

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**“NEUTRALIZACIÓN DEL EFECTO LETAL EN RATONES
(*Mus musculus*) DEL VENENO DE SERPIENTE
(*Bothrops atrox*) POR SUERO HIPERINMUNE
DE LLAMA (*Lama glama*)”**

TESIS

Presentada por:

Bach. Elizabeth Gaby Colque Alave

Para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

TACNA - PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

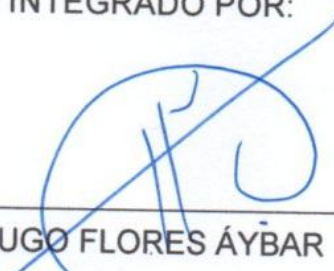
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

TESIS

**NEUTRALIZACIÓN DEL EFECTO LETAL EN RATONES
(*Mus musculus*) DEL VENENO DE SERPIENTE
(*Bothrops atrox*) POR SUERO HIPERINMUNE
DE LLAMA (*Lama glama*)**

TESIS SUSTENTADA Y APROBADA EL 26 DE DICIEMBRE DEL 2017,
POR EL JURADO CALIFICADOR INTEGRADO POR:

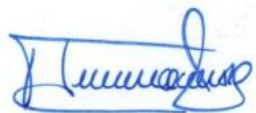
PRESIDENTE:


Dr. HUGO FLORES ÁYBAR

SECRETARIO:


MSc. FACUNDO EMILIO MAQUERA LLANO

VOCAL:


MSc. TEODORA JULIA CONDORI SILVESTRE

ASESOR:


MSc. LUIS ALBERTO BARRIOS MOQUILLAZA

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y estar conmigo en cada paso que doy, fortalecer mi corazón e iluminar mi mente.

A mi madre Blanca con mucho cariño por ser el pilar fundamental en toda mi educación y por su incondicional apoyo.

A mi tío Beto por ser ejemplo de padre y del cual aprendí aciertos en momentos difíciles; a mi madrina Blanca, mi tía Amparo, mi mamá Sabina y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en el desarrollo de esta tesis.

Al MV. Benigno Tintaya Félix por su tiempo compartido y por impulsar el desarrollo de mi formación profesional.

A mis amigos que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos.

AGRADECIMIENTOS

Al Blgo. Carlos Padilla Rojas por su excelente asesoramiento durante todo el trabajo de tesis.

Al Msc. Henri Bailón Calderón, Blgo., mi patrocinador por su perseverancia y permanente asistencia.

Al MV. Benigno Tintaya Félix por su colaboración material y su buena orientación en la parte experimental.

Del mismo modo agradezco por sus sugerencias y consejos a: Blgo. Omar Cáceres Rey, Blgo. César Bonilla Ferreyra, MV. Juan Lévano Saravia, Blgo. Marco Galarza Perez.

Al Instituto Nacional de Salud por su apoyo material y de animales de experimentación.

A mi asesor, el MV. Luis Barrios Moquillaza por su apoyo en todo momento.

A toda persona que de alguna manera ha prestado su apoyo durante el presente trabajo.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1 Descripción del problema.....	3
1.2 Justificación	5
1.3 Objetivos	7
1.3.1 Objetivo general	7
1.3.2 Objetivos específicos.....	7
1.4 Hipótesis	7
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	9
2.1 Antecedentes	9

2.2	Bases teóricas	13
2.3	<i>Bothrops atrox</i> (jergona)	14
2.4	Base conceptual.....	23
CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS.....		25
3.1	Materiales	25
3.1.1	Ubicación geográfica y temporal	25
3.1.2	Unidad de estudio.....	25
3.1.3	Población y muestra	25
3.1.4	Criterios de inclusión y exclusión	28
3.1.5	Materiales	28
3.2	Métodos	30
3.2.1	Tipo y diseño de investigación	30
3.2.2	Método de investigación	30
3.2.3	Metodología de la investigación.....	30
CAPÍTULO IV: RESULTADOS		52
4.1	Determinación de la Actividad Letal (DL ₅₀) del veneno de serpiente (<i>Bothrops atrox</i>) en ratones (<i>Mus musculus</i>).	52
4.2	Estandarización de un protocolo de inmunización de veneno de serpiente (<i>Bothrops atrox</i>) a un ejemplar de llama (<i>Lama glama</i>).	55

