

SUERO ANTIVENENO DE ALACRÁN EN HABITANTES DE UNA REGIÓN ENDÉMICA DE ALACRANISMO EN MÉXICO

Patricia TATO, Lilián YÉPEZ y José Luis MOLINARI

RESUMEN

Se estudió en individuos con antecedentes de picadura de alacrán, la presencia de anticuerpos neutralizantes de neurotoxinas obtenidas de veneno del alacrán de la región *Centruroides limpidus limpidus*. El 86% de la muestra estudiada refirió tener antecedentes de picaduras de alacrán (3 picaduras en promedio por individuo). El 100% de los sueros estudiados formaron bandas de precipitado con neurotoxinas obtenidas del veneno en pruebas de inmuno difusión. Asimismo, los sueros de personas con antecedentes de 2 o + picaduras a diluciones de 1:1 neutralizaron IDL_{50} de las neurotoxinas de veneno de *C. limpidus limpidus*; en contraste, sueros de personas con antecedentes de una sola picadura y de personas sin antecedentes, se comportaron como los controles (Sol. Sal. + IDL_{50} equivalente a $6.7\mu\text{g}$ de proteínas neurotóxicas). Un hallazgo inusitado fué encontrar suero neutralizante de neurotoxinas provenientes de individuos residentes en el Distrito Federal, los cuales no tenían antecedentes de vivir en alguna zona endémica de alacranismo y en consecuencia sin antecedentes de picadura de alacrán. Todos estos sueros formaron bandas de precipitado en presencia de neurotoxinas.

INTRODUCCION

En la República Mexicana el alacranismo es un problema de Salud Pública muy grave que alcanza anualmente elevadas tasas de morbi-mortalidad.

La amplia distribución geográfica de los alacranes venenosos en el Territorio Mexicano¹, afecta a grandes masas de población fundamentalmente rural. El problema es más intenso durante el verano, observándose que el 75% de la mortalidad corresponde a niños menores de 3 años. El número de defunciones registradas en la República Mexicana ha sido mayor de 1000 cada año, esta cifra es parte de una realidad mayor, ya que durante el decenio 1940-1949 y el bienio 1957-1958 fueron registradas en total 20,352 defunciones por picadura de alacrán. En muchas de las localidades afectadas, la picadura de alacrán es una de las principales causas de muerte y ha habido meses del año en que ha

ocupado el primer lugar en algunos poblados. Los estados mayormente afectados han sido Colima, Nayarit, Guerrero y Morelos, con tasas medias anuales de 83.7, 41.6, 41.5 y 37.3 defunciones por cada 100,000 habitantes², respectivamente.

En función de la distribución geográfica de la mortalidad por picadura de alacrán en México, los resultados obtenidos en los 1833 municipios, a base de la tasa media anual por 100,000 habitantes, durante los lapsos 1948-1949 y 1957-1958, fueron los siguientes:

Escorpionismo muy intenso: 31 municipios con tasas medias anuales de 100 a 400, en una extensión territorial de 19,635 Km² (1.0% de la superficie total de la República).

Escorpionismo intenso: 75 municipios con tasas medias anuales de 50 a 99, en una exten-

Depto. de Microbiología, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, Apartado Postal 70-600, U.N.A.M.
El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología subvencionó parcialmente este trabajo.

sión territorial de 43,579 Km² (2.2% de la superficie total de la República).

Escorpionismo mediano: 215 municipios con tasas medias anuales de 10 a 49, en una extensión de 207,619 Km² (10.6% de la superficie total de la República).

Escorpionismo reducido: 1512 municipios, con tasas medias anuales menores a 10, de una extensión de 1 693 327 Km² (86.2% de la superficie total de la República).

