente restringidos al área alrededor de la mordedura, y generan ampollas, dolor, hemorragia, cojera aguda en casos de mordedura en las extremidades, linfadenomegalia local y necrosis. Muchas tienen efectos directos o indirectos en las células sanguíneas de las víctimas, en el corazón, en los vasos sanguíneos, en los músculos y en los tejidos blandos. Estos venenos pueden asimismo causar una variedad de disturbios en órganos y tejidos, entre los que se incluyen lesión tisular local, aumento de la permeabilidad vascular, hipotensión, anormalidades severas hemostáticas y coagulopáticas, disfunción del sistema nervioso y depresión respiratoria. (Arias S.,2015)

Igualmente, se ha descrito que el envenenamiento por víboras de la familia *Viperidae* puede inducir lesión miocárdica y arritmias.

4.1.2 *Naja haje*

La serpiente *Naja haje* perteneciente a la familia *Elapidae* los cuales son considerados más graves que los crotálicos y bothrópicos por el cuadro de insuficiencia respiratoria restrictiva por la parálisis diafragmática y de los músculos torácicos. Tales accidentes corresponden a menos del 1 % de los casos (47,50). La examinación cuidadosa de una víctima con sospecha de mordedura por un elápidos debe enfocarse en los labios, la boca y las extremidades distales, en busca de la

presencia de marcas de colmillos, aunque, particularmente, las marcas de los colmillos de coral son pequeños, lucen más como rasguños e incluso pueden estar ausentes. (Arias S., 2015)

4.2 Ratones CD-1

Es un mamífero de sangre caliente, hábitos nocturnos y comportamiento influenciado por feromonas. Tiene habilidades sensoriales como el olfato, que le permiten distinguir entre individuos de su misma familia y los intrusos, territorialidad y localización de la pareja para la actividad sexual. El sentido del tacto le permite los movimientos en la oscuridad y la orientación a seguir mediados por vibrisas (Heuze; 2021). Se caracterizan por la combinación de un agudo sentido del oído capaz de distinguir sonidos ultrasónicos (de 22 kHz a 90 kHz). Están diseñados para ver en la oscuridad, perciben la profundidad y detectan movimientos a 10 m. El desarrollo del sentido del gusto le permite descubrir sustancias amargas, ácidas y tóxicas. Son susceptibles a los cambios de temperatura, afectando su fisiología. El comportamiento y organización social lo definen como especie gregaria, conformando grupos sociales que comparten comportamiento territorial y jerárquico. La actividad sexual del ratón se presenta durante la noche o lo que corresponde al periodo de oscuridad, definidos en los ciclos luz-oscuridad. El patrón reproductivo se caracteriza por ser una especie poliéstrica, con un ciclo estral de duración de 4-5 días, con celo de 12 horas. Tienen la capacidad de entrar nuevamente en estro a las 24 horas posteriores al parto. El periodo de gestación es de 19 a 21 días con un promedio de 8 a 10 crías por camada. Las características al nacer son: peso entre 1-2 g, nacen con los ojos y conducto auditivo cerrados, sin pelaje y poco activos. Al tercer día presentan desarrollo de pelaje, para el día 12 abren los ojos y el conducto auditivo externo, al día 14 inician a comer y se destetan al día 21, con un peso de 11-14 g. Tiene un sistema inmune y genoma similar al de los seres humanos. (Benavides y col., 2003; Heuze, 2019)

El ciclo de vida del ratón va 1 a 1.3 años, lo que le permite ser un modelo ideal en las investigaciones en muchas generaciones y en tiempos cortos. (Fuentes y col., 2008)

Presenta una frecuencia cardiaca de 325-780 latidos por minuto y una frecuencia respiratoria de 60 a 230 por minuto. La temperatura corporal es de 35.5 a 38 °C. (Fuentes y col., 2008)

4.2.1 Manejo y bienestar animal

Los componentes de temperatura, humedad, composición gaseosa y particularmente del aire, deben ser aceptables en el medio del encierro primario, es decir la jaula o caja del animal, debe tener el tamaño y las condiciones adecuadas para un desarrollo óptimo, con el fin de evitar escape y proteger de amenazas externas. (NOM-062-ZOO-1999)

Las cajas deben presentar paredes continuas sólidas y con tapa removible de reja o perforadas, la medida de la caja como espacio mínimo se encuentra referido en cuanto a peso en gramos del ratón, ≤100 g (110 cm² área, 10 cm altura), 100-300 g (187 cm² área, 20 cm de altura), 300-

400 g (258 cm² área, 20 cm altura), 400-500 g (387 cm² área, 20 cm altura) y 500 g (452 cm² área, 20 cm altura). (NOM-062-ZOO-1999)

El material utilizado para la cama debe estar libre de químicos, polvo y microorganismos; la comida y el agua se suministra *ad libitum* (a libertad). La comida se les presenta en forma de pellets de 3 a 5 gramos y el agua se administra acidulada o clorada. El medio ambiente físico del encierro secundario que constituye el macro-ambiente, es la sala donde se ubican las jaulas, la cual debe ser monitoreado para que mantenga una temperatura y humedad relativa confortable. (Anderson, 1996)

4.2.2 Sistema de apareo

Se usan 3 tipos de apareo, las parejas, los tríos y el harem; las parejas pueden ser de por vida (monogamia) los tríos están formados por un macho y dos hembras y el harem consiste en un macho con dos o más hembras. (Benavides y col., 2003)

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Obtención de datos reproductivos y productivos de la cepa CD1 y el efecto mortal y neutralizante de los venenos de serpientes africanas *Bitis arietans*, *Echis ocellatus* y *Naja haje*.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Llevar a cabo un control de los registros de cada lote.
2. Evaluar con los registros los parámetros durante el período de reproducción de las colonias.
3. Mantener en todo momento el bienestar animal de las colonias.
4. Establecer los parámetros para la evaluación de los efectos de antivenenos en la cepa Ratón CD-1.
5. Reportar el número de animales utilizados en el proyecto con antivenenos de serpientes *Bitis arietans*, *Echis ocellatus* y *Naja haje*.

6. METODOLOGIA

El estudio se realizará en la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco ubicada en: Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa quietud, Delegación Coyoacán, código postal 04960, Ciudad de México. Se llevará a cabo un control de crianza, selección pie de cría, apareos, partos, destete

y población existente. El apareo de los ratones CD1 se realizará por medio de un sistema de Harem de reproducción para evaluar los efectos de los antivenenos.

Se recibirá capacitación durante un mes por el M. V. Z. Héctor Sandoval encargado de la realización de los ensayos del convenio, con la supervisión y asesoría de la Dra. Ivonne Michelle Heuze de Icaza, con el propósito de que el personal debe aprender las rutinas diarias, los sistemas de esterilidad de la zona, el manejo de animales, así como actividades que se realizan para el logro de objetivos del proyecto.