4.3	Determinación de la curva de aparición de anticuerpos en llama (<i>Lama glama</i>) mediante la técnica de ELISA	55
4.4	Determinación de la Neutralización de la Actividad Letal (DE ₅₀) del veneno de serpiente (<i>Bothrops atrox</i>) en ratones (<i>Mus musculus</i>).	56
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN		60
5.1	Determinar la Actividad Letal (DL ₅₀) del veneno de serpiente (<i>Bothrops atrox</i>) en ratones (<i>Mus musculus</i>).	60
5.2	Estandarización de un protocolo de inmunización de veneno de serpiente (<i>Bothrops atrox</i>) a un ejemplar de llama (<i>Lama glama</i>).	62
5.3	Determinación de la curva de aparición de anticuerpos en llama (<i>Lama glama</i>) mediante la técnica de ELISA	64
5.4	Determinar la Neutralización de la Actividad Letal (DE ₅₀) del veneno de serpiente (<i>Bothrops atrox</i>) en ratones (<i>Mus musculus</i>).....	65
CONCLUSIONES.....		68
RECOMENDACIONES.....		69
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		70
ANEXOS		76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de veneno de <i>Bothrops atrox</i>	33
Tabla 2. Protocolo de inmunización de llama para la obtención de suero hiperinmune Antibotrópico.....	38
Tabla 3. Protocolo de re-inmunización del refuerzo de <i>Lama</i> <i>glama</i> con veneno de <i>Bothrops atrox</i>	40
Tabla 4. Concentración de mg de veneno/ mL de suero	49
Tabla 5. Dosis letal media (DL ₅₀) del veneno de <i>Bothrops atrox</i>	52
Tabla 6. Dosis efectiva media (DE ₅₀) del suero de llama (<i>Lama</i> <i>glama</i>) inmunizado contra el veneno de <i>Bothrops atrox</i>	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Bothrops atrox</i> (jergón de selva)	15
Figura 2. Representación estructural de la inmunoglobulina G convencional (IgG1) “A” y las inmunoglobulinas de cadenas pesadas (IgG2 “B” e IgG3 “C”) de los camélidos (Muyldermans y Lauwereys., 1999).	19
Figura 3. Curvas de dosis (ng de veneno/g de ratón) comparado con el porcentaje de mortalidad del veneno de <i>Bothrops atrox</i>	53
Figura 4. Título de suero de llama a una dilución de 1:800 para medir la concentración de anticuerpos post-inoculación.	55
Figura 5. Curva de dosis del antisuero en relación con el porcentaje de mortalidad pos-inyección del veneno de <i>Bothrops atrox</i> neutralizado “in vivo” con distintas dosis de suero de llama inmunizado contra este veneno a las 24 y 48 horas.	57
Figura 6. Dosis efectiva media en relación a los días de inoculación. La dosis efectiva media fue hallada para 5 inmunizaciones.	58

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cálculos de volúmenes de veneno y suero fisiológico que se inocularon en el ensayo DL ₅₀	77
Anexo 2. Cálculos de volúmenes de veneno de <i>Bothrops atrox</i> y suero de <i>Lama glama</i> para inocular en el ensayo DE ₅₀	78
Anexo 3. Mortalidad a distintas dosis de veneno en el ensayo DL ₅₀	79
Anexo 4. Observación macroscópica del ensayo del DL ₅₀	80
Anexo 5. Protocolo de inmunización (*) y re inmunización (**) de <i>Lama glama</i> con veneno de <i>Bothrops atrox</i>	81
Anexo 6. Mortalidad obtenida con diferentes dosis de veneno y antisuero (DE ₅₀).	82
Anexo 7. Prueba de chi – cuadrada y PROBIT.....	83

RESUMEN

El desarrollo de nuevos métodos en la producción de antivenenos es fundamental para enfrentar los crecientes niveles de ofidismo a causa de *Bothrops atrox* en el Perú. Para esto se buscó determinar la capacidad de neutralización del efecto letal del veneno de serpiente (*Bothrops atrox*) en ratones (*Mus musculus*) por acción de un suero hiperinmune experimental producido en llama (*Lama glama*). Se inmunizó a una llama sana. Se colectaron muestras de sangre cada siete días durante el transcurso del protocolo de inmunización. Se calculó la Dosis Letal 50 (DL₅₀) del veneno y se determinó el título de anticuerpos del suero de llama mediante la técnica inmunoquímica ELISA también se calculó la potencia y se realizó una comparación. La DL₅₀ fue de 3,96 µg/g, similar a otros trabajos realizados en *Bothrops atrox* en Perú. Con el suero obtenido se realizaron pruebas de neutralización en ratones utilizando una dosis reto de veneno de 4DL₅₀. Se determinó la DE₅₀, el título óptimo de anticuerpos fue de 3,6 mg/mL, obtenido al día 91 posterior a la primera inoculación.

Palabras clave: Veneno, pruebas de neutralización, suero, *Lama glama*, *Bothrops atrox*.

ABSTRACT

The development of new methods in the production of antivenoms is fundamental to face the rising levels of ophidism caused by *Bothrops atrox* in Peru. The aim of this study was to determine the neutralizing capacity of the lethal effect in mice (*Mus musculus*) of snake venom (*Bothrops atrox*) by hyperimmune llama serum (*Lama glama*). Induced by the application of a pre-imposed hyperimmunization scheme against the venom of *Bothrops atrox* to a specimen of *Lama glama*. Blood samples were collected every seven days. For this, the Lethal Dose 50 (LD₅₀) of the venom was evaluated and the serum titre of the llama serum was determined using the ELISA immunochemistry technique, also the potency was also calculated and a comparison was made. The LD₅₀ was 3,96 µg / g, similar to other studies performed in *Bothrops atrox* in Peru. With the serum obtained neutralization tests were performed in mice using a challenge dose of 4DL₅₀ venom. DE₅₀, which was expressed in ug of venom neutralized per ml of serum, was determined. The optimal titre of antibodies was 3,6 mg/mL obtained on day 91 after the first inoculation.

Keywords: Venom, Neutralization Tests, Serum, *Lama glama*, *Bothrops atrox*.

