



Universidad Nacional
Federico Villarreal

VRIN | VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMORRÁGICA DEL VENENO DE
BOTHROPS PICTUS CON SUERO HIPERINMUNE DE LAMA GLAMA**

Línea de investigación:

Microbiología, Parasitología e Inmunología

Tesis para optar por el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor

Bermúdez Meza, David Miguel

Asesor

Salas Asencios, Ramsés

ORCID: 0000-0002-4075-1736

Jurado

Ianacone Oliver, José Alberto

Cuya Briones Miriam Rebeca

Ramírez Aguilar, Priscilia

Lima - Perú

2026

RECONOCIMIENTO - NO COMERCIAL - SIN OBRA DERIVADA
(CC BY-NC-ND)



NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMORRÁGICA DEL VENENO DE *Bothrops pictus* CON SUERO HIPERINMUNE DE *Lama glama*

INFORME DE ORIGINALIDAD

11 %

INDICE DE SIMILITUD

10 %

FUENTES DE INTERNET

2 %

PUBLICACIONES

1 %

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	2 %
2	repositorio.unfv.edu.pe Fuente de Internet	1 %
3	revistabiomedica.org Fuente de Internet	1 %
4	repositorio.una.ac.cr Fuente de Internet	1 %
5	Submitted to Universidad Nacional Federico Villarreal Trabajo del estudiante	1 %
6	worldwidescience.org Fuente de Internet	1 %
7	patents.google.com Fuente de Internet	1 %
8	www.soqtapata.com Fuente de Internet	<1 %
9	Oswaldo Nina-Cueva, Derly Olazabal-Chambilla, Jair Quispe-Arpasi, Adell Alzamora-Sánchez et al. "Caracterización bioquímica del veneno de la serpiente <i>Bothrops roedingeri</i> Mertens, 1942, y sus actividades edematógena, hemorrágica y miotóxica", Biomédica, 2020	<1 %



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMORRÁGICA DEL VENENO DE
BOTHROPS PICTUS* CON SUERO HIPERINMUNE DE *LAMA GLAMA

Línea de Investigación:

Microbiología, Parasitología e Inmunología

Tesis para optar por el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor:

Bermúdez Meza, David Miguel

Asesor:

Salas Asencios, Ramsés

ORCID: 0000-0002-4075-1736

Jurado:

Ianacone Oliver, José Alberto

Cuya Briones Miriam Rebeca

Ramírez Aguilar, Priscilia

Lima – Perú

2026

DEDICATORIA

A mi familia y en especial a mi esposa,
quien ha sido de gran apoyo en todo el
proceso y quien siempre me anima a
superarme y lograr mis metas.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a Dios, por poner en mi camino personas que contribuyeron a mi crecimiento personal, mi aprendizaje y por guiar mis pasos hacia el lugar correcto, donde pude crecer no solo como profesional, sino también como persona. En su infinita sabiduría me permitió encontrar oportunidades que marcaron mi camino y fortalecieron mi vocación, incluso en los momentos de incertidumbre. A mi esposa, por su amor incondicional, comprensión y apoyo constante. Gracias por acompañarme en cada etapa de este proceso, por ser mi sostén en los momentos difíciles y por celebrar conmigo cada pequeño logro. Tu presencia ha sido fundamental para mantenerme firme en este camino académico. A mi familia, quienes siempre fueron un motor de impulso y aliento. Sus palabras de ánimo, su confianza en mí y su apoyo inquebrantable han sido clave para seguir avanzando en mi desarrollo académico. Este logro también les pertenece, porque cada paso que di estuvo acompañado de su respaldo.

A mi asesor externo, Msc. Blgo. César Bonilla Ferreyra, por confiar en mis habilidades desde el inicio y por brindarme la oportunidad de formarme como tesista bajo su guía. Su orientación, exigencia académica y disposición para compartir conocimientos han sido fundamentales en mi formación. A mi asesor interno, Msc. Ramses Salas Asencios, por su apoyo constante, su paciencia y su valiosa ayuda durante todo el proceso de revisión y sustentación. Sus observaciones y recomendaciones han contribuido significativamente a mejorar la calidad de este trabajo.

A la Blga. Karin Flores, por su dedicación y paciencia al enseñarme la parte experimental de cada ensayo biológico. Su guía práctica y su disposición para resolver dudas fueron esenciales para el desarrollo adecuado de la investigación.

Finalmente, al laboratorio de Toxinología del Instituto Nacional de Salud, por brindarme las facilidades necesarias para la ejecución de este trabajo de investigación. El

acceso a sus instalaciones y recursos permitió que este proyecto pudiera llevarse a cabo de manera satisfactoria.

A todos ustedes, mi más profundo agradecimiento por ser parte de este logro que hoy se concreta.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Descripción y formulación del problema.....	2
1.2	Antecedentes.....	3
1.3	Objetivos.....	4
1.3.1	Objetivo general	4
1.3.2	Objetivos específicos.....	4
1.4	Justificación	5
1.5	Hipótesis	6
1.5.1	Hipótesis nula:	6
1.5.2	Hipótesis alterna:.....	6
II.	MARCO TEÓRICO	7
2.1	Bases teóricas	7
2.1.1	Actividad Hemorrágica.....	7
2.1.2	Mecanismos de Acción.....	8
2.1.3	Manifestaciones Clínicas	9
III.	MÉTODO	10
3.1	Tipo de investigación	10
3.2	Ámbito laboral y espacial	10
3.3	Variables.....	10
3.3.1	Variable dependiente:.....	10
3.3.2	Variable independiente:	10
3.4	Población y muestra.....	11
3.5	Instrumentos y Herramientas	11
3.6	Procedimientos	11
3.6.1	Inoculación y Recolección de muestras.....	11
3.6.2	Cuantificación de anticuerpos antibotrópicos producidos por Lama glama	13
3.6.3	Determinación de la presencia de las proteínas hemorrágicas por SDS- PAGE.....	14
3.6.4	Dosis Hemorrágica Mínima (DHM)	15
3.6.5	Neutralización de la actividad hemorrágica.....	15
3.7	Análisis de datos.....	16
3.8	Consideraciones éticas	16
IV.	RESULTADOS	18

4.1 Determinación de la presencia de las proteínas hemorrágicas en el veneno de <i>Bothrops pictus</i>	18
4.2 Determinación de la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM)	20
4.3 Registro del aumento de la respuesta inmune mediante prueba de ELISA	21
4.4 Determinación de Dosis Neutralizante del veneno	22
V. DISCUSION DE RESULTADOS.....	24
VI. CONCLUSIONES	26
VII. RECOMENDACIONES	27
VIII. REFERENCIAS	28
IX. ANEXOS.....	32

RESUMEN

Las mordeduras de serpientes del género *Bothrops* constituyen una preocupación relevante para los sistemas de salud en el Perú, debido principalmente a la acción de componentes del veneno que generan alteraciones hemorrágicas. En este estudio se evaluó la capacidad del suero hiperinmune de *Lama glama* para neutralizar la actividad hemorrágica inducida por el veneno de *Bothrops pictus*. Los ejemplares de llama fueron sometidos a un proceso de inmunización gradual utilizando veneno en combinación con adyuvantes, obteniéndose sueros que fueron evaluados en modelos murinos (*Mus musculus*). Se estableció la dosis mínima necesaria para inducir hemorragia (DHM) en 12.87 µg y se realizaron ensayos de seroneutralización para evaluar la eficacia del suero. Además, la producción de anticuerpos fue evaluada empleando la técnica ELISA, evidenciando un incremento progresivo desde la tercera semana, con un máximo en la octava semana de inmunización. Los resultados evidenciaron una reducción significativa de las lesiones hemorrágicas, con una dosis neutralizante de 6.09×10^{-5} µL por 10 DHM. Estos hallazgos evidencian el potencial del uso de anticuerpos derivados de camélidos como alternativa eficiente en la producción de antivenenos, contribuyendo al desarrollo de estrategias terapéuticas más específicas y accesibles.

Palabras clave: *Bothrops pictus*, suero, neutralización, actividad hemorrágica.

ABSTRACT

Envenomation by snakes of the genus *Bothrops* represents a significant public health problem in Peru, especially due to the hemorrhagic effects associated with metalloproteinases in the venom. This study evaluated the capacity of hyperimmune serum from *Lama glama* to neutralize the hemorrhagic activity induced by *Bothrops pictus* venom. Llama specimens were immunized using a progressive inoculation schedule with venom and adjuvant, and the resulting sera were evaluated in murine models (*Mus musculus*). The minimum hemorrhagic dose (MHD) of the venom was determined to be 12.87 µg, and seroneutralization assays were performed to evaluate the serum's efficacy. Antibody production was quantified using ELISA, showing a progressive increase from the third week onward, with a peak in the eighth week of immunization. The results demonstrated that hyperimmune serum was able to significantly reduce hemorrhagic lesions, with a neutralizing dose of 6.09×10^{-5} µL per 10 DHM. These findings highlight the potential of using camelid-derived antibodies as an efficient alternative in antivenom production, contributing to the development of more specific and accessible therapeutic strategies.

Key words: Bothrops pictus, serum, neutralization, hemorrhagic activity.

I. INTRODUCCIÓN

Las mordeduras de serpientes representan un problema de salud global, que afecta a numerosas regiones y genera un alto número de casos graves cada año; sin embargo, en la mayoría de los casos deja una serie de secuelas como lo son amputaciones, necrosis, problemas hemostáticos, entre otros. De acuerdo a informes internacionales de salud, el envenenamiento por serpientes constituye un problema sanitario relevante, con millones de casos reportados anualmente y una elevada carga de mortalidad y secuelas incapacitantes, según reportes recientes de organismos internacionales de salud (Organización Mundial de la Salud, 2023). De acuerdo a nuestro contexto nacional se sabe que las secuelas repercuten fuertemente en la socioeconomía de las zonas rurales ya que muchos de los pobladores sustentan a sus familias a base del trabajo físico, por lo que al perder alguna extremidad a causa de la mordedura de serpiente impacta en gran manera en las oportunidades laborales que puedan optar. Es por ello que es esencial el estudio de la neutralización de las actividades biológicas que causan los venenos de serpiente para por medio de tratamientos más eficaces se pueda minimizar los daños que puedan causar las toxinas presentes en venenos de serpientes (Williams et al., 2019).

Uno de los géneros de serpientes que comprende un alto índice de casos en Latinoamérica son las serpientes del género *Bothrops*. Este género comprende serpientes venenosas ampliamente distribuidas en América Latina, cuya mordedura constituye un problema de salud pública debido a su alta incidencia y severidad (Manrique, 2000). El veneno del género *Bothrops* se caracteriza por su compleja composición bioquímica, capaz de inducir efectos proteolíticos, alteraciones en la coagulación y daño vascular, asociados principalmente a otras enzimas bioactivas, ello debido a que su veneno es rico en metaloproteasas de matriz (SVMPs), estas degradan componentes vasculares y de la matriz extracelular lo que es causa de hemorragias locales y sistémicas, además de alteración en la coagulación y daño en tejido

(De Roodt et al., 2003); enzimas como la fosfolipasas A2 son responsables de los efectos hemorrágicos, edematógenos y miotóxicos (Nina-Cueva et al., 2020), estos efectos pueden variar significativamente entre diferentes especies de *Bothrops*, por lo que se observa que es necesario contar con estrategias de inmunización de acuerdo al veneno de cada especie de este género.