Acceso a instalaciones

El bioterio cuenta con un control de acceso el cual consiste en el reconocimiento facial del lector que se encuentra en la entrada principal, la cual monitorea entradas y salidas del personal que labora en las diferentes áreas y la temperatura corporal. Este sistema de control comienza al autorizar el acceso las puertas, las cuales cuentan con un sistema de cortinas de aire que funcionan como una primera barrera para evitar la entrada de insectos o agentes contaminantes al interior de las instalaciones. Las puertas de tipo esclusa, se encuentran en un área restringida exclusiva para el personal del bioterio y alumnos de servicio social y dan acceso a la recepción administrativa, área de vestidores, bodegas, autoclaves y cuarto de máquinas. Una vez que el personal pasa esta puerta con el reconocimiento facial, se dirige a la zona de vestidores para realizar el cambio de ropa y portar la indumentaria esterilizada requerida, que consta de un overol, escafandra y zapatos con suela de hule antiderrapante. Dichas prendas están diseñadas y manufacturadas con tela Chemstat 969 Z Plus de acuerdo con las recomendaciones de “The Institute of Environmental Science and Technology” en “IEST-RP-CC003-2” las cuales pueden ser usadas en clase ISO4 (Clase 10) de bioseguridad las prendas deben de estar certificadas por la fábrica. (Heuze, 2021)

Una vez colocado el uniforme completo se pasa a la regadera de aire filtrado por filtros HEPA con una eficacia de 99.99% la cual no permite el paso de partículas mayores de 0.03 μ . Dicha regadera o ducha de aire funciona automáticamente al cerrarse las puertas por un período de 2 minutos, y no permite la salida hasta no haber concluido con el proceso de desinfección ya que las demás puertas se mantendrán cerradas. En estas áreas no se permite llevar maquillaje, cadenas ni accesorios de ningún tipo, no se pueden utilizar equipos que produzcan ruidos o timbres que perturban a los animales (radios, teléfonos, celulares). Posterior a la ducha y ya en el interior de la unidad de producción, se pisa tapete sanitario y se desinfecta las manos con espuma desinfectante que contiene cloruro de benzalconio al 0.1% marca Noback de Pharmacal Research Lab, logrando su acción a los 15 segundos y se utilizan guantes desechables de látex (Heuze, 2021).

Los pisos, paredes y techos de los cuartos del banco genético cuentan con pintura epóxica para evitar contaminaciones por el subsuelo. A su vez cada cuarto dispone de 4 filtros HEPA terminales para purificación del aire y con un sistema automatizado integral de ventilación, aire acondicionado y calefacción (SVAAC) es monitoreado las 24 horas del día. La temperatura se debe de mantener a 21°C +/-3 con una humedad de 40 a 60% estos parámetros se imprimen y registros semanales. (UAMX, 2020)

Los animales son alojados en cajas aisladoras estáticas de polisulfonato, de medidas estándar para reproducción de 31.8 x 23.5 x 15.2 cm se utiliza cama de madera de la marca CRIGAMEX, el cual esta esterilizada en autoclave, rejillas de acero inoxidable para evitar que los animales salgan e invadan otras cajas y bebederos. Se administra alimento comercial PMI-5001 para roedores de la marca LABDIET y agua ad libitum ozonizada y desinfectada por rayos UV.

El fotoperiodo de los animales debe de ser de 12 horas luz 12 horas oscuridad controlado en forma automática por timer's digitales programados.

El agua proporcionada es filtrada y purificada con ozono para evitar que los animales se contaminan con agentes infecciosas. Está se monitorea cada 3 meses y desinfecta las tuberías cada mes con aumento de la cantidad de ozono pase por las tuberías durante 15 minutos.

La planta baja del UPEAL-Bioterio se encuentra dividida por un área blanca, 6 cuartos y/o áreas, las cepas de ratón CD-1 se encuentran en el cuarto número 2 y 4 respectivamente. También cuenta con un pasillo gris y área de lavado

El área donde se lleva a cabo la investigación de antivenenos es el área de bioseguridad. Cada lote tiene aproximadamente 20 cajas con 6 ratones cada una, los cuales se inoculan los días, martes, miércoles y jueves de cada semana. Debido a la delicadeza y manejo de los animales las actividades se realizan exclusivamente en el área manteniendo las puertas cerradas no permitiendo la entrada de personal ajeno a esta.

Se deberá llevar un control adecuado de los pareos y destetes, además de dos veces por semana hacer cambios de caja de cada lote para mantenerlos limpios y en perfecto estado de bienestar a los animales, en cuanto al manejo de animales se utilizan guantes. Para no tener la dificultad en la manipulación de estos, para el traslado de los ratones de una caja a otra se sujetan de la región media de la cola con los dedos índice y pulgar.

Para la realización de los apareos el pie de cría se selecciona tanto hembras como machos deben tener un peso aproximado 25 g en machos y 20 g en hembras, ya que se toma como indicativo que se encuentren en su etapa de pubertad que s aproximadamente a las 9 semanas de edad.

Por otra parte, no deben tener colas mordidas o presentar algún problema neurológico el cual se manifiesta cuando estos se encuentran dando vueltas, al presentar alguna de estas características negativas se debe de realizar la eutanasia en la cámara de CO₂.

En cada caja se introducen de dos a tres hembras por un macho al azar para incrementar una reproducción y asegurar un mayor número de hembras gestantes en cada lote, las cajas se deberán rotular especificando en número de hembras por macho, así como número de servicio, después se anotará los datos correspondientes del apareo con la tarjeta de registros. Posteriormente él macho se rota a los 7 días y se saca a los 7 días para que entre en el siguiente apareo y/o lote correspondiente.

Después de la salida del apareo, las hembras se mantienen en observación durante la gestación ya que el manejo de estas debe de ser muy cuidadoso para evitar estresarlas, para los cambios

estás cajas se preparan con encamado de madera estéril algodón o papel ya que las hembras antes de parir preparan un nido, la manipulación de las crías lactantes debe de ser de manera suave y tranquila, tomarse en pequeños grupos y pasarlos cuidadosamente entre la palma y los dedos de la mano extendidos y juntos devolviendo la camada lo más pronto posible, evitando que la madre se dé cuenta. A los 21 días que es el tiempo entre el parto al destete se observa y registra el número de hembras no gestantes.

En el caso de los destetes son llevados a cabo a los 21 días de nacidos y se realiza el sexado de crías, observando la zona perianal en donde se evalúa la distancia entre la papila genital y la apertura anal, en el macho es casi el doble. Posteriormente hembras y machos se separan en cajas de 25 a 30 individuos para formar grupos o colonias ya que es un animal muy sociable, y así evitar comportamientos agresivos entre ellos, además de que se mantiene un control y manejo adecuado de todos los animales. En los casos en que se observe que las crías aún no están preparadas para el destete porque son demasiado pequeñas debido a diferencia de días en el nacimiento, permanecen de tres a cuatro días más con sus madres. Posteriormente se lleva a cabo un registro de hembras no gestantes, de primero segundo servicio y se separan para un segundo servicio o eutanasia. Cabe mencionar que el lote en donde se desteta para la investigación entraría el siguiente apareó 7 días después y así se repite procedimiento.

Los animales destetados se colocan en un rack para producción, los cuales permanecen hasta alcanzar un peso de 18 a 20 g para ser asignados a la investigación.

Para llevar a cabo algún procedimiento como cambios de caja, los racks se limpian y desinfecta. Dos veces por semana los bebederos son lavados con cepillo y desinfectados, el agua es renovada cada dos días eliminando todo el contenido residual de estos y revisando que no se encuentran tapados. Los materiales, así como utensilios son exclusivos de cada área para mantenerlos en buenas condiciones de uso y evitar que actúen como vectores de microorganismos o contaminación cruzada.

Las cajas sucias se trasladan mediante un carro transportador por el pasillo gris hacia el área de lavado. Los desechos como encamado sucio se depositan en bolsas de polietileno transparentes y de igual manera se trasladan por el pasillo gris donde el personal encargado les da el manejo adecuado. Por otra parte, todo animal encontrado fuera se le realiza eutanasia y no debe ser devuelto a su colonia. Tanto los animales encontrados muertos en alguna caja y aquellos que se llevan a eutanasia, deben de ser depositados en bolsas amarillas para residuos peligrosos biológicos infecciosos (RPBI) y son llevados a un congelador en donde posteriormente el personal encargado los traslada al incinerador.