INTRODUCCIÓN

El ofidismo es un síndrome resultante del envenenamiento ocasionado por el accidente ofídico, con serpientes venenosas, generalmente con especies pertenecientes a las familias Viperidae y Elapidae.

En nuestro país existe una gran diversidad de ecosistemas naturales que permiten albergar una fauna ponzoñosa muy variada, que se ve amenazada por el hombre en las distintas regiones, especialmente de la selva, convertidas hoy en atractivos polos de desarrollo, colonización y turismo, situaciones que hacen inevitable la invasión de sus nichos ecológicos, provocando por tanto, un aumento alarmante de accidentes por envenenamiento. Así mismo, debido a que nuestro país, durante los últimos diez años, ha experimentado un permanente crecimiento poblacional y una creciente urbanización de las áreas silvestres, que involucra el reemplazo sistemático de las áreas naturales por cultivos agroindustriales, áreas de ganadería y pastoreo, situaciones que multiplican aún más la probabilidad de accidentes por envenenamiento.

En el Perú, se conoce a la serpiente (*Bothrops atrox*) como la especie de mayor importancia médica, responsabilizándosele del 88 a 92% de los

casos de ofidismo en el quinquenio 2010 – 2015, produciendo morbimortalidad y dejando secuelas como amputaciones y/o laceraciones en las partes afectadas. El daño tisular que se presenta, es debido a un conjunto de actividades presentes en el veneno, como el efecto proteolítico (destrucción de proteínas especialmente estructurales), coagulante, vasculotóxico y nefrotóxico. El cuadro clínico se caracteriza por dolor, edema, equimosis, eritema y necrosis. En los casos graves puede presentarse vesículas o ampollas de contenido seroso y hemorrágico, así como hematemesis y choque.

El único tratamiento farmacológicamente válido, para los casos de ofidismo, es la aplicación de inmunoterapia artificial pasiva, mediante la transferencia de anticuerpos IgG antiveneno, generalmente heterólogos, de origen equino.

En el Perú, el suero antibotrópico polivalente líquido es elaborado por el Instituto Nacional de Salud como una solución purificada de inmunoglobulinas específicas, IgG completa, obtenidas a partir del plasma de equinos hiperinmunizados con un pool de venenos de las serpientes del género *Bothrops*, específicamente *Bothrops atrox*, *B. pictus*, *B. barnetti*, *B. braziili* y *Bothrocophias hyoprora*.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del problema

El Instituto Nacional de Salud (INS-MINSA) produce y controla la calidad de los antiofídicos de uso humano disponibles en el Perú. Los sueros son distribuidos a las diferentes regiones y áreas del Ministerio de Salud (Zavaleta, A., 2013).

El uso del suero antiofídico oportunamente es necesario, ya que el beneficio máximo del mismo se obtiene en un lapso de tiempo que comprende las primeras seis horas del accidente (Rodríguez, S. et al., 2004).

En el Perú, la serpiente (*Bothrops atrox*), o comúnmente llamada jergón, es la responsable del 88 al 92% de los casos de mordedura reportados. Los accidentes por ofidismo ocurren en la mayoría de casos en personas que están en plena actividad productiva (agrícola, tala de madera, buscadores de oro, etc.). El sexo masculino entre 10 y 50 años es el más afectado (65 %) (Lévano, J. & Fernández, R., 2004).

Actualmente existen algunos problemas asociados a la producción de antídoto contra el veneno de serpiente (*B. atrox*), como la necesidad del uso de serpientes para la obtención del veneno, el riesgo implícito en la obtención del veneno, el uso de animales equinos para la obtención del suero hiperinmune y luego extraer los anticuerpos totales, que contienen los anticuerpos neutralizantes del veneno y demás anticuerpos del animal. Los equinos utilizados sufren a menudo de hepatomegalia, a causa de la inmunización con los venenos. Diversas investigaciones se dirigen a mejorar los procesos fisiológicos y bioquímicos de esta importante misión, entre ellos las pruebas con coadyuvantes alternativos que mejoran la liberación y asimilación del veneno dentro del caballo con miras para reducir los efectos negativos de las inoculaciones (Mora, D. et al., 2012).

Además, los anticuerpos equinos completos contienen la fracción constante en la cadena pesada, que es reconocida por los receptores de células T y por los factores del complemento; lo cual también pueden causar otras reacciones adversas conocidas como enfermedad asociada al suero, que se caracteriza principalmente por urticaria, tos, náusea y vómitos, taquicardia y dolores de cabeza; además, en muchos casos el paciente puede desarrollar anafilaxia sistémica con síntomas como hipotensión, broncoespasmo y angioedema (Rodríguez, S. et al., 2004).

Debido a la creciente demanda y al indiscutible interés socio-sanitario de esta actividad, la industrialización de sueros antiofídicos ha perseguido una mejora operativa que conlleva a la reducción de costos, donde a mayor demanda de sueros mayores serán los requerimientos de gastos y debido a su alto costo eventualmente puede hacer que su fabricación se torne menos accesible económicamente (Rodríguez, S. et al., 2004).

1.2 Justificación

La investigación se realizó con la finalidad de aportar nuevas alternativas metodológicas para la producción de biológicos en el INS – MINSA, principal ente productor y distribuidor de sueros antiofídicos a nivel nacional.