La primera zona abarca casi todo el estado de Colima y las vecinas costas de Jalisco y Michoacán. La segunda corresponde a la Cuenca del Río Balsas, abarca el suroeste del Edo. de Puebla, el noroeste del Edo. de Oaxaca, el Edo. de Morelos, el suroeste del Edo. de México, la mitad del norte del Edo. de Guerrero y el sur del Edo. de Michoacán. A esta cuenca pertenecen 20 de los 31 municipios que tuvieron tasas medias anuales de 100 para arriba. Zonas de menor importancia están localizadas también en la Vertiente del Pacífico, desde el sur de Sinaloa hasta el oeste de Oaxaca³.

Posteriormente a los estudios de los autores señalados parece no haber mayor interés por actualizar las estadísticas sobre mortalidad por picadura de alacrán, a pesar de seguir siendo un problema importante de Salud Pública.

La explicación acerca de que las Instituciones de Salud no se avoquen seriamente a plantear y resolver dicho problema, puede encontrarse en que el escorpionismo afecta fundamentalmente a poblaciones rurales de más bajo estrato socioeconómico, las cuales no tienen acceso a los servicios de Salud más importantes como el Seguro Social y el ISSSTE. Por otro lado, aunque en muchos poblados existen servicios médicos de Salubridad, el problema subsiste y es debido a una serie de factores como los que se mencionan a continuación.

La falta de suero antialacrán en centros de Salud, la falta de información acerca del tratamiento médico apropiado, el hecho de que la mayoría de estos accidentes ocurren durante la noche y de que muchos médicos no atienden a los accidentados a esas horas. La falta de caminos y transportes en grandes zonas endémicas de nuestro país y fundamentalmente la falta de recursos económicos para poder obtener el suero y pagar atención médica. Todo esto aunado a la amplia distribución geográfica de alacra-

nes venenosos en la República Mexicana y al número inmenso que llegan a alcanzar; baste señalar un ejemplo citado por MAZZOTTI & BRAVO-BECHERELLE² "que en la región de Iguala, Gro., una persona encargada de la colecta de arácnidos para preparar el suero antialacrán recogió en unos cuantos días, con la colaboración de sus ayudantes, al iniciarse la estación de lluvias, un total de 500,000 alacranes".

Entre las posibilidades de atacar este problema tan complicado, estaría el uso de una vacuna contra el envenenamiento por picadura de alacrán. Experimentalmente, se ha podido obtener a partir del veneno de *Centruroides limpidus limpidus* (alacrán de Guerrero) un grupo de proteínas que inducen en ratón inmunidad contra el veneno de la misma especie⁴. Si se ensayara esta fracción proteica en humanos posiblemente indujera inmunidad contra el veneno de alacrán.

La finalidad del presente trabajo es investigar la presencia de anticuerpos circulantes contra las proteínas neurotóxicas del veneno de *C. limpidus limpidus* en personas resistentes en una zona endémica de alacranismo y con antecedentes de picaduras de alacrán.

Si encontráramos inmunidad natural en personas con antecedentes de alacranismo, este hecho le daría a la vacuna, probada experimentalmente⁴, la posibilidad real de ser estudiada en seres humanos por la implicación de ser una herramienta muy importante para abatir las elevadas tasas de morbi-mortalidad causadas por la picadura de alacrán en nuestro país.

MATERIAL Y METODOS

Sueros Humanos — Se obtuvieron, en condiciones de asepsia, 10 ml de sangre de cada uno de 35 donadores voluntarios, residentes de Huitzaco, Gro.; la mayoría con antecedentes de picadura de alacrán. Las sangres se mantuvieron a 5°C durante 3 horas y luego se centrifugaron en centrífuga clínica a 3000 rpm/10 min. Los sueros se obtuvieron por decantación, y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

En las mismas condiciones se obtuvo suero de 10 donadores voluntarios, residentes en el Distrito Federal, ninguno de ellos con antecedentes de haber vivido en áreas endémicas de alacranismo o tener antecedentes de picadura

de alacrán. Se empleó suero antialacrán (MyN) como control estándar.