Actividades realizadas procedimiento para los apareos:

1. Antes de iniciar el apareó el operador deberá ponerse un par de guantes estériles y se produce a realizar esta operación
2. Las cajas se recogen manualmente en el área blanca donde ya se encuentra limpias y desinfectadas se llevan al cuarto mediante un carro transportador
3. Colocar las cajas limpias de un lado aproximadamente 60 cajas que son el total que se coloca por lote

4. Las cajas se preparan con cama de madera estéril rejilla y bebedero limpio
5. Para realizar los apareos se toman las siguientes consideraciones se identifica número de lote donde entrara nuevo apareo se selecciona el pie de cría al azar conforme a los estándares de la cepa
6. Meter en apareo de dos a tres hembras con un macho por jaula
7. Llenar el registro preestablecido por los procedimientos operacionales de trabajo del bioterio marcando el número de lote correspondiente número de cajas, inicio de apareo salida de apareo parto y destete (Heuze, 2021)

Procedimiento para cambio de cajas

1. Antes de iniciar el cambio el operador deberá ponerse un par de guantes estériles
2. Las cajas se recogen manualmente en el área blanca donde ya se encuentra limpias y desinfectadas se llevan al cuarto mediante un carro transportador
3. Se preparan con cama de madera estéril rejilla y bebedero limpio
4. Se quita la rejilla para poder cambiar a los animales de caja
5. No se debe tocar el interior para no contaminar a los animales por estar en contacto de áreas no estériles
6. Revisar el nivel de agua del bebedero de la caja limpia observando la válvula de éste que indica si sale o no la agua
7. Colocar la rejilla en la jaula limpia y agregar al alimento junto con el bebedero limpio y lleno de agua
8. En caso de observar que algún animal está dando vueltas o mordido será necesario llevarlo a la cámara de CO₂ para eutanasia
9. Entre cada actividad se debe cuidar que los animales no tengan contacto con cualquier superficie para evitar los riesgos de contaminación
10. Este procedimiento se repetirá en cada cambio de jaula
11. Al término de estas actividades se lleva el control y registro en las tarjetas de cada lote con las anotaciones y observaciones correspondientes
12. Al finalizar se produce de sacar jaulas y rejas las cuales se trasladan por el pasillo gris y se llevan al área de lavado dejándose en el lugar destinado. (Heuze, 2021)

Finalmente, establecer los parámetros para la evaluación de los antivenenos en las cepas de ratón antes referidas.

Inoculación

Para realizar la inoculación por vía intravenosa es necesario separar a los animales en las cajas donde permanecerán el tiempo necesario para reportar la sobrevivencia, dicho tiempo será de entre 24-48 horas dependiendo que tipo de prueba se realiza letalidad o neutralización.

Una vez que se han dispuesto los ratones en cada caja se colocan bajo una fuente de calor donde permanecerán alrededor de 4 min previo a la inoculación, esto induce una irrigación adecuada en la vena caudal la cual facilita la inoculación.

El inóculo se mantendrá en refrigeración una vez preparado y antes de la inoculación deberá estar a temperatura ambiente, se utilizará jeringas 25G X16 mm (25G X 5/8") 0.50 x 16 mm, las cuales se llenarán hasta los 3 cm³ y se utilizara una jeringa por grupo; ya que los ratones permanecerán el tiempo suficiente bajo la fuente de calor se produce la inoculación tomando al animal de la cola y colocándolo en un cepo de acrílico. Se inoculará 0.5 ml del inóculo correspondiente a cada individuo, una vez terminado la inoculación se retira la jeringa y se coloca algodón en el área de punción para evitar un sangrado excesivo. Terminando este procedimiento se colocan los animales en grupos de 6 proporcionándoles agua y alimento ad libitum.

Se tomarán reportes de la supervivencia de los animales en cada grupo y se realizara un reporte del mismo.

7. Resultados y discusión

Se determinó la actividad letal y potencia neutralizante de 2 antivenenos provenientes de serpientes *Bitis arietans* y *Echis ocellatu*, sin embargo, no se pudo obtener datos de la serpiente *Naja haje* debido a que no se presentaron pruebas para la inoculación.

Para el uso de animales de laboratorio (ratón) cepa CD1 estos se mantuvieron en constante mantenimiento, cumpliendo siempre con el bienestar animal. Para esto se les mantuvo con constante agua y alimento, así como de enriquecimiento ambiental. Para cada concentración de dosis se tomaron 5 animales los cuales fueron inoculados vía intravenosa y se recolectaron los datos a las 48 horas tomando en cuenta la cantidad de animales muertos.

7.1 Letalidad

Para la obtención de la actividad letal (DL50) se utilizó el método logarítmico en el programa Excel, los resultados fueron los siguientes:

7.1.1 *Bitis arientans*

CUADRO 1. RESULTADOS DE TOXICIDAD EN LAS DOS REPLICAS A 48 h

CEPA CD-1 Lote	Concentración $\mu\text{l/r}$	No. de organismos muertos por concentración	Mortalidad (%)
12/01/21-14/01/21 1512001408 (Grafica 1)	30	5	100
	25	4	80
	20	2	40
	15	0	0
	10	0	0
27/04/21-29/04/21 1512001408 (Grafica 2)	30	5	100
	25	4	80
	20	3	60
	15	1	20
	10	0	0

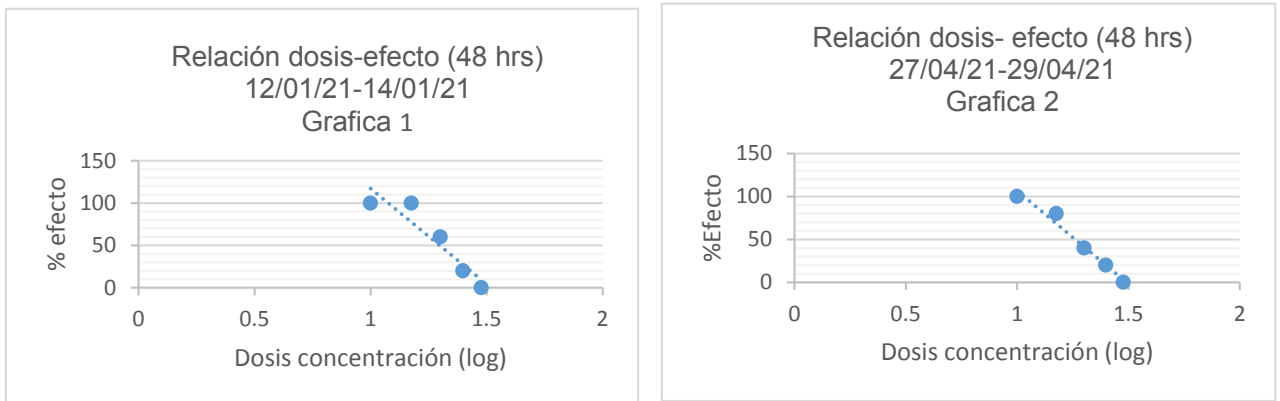
Cuadro 1 muestra los resultados obtenidos, 48 horas después de la inoculación donde se observa que dicho estudio se duplico en diferentes fechas, demostrando una pequeña variabilidad en cuanto al número de organismos muertos por concentración.

La variabilidad se observa principalmente en el rango de 15-20 $\mu\text{l/r}$ donde la mortalidad aumenta a 60%, a una concentración de 20 $\mu\text{l/r}$, donde primeramente se había observado una mortalidad del 40%.