Bothrops pictus, conocida como "jergón de la costa", es una serpiente venenosa endémica del Perú, suele encontrarse en la costa central desde el nivel del mar hasta aproximadamente 2,300 msnm., su veneno ha tenido un impacto en la salud pública debido a sus efectos tóxicos (Navarrete et al., 2010). Algunos de los componentes identificados en el veneno de *B. pictus* son: metaloproteasas hemorrágicas y serinoproteasas similares a la trombina; estas enzimas se encargan de degradar los componentes presentes en la membrana basal y la matriz extracelular que rodean las células endoteliales de los capilares y vénulas, originando así la respuesta hemorrágica (Vivas-Ruiz et al., 2015). La acción de estos componentes tóxicos presentes en el veneno de *B. pictus* aumentan la morbilidad y complican la intervención clínica, por lo que el desarrollo de antivenenos y estrategias complementarias para optimizar la neutralización a tiempo es de gran interés para la salud pública.

1.1 Descripción y formulación del problema

Existe una necesidad latente de tratamientos eficaces en la neutralización de la actividad hemorrágica de *B. pictus* ya que esta especie endémica en nuestro país se encuentra presente en varias regiones costeras y valles peruanos. Aunque *B. atrox* es la especie más comúnmente asociada a mordeduras ofídicas, *B. pictus* también representa un riesgo significativo, especialmente en áreas costeras donde su hábitat se superpone con el de las poblaciones humanas.

Estudios recientes han reportado la caracterización de una metaloproteinasa hemorrágica de *B. pictus* denominada pictolysin-III, la cual está encargada de degradar matriz y proteínas de coagulación desencadenando la actividad hemorrágica (Vivas-Ruiz et al., 2023), estos resultados evidencian el papel que desempeñan determinadas metaloproteinasas en la patogenicidad hemorrágica y a su vez resalta la necesidad de estudiar medidas que estén dirigidas a neutralizar dichas proteínas para un mejor manejo de estos caso en el Perú. Habitualmente se emplea equinos como los caballos para la obtención de IgG antibotrópicos, pero dichos procesos fatigan mucho a los animales ya que deben realizarles sangrías constantes para producir los antivenenos; sin embargo estudios sugieren que la utilización de nanoanticuerpos recombinantes producidos por camélidos como las llamas son más eficaces, económicos y específicos (Bailón, Bonilla, et al., 2020) lo cual sugiere la necesidad de contar con una mejor comprensión de las interacciones entre el veneno y el sistema inmunológico en camélidos, lo cual permitiría mejorar las prácticas veterinarias y la seguridad en áreas donde las mordeduras son comunes. Mediante este proyecto no solo se busca estudiar la respuesta inmunitaria de los camélidos para neutralizar la actividad hemorrágica del veneno de *B. pictus*, sino también desarrollar un suministro adecuado de suero antiofídico para uso humano, contribuyendo así a la salud pública.

1.2 Antecedentes

A lo largo del tiempo los camélidos han demostrado tener una respuesta inmunológica única y eficiente frente a diferentes antígenos, incluidas toxinas como las presentes en el veneno de serpientes del género *Bothrops* (Ledesma, 2016). Los camélidos producen anticuerpos convencionales y anticuerpos especiales conocidos como nanoanticuerpos, que son fragmentos más pequeños y estables. Estos nanoanticuerpos son más resistentes a condiciones extremas de temperatura y pH, lo que los hace ideales para neutralizar toxinas (Bailón, Bonilla,

et al., 2020). Los nanoanticuerpos tienen una mayor capacidad para acceder a epítomos en regiones inaccesibles para anticuerpos convencionales, lo que les confiere una ventaja en la neutralización de componentes complejos del veneno.

Al realizar ensayos para la obtención de antivenenos se aprovechan ciertas ventajas que posee el sistema inmune de los camélidos, la cual radica en la eficiencia que poseen para la producción de anticuerpos; los camélidos generan respuestas inmunes rápidas y duraderas, incluso frente a toxinas complejas, además de su facilidad para el desarrollo de nanoanticuerpos. A partir de una pequeña muestra de sangre, se pueden aislar y clonar los nanoanticuerpos para producción en sistemas recombinantes.

Los nanoanticuerpos derivados de camélidos tienen potencial terapéutico en el tratamiento de envenenamientos, ya que son altamente específicos, económicos de producir y presentan menor riesgo de reacciones adversas; por otro lado, enzimas como las L-aminoácido oxidasas (LAAO) mostraron tener propiedades anticancerígenas (Lazo, 2014). Estudios recientes han demostrado que los nanoanticuerpos de camélidos pueden neutralizar eficazmente componentes específicos del veneno, como fosfolipasas A2 y metaloproteinasas (Bailón, Yaniro, et al., 2020).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Neutralizar la actividad hemorrágica del veneno de *Bothrops pictus* (“Jergón de la costa”) mediante el uso de suero hiperinmune de *Lama glama* (“Llama”).

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar la presencia de las proteínas hemorrágicas por SDS-PAGE del veneno de *Bothrops pictus*

- Determinar la dosis hemorrágica mínima (DHM) del veneno de *B. pictus*.
- Analizar la relación del aumento del título de anticuerpos antibotrópicos a lo largo del periodo de inmunizaciones con la actividad neutralizante.
- Analizar la capacidad del suero hiperinmune para neutralizar la actividad hemorrágica que el veneno de *B. pictus* provoca en el tejido de ratones *Mus musculus*.
- Determinar la dosis de suero hiperinmune capaz de neutralizar y contrarrestar la actividad hemorrágica del veneno en un modelo murino.

1.4 Justificación

El estudio de la respuesta inmunológica de las llamas frente al veneno de serpientes del género *Bothrops* es fundamental ya que es un género de serpientes ampliamente distribuido en el Perú. Estudios han demostrado que el suero hiperinmune obtenido de llamas puede neutralizar efectivamente la actividad letal del veneno de *Bothrops atrox* (Bailón, Bonilla, et al., 2020), una serpiente común en Perú; por lo que es necesario de igual manera evaluar la respuesta inmune frente al veneno de otras especies del mismo género.

A través de un esquema de inmunización, se podrá observar si los títulos de anticuerpos específicos neutralizan la actividad hemorrágica significativamente tras varias semanas de inoculaciones, alcanzando niveles óptimos en un periodo relativamente corto (Bailón, Yaniro, et al., 2020). Esta información no solo es útil para la producción de antivenenos, sino que también puede contribuir a un mejor entendimiento sobre cómo otros mamíferos podrían responder a toxinas similares. De igual manera el estudio de la respuesta inmune tiene implicaciones en la salud pública, ya que en muchas comunidades rurales es muy común el ofidismo por lo que es necesario que puedan tener acceso a antivenenos de buena calidad y alta especificidad.

1.5 Hipótesis

1.5.1 Hipótesis nula:

El suero hiperinmune de *Lama glama* no puede neutralizar la actividad hemorrágica del veneno de *Bothrops pictus*.

1.5.2 Hipótesis alterna:

El suero hiperinmune de *Lama glama* puede neutralizar la actividad hemorrágica del veneno de *Bothrops pictus*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Bases teóricas

Los venenos producidos por serpientes del género *Bothrops*, incluyendo la especie *Bothrops pictus*, puede generar múltiples alteraciones fisiopatológicas tanto a nivel local como sistémico; entre los efectos a nivel local destacan el edema, la necrosis tisular o hemorragias, mientras que a nivel sistémico puede presentarse trastornos de coagulación, daño renal y hemorragias generalizadas (Gutiérrez, 2011). Estas manifestaciones son consecuencia de la acción combinada de diversas biomoléculas presentes en el veneno, principalmente enzimas como las metaloproteasas, las hemorrinas y otras enzimas como las fosfolipasas A2 (PLA2) las cuales interactúan con diferentes estructuras celulares y componentes de la matriz extracelular (Nina-Cueva et al., 2020).

2.1.1 Actividad Hemorrágica

La actividad hemorrágica del veneno de *Bothrops pictus* constituye uno de los efectos más relevantes, este se manifiesta tanto a nivel local como sistémico y debido a su capacidad para generar daño severo es uno de los efectos más peligrosos, pudiendo causar daños irreversibles en el tejido vascular que conducen a la necrosis. El origen de este efecto radica principalmente en la acción de metaloproteasas dependientes de zinc, estas enzimas afectan la integridad de la microvasculatura al degradar componentes estructurales de la membrana basal, comprometiendo la estabilidad del endotelio y produciendo como resultado la extravasación sanguínea hacia los tejidos (Rosas, 2024). A nivel sistémico, estas alteraciones pueden desencadenar trastornos como coagulopatías, hemorragias generalizadas, nefrotoxicidad e incluso compromiso cardiovascular, lo cual puede provocar la muerte de la víctima. El veneno de *B. pictus* contiene aproximadamente ocho metaloproteasas, que constituyen alrededor del

30% del contenido total del veneno de los vipéridos; estas enzimas están fuertemente ligadas al efecto hemorrágico, así como a la degradación de proteínas tisulares y plasmáticas.

2.1.2 *Mecanismos de Acción*

El efecto toxico del veneno de serpientes del género *Bothrops* puede favorecer la activación de factores de la coagulación sanguínea, lo que conduce al consumo de fibrinógeno y formación de fibrina intravascular, induciendo frecuentemente incoagulabilidad sanguínea. Así mismo, las metaloproteasas presentes en el veneno de *B. pictus* tienen la capacidad de hidrolizar proteínas plasmáticas lo que afecta la coagulación debido a su capacidad para degradar el fibrinógeno. Los mecanismos de acción del veneno de *Bothrops* involucran principalmente proteólisis, coagulación y efectos vasculotóxicos. Estos mecanismos pueden provocar una variedad de lesiones, hemorragias, desórdenes neuromusculares y destrucción de diversos tejidos (Crispin et al., 2025).

Los principales mecanismos de acción son:

a) **Acción proteolítica.** Está presente en los géneros *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Porthidium* y *Lachesis*, implica la degradación de proteínas en el sitio de la mordedura, provocando daño local en los tejidos. En la actualidad se reconoce que este efecto no depende de una sola enzima, sino de la interacción sinérgica de múltiples componentes del veneno, además de posibles factores secundarios como infecciones.

b) **Acción coagulante.** Algunos componentes de venenos de serpientes del género *Bothrops* activan el Factor X para degradar protrombina y fibrinógeno, similar a la acción de la trombina que transforma el fibrinógeno en fibrina (Lazo, 2014), esto resulta en un consumo de fibrinógeno, que puede ser más severo en pacientes jóvenes.

c) **Acción vasculotóxica.** Los venenos botrópicos contienen hemorraginas y polipéptidos no enzimáticos que causan separación de las uniones endoteliales, contribuyendo

a hemorragias. También se produce edema local debido a la acción proteolítica del veneno, manifestándose como dolor, eritema, equimosis y flictenas en el sitio de la mordedura.

Adicionalmente enzimas como la fosfolipasa A2 (PLA2) (Guevara et al., 2011) desempeñan un papel importante al hidrolizar los fosfolípidos de las membranas celulares, lo que conlleva a la pérdida de integridad estructural de las células y eventualmente la muerte celular.