Antígenos — La metodología para obtener el veneno de alacrán y sus fracciones fue la seguida por MOLINARI et al.⁴ y Tato et al.⁵. Brevemente, el veneno se obtuvo por estimular eléctricamente el penúltimo segmento caudal de cada alacrán: se estimularon 5000 alacranes *Centruroides limpidus limpidus*, los cuales se capturaron en Huitzuco, Gro. y se mantienen en nuestro laboratorio alimentados con larvas de *Tenebrium molitor*. El veneno se recogió en un recipiente congelado, se liofilizó y se guardó a -20°C hasta su uso. Se resuspendió en amortiguador de acetato de amonio 0.05 M a pH 7.0 y se cromatógrafió en Sephadex G-50 M en una columna de 1.6 X 100 cm. Las fracciones se eluyeron con el mismo amortiguador, el material eluido se colectó en alíquotas de 3.2 ml y se monitoreó a 280 nm con un analizador ISCO modelo UA-5 conectado a un registrador automático. La cromatografía se realizó a 5°C. Los tubos de cada pico se mezclaron y se liofilizaron. Se obtuvieron 4 picos de los cuales la fracción denominada pico II fue la más tóxica; 1 x DL₅₀ es equivalente a 0.85 µg/gramo de ratón y contiene al menos 14 componentes neurotóxicos⁴. Esta fracción se usó en las pruebas de inmunodifusión y de neutralización.

Inmunodifusión — La reacción antígeno-anticuerpo se estudió por inmunodifusión en geles de agar purificado de acuerdo al método de OUCHTERLONY⁶.

Prueba de Neutralización de Neurotoxinas: Los sueros se clasificaron de la manera siguiente: a) Sueros de individuos sin antecedentes de picadura de alacrán residentes en el Distrito Federal (18 años de edad en promedio); b) Sueros de individuos sin antecedentes de picadura de alacrán residentes en Huitzuco; c) Sueros de individuos con antecedentes de una picadura de alacrán; d) Sueros de individuos con antecedentes de 2 y más picaduras de alacrán.

De cada grupo de sueros se tomaron alíquotas de 1 ml y se mezclaron; a partir de esta mezcla se hicieron diluciones 1:1, 1:5 y 1:10; a 1 ml de cada dilución se añadieron 72 µg de Pico II solubilizados en un volumen de 0.07 ml de solución salina estéril 0.15 M. Se incluyó suero antialacrán de los laboratorios "MyN", con un poder específico para neutralizar más de 100 DMM de veneno de alacrán, el cual se diluyó

hasta 1:80. Se usaron 6 ratones por cada dilución, inoculándose 0.1 ml/ratón por vía subcutánea. Se incluyeron ratones controles, a cada uno se le inoculó 6.7 µg de Pico II solubilizados en 0.1 ml de solución salina se registró el número de muertes en un lapso de 24 horas. Los resultados se dan como índice de sobrevivencia⁷.

RESULTADOS

Después de haber impartido una plática sobre el problema del escorpionismo a estudiantes de una escuela Secundaria y una Preparatoria en Huitzuco, Gro. y de haber solicitado su colaboración, 35 de ellos se ofrecieron como voluntarios para donar sangre.

Por interrogatorio directo obtuvimos de ellos la siguiente información: edad, número de picaduras por alacrán y posible estado inmune al veneno de este arácnido. En relación a esto último, consideramos que las personas estaban inmunes cuando refirieron no ser afectadas ya, al ser picadas por un alacrán, es decir no desarrollar el cuadro clínico del envenenamiento.

Los resultados están compendiados en la Tabla I, en donde se puede observar que el promedio de edad de la muestra estudiada fue de 16 años, y que el 86% (30 individuos) refirió antecedentes de picadura.