A pesar de que la diferencia en cuanto cantidad de animales muertos por concentración es de 1 demuestra una variabilidad que se puede deber al método de preparación de cada dosis, así como de la presencia de productos inertes y a una descomposición de algún componente toxico del veneno.

La determinación de la dosis letal 50 (DL 50) de cada curva de concentración se realizó por el método logarítmico, utilizando la ecuación de la recta se determinó una DL50 de de 19.8135085 $\mu\text{l/r}$ para la gráfica 1, correspondiente a la primera curva de concentración en el cuadro 1. Y una DL50 de 18.24996732 $\mu\text{l/r}$ para la gráfica 2 correspondiente a la segunda curva de concentración del cuadro 1.

REPRESENTACION GRAFICA DOSIS- EFECTO (48 HRS) DEL CUADRO 1



- Relación dosis- respuesta de acuerdo al número de animales muertos por cada concentración por método logarítmico. GRAFICA 1 Y 2

7.1.2 *Echis ocellatus*

CUADRO 2. RESULTADOS DE TOXICIDAD EN LAS TRES REPLICAS A 48 H

CEPA CD-1 LOTE 1512001408	CONCENTRACION µl/r	No. De organismos muertos por concentración	Mortalidad (%)
12/01/21- 14/01/21 (Grafica 3)	59	5	100
	39	3	60
	26	1	20
	17	0	0
	11	0	0
09/03/2111/03/21 (Grafica 4)	59	5	100
	39	2	40
	26	0	0
	17	0	0
	11	0	0
18/03/21- 20/03/21 (Grafica 5)	59	5	100
	39	2	40
	26	1	20
	17	0	0
	11	0	0

El cuadro No. 2 muestra los resultados obtenidos, 48 horas después de la inoculación donde se

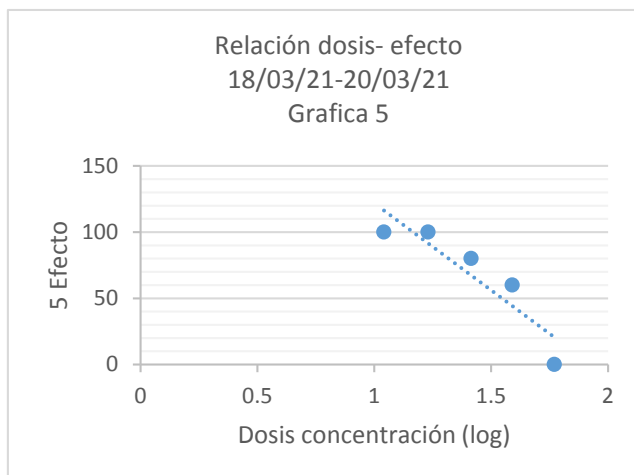
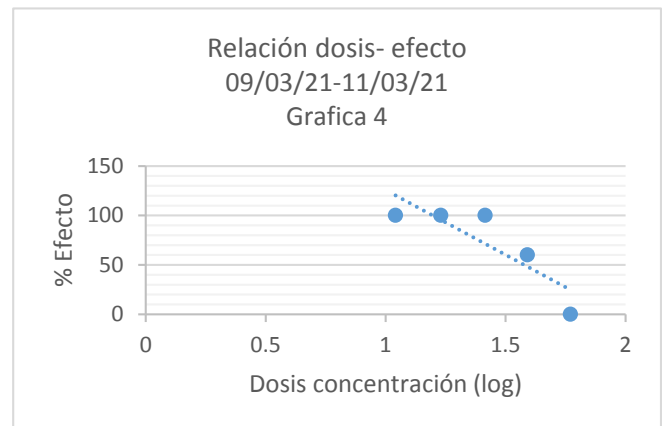
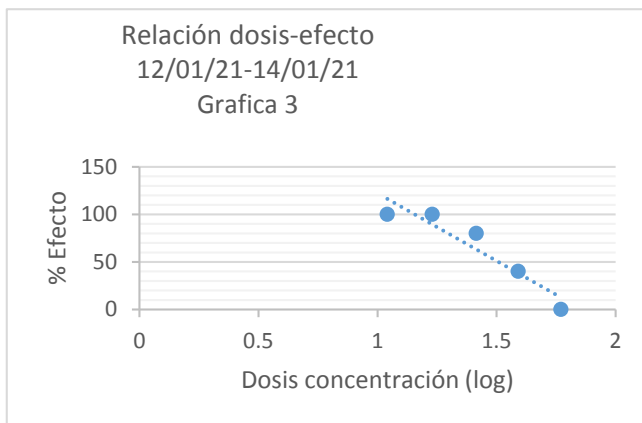
observa que dicho estudio se triplico en diferentes fechas, demostrando una pequeña variabilidad en cuanto al número de organismos muertos por concentración en las dosis 39,26 y 17 μl .

A pesar de tener las mismas concentraciones en cada curva, se esperaría que la cantidad de organismos muertos en determinadas dosis fueran las mismas, sin embargo, esto no es así. Unas de las razones principales que aplica a cualquier prueba de letalidad es la preparación de veneno a utilizar, y el manejo de las pruebas que incluye el manejo y mantenimiento durante el transporte si se llega a requerir.

A pesar de que los resultados varían en un mínimo de animales muertos, la DL50 se encuentra dentro de resultados del cuadro 2.

Para la gráfica 1, correspondiente a la primera replica se estimó una DL50 de 1.142516298 μl , grafica 2 refiere a una DL50 de 37.82489906 μl y para la gráfica 3 una DL50 de 35.22800856 μl .

REPRESENTACION GRAFICA DOSIS- EFECTO (48 HRS) DEL CUADRO 2



- Relación dosis-respuesta de acuerdo al número de animales muertos por cada concentración por método logarítmico. GRAFICA 3, 4 y 5.

7.2 Neutralización

En las pruebas de neutralización se utilizaron 5 ratones cepa CD-1 para cada concentración, los resultados fueron los siguientes:

7.2.1 *Bitis arientans*

CUADRO 3. RESULTADOS DE NEUTRALIZACION A 48 H.

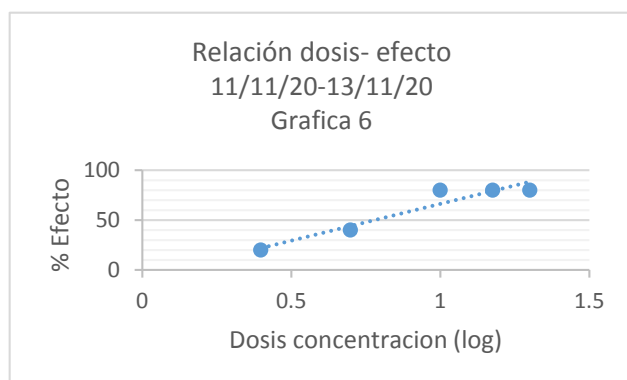
CEPA CD-1 LOTE2007003435	CONCENTRACION $\mu\text{l/r}$	No. organismos vivos por concentración	De (%)
11/11/20-13/11/20 (Grafica 6)	20	4	80
	15	4	80
	10	4	80
	5	2	40
	2.5	1	20

Cuadro 3. Muestra la concentración y numero de sobrevivientes a cada dosis de un solo lote.

En las pruebas de neutralización se evaluaron 2 lotes diferentes. Como se observa en el cuadro 3 y 4 las dosis mínimas fueron de 2 y 2.5 $\mu\text{l/r}$.