Los beneficiarios directos son la población afectada por mordedura de serpiente (*Bothrops atrox*) generalmente de bajos recursos, las personas que realizan ecoturismo, personal que realiza el mantenimiento y extracción del veneno de serpiente.

El Instituto Nacional de Salud, se encuentra en constantes estudios de investigación en salud, en beneficio de nuevos aportes científicos a favor de la Salud Pública. Lo que conlleva a la búsqueda de mejorar el sistema de producción de antídotos contra las mordeduras de serpientes, con un proceso más sencillo, más económico, más seguro y eficaz, que al mismo

tiempo de neutralizar la acción del veneno, proteja la salud del paciente y no tenga efectos adversos.

El valor teórico del trabajo de investigación permite aportar hacia áreas del conocimiento en ciencias de la salud. Los resultados pueden ser aplicables en nuevos estudios de investigación relacionados al ofidismo y a las ventajas del suero hiperinmune producido en llama (*Lama glama*) contra veneno de *Bothrops atrox*; del cual se esperó una mayor actividad específica, porque tiene una mejor farmacocinética y tiempo de respuesta, debido al menor tamaño de los nanoanticuerpos, que permiten un acceso más rápido y fácil a las células y tejidos. También se sabe que los nanoanticuerpos son más estables y resistentes que los anticuerpos normales, a diferentes condiciones como altas temperaturas y acidez.

Por ello, el objetivo principal de este trabajo es determinar la capacidad de neutralización del efecto letal del veneno de serpiente (*Bothrops atrox*) en ratones (*Mus musculus*), por acción del suero hiperinmune de llama (*Lama glama*).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Determinar la capacidad de neutralización del efecto letal en ratones (*Mus musculus*) del veneno de serpiente (*Bothrops atrox*) por suero hiperinmune de llama (*Lama glama*).

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar la Actividad Letal (DL_{50}) del veneno de serpiente (*Bothrops atrox*) en ratones (*Mus musculus*).
- Estandarizar un protocolo de inmunización de veneno de serpiente (*Bothrops atrox*) a un ejemplar de Llama (*Lama glama*).
- Determinar la curva de aparición de anticuerpos en llama (*Lama glama*) mediante la técnica de ELISA.
- Determinar la Neutralización de la Actividad Letal (DE_{50}) del veneno de serpiente (*Bothrops atrox*) en ratones (*Mus musculus*).

1.4 Hipótesis

H1: El suero hiperinmune producido en la Llama (*Lama glama*) neutraliza el efecto letal del veneno de serpiente (*Bothrops atrox*).

Ho: El suero hiperinmune producido en la Llama (*Lama glama*) no neutraliza el efecto letal del veneno de serpiente (*Bothrops atrox*).

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Se procedió a buscar información relacionado al tema y lo que se obtuvo fue:

A nivel nacional:

En el Perú, el suero antibotrópico polivalente líquido es elaborado por el Instituto Nacional de Salud (INS) y para ello se utiliza un método antiguo que consiste en inmunizar animales equinos con un pool de venenos de las serpientes del género *Bothrops*, específicamente *Bothrops atrox*, *B. pictus*, *B. barnetti*, *B. braziili* y *Bothrocophias hyoprora* para inducir la producción de un suero hiperinmune que contenga los anticuerpos neutralizantes (Rodríguez, S. et al., 2004).

En el Laboratorio de Biología Molecular de la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos se estudió la inmunogenicidad del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*, “jergón”, utilizando los métodos inmunoenzimáticos de ELISA y Western Blot. Para

este fin se inmunizaron conejos albinos Nueva Zelanda (2 kg. aprox.) con cuatro dosis de 500 µg del veneno de *B. atrox* en un período de 90 días. La producción de anticuerpos fue monitoreada mediante la técnica de ELISA, determinándose el título del suero hiperinmune obtenido al final del protocolo de inmunización. El esquema de inmunización utilizado permitió una producción sostenida de anticuerpos a partir del día 20 del protocolo. Finalizado este proceso, el título del suero fue calculado en 25 6000, lo cual mostró la eficacia y practicidad del procedimiento desarrollado. Los resultados obtenidos constituyen el paso inicial para posteriores ensayos dirigidos a la optimización en la producción de inmunoseros para el tratamiento del envenenamiento (Sandoval, G. et al., 2011).

En el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos se desarrolló un protocolo de inmunización para producir inmunoglobulinas IgY de origen aviar contra el veneno de *Bothrops atrox* y evaluar la capacidad neutralizante. Se inmunizaron seis gallinas de postura de la raza Hy line Brown con 500 µg/dosis de veneno de *B. atrox* en un período de dos meses. Cada semana, los huevos fueron colectados para el aislamiento de inmunoglobulinas IgY a partir de la yema, usando dos pasos consecutivos con ácido caprílico y sulfato de amonio. La detección de

anticuerpos se realizó por inmunodifusión doble mientras que el título y reactividad cruzada se determinaron por las técnicas de ELISA y Western blot. El cálculo de DL_{50} y de la DE_{50} del antiveneno IgY producido se realizó utilizando el método de Probits. La masa de anticuerpos aislados fue de $8,5 \pm 1,35$ mg de IgY/mL de yema. La DL_{50} determinada fue de $3,3 \pm 0,5$ µg/g de ratón. Asimismo, la DE_{50} del antiveneno aviar fue calculada en 575 µL de antiveneno/mg de veneno (Mendoza, J. et al., 2012).