2.1.3 Manifestaciones Clínicas

El envenenamiento por especies del género *Bothrops* se caracteriza por causar cuadros clínicos complejos y efectos locales como edema, dolor, hemorragia y necrosis, así como efectos sistémicos que incluyen coagulopatías, hemorragia sistémica, daño renal y cardiotoxicidad. Entre los signos y síntomas más frecuentes se incluyen el dolor ardiente inmediato, mareos, náuseas, vómitos, sudoración, dolor de cabeza, hinchazón masiva de la extremidad afectada, ampollas hemorrágicas, necrosis local, sangrado de la nariz y las encías, entre otros (Crispin et al., 2025). La severidad del cuadro clínico dependerá de factores como la cantidad de veneno inoculado, la localización de la mordedura y la respuesta fisiológica del individuo afectado.

III. MÉTODO

3.1 Tipo de investigación

El presente proyecto corresponde a un tipo de investigación prospectiva experimental analítica ya que se evaluó la respuesta inmune de *Lama glama* mediante la aplicación de veneno de *B. pictus* con un adyuvante el cual permite preservar la integridad de las proteínas presentes en el veneno y su potencial seroneutralizante.

3.2 Ámbito laboral y espacial

El presente proyecto de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Toxinología del Centro Nacional de Productos Biológicos y Bienes estratégicos de Salud Pública (CNPB) del Instituto Nacional de Salud (INS) ubicado en Av. Defensores del Morro N°2288 sede Chorrillos, Lima -Perú.

3.3 Variables

3.3.1 Variable dependiente:

La variable dependiente es la capacidad del suero para neutralizar la actividad hemorrágica causada por el veneno, la cual será evaluada en “ratón” (*Mus musculus*).

3.3.2 Variable independiente:

La variable independiente es el suero antibotrópico usado para neutralizar las toxinas causantes de la actividad hemorrágica en el veneno de *B. pictus* aplicado a camélidos.

3.4 Población y muestra

Para este proyecto se usaron 2 llamas (*Lama glama*) a las cuales se les inoculó semanalmente 2 ml de veneno de *B. pictus* más adyuvante, previo a cada inoculación se obtuvo un volumen de sangre periférica de la cual se usó el suero para luego ser aplicado a 66 ratones a fin de evaluar la capacidad del suero para neutralizar la actividad hemorrágica del veneno.

3.5 Instrumentos y Herramientas

Se usaron jeringas de 3ml, tuberculinas de 1ml, agujas número 21G, agujas número 25G, tubos colectores amarillos con gel separador, algodón en torundas, yodo antiséptico, alcohol al 70%, navaja y hoja de afeitar, tijeras, balanza analítica, jaulas y rejillas para ratones, rejilla metálica de 15x25 cm, tubos de ensayo de 13x100 mm, cinta Parafilm, papel aluminio, papel absorbente, Cloruro de sodio, crioviales, racks para criovial, gradilla, baño maría, placas de ELISA, buffer carbonatado, buffer de bloque, buffer de lavado, conjugado anti-Llama IgG-Peroxidasa, sustrato TMB, ácido sulfúrico, vortex, espectrofotómetro, micropipetas y tips de 10, 200 y 1000 ul, congeladora vertical, refrigerador.

3.6 Procedimientos

3.6.1 Inoculación y Recolección de muestras

Las llamas empleadas en el presente tema de investigación fueron analizadas antes a iniciar con el esquema de inmunización que se muestra en la tabla 1, esto con el propósito de llevar un control de la condición hematológica y bioquímica en la que iniciaron los animales, luego fueron inmunizadas una vez por semana con 2 ml de un pool de venenos de *Bothrops pictus*, *B. atrox*, *B. barnetti*, *B. brazili* más solución adyuvante, la cual permite preservar la integridad proteica de las toxinas presentes en el veneno de serpiente. Pasada una semana de

haber inoculado se recolectaron 20 – 30 ml de sangre periférica para posteriormente separar el suero antiofídico el cual fue inoculado a ratones *Mus musculus* a diferentes niveles de concentración de suero junto con una dosis reto de veneno de *B. pictus* para determinar la potencia que poseía el suero para neutralizar las toxinas botrópicas a diferentes concentraciones las cuales son las causantes de la actividad hemorrágica de esta especie de serpiente en particular.

Cabe señalar que, pese a que las llamas empleadas en el presente proyecto de investigación fueron inoculadas con un pool constituido por el veneno de cuatro especies de serpientes del género *Bothrops*; sin embargo, para efecto de esta tesis solo se evaluó la respuesta del suero hiperinmune total producido frente al veneno completo de la especie *Bothrops pictus*.

Tabla 1.*Esquema de preparación semanal de inóculos para las llamas*

Preparación de inóculos							
Fechas	Procedencia del veneno	Veneno (μL)	Volumen 4 venenos (μL)	Hepes 1X (μL)	Adyuvante (μL)	Total del inóculo (μL)	Concentración del inóculo (mg)
Semana 1	<i>Bothrops pictus</i>	18.75	75	1425	1500	3000	0.5
	<i>B. atrox</i>	18.75					
	<i>B. barnetti</i>	18.75					
	<i>B. brazili</i>	18.75					
Semana 2	<i>Bothrops pictus</i>	37.5	150	1350	1500	3000	1
	<i>B. atrox</i>	37.5					
	<i>B. barnetti</i>	37.5					
	<i>B. brazili</i>	37.5					
Semana 3	<i>Bothrops pictus</i>	75	300	1200	1500	3000	2
	<i>B. atrox</i>	75					
	<i>B. barnetti</i>	75					
	<i>B. brazili</i>	75					
Semana 4	<i>Bothrops pictus</i>	112.5	450	1050	1501	3000	3
	<i>B. atrox</i>	112.5					
	<i>B. barnetti</i>	112.5					
	<i>B. brazili</i>	112.5					
Semana 5	<i>Bothrops pictus</i>	150	600	900	1500	3000	4
	<i>B. atrox</i>	150					
	<i>B. barnetti</i>	150					
	<i>B. brazili</i>	150					
Semana 6	<i>Bothrops pictus</i>	150	600	900	1500	3000	4
	<i>B. atrox</i>	150					
	<i>B. barnetti</i>	150					
	<i>B. brazili</i>	150					
Semana 7	<i>Bothrops pictus</i>	150	600	900	1500	3000	4
	<i>B. atrox</i>	150					
	<i>B. barnetti</i>	150					
	<i>B. brazili</i>	150					
Semana 8	<i>Bothrops pictus</i>	150	600	900	1500	3000	4
	<i>B. atrox</i>	150					
	<i>B. barnetti</i>	150					
	<i>B. brazili</i>	150					

3.6.2 Cuantificación de anticuerpos antibotrópicos producidos por *Lama glama*

Para la cuantificación de los anticuerpos IgG producidos por *Lama glama* a lo largo del desarrollo del esquema de inmunización, se utilizó la prueba de ELISA, la cual mediante microtitulaciones nos permite identificar el aumento en la concentración de anticuerpos

producidos para el veneno de *B. pictus*; cabe resaltar que se usó como antígeno en la prueba de ELISA únicamente al veneno de la especie *B. pictus* a fin de observar mediante intensidad colorimétrica la concentración de anticuerpos que se unen al antígeno de interés para el veneno de esta especie en particular. Para esta prueba, se realizaron diluciones en serie desde 1/200 hasta 1/3200 en buffer carbonato a los sueros post inmunizaciones obtenidos luego de cada semana de inoculaciones realizadas. Finalmente, se realizó una curva de titulación y se cuantificaron las concentraciones a partir de las absorbancias obtenidas a partir de la prueba de ELISA a una longitud de onda de 450 nm. Los datos obtenidos de la lectura de absorbancia también permitieron formar una curva estándar de crecimiento para observar el incremento de los anticuerpos producidos a lo largo de cada semana de inmunización.

3.6.3 Determinación de la presencia de las proteínas hemorrágicas por SDS-PAGE

Para lograr identificar el peso molecular estimado de las diversas proteínas hemorrágicas presentes en el veneno de *B. pictus* se realizó una electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 12%, para ello se empleó una muestra de veneno al 0.1 mg/ml la cual se preparó junto con un loading buffer a una concentración de 2X esto con el fin de poder usar una relación 1:1 de muestra de buffer de carga para la corrida electroforética, la muestra fue calentada a 100°C durante 5min., pasado este tiempo se dejó atemperar y se dispensó en volúmenes de 2 ul, 4 ul, 6 ul, 8 ul y 10 ul además de 7 ul del marcador molecular Blueye All Protein Standar. Las muestras se corrieron inicialmente a 80v por 20min., luego se aumentó el voltaje a 100v por 60min., pasado el tiempo de corrida se coloreo el gel usando Azul de Coomassie R-250 durante 1 hora y se decoloró usando una solución de 10ml de Ácido acético glacial más 40 ml de Etanol absoluto en 50ml de agua destilada. Finalmente, el gel se llevó a fotografiar usando un fotodocumentador de la marca ChemiDoc XRS de Biorad.

3.6.4 Dosis Hemorrágica Mínima (DHM)

Para la determinar Dosis hemorrágica mínima se emplearon un total de 18 ratones los cuales fueron agrupados en 4 grupos de cuatro ratones por jaula y una jaula con dos ratones como grupo control, se trabajó a partir una muestra de veneno completo de *B. pictus* al 0.01 mg/ml, el cual se usó a diluciones seriadas de 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8 respectivamente inoculadas a cada grupo de cuatro ratones por jaula, el grupo control fue inoculado con solución salina al 0.9% y se dejó actuar durante un periodo de 2 horas. Pasadas las dos horas se procedió a sacrificar a los ratones y a su disección a fin de observar y tomar medidas de los patrones hemorrágicos presentes a nivel intradérmico, luego se calculó el área y se promedió por nivel de dilución. Dicha área nos permitió determinar la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) del veneno mediante la ecuación de regresión lineal luego de enfrentar el diámetro de las hemorragias vs el logaritmo de los µg de veneno empleados.

3.6.5 Neutralización de la actividad hemorrágica

La actividad hemorrágica es causada por metaloproteasas como las hemorraginas, presentes en el veneno del Vipérido; estas actúan a nivel de la membrana basal de capilares y vénulas causando su ruptura. Para neutralizar esta actividad biológica se realizaron ensayos en donde se incubó una cantidad determinada de veneno (dosis reto) frente a diversas diluciones del antiveneno (Int. Clodomiro Picado, 2007), luego esta mezcla fue inoculada a un número de roedores (48 ratones) para evaluar la capacidad del suero para neutralizar la actividad hemorrágica del veneno, para ello fue necesario usar el valor de Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) obtenido previamente el cual sirvió de referencia para preparar la mezcla de veneno y antiveneno requerido para el ensayo.