Ahora bien, de los individuos con antecedentes de picadura, el 79% refirió estar inmune y el 17%, a pesar de haber sufrido de 2 a 8 picaduras, refirieron ser susceptibles a la picadura de alacrán. Del 10% restante no se pudo saber de su estado inmune, porque esas personas refirieron haber sido picadas una sola vez y haber desarrollado el cuadro clínico de envenenamiento. Desde el punto de vista estadístico se obtuvo la media aritmética y la mediana del número total de picaduras acumuladas por todos los individuos de la muestra. Por ambos caminos el resultado fue de 3 picaduras por individuo (Tabla II).

Estudiando el número de picaduras en relación al número de individuos inmunes, se observó que el 27.27% de los individuos que refirieron inmunidad, mencionaron también haber sufrido solamente 2 picaduras (Tabla III).

Por medio de inmunodifusión, se detectaron anticuerpos que reaccionaron contra las neurotoxinas (Pico II) obtenidas del veneno de C.

T A B L A I

Edad, número de picaduras y estado inmune contra el veneno de *C. limpidus limpidus* en pobladores de Huitzaco, Guerrero

No.	Iniciales personales	Edad en años	No. de picaduras	Edo. inmune
1	M.I.T.	16	0	—
2	M.M.	17	0	—
3	M.S.C.	17	0	—
4	M.A.V.	17	0	—
5	M.A.C.	14	0	—
6	N.C.	18	1	?
7	R.T.	15	1	?
8	M.L.A.	17	1	+
9	B.C.	16	1	?
10	I.O.	16	2	+
11	R.T.	16	2	+
12	S.A.G.	16	2	—
13	M.C.C.	15	2	+
14	R.B.	16	2	+
15	G.V.	15	2	+
16	C.C.	17	2	+
17	J.C.	15	2	—
18	A.A.	17	3	+
19	S.J.	17	3	+
20	A.C.	16	3	—
21	M.F.A.	15	3	+
22	G.B.C.	15	3	+
23	F.A.	16	3	+
24	V.A.A.	17	4	+
25	F.U.V.	16	5	+
26	A.N.A.	17	5	+
27	M.M.	15	5	+
28	A.S.	15	6	—
29	L.P.	13	6	+
30	S.M.	16	6	+
31	A.S.	17	6	+
32	M.I.T.	16	7	+
33	M.L.	16	7	+
34	E.J.C.	17	8	—
35	A.S.	21	10	+

T A B L A II

Por ciento de individuos picados por alacrán que refieren inmunidad, se incluyen mediana y media aritmética de picaduras

	Individuos		Picaduras	
	No.	%	X	Mediana
Picados	30	100	3	3
Inmunes	22	73	3	3
No inmunes	5	17	3	3
Con inmunidad incógnita	3	10	1	1

T A B L A III

Número y por ciento de individuos con antecedentes de picaduras de alacrán, que refieren inmunidad en función del número de picaduras

No. picaduras	Individuos inmunes	
	No.	%
1	1	4.54
2	6	27.27
3	5	22.27
4	1	4.54
5	3	13.63
6	3	13.63
7	2	9.09
10	1	4.54
Total	22	99.96

limpidus limpidus. Lo más interesante de los resultados fue, en primer lugar, que el 100% de los sueros obtenidos de los 30 individuos con antecedentes de picadura, produjeron de 1 a 3

bandas de precipitado. De tales individuos, 22 refirieron inmunidad (73%), 5 refirieron susceptibilidad (17%) y los 3 restantes, refirieron haber sufrido una sola picadura (10%) (ver Tabla II). Y en segundo, que los sueros procedentes de individuos sin antecedentes también produjeron de 1 a 2 bandas de precipitado, aunque éstas no fueron tan conspicuas como las observadas con sueros de individuos con antecedentes de picadura de alacrán. Resultados representativos se muestran en la Fig. 1.