A nivel internacional:

En el Instituto Nacional de Laboratorios de Salud de Bolivia (INLASA), en un estudio experimental para evaluar la neutralización del veneno de *Bothrops mattogrossensis* a partir de antiveneno derivado de burro y llama, se llegó al resultado que ambos antivenenos son altamente efectivos, en la neutralización de los más relevantes efectos tóxicos del veneno de *Bothrops mattogrossensis*. Curiosamente el antiveneno derivado de la llama logra tal efecto neutralizante a una concentración de proteína casi cuatro veces menor que el antiveneno derivado de burro y de antiveno derivado de caballos fabricados en otros países, cuya concentración de proteína oscila entre 4 y 6 g/dL. La DL_{50} obtenida fue de 19 µg. La DE_{50} (µL antiveneno/mg veneno) del antiveneno derivado de

burro resultó 252 ± 24 , mientras que el antiveneno derivado de llama resultó 252 ± 68 (Fernández, G. et al., 2010).

En la Escuela de Medicina Tropical de Liverpool, Inglaterra se estudió un pool de IgG de dos camellos y dos llamas que fueron inmunizados con el veneno de serpiente *E. ocellatus*, en seis ocasiones. La seroconversión fue comparada en ELISA, resultando que las llamas respondieron más rápido a las inmunizaciones, y obteniendo títulos más altos a comparación de los camellos durante el período de inmunización. Asimismo, utilizando un pool de IgG de dos camellos inmunizados se realizó la neutralización de la Actividad Hemorrágica del veneno, resultando la dosis hemorrágica mínima en 210 µg y 175 µg respectivamente; lo cual exhibió una neutralización preclínica satisfactoria (Harrison, R. et al., 2006.).

En la Escuela de Medicina Tropical de Liverpool, Inglaterra y en el Laboratorio Central de Investigación Veterinaria, Dubai, Emiratos Árabes Unidos investigaron los atributos de las IgG de los camélidos como antiveneno y su eficacia neutralizante en ventaja sobre el antiveneno convencional derivado de equino u ovino. Se inmunizaron cinco camellos con el veneno por separado o en combinación de tres especies de serpientes (*E. ocellatus*, *B. arientans* y *N. nigricollis*) por un período de 60 semanas. La DL_{50} de *E. ocellatus* resultó 14,85 µg/ratón; de *B. arientans*

resultó 33,80 µg/ratón y de *N. nigricollis* resultó 17,70 µg/ratón. En conclusión demostraron que los camélidos inmunizados con veneno de las serpientes mencionadas son capaces de producir IgG con una capacidad de neutralización similar al de las IgG de uso comercial derivado de equino u ovino (Cook D. & Owen T., 2010).

2.2 Bases teóricas

El Perú, por su posición geográfica, tiene una amplia región de selva en la que habitan entre otras especies animales como las serpientes. Estos ofidios en el caso que sean especies venenosas son motivo de constante preocupación para las poblaciones aborígenes y con mucha mayor razón para los visitantes (Poggi, D., 2002).

A pesar de que el ser humano no hace parte de su cadena alimenticia, el contacto del hombre con éstas hace que el envenenamiento ofídico todavía sea una causa importante de morbilidad y mortalidad humana a nivel mundial (Bermúdez, F., 2010).

Los géneros de serpientes venenosas de mayor importancia médica que se presentan en el Perú, son los siguientes: *Bothrops*, *Lachesis*, *Bothriopsis*, *Porthidium* y *Crotalus*. Todos estos géneros son vivíparos con excepción de *Lachesis* que es ovíparo. El género *Bothrops* de hábito

terrestre es el más diversificado con más de 40 especies (Lévano, J. & Fernández, R., 2004).

2.3 *Bothrops atrox (jergona)*

Esta especie ocupa una gran variedad de hábitats (bosque húmedo, bosque tropical, montaña baja, zonas de árboles, deciduos tropicales, etc.) está asociado a arroyos, lagos o cursos de ríos; sin embargo también se le encuentra en áreas de cultivo, alrededor de habitaciones o zonas urbanas con malezas. Es moderadamente delgada de hábito terrestre; los adultos miden en promedio hasta 153 cm. El patrón del dorso en color y marcas es sumamente inconstante, por la gran variedad de especímenes (la alimentación, hábitat, tipo de vegetación, altitud) también se le conoce como “jergona” y “catari”, “archu”, “jergón de Selva”. El color del vientre varia de crema a amarillo, gris con o sin moteado oscuro. El iris es dorado con reticulaciones oscuras. La lengua es de color negro. En general, el modelo del cuerpo consiste en una serie de manchas triangulares, rectangulares o trapezoidales que se extienden de la unión ventral al medio cuerpo; estas manchas pueden o no alternar con la serie opuesta o formar bandas que cruzan el dorso entero (Lévano, J. & Fernández, R., 2004).



Figura 1. *Bothrops atrox* (jergón de selva)

Fuente: Campbell Jonathan A.