Una vez obtenido este dato, se usó para preparar una dosis de veneno desafío, la cual se buscó neutralizar empleando el suero hiperinmune. Para ello, se prepararon inóculos con el

suero hiperinmune en diluciones de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32, los cuales fueron aplicados subcutáneamente a 6 grupos de 4 ratones más 1 grupo control de solo veneno y otro grupo control con solo el suero. Previamente los inóculos preparados con el suero fueron incubados a 37°C por 30min a fin de activar el accionar de los anticuerpos generados capaces de neutralizar las toxinas hemorrágicas del veneno problema, luego se les inocularon 100 μ l intradérmicamente a cada grupo de ratones con las diluciones correspondientes y se dejó actuar por un periodo de 2 horas. Pasado el tiempo indicado se sacrificaron a los ratones mediante cámara letal y se retiró la piel para medir la reducción de las áreas hemorrágicas usando papel milimetrado y un esquema de conversión del área de cada cuadrado del papel milimetrado por el total del área de la mancha. Finalmente, se realizó una curva dosis-respuesta utilizando el diámetro de la lesión hemorrágica vs las diferentes concentraciones de antiveneno.

3.7 Análisis de datos

Se usaron los datos de la curva dosis - respuesta obtenidos al evaluar la reducción de los diámetros de las lesiones en los ratones inoculados para la prueba de neutralización de la actividad hemorrágica; en función a dichos datos obtenidos, se cuantificó la cantidad de anticuerpos presentes en el suero de llama de cada semana de acuerdo al esquema de inoculación usando la prueba de ELISA.

3.8 Consideraciones éticas

En el desarrollo del presente proyecto se siguieron estrictamente principios bioéticos para el manejo de camélidos y roedores, asegurando su bienestar y minimizando cualquier sufrimiento innecesario. Se respetaron las normativas internacionales de bioética y bienestar animal, como las establecidas por el Comité Internacional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (IACUC). Las consideraciones éticas del presente proyecto fueron aprobadas por el Comité Institucional de Ética para el uso de animales en Investigación (CIEA) del

Instituto Nacional de Salud (INS) mediante la Resolución Directoral N° 177-2019-OGITT/INS.

IV. RESULTADOS

4.1 Determinación de la presencia de las proteínas hemorrágicas en el veneno de *Bothrops pictus*

El veneno de *Bothrops pictus* se compone por una serie de proteínas asociadas a las diversas actividades biológicas causadas por la mordedura de esta especie, actividades como la neurotoxicidad, miotoxicidad o actividad hemorrágica son causadas por proteínas diferenciadas no solo por su acción sino también por su peso molecular.

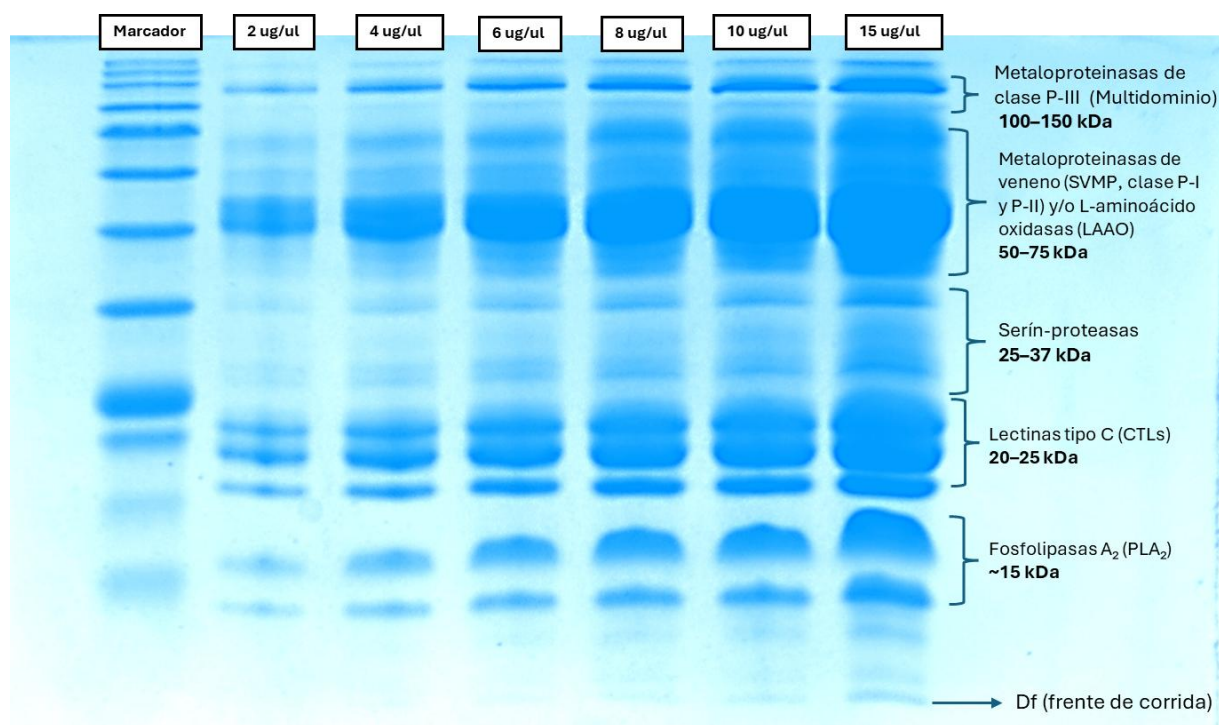
Para determinar los diferentes pesos moleculares de las proteínas presentes en el veneno estudiado, se realizó una electroforesis vertical SDS-PAGE, la cual reveló bandas con pesos moleculares estimados desde los 94 a 8 kDa (Figura 1). La curva estándar permitió determinar los pesos moleculares estimados de las bandas presentes en la electroforesis (Figura 2) usando de referencia los datos de pesos moleculares del marcador y aplicando la ecuación de la recta para reemplazar con los valores de recorrido por banda observada en cada pocillo; cabe resaltar que en cada pocillo se colocó la misma muestra de veneno a diferentes concentraciones.

Se observó que algunas bandas eran más robustas que otras, entre las cuales destacó la presencia de bandas de alto peso molecular comúnmente asociado a las metaloproteasas (Rosas, 2024), las cuales han sido asociadas a la actividad biológica más predominante en esta especie que es la actividad hemorrágica.

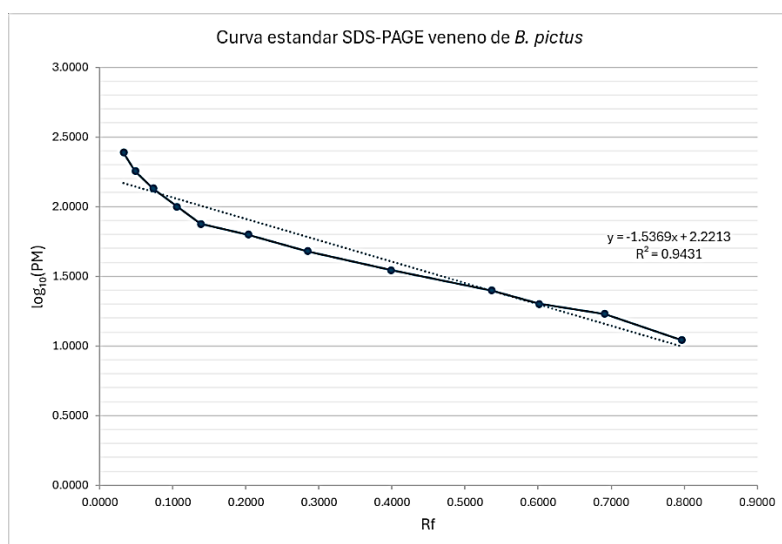
De acuerdo a los resultados de la curva estándar que se visualizan en la Figura 2, las bandas A, B, C y D observadas en el intervalo de peso molecular son compatibles con el peso molecular de metaloproteasas, las cuales están asociadas a la función biológica hemorrágica.

Figura 1.

Determinación del peso molecular de las fracciones del veneno de B. pictus mediante SDS-PAGE

**Figura 2**

Curva estándar aplicada a las distancias recorridas de las bandas para determinar el peso molecular estimado.



Bandas	Antilog ₁₀ (PM)	PM estimado (kDa)
Banda A	94.856	≈94.86 kDa
Banda B	72.314	≈72.31 kDa
Banda C	63.140	≈63.14 kDa
Banda D	48.135	≈48.14 kDa
Banda E	32.922	≈32.92 kDa
Banda F	27.976	≈27.98 kDa
Banda G	22.517	≈22.52 kDa
Banda H	17.638	≈17.64 kDa
Banda I	14.988	≈14.99 kDa
Banda J	13.087	≈13.09 kDa
Banda K	9.450	≈9.45 kDa
Banda L	8.478	≈8.48 kDa

4.2 Determinación de la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM)

Los ensayos de dosis hemorrágica nos dieron como resultado una dosis hemorrágica mínima (DHM) de 12.87 μg de veneno de *B. pictus* necesarios para causar la actividad biológica de hemorragia, este valor nos sirve de referencia para determinar la cantidad mínima de veneno que debe ser neutralizada para contrarrestar su actividad hemorrágica. Este valor de DHM se obtuvo a partir de medir las áreas de cada mancha hemorrágica producida (Figura 3) y usando dichos datos se aplicó una curva estándar para obtener así mediante la ecuación de la recta el valor en microgramos de veneno mínimo requerido para la actividad hemorrágica (Figura 4).

Figura 3

*Ensayo de dosis hemorrágica mínima en gradiente de dilución del veneno de *B. pictus**