Para determinar a qué dosis se presenta una neutralización de veneno se trazó una recta de la cual se obtuvo el punto medio, dando como resultado 6.011 $\mu\text{l/r}$ dosis a la cual el veneno deja de actuar con efecto toxico.

REPRESENTACION GRAFICA DOSIS- EFECTO (48 HRS) DEL CUADRO 3



Relación dosis-respuesta de acuerdo al número de animales vivo por cada concentración por método logarítmico. GRAFICA 6.

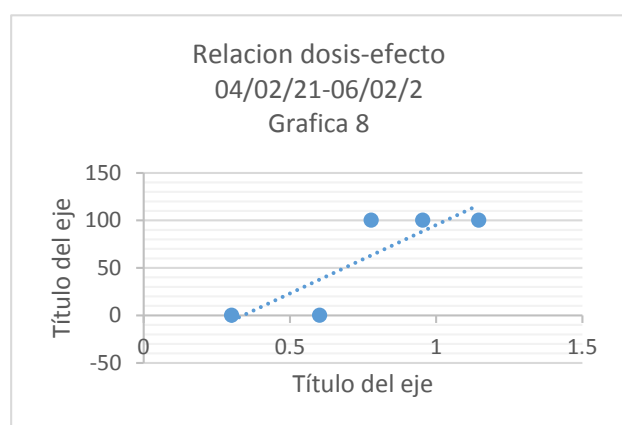
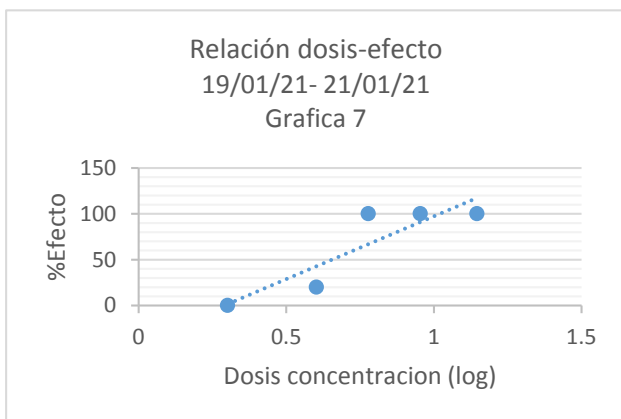
CUADRO 4. RESULTADOS DE NEUTRALIZACION A 48 H.

CEPA CD-1 LOTE	CONCENTRACION μl/r	No. De organismos vivos por concentración	(%)
1506004846 19/01/21- 21/01/21 (Grafica 7)	14	5	100
	9	5	100
	6	5	100
	4	1	20
	2	0	0
1506004846 19/01/21- 21/01/21 (Grafica 8)	14	5	100
	9	5	100
	6	5	100
	4	0	0
	2	0	0
1506004846 18/03/21-20/03/21 (Grafica 8)	14	5	100
	9	5	100
	6	5	100
	4	0	0
	2	0	0
1506004846 04/02/21-06/02/21 (Grafica 9)	15	5	100
	10	5	100
	7	4	80
	5	0	0
	3	0	0
1506004846 04/02/21-06/02/21 (Grafica 10)	74	5	100
	50	5	100
	33	0	0
	22	0	0
	15	0	0
1506004846 05/05/21-07/05/21 (Grafica 10)	74	5	100
	50	5	100
	33	0	0
	22	0	0
	15	0	0
1506004846 04/02/21-06/02/21 (Grafica (11))	23	5	100
	15	5	100
	10	0	0
	7	0	0

	5	0	0
1506004846 09/03/21-11/03/21 (Grafica 12)	30 20 13 9 5	5 4 4 0 0	100 80 80 0 0
1506004846 09/03/21-11/03/21 (Grafica 13)	30 20 13 9 5	5 5 2 0 0	100 100 40 0 0
1506004846 09/03/21- 11/03/21 (Grafica 14)	21 14 9 6 3	5 5 0 0 0	100 100 0 0 0
1506004846 18/03/21-20/03/21 (Grafica 15)	18 14 10 6 2	5 5 5 0 0	100 100 100 0 0

En el cuadro 4 representan los resultados del segundo lote a diferentes concentraciones.

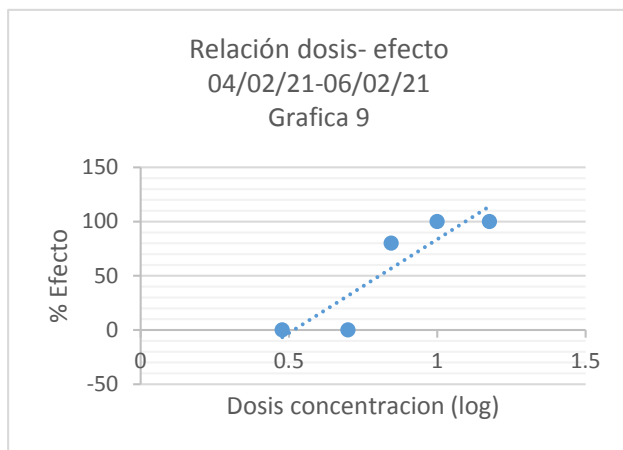
REPRESENTACION GRAFICA DOSIS- EFECTO (48 HRS) DEL CUADRO 4



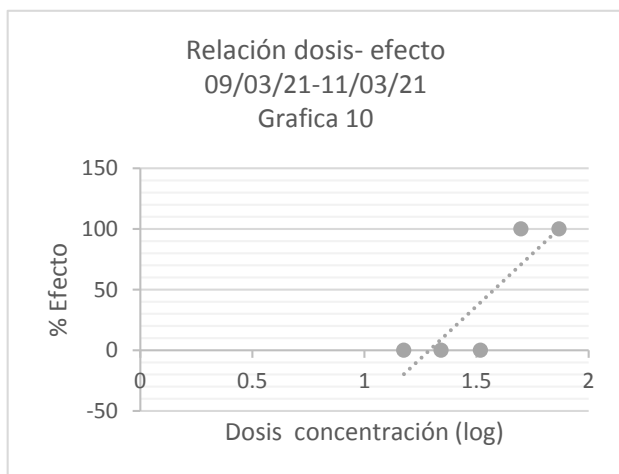
Grafica 7 y 8 corresponden a la misma curva de concentración a diferentes tiempos de inoculación, los resultados varían únicamente a la concentración de 4 μ /r en un aumento del 20% de animales vivos.

Como se observa en el cuadro 4, referente a las gráficas 7 y 8 hay una pequeña variabilidad en cuanto animales vivos por cada concentración, lo cual se puede deber a los tiempos diferentes de inoculación o en su caso al método de preparación de los inóculos, sin embargo se pudo establecer la dosis media a la cual hay mayor supervivencia al efecto letal, este no afecta los resultados ya que la potencia se encuentra dentro de la curva de concentración con 4.50891 $\mu\text{l/r}$ para la gráfica 7 y 4.863818 para la gráfica 8.