El veneno del género *Bothrops* tiene acción proteolítica. Aun cuando no es imprescindible que el paciente identifique la especie agresora, es de utilidad para dirigir el tratamiento y valorar la magnitud de la intoxicación. El efecto tiene una acción letal de alrededor de 20 horas siendo los signos de alarma: edema, hinchazón, aumento de volumen de los tejidos, dolor intenso, hemorragia, ampollas, equimosis y necrosis de los tejidos (Lévano, J. & Fernández, R., 2004).

Cuadro clínico:

Dolor local inmediato y de variable intensidad, edema que se incrementa con el tiempo, coagulación intravascular diseminada (CID) y luego ausencia de coagulación por consumo de los componentes de la cascada, ampollas, equimosis, necrosis, hemoglobinuria, oliguria/anuria, tiempo de coagulación (TC) incrementada, tromboplastina parcial activada (TTPA) elevado (Lévano, J. & Fernández, R., 2004).

El suero antiveneno usado en el tratamiento del Ofidismo por *B. atrox*, es producido por el Instituto Nacional de Salud del Perú (INS) desde el año 1978. El suero polivalente del Perú tiene un efecto neutralizante contra casi todos los venenos de las especies del género *Bothrops*, tanto de la selva como de la costa (Lévano, J. & Fernández, R., 2004).

Para ello se utiliza un método antiguo que consiste en inmunizar equinos para inducir la producción de un suero hiperinmune que contenga los anticuerpos neutralizantes contra el veneno, pero que además contiene varios otros anticuerpos del animal que no son necesarios para la terapia. Al ser los anticuerpos de equinos diferentes de los anticuerpos humanos, en algunas ocasiones ocurre una respuesta inmune en los pacientes tratados que generalmente produce luego reacción alérgica y anafiláctica que agravan la situación de los pacientes (Rodríguez, S. et al., 2004).

Extracción de veneno y preparación de suero antiofídico del INS:

El veneno ofídico es extraído por personal especializado en el Serpentario del Instituto Nacional de Salud en Lima. Para la extracción del veneno se emplean los siguientes materiales: gancho de serpientes, pinzas, beacker. La serpiente se fija por el cuello mediante el empleo de ganchos especiales, procediéndose a continuación a extraer el veneno

mediante compresión glandular externa. El veneno líquido obtenido es inmediatamente centrifugado para retirar el detritus celular, el sobrenadante es desecado en viales oscuros y mantenido en refrigeración hasta su utilización. En el Perú, el Instituto Nacional de Salud inició la producción comercial de sueros hiperinmune en 1978, como único tratamiento específico para los accidentes de serpientes de importancia médica. Estos sueros se preparan comercialmente mediante hiperinmunización de equinos, empleando adyuvantes oleosos y Alginato de Sodio, componentes que incrementan la respuesta inmunológica del animal inmunizado con el veneno. El INS emplea como antígenos para la preparación del suero antiofídico a los venenos de las principales especies de serpientes venenosas de importancia médica (*Bothrops*, *Lachesis* y *Crotalus*). El suero comercial es el resultado de la separación de la Inmunoglobulina G del resto de proteínas heterólogas del plasma del caballo hiperinmunizado, con capacidad para neutralizar el veneno ofídico (MINSA, 2004).

Inmunoglobulinas G de camélidos:

Las características estructurales de la IgG de los camélidos difieren de los demás anticuerpos conocidos y contradicen todas las teorías comunes sobre diversidad de anticuerpos. Los camélidos presentan tres subclases

de IgG denominados: IgG1 que corresponde a los anticuerpos convencionales, IgG2 e IgG3, son anticuerpos no convencionales por carecer de cadenas ligeras y son conocidas como anticuerpos de cadena pesada (HCAbs). Esta característica molecular, la pérdida de las cadenas livianas, resulta de una alteración de la escisión que impide su transcripción al ARN mensajero y no de una supresión en el gen correspondiente (Herrera, A., 2011).

Las IgG1 son los anticuerpos clásicos o convencionales y están presentes en 25% de la IgG sérica; en cambio, la IgG2 y la IgG3 poseen dímeros de cadenas pesadas cortas, las cuales se caracterizan por poseer un fragmento cristalizante (Fc) normal sin un dominio CH1, y están presentes en 75% de la IgG sérica. Los HCAbs junto con sus VHs tienen muchas ventajas comparados con los anticuerpos convencionales, debido a su pequeño tamaño lo que mejora su biodistribución y permite una mejor penetración tisular (Herrera, A., 2011).

Estructura de las inmunoglobulinas G de camélidos:

La estructura básica de las inmunoglobulinas consta de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L), unidas generalmente por puentes disulfuro. Además, se ha establecido que todas las inmunoglobulinas presentan un cierto grado de glicosilación. Ambas

cadenas contienen un n oligosacárido unido al segundo dominio constante de la cadena pesada (CH2) (Herrera, A., 2011).