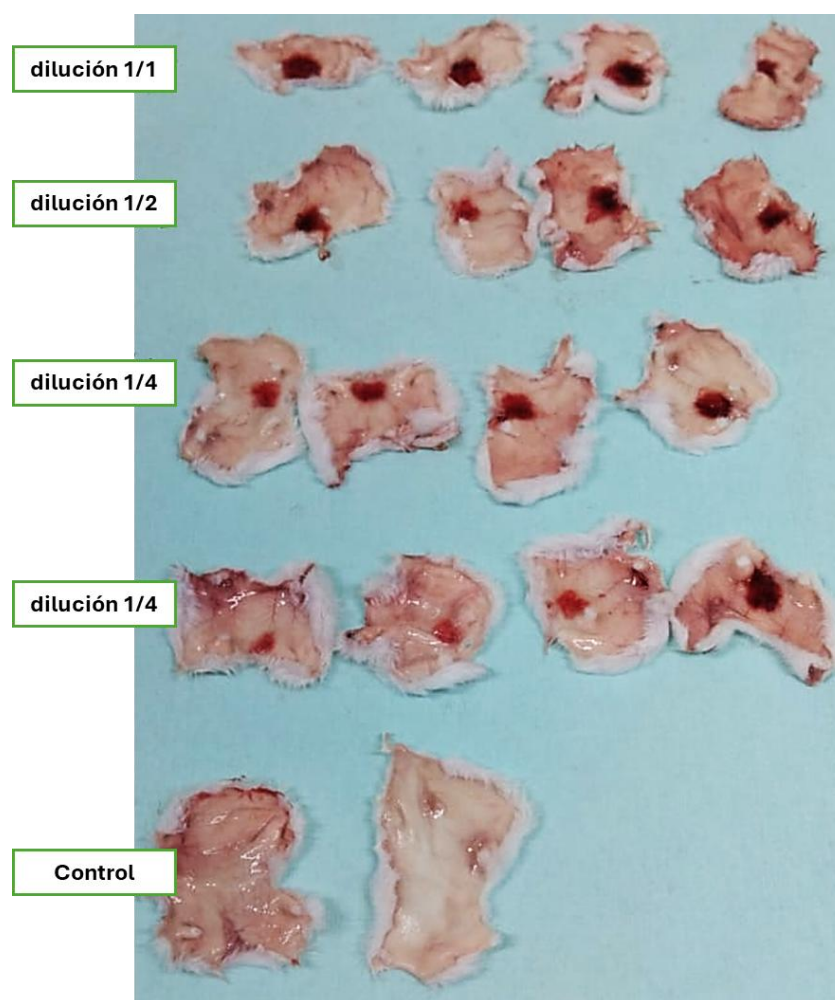
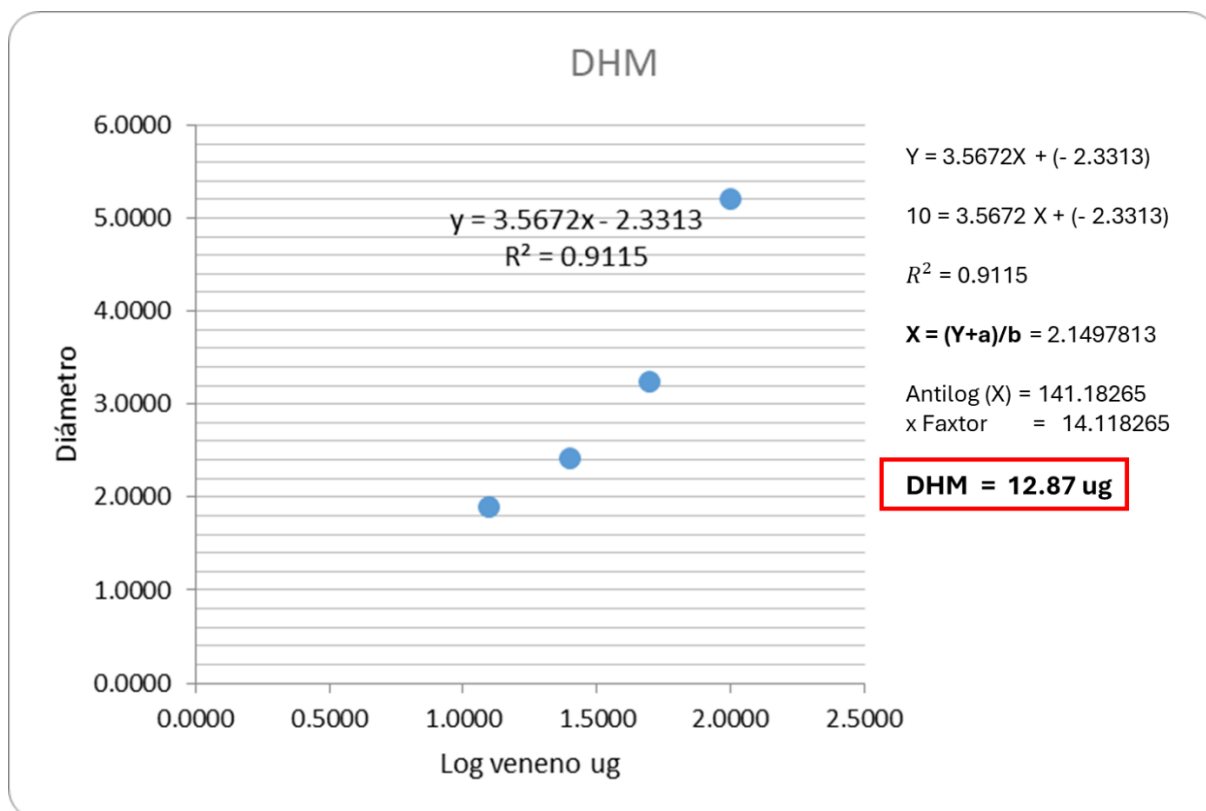


Figura 4

Grafica para dosis hemorrágica mínima según el diámetro de las manchas hemorrágicas producidas por el veneno

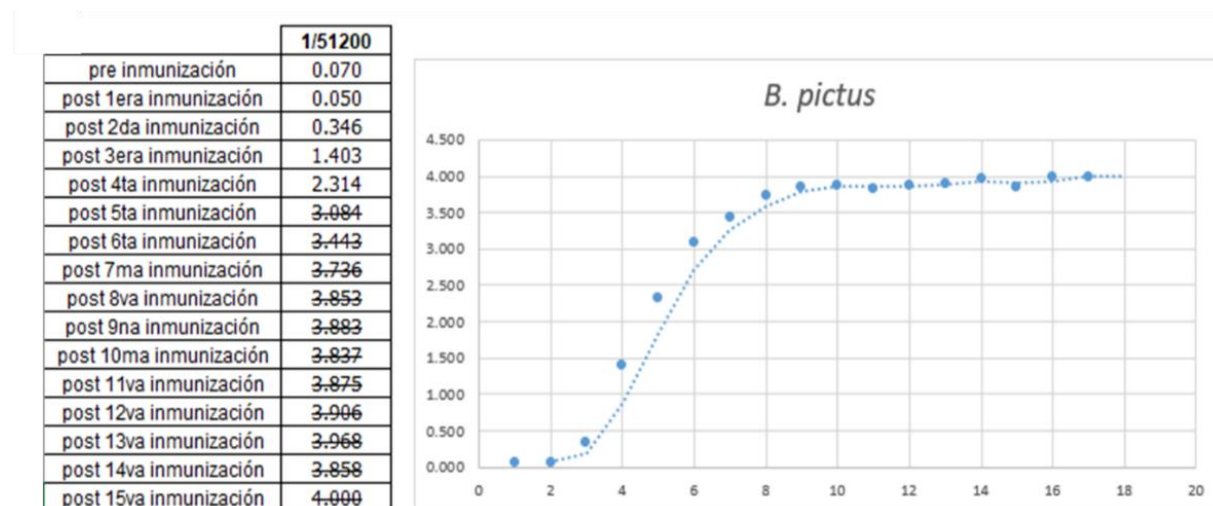


4.3 Registro del aumento de la respuesta inmune mediante prueba de ELISA

Se evaluó el aumento de la cantidad de anticuerpos presentes en los sueros obtenidos de cada semana post inmunización mediante prueba de ELISA, los resultados mostraron un incremento desde la tercera semana de inoculación siendo la semana 8 la de mayor aumento de anticuerpos antitoxinogénicos presentes en el suero. Las semanas subsiguientes mostraron la concentración de anticuerpos se mantuvo como se observa en la figura 5.

Figura 5

Cuantificación de anticuerpos presentes en suero hiperinmune de llama 1 para veneno de B. pictus



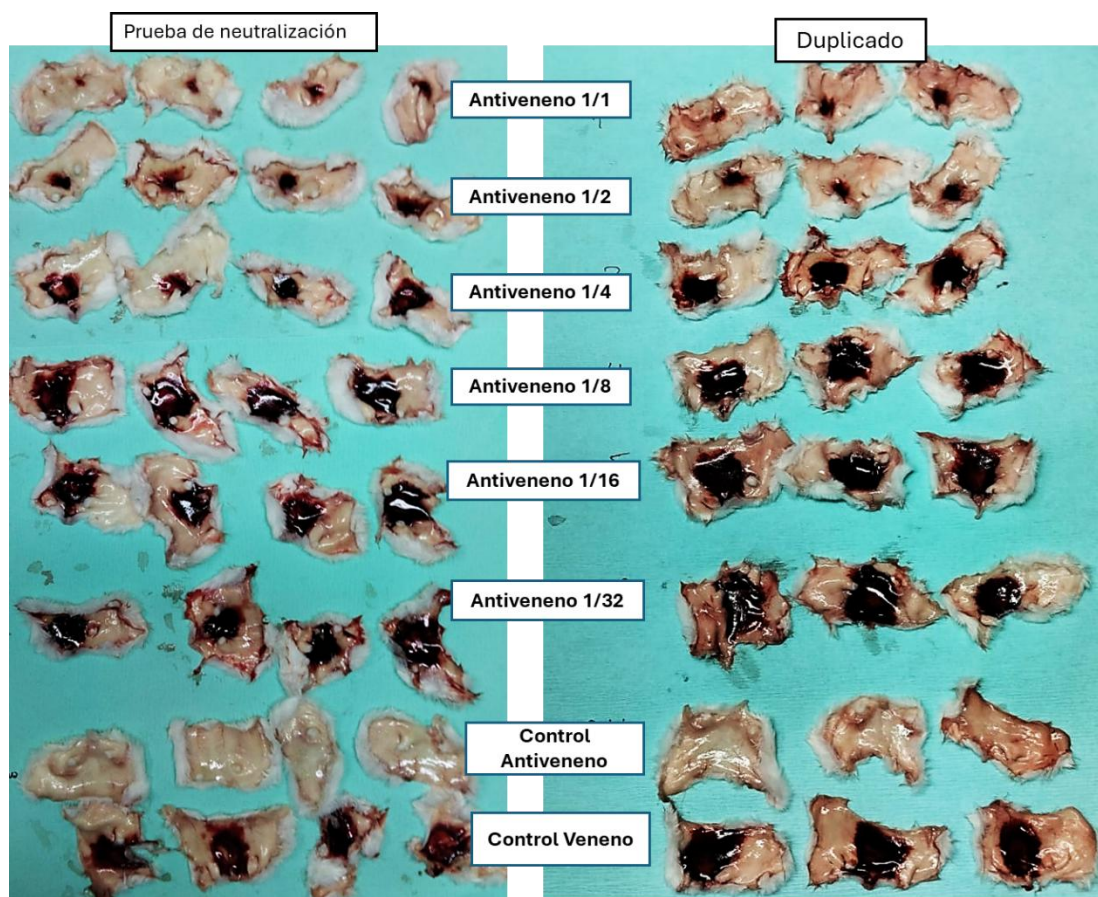
4.4 Determinación de Dosis Neutralizante del veneno

La dosis neutralizante se obtuvo a partir de la medición del área de los halos hemorrágicos presentes en las pieles de los ratones a diferentes concentraciones de suero hiperinmune, se calculó la reducción del área de cada mancha hemorrágica y se usó la ecuación de la recta para determinar la dosis capaz de neutralizar la actividad hemorrágica del veneno.