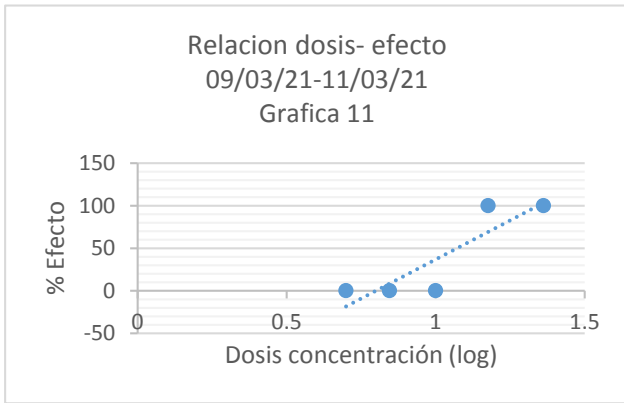
REPRESENTACIONES GRAFICAS DOSIS- EFECTO (48 HRS) DEL CUADRO 4



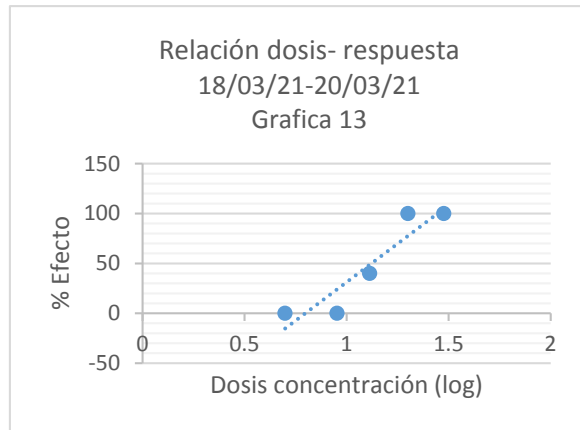
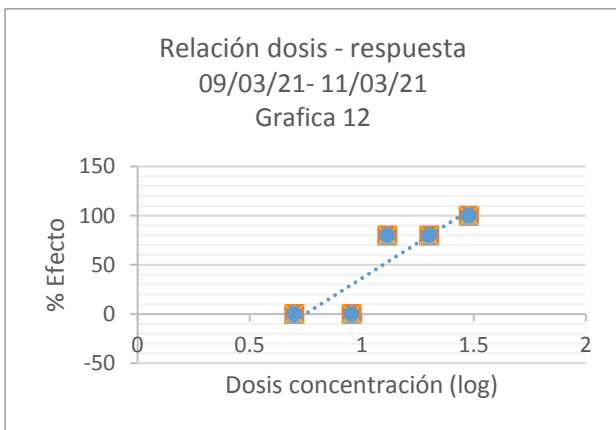
Los resultados de la gráfica 9 muestran un aumento de 1 $\mu\text{l/r}$ a diferencia de los resultados de la gráfica 7 y 8 donde se muestra que a medida que la concentración es mayor hay una disminución de animales muertos. Sin embargo, se determinó la potencia con un valor de 6.3788 $\mu\text{l/r}$ en el cual hay una disminución del efecto letal y aun aumento del efecto neutralizante del antiveneno.



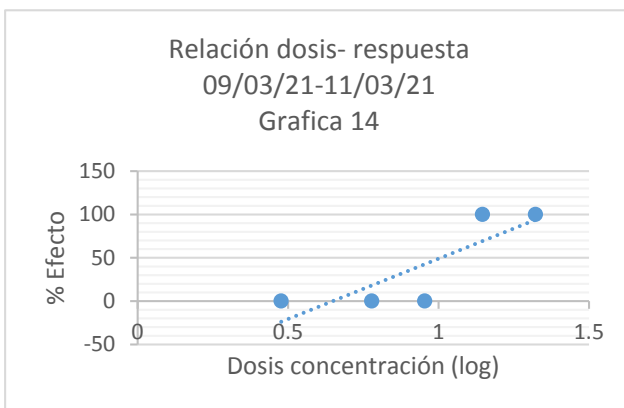
La grafica 10 representa una curva de concentración duplicada, en este caso no existió variabilidad en cuanto a los resultados de la potencia neutralizante del antiveneno con una dosis media de 37.9107 $\mu\text{l/r}$.



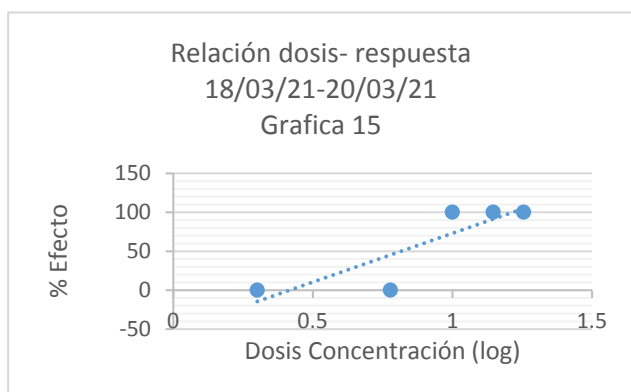
En la gráfica 11, de acuerdo a la curva de concentración se obtuvo una potencia neutralizante de 11.7725 $\mu\text{l/r}$.



Los resultados de la gráfica 12 y 13 representan a una curva de concentración duplicada a diferentes tiempos de inoculación, se observa una variabilidad del 20% y 40% de animales vivos a una concentración de 20 y 13 $\mu\text{l/r}$. se determinó la potencia neutralizante con un resultado de 12.4495 para para grafica 12y 13.2454 $\mu\text{l/r}$ para la gráfica 13.



Grafica 14 representación dosis- efecto de cada dosis donde por método logarítmico se determinó una potencia neutralizante de 10.1698 $\mu\text{l/r}$.



Grafica 15 representación dosis- efecto de cada dosis donde por método logarítmico se determinó una potencia neutralizante de 6.5487 μ l/r.

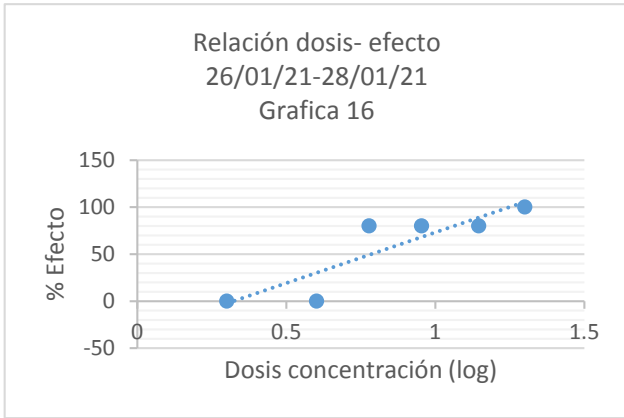
7.2.2 *Echis ocellatus*

CUADRO 5. RESULTADOS DE NEUTRALIZACION A 48 H.

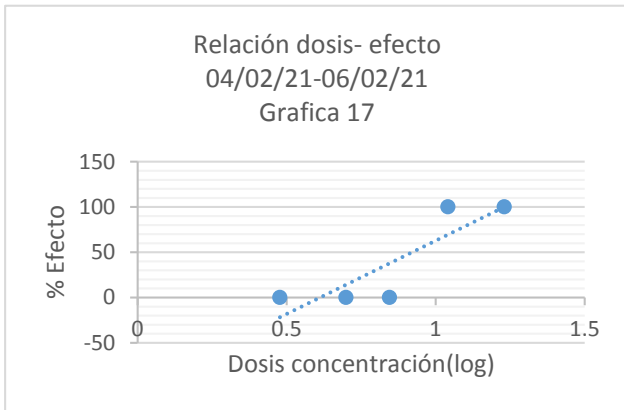
CEPA CD-1 LOTE	CONCENTRACION μ l/r	No. De organismos vivos por concentración	(%)
1512001408 26/01/21-28/01/21 (Grafica 16)	20	5	100
	14	4	80
	9	4	80
	6	4	80
	4	0	0
	2	0	0
1512001408 04/02/21-06/02/21 (Grafica 17)	17	5	100
	11	5	100
	7	0	0
	5	0	0
	3	0	0
1512001408 (Grafica 18)	14	5	100
	9	5	100
	6	5	100
	4	0	0
	2	0	0
1512001408 (Grafica 18)	14	5	100
	9	5	100
	6	5	100
	4	0	0
	2	0	0