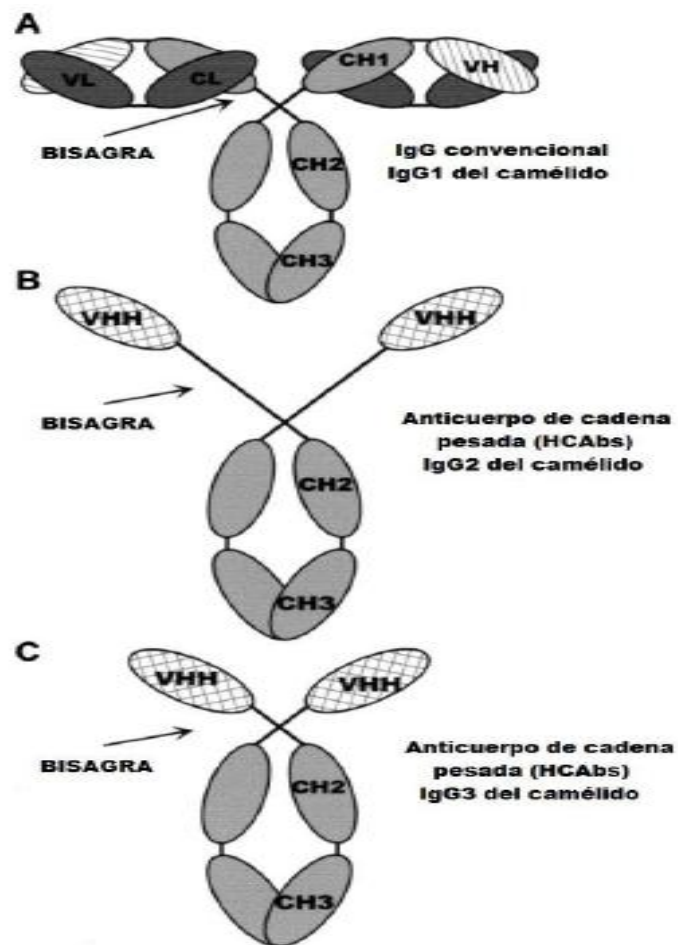


Figura 2. Representación estructural de la inmunoglobulina G convencional (IgG1) “A” y las inmunoglobulinas de cadenas pesadas (IgG2 “B” e IgG3 “C”) de los camélidos (Muyldermans y Lauwereys., 1999).

Fuente: Herrera, A., 2011

Determinación de la Actividad letal (DL₅₀):

La actividad letal es el efecto toxicológico que más frecuentemente se estudia al caracterizar un veneno. Este efecto es el resultado de la acción de diversos tipos de componentes. En el caso de la mayoría de los venenos de serpientes de la familia Viperidae, la letalidad tiene una causalidad multifactorial, ya que intervienen diferentes componentes (metaloproteinasas, serinaproteinasas, fosfolipasas A2 y otros) que causan sangrado, coagulopatía y alteraciones hemodinámicas que provocan la muerte (Manual de métodos de laboratorio – Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica., 2007).

Inmunización de una llama (*Lama glama*) con veneno de *Bothrops atrox*:

Inmunización a una llama con una mezcla de veneno de *B. atrox*, junto al adyuvante GERBU. El adyuvante comercial GERBU (Gerbu Biotechnik GmbH) es un estimulante de la respuesta inmune humoral cuya fórmula contiene tres componentes principales, una suspensión coloidal de macropartículas cationizadas, un dipeptido glucosaminilmuramil (GMDP) y Cimetidina. Este adyuvante Gerbu ha demostrado ser mejor que el adyuvante de Freund y otros adyuvantes comerciales y ha sido

recomendado como un adyuvante para la producción de anticuerpos de llama (Pardon, E. et al., 2014).

Título o Potencia del Suero Antiveneno (DE₅₀):

El título es la medida de la capacidad neutralizante del antiveneno frente a los efectos del veneno de la serpiente. Dado que los venenos tienen varias actividades biológicas (neurotoxinas, hemorraginas, mionecrotoxinas, etc) la capacidad neutralizante del antiveneno o título, varía para cada actividad biológica. Por lo general los laboratorios productores titulan sólo sobre la base de la actividad tóxica letal y es expresado en miligramos de veneno que son neutralizados por un mililitro de suero antiveneno. El título de cada lote de suero antiveneno puede variar: a mayor título, mayor capacidad neutralizante, por lo que existe un título mínimo establecido por cada laboratorio productor. Para el suero antibotrópico polivalente líquido del INS, la potencia neutralizante o DE50, es de 2,5 mg/mL (Poggi, D., 2002).

Experimentalmente, este efecto se estudia mediante la inyección de una mezcla de veneno y suero del animal inmunizado pre incubado a ratones por vía intraperitoneal, observándose si los ratones inoculados mueren o sobreviven al cabo de 24 a 48 horas (Manual de métodos de laboratorio – Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica., 2007).

Análisis de seroconversión (ELISA):

La prueba de ELISA se usa para comparar los títulos de anticuerpos del suero pre inmune y del post inmune, para medir la conversión inducida por el veneno de *B. atrox*.