Un resultado inesperado pero muy interesante fue que el 100% de sueros obtenidos de individuos residentes en el Distrito Federal (Méx.), sin antecedentes de haber vivido en una zona endémica de alacranismo ni mucho menos tener antecedentes de picadura de alacrán, produjeron de 2 a 3 bandas de precipitado cuando fueron probados contra neurotoxinas (Pico II) obtenidas de *C. limpidus limpidus*. Resultados representativos se muestran en la Fig. 1.

La mezcla de sueros de individuos residentes en Huitzucó sin antecedentes de picadura de alacrán, así como la de individuos con antecedentes de una sola picadura, no fueron capaces de neutralizar las neurotoxinas de Pico II. Sin embargo, la mezcla de sueros de individuos con antecedentes de 2 y más picaduras y los sueros de individuos residentes en el Distrito Federal fueron capaces de neutralizar el efecto de las neurotoxinas al 100% a la dilución 1:1, observándose desaparición gradual de la neutralización con las subsecuentes diluciones (Tabla IV).

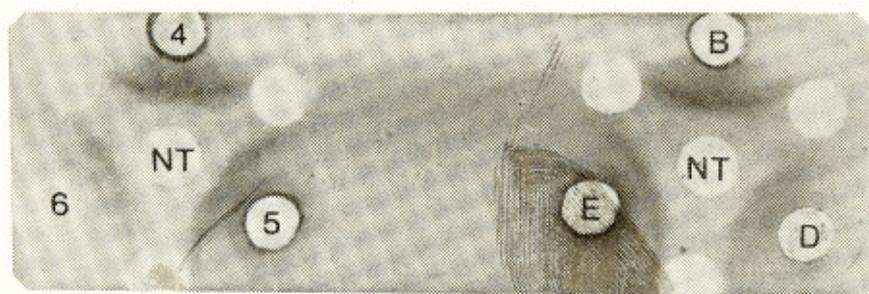


Fig. 1 — Pozos centrales (NT) neurotoxinas del veneno de *Centruroides limpidus limpidus* 15 mg/ml. Pozos 4, 5 y 6 sueros de habitantes de Huitzucó, Gro. (zona endémica de alacranismo intenso). Pozos B, D y E, sueros de habitantes del Distrito Federal (zona no endémica)

T A B L A IV

Prueba de neutralización de neurotoxinas obtenidas del veneno de *Centruroides limpidus limpidus* con sueros obtenidos de individuos residentes en zona endémica de alacranismo y sueros obtenidos de individuos residentes en el D.F. suero antialacrán (MyN) se incluye como control

Procedencia de los Sueros e Índice de Sobrevivencia (°)				
Diluciones de los sueros	Huitzucos 2 picaduras	Huitzucos 0 y 1 picadura	Distrito Federal	MyN
1:1	100	50	100	100
1:5	88	50	88	100
1:10	63	50	63	100
1:20	50	50	50	100
Control (°)	50	50	50	50

(°) índice de sobrevivencia = $\frac{\text{No. de animales sobrevivientes}}{\text{No. de animales probados}} \times 100$

(°) Control = Solución Salina + 6.7 μg de Pico II/ratón

La capacidad de los sueros para neutralizar neurotoxinas provenientes de veneno de alacrán se estimó en función del cuadro clínico y el índice de sobrevivencia. Esta estimación se basó en que los ratones inoculados con las diluciones 1:1 de mezclas de sueros pertenecientes tanto a residentes en Huitzucos con antecedentes de 2 y más picaduras, como a los sueros de residentes del Distrito Federal, no desarrollaron el cuadro típico de envenenamiento y por consiguiente hubo un 100% de sobrevivencia en comparación con los ratones controles o los que se inocularon con mezclas de sueros de individuos residentes en Huitzucos sin antecedentes de alacranismo o con una sola picadura, los cuales desarrollaron en función del tiempo irritabilidad, parestesias faciales, hiperpnea, taquicardia, convulsiones, postración y muerte del 50% en término de 24 horas.