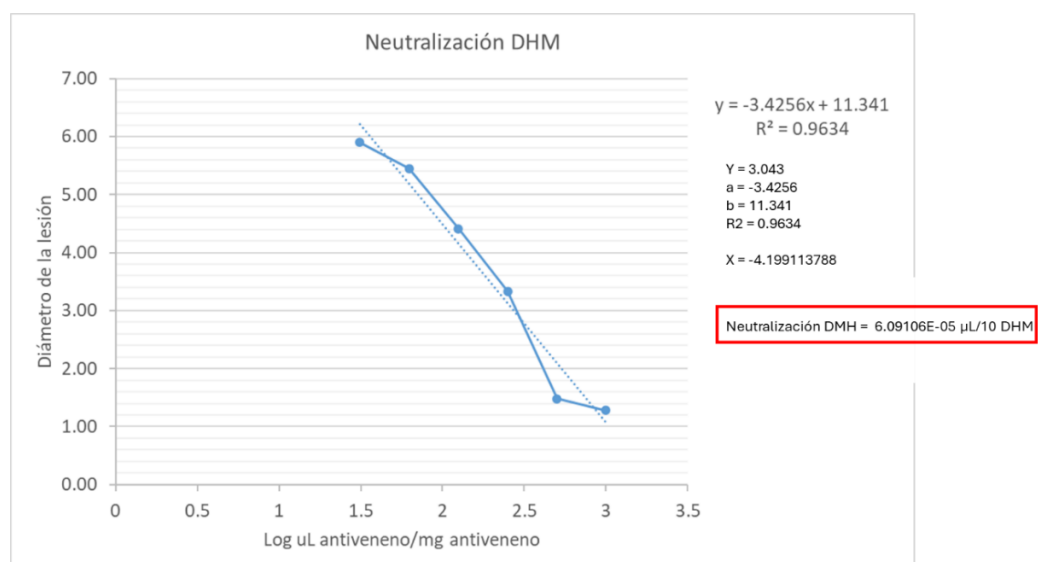
El ensayo de neutralización se realizó por duplicado a fin de poder verificar el resultado preliminar de manera experimental. El resultado mostró una reducción del área hemorrágica para ambos ensayos siendo los 2 primeros niveles los más significativos en cuanto a la neutralización de la actividad hemorrágica, al extrapolar las medidas obtenidas en una curva estándar se obtuvo una neutralización de 6.09×10^{-5} μL por 10 DHM lo que se traduciría como un valor de 0.0000609106 μL de suero hiperinmune capaz de neutralizar 10 DHM de veneno.

Figura 6

Reducción del patrón hemorrágico mediante la neutralización de la actividad hemorrágica usando suero hiperinmune de llama.

**Figura 7**

Curva estándar del promedio de ambos resultados de la prueba de neutralización hemorrágica



V. DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente estudio han demostrado que el suero hiperinmune producido por *Lama glama* presenta una alta capacidad para neutralizar la actividad hemorrágica inducida por el veneno de *Bothrops pictus*. La capacidad neutralizante observada podría atribuirse a la presencia de anticuerpos de dominio único (VHH), característicos de los camélidos, los cuales presentan alta afinidad y especificidad hacia epítomos de difícil acceso en toxinas complejas (Muyldermans, 2013). A pesar de que los ensayos de ELISA registraron un aumento de anticuerpos IgG totales a lo largo de las semanas de inmunización esto no necesariamente está asociado a la capacidad del suero hiperinmune para neutralizar la actividad hemorrágica de mejor forma a medida que aumenta la presencia de anticuerpos ya que la neutralización dependería de subclases específicas de IgG, además los ensayos de ELISA solo miden el reconocimiento o binding mientras que la neutralización implica la unión específica de epítomos funcionales y bloqueo de la actividad biológica en cuestión (Ledsgaard et al., 2018), en todo caso esta prueba solo nos señalaría que existe una respuesta humoral en curso y que el sistema inmunológico del espécimen está reaccionando al veneno. Esta respuesta inmunológica es consistente con la descrita para camélidos (Muyldermans, 2013, 2021), los cuales poseen una respuesta inmune eficiente frente a toxinas complejas.

La determinación de la dosis hemorrágica mínima (DHM) permitió establecer un parámetro experimental de referencia para evaluar la capacidad neutralizante del suero, obteniéndose un valor de 12.87 µg de veneno necesarios para inducir la actividad hemorrágica en el modelo experimental. Este valor es consistente con lo reportado para venenos del género *Bothrops*, los cuales presentan una alta actividad proteolítica y hemorrágica debido a la presencia de metaloproteasas con una dependencia directa de zinc para su acción biológica (Nina-Cueva et al., 2020).

En la Figura 1 se observan los pesos moleculares de las proteínas presentes en el veneno empleado, como se describe en publicaciones asociadas a estudios de proteínas en venenos de serpientes del género *Bothrops*, se estima que sus pesos moleculares correspondan a proteínas como: Metaloproteinasas clase P-III, SVMP, Serin-proteasas y Fosfolipasas A2 respectivamente, siendo principalmente las Metaloproteinasas las proteínas de mayor importancia para este estudio, ya que están estrechamente asociadas a la actividad hemorrágica causada por el veneno de *B. pictus* (Oyama & Takahashi, 2017). Las metaloproteasas presentes en el veneno, según lo observado en el análisis mediante SDS-PAGE, degradan componentes de la membrana basal como colágeno tipo IV y laminina, produciendo de esta manera daño en la microvasculatura y extravasación sanguínea (Oyama & Takahashi, 2017). Este mecanismo coincide con lo descrito en estudios previos sobre venenos botrópicos, en donde las hemorragias tienen un papel fundamental en la patogénesis del envenenamiento. Este mismo comportamiento se observa en la Figura 3 por lo que se puede afirmar que el veneno usado para los estudios tiene una alta capacidad hemorrágica ya que presenta fehacientemente las proteínas para tal fin.

El ensayo de neutralización hemorrágica demostró una reducción significativa del área de las lesiones hemorrágicas en los ratones tratados con el suero hiperinmune, lo cual confirmó su capacidad neutralizante frente al veneno. Esto indica que pequeñas cantidades del suero producido en llamas son capaces de reducir la actividad hemorrágica inducida por el veneno de forma satisfactoria. Ello respalda la utilidad potencial del suero hiperinmune producido en camélidos como una alternativa para la producción de antivenenos en nuestro país.

VI. CONCLUSIONES

- Se logró una neutralización exitosa de la actividad hemorrágica usando el suero hiperinmune de *Lama glama*.
- El veneno de *B. pictus* está constituido por una variedad de proteínas donde resaltan las metaloproteasas de alto peso molecular, las cuales son la principal causa de la actividad hemorrágica.
- Se determinó la dosis hemorrágica mínima (DHM) en 12.87 µg de veneno como la cantidad mínima capaz producir una lesión hemorrágica.
- Los títulos altos de IgG en muestras de sueros no se relacionan necesariamente con la neutralización funcional y efectiva de la actividad hemorrágica, este ítem merece una pronta atención en estudios futuros.
- El proceso de inmunización en *Lama glama* permite la producción progresiva de anticuerpos antibotrópicos especializados denominados nanoanticuerpos o anticuerpos VHH los cuales poseen la capacidad de neutralizar la actividad hemorrágica en el modelo experimental con ratones *Mus musculus*.
- Se evidenció una reducción significativa de las lesiones hemorrágicas, con una dosis neutralizante de 6.09×10^{-5} µL por 10 DHM, lo cual sugiere que pequeñas cantidades de suero hiperinmune son capaces de reducir significativamente el efecto hemorrágico del veneno, lo que demuestra su potencial utilidad en la producción de antivenenos.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios adicionales que evalúen el progreso de la neutralización hemorrágica en las diferentes etapas de la inmunización a fin de identificar en cuál de ellas se alcanza la máxima neutralización lo cual sería de mucha ayuda para establecer el límite del esquema de inmunización en los camélidos.
- Ampliar el número de individuos inmunizados para evaluar con mayor precisión la variabilidad inmunológica en camélidos.
- Realizar estudios de caracterización molecular de los nanoanticuerpos producidos para determinar su especificidad frente a otras toxinas del veneno.
- Desarrollar investigaciones orientadas a la producción de nanoanticuerpos recombinantes derivados de camélidos como alternativa a la producción tradicional de antivenenos.

VIII. REFERENCIAS

- Bailón Calderón, H., Colque Alave, E. G., Yaniro Coronel, V. O., Padilla Rojas, C., Galarza Pérez, M., Cáceres Rey, O. A., Bonilla Ferreyra, C., Tintaya Felix, B., García Neyra, D., Inga Arellano, R. R., Seraylan Ormachea, S., & Montejo Arevalo, H. (2020). Neutralización de la actividad letal del veneno de serpiente *Bothrops atrox* por suero hiperinmune de llama (*Lama glama*). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 37(3), 446–453. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.373.4597>
- Bailón Calderón, H., Yaniro Coronel, V. O., Cáceres Rey, O. A., Colque Alave, E. G., Leiva Duran, W. J., Padilla Rojas, C., Montejo Arevalo, H., García Neyra, D., Galarza Pérez, M., Bonilla, C., Tintaya, B., Ricciardi, G., Smiejkowska, N., Romão, E., Vincke, C., Lévano, J., Celys, M., Lomonte, B., & Muyldermans, S. (2020). Development of nanobodies against hemorrhagic and myotoxic components of *Bothrops atrox* snake venom. *Frontiers in Immunology*, 11, 655. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00655>
- Crispin, J., Atencio, J., Galarza, D., Bendezu, J., & Sanabria, A. (2025). Mordedura por *Bothrops pictus* en paciente adulto de un distrito de Lima: reporte de caso. *Revista Horizonte Médico (Lima)*. <https://doi.org/10.24265/horizmed.2025.v25n1.13>
- De Roodt, A. R., Litwin, S., & Vidal, J. C. (2003). Hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms determined by two different methods and relationship with proteolytic activity on gelatin and lethality. *Toxicon*, 41(8), 949–958. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00392-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00392-6)
- Guevara, M., Lazo Manrique, F., Chocas, A. Y., & Peruanas, A. (2011). Purificación y caracterización de un nuevo principio coagulante del veneno de la serpiente peruana *Bothrops pictus*. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 77(3), 182–190.

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2011000300003&lng=es&nrm=iso&tlng=es

- Gutiérrez, J. M. (2011). Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 51(1), 1–16.
- Instituto Clodomiro Picado. (2007). *Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos: Manual de métodos de laboratorio*. Universidad de Costa Rica. Instituto Clodomiro Picado – manual.
- Lazo Manrique, F. E. (2014). *Caracterización bioquímica, biológica y molecular de la L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente peruana Bothrops pictus “Jergón de Costa”* [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. Repositorio Institucional Cybertesis UNMSM
- Ledesma, M. (2016). *La inmunoserología como indicador del estatus sanitario en Camélidos Sudamericanos* [Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires]. Repositorio Digital Institucional de la Universidad de Buenos Aires. Registro de la tesis.
- Ledsgaard, L., Jenkins, T. P., Davidsen, K., Krause, K. E., Martos-Esteban, A., Engmark, M., Andersen, M. R., Lund, O., & Laustsen, A. H. (2018). Antibody cross-reactivity in antivenom research. *Toxins*, 10(10), 393. <https://doi.org/10.3390/toxins10100393>
- Manrique, H. (2000). *Ofidismo*. https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/folia/vol9_n1-2/ofidismo.htm
- Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 775–797. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>

- Muyldermans, S. (2021). Applications of Nanobodies. *Annual Review of Animal Biosciences*, 9, 401–421. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021419-083831>
- Navarrete, M., Silva, W., & Vargas, E. (2010). Las serpientes venenosas de importancia en la salud pública del Perú. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 11 (7), 1-13.
- Nina-Cueva, O., Olazábal-Chambilla, D., Quispe-Arpasi, J., Alzamora-Sánchez, A., Gomes-Helena, M., & Huancahuire-Vega, S. (2020). Caracterización bioquímica del veneno de la serpiente *Bothrops roedingeri* Mertens, 1942, y sus actividades edematógena, hemorrágica y miotóxica. *Biomédica*, 40(4), 682. <https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.5228>
- Organización Mundial de la Salud. (2023). *Snakebite envenoming*. WHO.Int NewsRoom. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>.
- Oyama, E., & Takahashi, H. (2017). Structures and Functions of Snake Venom Metalloproteinases (SVMP) from *Protobothrops* venom Collected in Japan. *Molecules*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/molecules22081305>
- Rosas, P. (2024). *Caracterización molecular y funcional de la metaloproteasa tipo III del veneno de la serpiente Bothrops pictus (Serpentes: Viperidae)* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. Repositorio Institucional Cybertesis UNMSM. unmsm.edu.pe
- Vivas-Ruiz, D., Rosas, P., Proleón, A., Torrejón, D., Lazo, F., Tenorio-Ricca, A. B., Guajardo, F., Almarza, C., Andrades, V., Astorga, J., Oropesa, D., Toledo, J., Vera, M. J., Martínez, J., Araya-Maturana, R., Dubois-Camacho, K., Hermoso, M. A., Alvarenga, V. G., Sanchez, E. F., ... Urra, F. A. (2023). Pictolysin-III, a Hemorrhagic Type-III Metalloproteinase Isolated from *Bothrops pictus* (Serpentes: Viperidae) Venom, Reduces Mitochondrial Respiration and Induces Cytokine

Secretion in Epithelial and Stromal Cell Lines. *Pharmaceutics*, 15(5).