1512001408 (Grafica 19)	30 20 13 9 6	5 5 0 0 0	100 100 0 0 0
1512001408 (Grafica 20)	15 10 7 5 2	5 5 2 0 0	100 100 40 0 0
1512001408 (Grafica 21)	43 29 19 13 9	5 5 1 0 0	100 100 20 0 0
1512001408 (Grafica 22)	32 21 14 9 6	5 5 0 0 0	100 100 0 0 0
1512001408 04/02/21-06/02/21 (Grafica 23)	111 74 50 33 22	5 5 3 0 0	100 100 0 0 0
1512001408 27/04/21-29/04/21 (Grafica 24)	111 74 50 33 22	5 4 1 0 0	100 80 20 0 0

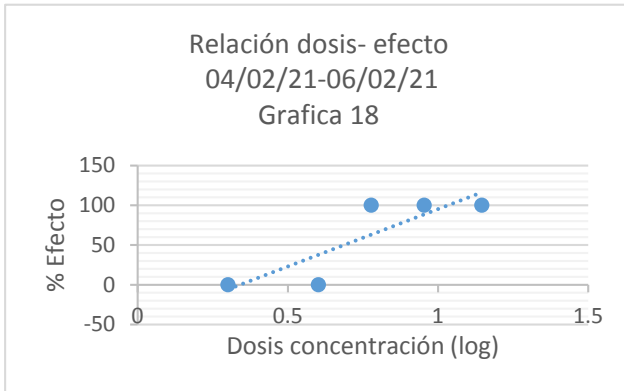
Para la determinación de la potencia neutralizante de las curvas de concentración representadas en el cuadro 5 se utilizó el mismo método estadístico Excel.



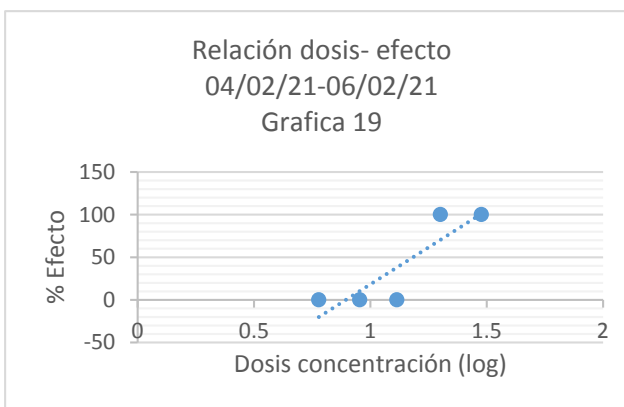
En la gráfica 16 de acuerdo a la curva de concentración se obtuvo una potencia neutralizante de 6.0555 µl/r.



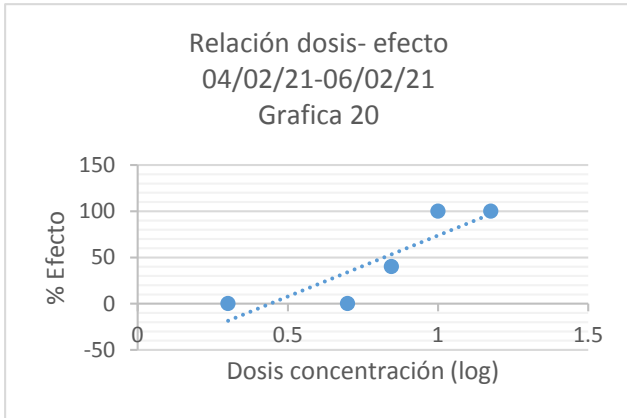
En la gráfica 17, a diferencia de la curva de concentración de la gráfica 16 existe una disminución en cuanto a concentración de dosis dando como resultado una potencia neutralizante de 8.3256 µl/r.



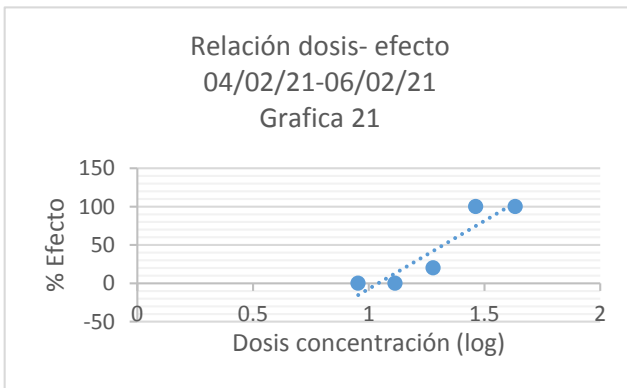
La grafica 18 representa una curva de concentración duplicada con el mismo resultado de animales vivos por concentración y con una potencia neutralizante de 4.8630 µl/r.



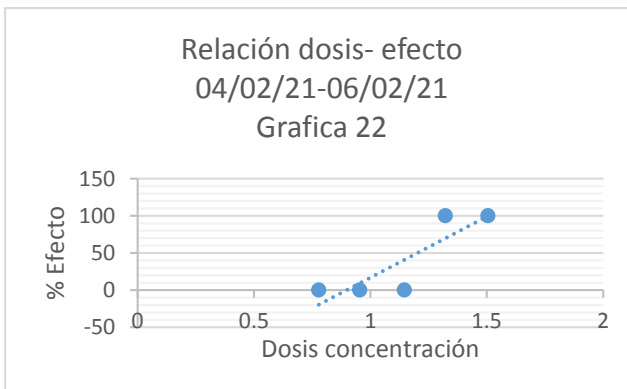
En la curva de concentración de la gráfica 19 se obtuvo una potencia neutralizante de 15.2209 µl/r.



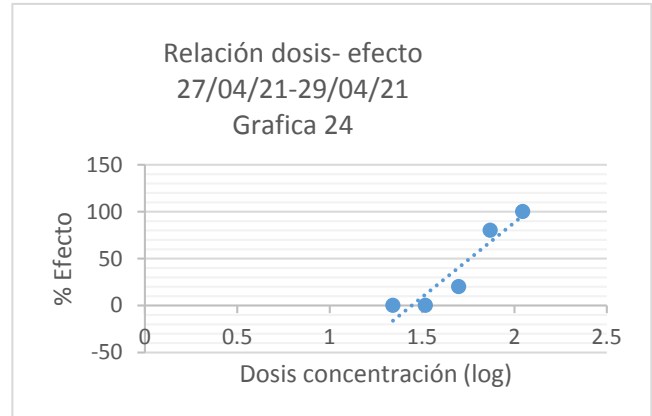
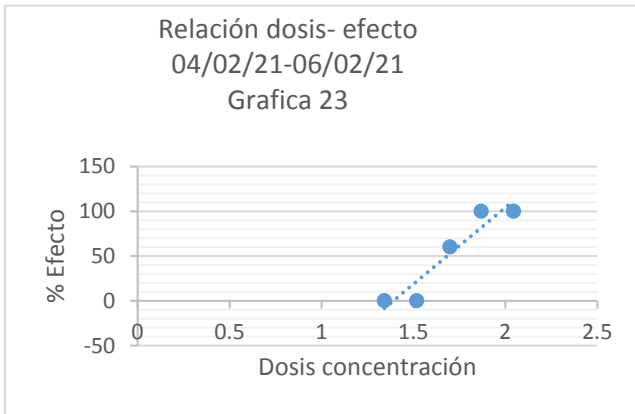
En la gráfica 20 se obtuvo una potencia neutralizante de 6.5976 μ /r.