Una observación notable fue que el cuadro clínico en los ratones inoculados con suero de personas con antecedentes de una picadura se instaló más rápidamente, fue más grave y la muerte del 50% ocurrió mucho antes que en los animales controles.

DISCUSION

En función de la muestra estudiada, de la edad de sus individuos y de los resultados obtenidos, se destaca en primer lugar que el 86% de los individuos habían sido picados por ala-

cranes una o más veces, uno de ellos refirió 10 picaduras. Lo que significa que durante 16 años, que fue el promedio de edad en la muestra, el riesgo por picadura de alacrán en Huitzucos, Gro. ha sido muy elevado, ya que ese 86% ha sufrido en promedio 3 accidentes de esta índole. Este porcentaje debe incrementarse al aumentar la edad, tomando en consideración factores como: tipo de habitación, ubicación de ésta en relación a los sitios de mayor abundancia de alacranes, estrato socio-económico, etc. Se observó también que un porcentaje importante de esta muestra había adquirido inmunidad contra el veneno de alacrán posteriormente a la primera picadura; esta aseveración se fundamenta en que 6 individuos (27%) refirieron inmunidad al ser picados la segunda ocasión y además en que el suero obtenido de ellos produjo bandas de precipitación al reaccionar con neurotoxinas provenientes del veneno de *C. limpidus limpidus* en pruebas de inmunodifusión. Otra observación importante es que de los 30 individuos que refirieron antecedentes de picadura de alacrán, 22 de ellos (73%) manifestaron ser inmunes al veneno de este arácnido.

Subsecuentemente se encontró que el 100% de los sueros provenientes de individuos con antecedentes de picadura produjeron bandas de precipitación al reaccionar con proteínas neurotóxicas en estudios de inmunodifusión, incluyendo por supuesto a los sueros de individuos que refirieron no estar inmunes y de in-

dividuos que sólo habían sido picados una sola vez y cuyo estado inmunitario se desconocía.

Finalmente, la prueba irrecusable de que estos anticuerpos estaban involucrados en la inmunidad, la dió la neutralización de neurotoxinas por estos anticuerpos. El hecho de que la dilución 1:1, la cual neutralizó a 72 μg de neurotoxinas equivalentes a 84 DL_{50}/g de ratón por 0.5 ml de suero, es congruente con el testimonio de inmunidad y el hallazgo de anticuerpos que reaccionaron con proteínas neurotóxicas de veneno de alacrán.

Contrariamente a lo esperado, los sueros obtenidos de residentes en el Distrito Federal produjeron bandas de precipitación al reaccionar con las proteínas neurotóxicas obtenidas del veneno de *C. limpidus limpidus*. La presencia de anticuerpos en estos individuos sin experiencia antigénica con veneno de alacrán, los cuales reaccionaron con neurotoxinas del veneno, y que además fueron capaces de neutralizar el efecto tóxico de esas proteínas al mismo nivel de poder antitóxico que sueros de personas con antecedentes de alacranismo sugiere la existencia de antígenos comunes o muy parecidos a las proteínas del veneno de alacrán, pertenecientes muy probablemente a parásitos, los cuales deben de tener un contacto muy estrecho y muy frecuente con huéspedes como el hombre.

En virtud de que las infecciones y enfermedades bacterianas son muy frecuentes en nuestro medio, nos hemos abocado a estudiar antígenos bacterianos para ver si es posible encontrar algunos de ellos que reaccionen con anticuerpos inducidas por neurotoxinas provenientes de veneno de alacrán.

El objetivo del presente trabajo se ha cumplido al haber encontrado, en sueros obtenidos de individuos residentes en una zona endémica de alacranismo (donde la tasa media anual de mortalidad por escorpionismo es de 63.8 defunciones por 100,000 habitantes — zona de escorpionismo intenso — BRAVO-BECHERELLE & MAZZOTTI³: 6% de mortalidad anual en niños menores de 5 años durante el lapso de 1970-1974, TATO et al.⁵, anticuerpos que reaccionaron con proteínas neurotóxicas obtenidas del veneno del alacrán de la localidad, *C. limpidus limpidus*, y que también fueron capaces de neutralizar la acción tóxica de ellas.