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051533>

Vivas-Ruiz, D., Sandoval, G. A., Lazo, F., Rodríguez, E., Yarlequé, A., & Flores-Sánchez, E. (2015). Caracterización de la enzima similar a trombina del veneno de *Bothrops pictus* “jergón de costa.” *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(4), 652–658. <https://doi.org/10.17843/RPMESP.2015.324.1754>

Williams, D. J., Faiz, M. A., Abela-Ridder, B., Ainsworth, S., Bulfone, T. C., Nickerson, A. D., Habib, A. G., Junghanss, T., Fan, H. W., Turner, M., Harrison, R. A., & Warrell, D. A. (2019). Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: Snakebite envenoming. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0007059>

IX. ANEXOS

Anexo A.

Constancia de aprobación del protocolo de investigación del proyecto principal.

MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año de la Lucha contra la Corrupción y la Impunidad"

CONSTANCIA

El que suscribe, Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEA) del Instituto Nacional de Salud, deja constancia que el protocolo de investigación titulado: **"EVALUACION DEL POTENCIAL TERAPEUTICO Y APLICABILIDAD DE NUEVOS NANOANTICUERPOS RECOMBINANTES CONTRA EL VENENO DE SERPIENTES BOTHROPS PERUANOS"**, código OC-005-19, ha sido Evaluado y Aprobado por nuestro CIEA, no habiéndose encontrado objeciones en dicho protocolo de acuerdo a los estándares propuestos por nuestro Comité, y que se ejecutará bajo la responsabilidad del Biólogo César Augusto Bonilla Ferreyra, incluyendo los siguientes documentos:

1. Protocolo de Investigación. Versión 2.0 del 22/01/2019.
2. Anexo B – Formato Básico de Protocolos que Involucran Animales

La fecha de aprobación tendrá vigencia desde el 26 de marzo del 2019 hasta el 25 de marzo del 2020. Los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento, adjuntando el Informe de Avance de ejecución del estudio.

Notificar inmediatamente al CIEA-INS de cualquier enmienda, desviaciones o incidentes de acuerdo a los términos establecidos, el investigador reportará cada seis (06) meses el avance del proyecto de investigación y alcanzar al término de este estudio un informe final.

El Investigador debe conocer que la culminación del trámite de aprobación del proyecto de investigación, se hará a través de una Resolución Directoral emitida por la DG-OGITT.

Esta aprobación ética del protocolo no implica que este autorizado para ser ejecutado en nuestro país.

Jesús María, 28 de marzo del 2019



Ricardo López Ingunza
Med. Vet. Ricardo López Ingunza
 Presidente
 Comité Institucional de Ética para el Uso de
 Animales en Investigación
 Instituto Nacional de Salud

RLI/NCLF/cml.

Exp. OC-005-19
 Reg. 22377-18

Pág. 2 de 2

Anexo B.

Constancia del comité de ética para la aprobación del protocolo de investigación.

02

MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año de la Lucha contra la Corrupción y la Impunidad"

COPIA

MEMORANDO N° 014-2019-CIEA-INS

Para	:	DRA. NORA ESPIRITU SALAZAR Directora General Oficina General de Investigación y Transferencia Tecnológica
Asunto	:	APROBACION DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACION
Atención	:	Biólogo César Augusto Bonilla Ferreyra (Investigador Principal) CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLOGICOS
Referencia	:	MEMORANDO N° 038-2019-DG-CNPB/INS Registro N°22377-18
Fecha	:	Jesús María, 28 de marzo del 2019

Mediante el presente, expreso a usted mi cordial saludo y a la vez hago de su conocimiento que el Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales en Investigación (CIEA) del INS, ha EVALUADO y APRUEBA el protocolo de investigación titulado "EVALUACION DEL POTENCIAL TERAPEUTICO Y APLICABILIDAD DE NUEVOS NANOANTICUERPOS RECOMBINANTES CONTRA EL VENENO DE SERPIENTES BOTHROPS PERUANOS", código OC-005-19, se adjunta la Constancia de Aprobación respectiva, la misma que tendrá vigencia desde el 26 de marzo del 2019 hasta el 25 de marzo del 2020.

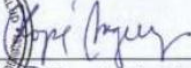
Asimismo, indicar al Investigador Principal que debe enviar al CIEA-INS el **Informe Semestral** de avance de ejecución del proyecto de investigación, de ser necesario presentar con un mes de anticipación la solicitud de extensión (renovación), cumpliendo los siguientes requisitos:

1. Haber cumplido con presentar al CIEA-INS los Informes Periódicos de Avance (formato G del CIEA).
2. Haber Notificado al CIEA-INS de cualquier cambio en el Protocolo (enmiendas), en el Consentimiento Informado o eventos adversos serios (si lo contempla el protocolo).
3. Carta dirigida al presidente del CIEA (justificando la renovación o extensión de tiempo del estudio).
4. Adjuntar a la solicitud de renovación o extensión de tiempo el **Informe Periódico de Avance** (formato G del CIEA).

Sin otro particular, reitero a usted las muestras de mi especial consideración.

Atentamente,




Med. Vet. Ricardo López Ingunza
 Presidente
 Comité Institucional de Ética para el Uso de
 Animales en Investigación
 Instituto Nacional de Salud

RLI/NCLF/cml.

 Exp. OC-005-19
 Reg. 22377-18

Pág. 1 de 2

Anexo C

Protocolo de preparación de geles de poliacrilamida

A. Armado de los geles:

Armar el marco de preparación del gel, llenarlo con agua destilada. Verificar su hermeticidad evidenciando que no existen fugas de agua del marco, dejándolo 20 min en reposo. Retirar el agua y secar con papel filtro.

B. Preparación del gel de corrida:

Preparar los geles según la cantidad de muestras a analizar. Para esto, tener cuidado de colocarse guantes descartables no estériles ya que los reactivos a manipular son altamente tóxicos.

Rotular un tubo como “Gel de Corrida” y **preparar 5 ml del gel de corrida al 12%**, mezclando los siguientes reactivos en el orden que se indican:

REACTIVOS	Geles de Resolución al 12%
Agua destilada	1.6 ml
Poliacrilamida al 30%	2 ml
Tris 1.5 M (pH 8.8)	1.3 ml
SDS al 10%	50 ul (0.05 ml)
APS (Persulfato de amonio) al 10%	50 ul (0.05 ml)
TEMED	2 ul (0.002 ml)

Homogenizar la mezcla con movimientos suaves, evitando la producción de burbujas que pudieran impedir la polimerización.

Llenar inmediatamente el marco del gel hasta $\frac{2}{3}$ de su altura aproximadamente. Si se presentan burbujas, estas pueden ser eliminadas golpeando suavemente la pared del marco o vertiendo 1.5 ml de butanol. El volumen sobrante mantenerlo como control de polimerización.

Agregar sobre el gel 500 ul de agua purificada o destilada depositando suavemente desde las paredes laterales del marco, con ello se asegura una superficie regular en el gel de corrida. Dejar en reposo 15 min, a temperatura ambiente hasta su polimerización.

C. Preparación del gel de apilamiento:

Rotular un tubo como “Gel de Apilamiento” y **prepara 3 ml del gel de apilamiento al 5%** mezclando los siguientes reactivos en el orden que se indica:

REACTIVOS	Geles de Apilamiento al 5%
Agua destilada	2.1 ml
Poliacrilamida al 30%	0.5 ml (500 ul)
Tris 1.5 M (pH 6.8)	0.38 ml (380 ul)
SDS al 10%	300 ul (0.30 ml)
APS (Persulfato de amonio) al 10%	300 ul (0.30 ml)
TEMED	3 ul (0.003 ml)

Homogenizar la mezcla con movimientos suaves evitando la producción de burbujas que pudieran impedir la polimerización.

Eliminar el agua de la superficie del gel de corrida, inclinándolo lateralmente y absorbiendo el agua con un papel toalla.

Llenar inmediatamente todo el marco del gel hasta el borde.

Colocar suavemente un peine formador de pocillos para 10 muestras, evitando la formación de burbujas. Dejar polimerizar a temperatura ambiente, el volumen sobrante mantenerlo como control de polimerización.

D. Armado del equipo de electroforesis

1) Retirar el gel de corrida, del marco una vez polimerizado y colocarlo en el soporte de geles del equipo de electroforesis vertical de mini gel, asegurándolo correctamente a su estructura. Cerrar el otro lado con la tapa de plástico que para tal fin tiene el equipo. Se forma un pozo interno entre ambos.

2) Llenar primero el pozo interno con solución Tamponada de corrida Tris-glicina pH 8.1 - 8.8 hasta el tope y verificar que no haya fugas. Luego, terminar de llenar el tanque por rebalse del pozo interno hasta donde corresponda.

3) Retirar el peine con movimientos suaves, teniendo cuidado de no romper los geles, para facilitar que el buffer pueda ingresar y llene los pocillos. Si hubiera formación de burbujas en ellos, ayudarse con una aguja hipodérmica para eliminarlas.

E. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y MARCADOR ESTÁNDAR DE PESO MOLECULAR

1. Preparar la muestra de veneno pesando **10 mg** y reconstituyéndolo en **1 ml de agua destilada**. A partir de esta, tomar 10 ul y diluir con 990 ul de agua destilada, quedando este último con una **concentración de 1 ug/ul**. De esta última tomar 60 ul y depositar en un criovial o microvial de fondo cónico y agregar 60 ul con la solución Tamponada de muestra **NO REDUCTORA (1:1)**.

2. En otro criovial o microvial colocar otros 60 ul y agregar 60 ul de la solución Tamponada de muestra **REDUCTORA**.

3. Calentar las muestras en condiciones **REDUCTORAS a 100°C por 5 min** y luego dejar enfriar.

obs: El estándar de peso molecular se emplea según indicaciones del fabricante.

F. CARGADO DE LOS POCILLOS

Llenar los pocillos con 10 ul de muestra de veneno dejando un pocillo entre cada muestra y colocar el marcador molecular en el primer o 6to pocillo del gel como se observa en la siguiente tabla.