En la gráfica 21 se obtuvo una potencia neutralizante de 21.0091 μ /r.



En la gráfica 22 se obtuvo una potencia neutralizante de 15.2445 μ /r.



Las gráficas 23 y 24 representan curvas de concentración iguales, inoculadas a diferente tiempo, pero por misma vía de inoculación en las cuales se observa un aumento considerable en cuanto a concentración en comparación con las curvas anteriores, sin embargo, como se muestra en la gráficas y resultados obtenidos a mayor concentración de antiveneno mayor es la capacidad de respuesta. La potencia neutralizante de la gráfica 23 es de 48.2115 $\mu\text{l/r}$ y por la gráfica 24 de 57.2441 $\mu\text{l/r}$.

De acuerdo a todos los resultados recopilados se puede determinar que las curvas de concentración que se realizaron de 2 a tres veces en diferentes fechas, si presentan una variabilidad en cuanto al resultados de animales muertos y vivos, de acuerdo a (Forero, 1984), esto se debe a las diferencias sistemáticas durante la preparación del veneno y antiveneno ya que puede variar el contenido de materia inerte, así como la pérdida de algún componente toxico.

De la misma manera se puede observar que al aumentar la concentración de cada dosis su respuesta se ve afectada a un ritmo más lento a diferencia de concentraciones más pequeñas donde los efectos se ven más rápido. A pesar de estas diferencias en cuanto a respuesta, también se debe considerar la calidad y tipo de excipientes utilizados para la realización de dichas dosis como influyen estas en su respuesta.

8. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo establecer la dosis letal 50 de cada curva de concentración presentada, así como la potencia neutralizante de cada antiveneno de *Bitis arietans* y *echis ocellatus*. El adecuado manejo y mantenimiento de los animales de bioterio de la UPEAL- Boterio ubicado en la UAM Xochimilco permitió que cada prueba se realizara en tiempo y forma de acuerdo a las normas establecida.

Cronograma de actividades

Fecha	Mayo	Junio	julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre
Capacitación	x	x					
Crianza y Reproducción	x	x		x	x	x	x
xProgramación de apareo	x	x	x	x	x	x	x
Destete y entrada de animales para investigación	x	x	x	x	x	x	X
Potencia y neutralización de venenos	x	x	x	x	x	x	x
Desinfección del área		x			X		
Enriquecimiento ambiental	x		x	x	x	x	X
Registro en bitácora	x	x	x	x	x	X	x
Recopilación bibliográfica					x	X	
Informe final							x

Bibliografía

- 1- Temprano G, Aprea P, Dokmetjian JC. La producción pública de antivenenos en Las Américas como factor clave de su accesibilidad. *Rev Panam Salud Pública*. 2017;41: e109.
- 2- RAFAEL OTERO; VITELBINA NÚÑEZ; JACQUELINE BARONA; ABEL DÍAZ, MÓNICA SALDARRIAGA. (2002). Características bioquímicas y capacidad neutralizante de cuatro antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum* de Antioquia y Chocó. *Iatreia* , vol.15 no.1, 2.
- 3- Gené, J.A., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., Cerdas, L. (1989) Comparative study on the coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 27, 841-848.
- 4- Adolfo R. de Roodt, Judith Estévez–Ramírez, Jorge F. Paniagua–Solís, Silvana Litwin, Alejandro Carvajal–Saucedo, Jorge A. Dolab, Luis E. Robles–Ortiz, Alejandro Alagón.. (México ene./feb. 2005). Toxicity of venoms from snakes of medical importance in Mexico. *Scielo*, vol.141 no.1, ISSN 0016-3813.
- 5- Manual de métodos de laboratorio, (2007). Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos. Universidad de Costa Rica Facultad de Microbiología Instituto Clodomiro Picado
- 6- Gutiérrez, J. M., Burnouf, T., Harrison, R. A., Calvete, J. J., Brown, N., Jensen, S. D., Warrell, D. A., Williams, D. J. Global Snakebite Initiative. (2015). A Call for Incorporating Social Research in the Global Struggle against Snakebite
- 7- Yarlequé Mirtha, Ortiz César, Morante Yolanda y Yarlequé Armando. (2012). Estudio comparativo de algunas propiedades bioquímicas de venenos de serpientes de diferentes regiones del mundo. En *Rev. Soc. Quím*(1). Lima, Perú: ISSN 1810-634X.
- 8- Benavides F. J. y Guénet Jean-Louis. 2003. “Manual de Genética de Roedores de Laboratorio” Principios Básicos y Aplicaciones. Universidad de Alcalá, Laboratory Animals LTD y SECAL, España.
- 9- Fuentes Paredes F. M., R.A Mendoza Yanavilca., A.L Rosales Fernández y R.A Cisneros Tarmeño. 2008. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón. Ministerio de Salud, Centro Nacional de Productos Biológicos, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú. 52 pp
- 10-Heuze Ivonne. (2021). Procedimientos operacionales de trabajo. UPEAL- Bioterio. UAM-X. México D.F.
- 11-Heuze Ivonne. (2019). El ABC de los animales de laboratorio. UAM-X. Ciudad de México. UAMX.
- 12-Heuze Ivonne. (2022) Memorias del 4to. Congreso Internacional FeSAHANCCCAL. “Sistema Vibrisal. El sistema sensorial táctil en los roedores”. Diciembre 3, 2021.

- 13-FORERO CH., M. C. & WASSERMAN, M. (1984). COMPARACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS DE NEUTRALIZACIÓN EN RATÓN Y ELISA. PARA DETERMINAR LA POTENCIA DEL ANTIVENENO DE CROTALUS DURISSUS TERRIICUS. *BIOMEDICA*, 4(3 Y 4), 91-97.
- 14-Harrison RA, Hasson SS, Harmsen M, Laing GD, Conrath K, Theakston RD. Neutralisation of venom-induced haemorrhage by IgG from camels and llamas immunised with viper venom and also by endogenous, non-IgG components in camelid sera. *Toxicon*. 2006;47(3):364-8. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.10.017.

Bibliografía digital

I

- 1- Ministerio de salud. Accidente ofídico; Disponible en: <https://www.minsalud.gob.co/salud/PSservicios/paginas/accidente-ofidico.aspx>. (citado 25 febrero 2021)
- 2- Universidad Autónoma Metropolitana –Xochimilco/Bioterio (2020) <https://www.xoc.uam.mx/bioterio>. Instalaciones del Bioterio. Consultado: 05.10.2020.
- 3- Johnson, M. (2012). Laboratory Mice and Rats. Consultado el 9/10/2020 de: <https://www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>
- 4- Yarlequé, Mirtha y Ortiz, César y Morante, Yolanda y Yarlequé, Armando (2012). Estudio comparativo de algunas propiedades bioquímicas de venenos de serpientes de diferentes regiones del mundo. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 78(1), 27-36. ISSN 1810-634X. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371937626004>. (Fecha de consulta 24 de Marzo de 2021)
- 5- Maaloe, O. M. (2012, enero). *La estandarización de antivenenos de serpientes*. <https://iris.paho.org/>. <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2>(Fecha de consulta 24 de marzo de 2022)
- 6- Espino-Solis G. Los caballos y la producción de antivenenos. [Internet]. *Hypatia*. 2010; 36(4). Disponible en: <https://revistahypatia.org/216>. (Fecha de consulta 16 Agosto del 2022)