El haber descubierto inmunidad natural contra el veneno de alacrán es un acontecimien-

to que justifica plenamente el ensayo de la vacuna antialacrán en seres humanos y refuerza aún más la necesidad de estudiar el potencial inmunogénico de los diversos venenos de las diferentes especies de *Centruroides*. Además, dilucidar el porqué la mezcla de sueros con bajas concentraciones de antineurotoxinas mezcladas con neurotoxinas de veneno de alacrán, al ser inoculadas en ratón producen un cuadro de envenenamiento más grave que el producido por la misma concentración de neurotoxinas sin suero.

SUMMARY

Serum antivenom of scorpion in inhabitants of a scorpionism endemic region in México

It was studied the presence of antibodies able to neutralize neurotoxins obtained from the venom of a mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus*, in the sera from inhabitants of a scorpionism endemic region from Mexico.

It was found that 86% of the sample under study referred antecedent of scorpion stings (3 stings in average per person). 100% of such sera produced of 1 to 3 precipitation lines with neurotoxins used as antigens in immunodiffusion tests.

Likewise, sera from persons with antecedent of two or more scorpion stings, at dilutions of 1:1 were able to neutralize 6.7 μg of neurotoxins per 0.1 ml of diluted serum. On the contrary, sera from persons with only one scorpion sting did not neutralize the neurotoxins. Sera obtained from persons with no antecedent of scorpion stings, and neurotoxins solubilized in isotonic saline solution were used as controls. It was unusual to find neutralizing sera of neurotoxins in inhabitants from Federal District, which had not antecedent of scorpion stings.

These sera formed precipitation lines with neurotoxins in immunodiffusion test.

AGRADECIMIENTOS

Los Autores agradecen profundamente al Profesor Eduardo Ojeda y a sus alumnos de la escuela Secundaria "Profesor Manuel Sáenz" de Huitzuco, Gro., por su valiosísima colaboración a este trabajo. Lo mismo a los alumnos del C. C.H. La Salle de México, D.F. por su importante contribución.

TATO, P.; YÉPEZ, L. & MOLINARI, J. L. — Suero antiveneno de alacrán en habitantes de una región endémica de alacranismo en México. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 23:147-154, 1981.

REFERENCIAS

1. HOFFMAN, C. C. — Boletín Instituto Higiene. Dept. Salubr. Publ. Tomo II No. 5, pp. 321-330, 1936.
2. MAZZOTTI, L. & BRAVO-BECHERELLE, M. A. — *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Méx.)* XXI: 1-2, 3-19, 1961.
3. BRAVO-BECHERELLE, M. A. & MAZZOTTI, L. — Distribución geográfica de la mortalidad por picadura de alacrán en México. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Méx.)* XXI: 3-4, 129-140, 1961.
4. MOLINARI, J. L.; TATO, P. & MÉNDEZ, L. — Immunity against the venom of mexican scorpion *Centruroides limpidus limpidus* induced by some proteins from this venom. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 130C, 859-877, 1979.
5. TATO, P.; GAVILANES, M.; MUÑOZ, L.; FLETCHER, P. & MOLINARI, J. L. — Proceedings of the Fifth International Symposium, Pergamon Press, Oxford, pp. 639-646, 1978.
6. CLAUSEN, J. — In *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Amsterdam, North Holland Publishing Co., 1971, pp. 447-463, 519-523.
7. KWAPINSKI, J. B. G. — In *Methodology of Immunochemical and Immunological Research*. New York, John Wiley & Sons, Mc, 1972, pp. 576.

Recebido para publicação em 25/11/1980.