Gel 1:

Pocillo N° 1	-----
Pocillo N° 2	10 ul de Muestra 1 de veneno en condiciones REDUCTORAS
Pocillo N° 3	-----
Pocillo N° 4	10 ul de Muestra 1 de veneno en condiciones NO REDUCTORAS
Pocillo N° 5	-----
Pocillo N° 6	10 ul de Marcador Molecular
Pocillo N° 7	-----
Pocillo N° 8	10 ul de Muestra 1 de veneno en condiciones REDUCTORAS
Pocillo N° 9	-----
Pocillo N° 10	10 ul de Muestra 1 de veneno en condiciones NO REDUCTORAS

Tapar el tanque de electroforesis, conectar el equipo a la fuente de poder y programar a un voltaje de **100 voltios** y en un tiempo entre **60 a 90 minutos**.

Una vez terminado el tiempo de corrida apagar la fuente de poder y proceder a desmontar el equipo de electroforesis.

Retirar el gel de los vidrios y evitando que se rompa para ello humedecer los dedos de los guantes con buffer de corrida y en una bandeja con buffer a fin de evitar que se rompa el gel. Colocar el gel dentro de una bandeja con aproximadamente 10 ml de colorante Azul de Coomassie, luego agregar la cantidad suficiente de colorante hasta cubrir todo el gel.

Dejar coloreando el gel por 1 hora a temperatura ambiente, en agitación orbital constante por 60 rpm/min.

Retirar el colorante empleado y agregar 20 ml de solución decolorante, a manera de retirar el restante de colorante, agitar suavemente y retirar la solución coloreada (repetir de ser necesario).

Cubrir completamente el gel con suficiente solución decolorante, tapar la bandeja y agitar por 1 hora en agitación orbital constante de 60 rpm/min. Repetir la operación, cambiando la solución decolorante, hasta que desaparezca la coloración azul excedente y se observe nítidamente las bandas.

Retirar la solución decolorante y agregar agua destilada, manteniéndola en ella hasta su fotodocumentación.

Anexo D

Protocolo de ELISA para medición de anticuerpos de *Lama glama*

Preparación de Buffers:

- Buffer carbonato pH 9.6

Agregar 150 ul de carbonato de sodio (NaCO_3) al 1M y 350 ul de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) al 1M. Llevar el volumen hasta 10 ml con H_2O mili-Q. Filtrar en 0.22um y almacenar a temperatura ambiente.

- Buffer de Bloqueo

Mezcla de leche al 2% en PBS 1X. Resuspender 0.5g de leche en 25 ml de PBS 1X.

- Buffer de lavado

PBS 1X + 0.05% de Tween 20. Mezclar 500 uL de Tween 20 en 1 L de PBS 1X. Temperar antes de usar.

- Acido Sulfúrico (H_2SO_4)

Agregar 6 ml de H_2O mili-Q, luego en campana extractora añadir 266 ul de ácido sulfúrico puro. Ajustar el volumen a 10 ml con H_2O mili-Q. Almacenar a temperatura ambiente y cubrir el tubo con aluminio.

PRUEBA DE ELISA (para venenos de Bothrops)

- A. Diluir cada veneno en buffer carbonato a una concentración final de 1 ng/ml.
- B. Agregar 100 ul/pocillo del veneno diluido, cubrir la placa con parafilm y papel aluminio e incubar toda la noche a 4°C.
- C. Descartar por inversión la solución de veneno y secar la microplaca sacudiéndola sobre papel absorbente.

D. Agregar 250 ul del buffer de bloqueo (leche al 2% en PBS 1X) en cada pocillo, cubrir la placa con parafilm y papel aluminio e incubar por 1 hora a temperatura ambiente.

E. Diluir los sueros desde 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600; y 1/3200 en buffer carbonato y homogenizarlos por vortex; así como el control negativo (suero pre inmune) y el blanco (pocillo con antígeno fijado sin suero y pocillo sin antígeno fijado con suero, ambos bloqueados).

F. Descartar por inversión el buffer de bloqueo, secar la placa sobre papel absorbente y lavar 10 veces con 250 ul de buffer de lavado cada pocillo.

G. Añadir a cada pocillo 100 ul del suero a titular e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, realizándose por duplicado.

H. Descartar por inversión el suero, secar la placa sobre papel absorbente y lavar 10 veces con 250 ul de buffer de lavado cada pocillo.

I. Agregar a cada pocillo 100 ul de conjugado (anti-Llama IgG (H+L)-Peroxidasa) diluido 1:10000 (si el anti-IgG es nuevo) en buffer carbonato, cubrir la placa con parafilm y papel aluminio e incubar por 1 hora a temperatura ambiente.

J. Descartar por inversión el conjugado, secar la placa sobre papel absorbente y lavar 10 veces con 250 ul de buffer de lavado cada pocillo.

K. Añadir a cada pocillo 100 ul de sustrato TMB (tetrametil-benzidina) en condiciones de baja luz e incubar de 5 a 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

L. Añadir 50 ul de solución de parada (H₂SO₄) 0.5M.

M. Leer la placa a una longitud de onda de 450 nm en el espectrofotómetro.

Anexo E

Protocolo de preparación de inóculos para Dosis Hemorrágica Mínima (DHM)

Preparación del veneno de trabajo:

1. De una solución stock de veneno al 10 mg/ml cargar 400 ul de veneno en un tubo Falcon de 15ml y completar con 3600 ul de solución salina para tener una concentración final de 0.1 mg/ml de veneno.

2. De la preparación anterior de veneno al 0.1 mg/ml cargar 300 ul en otro tubo Falcon y completar con 2700 ul de solución salina para tener una concentración final de 0.01 mg/ml de veneno, esta será la concentración de trabajo para el ensayo de DOSIS HEMORRÁGICA MÍNIMA.

Preparación de los inóculos para el ensayo de DHM:

- a) Colocar 600 ul de veneno al 0.01 mg/ml en un microtubo, esta será la dilución 1/1.
- b) Del veneno al 0.01 mg/ml cargar 525 ul en un microtubo y agregar 525 ul de sol. salina para tener una dilución $\frac{1}{2}$.
- c) A partir de la dilución $\frac{1}{2}$ cargar 450 ul y completar con 450 ul de sol. salina para obtener la dilución $\frac{1}{4}$.
- d) A partir de la dilución $\frac{1}{4}$ cargar 300 ul y completar con 300 ul de sol. salina para obtener la dilución $\frac{1}{8}$.

Luego de tener listos los inóculos con diluciones en serie del veneno de trabajo se deberán inocular de manera subcutánea 100 ul a cada ratón de acuerdo a la dilución asignada por caja ($\frac{1}{1}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, y $\frac{1}{8}$) y adicionalmente en una caja control con 2 ratones inocular 100 ul de solución salina a cada ratón.

Tabla 2.*Preparación de inóculos para DHM*

DILUCIONES	Concentración del veneno (ug/ml)	Vol. de veneno (ul)	vol. de solución salina (ul)	TOTAL (ul)	volumen final de trabajo (ul)
1/1	100	600	-----	600	600
1/2	50	525	525	1050	600
1/4	25	450	450	900	600
1/8	12.5	300	300	600	600

Anexo F

Protocolo de preparación de inóculos para Neutralización de la Dosis Hemorrágica Mínima

Preparación de la dosis reto:

1. De una muestra de veneno de 20 mg/ml colocar 643 ul de muestra en un vial y completar con 357 ul de solución salina para obtener una dosis reto final de 12.87 mg/ml.

Preparación de los inóculos con antiveneno:

- a) Colocar 500 ul de suero hiperinmune puro y rotular como Tubo A.
- b) Colocar 250 ul del suero del Tubo A en otro vial y completar con 250 ul de solución salina y rotular como Tubo B
- c) Colocar 250 ul del suero del Tubo B en otro vial y completar con 250 ul de solución salina y rotular como Tubo C.
- d) Colocar 250 ul del suero del Tubo C en otro vial y completar con 250 ul de solución salina y rotular como Tubo D.
- e) Colocar 250 ul del suero del Tubo D en otro vial y completar con 250 ul de solución salina y rotular como Tubo E.
- f) Colocar 250 ul del suero del Tubo E en otro vial y completar con 250 ul de solución salina y rotular como Tubo F.

Preparación de los inóculos de veneno + antiveneno

- 1) En el Tubo 1 colocar 100 ul de dosis reto de veneno mas 100 ul de solución del Tubo A preparado previamente mas 800 ul de solución salina.
- 2) En el Tubo 2 colocar 100 ul de dosis reto de veneno más 100 ul de solución del Tubo B preparado previamente más 800 ul de solución salina.

- 3) En el Tubo 3 colocar 100 ul de dosis reto de veneno más 100 ul de solución del Tubo C preparado previamente más 800 ul de solución salina.
- 4) En el Tubo 4 colocar 100 ul de dosis reto de veneno más 100 ul de solución del Tubo D preparado previamente más 800 ul de solución salina.
- 5) En el Tubo 5 colocar 100 ul de dosis reto de veneno más 100 ul de solución del Tubo E preparado previamente más 800 ul de solución salina.
- 6) En el Tubo 6 colocar 100 ul de dosis reto de veneno más 100 ul de solución del Tubo F preparado previamente más 800 ul de solución salina.
- 7) Para el inóculo de Control de Veneno colocar 100 ul de veneno desafío mas 900 ul de solución salina.
- 8) Para el inóculo de Control de Antiveneno colocar 100 ul de Suero hiperinmune puro más 900 ul de solución salina.

Una vez lista la preparación de los inóculos de veneno + antiveneno estos pasan a ser incubados a 37°C durante 30 minutos en baño maría a fin de activar el efecto neutralizante del suero. Luego de la incubación se les inocula intradérmicamente a los ratones 100 ul de los inóculos preparados respectivamente a los ratones divididos en grupos de 6 jaulas mas una jaula control de veneno y una jaula control de suero y se deja actuar durante 2 horas, pasado este tiempo los ratones son sacrificados y se les retira la piel a fin de medir el patrón hemorrágico neutralizado.

Tabla 3.*Preparación de inóculos con antiveneno*

DILUCIONES	Procedencia del suero usado	Vol. de suero (ul)	vol. de solución salina (ul)	TOTAL (ul)	Rotulo final por Tubo
1/1	-----	500	-----	500	A
1/2	Tubo A	250	250	500	B
1/4	Tubo B	250	250	500	C
1/8	Tubo C	250	250	500	D
1/16	Tubo D	250	250	500	E
1/32	Tubo E	250	250	500	F

Tabla 4.*Preparación de inóculos con veneno + antiveneno*

INOCULOS	Vol. de veneno desafío (ul)	Antiveneno preparado (ul)	vol. de solución salina (ul)	TOTAL (ul)	volumen inoculado a ratones (ul)
Tubo 1	100	Tubo A: 100	800	1000	100
Tubo 2	100	Tubo B: 100	800	1000	100
Tubo 3	100	Tubo C: 100	800	1000	100
Tubo 4	100	Tubo D: 100	800	1000	100
Tubo 5	100	Tubo E: 100	800	1000	100
Tubo 6	100	Tubo F: 100	800	1000	100
Control de veneno	100	-----	900	1000	100
Control de suero	-----	100	900	1000	100