Modelo Próbit:

El modelo Próbit constituye una alternativa log-lineal para manejar conjuntos de datos con variable dependiente categórica. Típicamente, este modelo se utiliza para analizar datos del tipo dosis respuesta. Los datos obtenidos de un bioensayo no pueden ser analizados con la metodología estadística tradicional que se usa en los ensayos de campo sino que se debe utilizar lo que se llama estadística cuantal, la cual se caracteriza por la respuesta a un estímulo de n unidades experimentales, donde r unidades responden y $n - r$ no lo hacen. El principal objetivo de este tipo de análisis es evaluar el nivel de estímulo que es necesario para obtener una respuesta en un grupo de individuos de la población. El nivel de estímulo que causa una respuesta en el 50% de los individuos de una población bajo estudio es un importante parámetro de caracterización denotado como DL_{50} por dosis letal media (o DE_{50} por dosis efectiva media, CL_{50} por concentración letal media, CE_{50} por concentración efectiva media y Ltm por límite de tolerancia media). El período de tiempo

durante el cual se expone el estímulo debe ser especificado, por ejemplo, 24 horas DL_{50} , esto con el fin de comparar y estimar la potencia relativa del estímulo.

2.4 Base conceptual

Vipérido: Son los géneros de serpientes venenosas de mayor importancia médica. Los que se presentan en el Perú son los siguientes: *Bothrops*, *Lachesis*, *Bothriopsis*, *Porthidium* Y *Crotalus* (Lévano, J. & Fernández, R., 2004).

Accidente ofídico: Es el conjunto de signos y síntomas resultantes de la inoculación accidental de sustancias venenosas producto de la mordedura de una serpiente, que pueden causar severos daños a tejidos y órganos e incluso terminar en un desenlace fatal (Lévano, J. & Fernández, R., 2004).

Veneno: Es un producto de secreción exocrina de las glándulas salivales, constituido de una serie de péptidos y proteínas tóxicas, tales como miotoxinas, hemorraginas, nefrotoxinas, neurotoxinas y toxinas coagulantes (Lévano, J. & Fernández, R., 2004).

Bothrops atrox: Comúnmente llamada jergón, es la responsable del 88 al 92% de los casos de mordedura reportados en el Perú (Lévano, J. & Fernández, R., 2004).

Dosis Letal Media (DL₅₀): Dosis de un compuesto que resulta letal para el 50% de la población de organismos o animales de prueba.

Título o Potencia del Suero Antiveneno: Es la medida de la capacidad neutralizante del antiveneno frente a los efectos del veneno de la serpiente (Poggi, D., 2002).

IgG Camélidos: Presentan tres subclases de IgG denominados: IgG1 que corresponde a los anticuerpos convencionales, IgG2 e IgG3, son anticuerpos no convencionales por carecer de cadenas ligeras y son conocidas como anticuerpos de cadena pesada (HCAbs) (Daley, L. et al., 2005).

Adyuvante GERBU (Gerbu Biotechnik GmbH): Es un estimulante de la respuesta inmune humoral cuya fórmula contiene tres componentes principales, una suspensión coloidal de macropartículas cationizadas, un dipéptido glucosaminilmuramil (GMDP) y Cimetidina.

HEPES: Es un buffer químico orgánico zwitteriónico y se clasifica como un "Buen" buffer.

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Ubicación geográfica y temporal

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular del Centro Nacional de Salud Pública, en el Instituto Nacional de Salud, ubicado en Av. Defensores del Morro N° 2268 (Ex Av. Huaylas), Distrito Chorrillos, Provincia de Lima, Departamento de Lima.

3.1.2 Unidad de estudio

El estudio se realizó con muestras de suero de *Lama glama*, veneno de *Bothrops atrox* y ejemplares de *Mus musculus*. Teniendo las consideraciones de ética animal.

3.1.3 Población y muestra

Población:

Llama (*Lama glama*)

Se empleó 01 ejemplar de llama para obtener el suero pre-inmune y post inmune, ya que el objetivo principal no es analizar el efecto de la intervención en el animal que es la inmunización con el veneno, sino extraer el suero sanguíneo que expresa anticuerpos contra el veneno. El animal estuvo sano y saludable, pasó un período de evaluación clínica y cuarentena de 40 días, previo a la experimentación.

Ratón (*Mus musculus*)

Se emplearon ratones BALB/c (17-19 g.), del Bioterio del CNPB - INS, los cuales fueron mantenidos en un ambiente de laboratorio controlado con temperatura entre 20 - 25 °C, humedad relativa 85-90 %, períodos de 12 horas luz natural, en grupos de 06 ratones en jaulas para ratones individuales de acero inoxidable, con lecho de fibras de viruta por jaula, con comida y bebida ad libitum hasta su uso. Para la prueba de Determinación de la Actividad Letal (DL₅₀), se hizo seis grupos (dosis) de doce ratones cada uno (72 ratones), más un grupo control de doce ratones (12 ratones); para la prueba de Determinación de la Neutralización de la Actividad Letal (DE₅₀), se hizo ocho grupos (dosis) de seis ratones cada uno (48 ratones), más dos grupos control de seis ratones cada uno (12 ratones) ambas pruebas se hicieron por duplicado, es decir se necesitó 84 ratones para la prueba DL₅₀ y 60 ratones para la

prueba DE₅₀ por 2 (duplicado) nos da un total de 288 ejemplares de ratones.

El manejo de los ratones se realizó siguiendo lo descrito en: Biología y Clínica de Conejos y Roedores (Harkness J. & Warner, J., 1980) (Instituto Nacional de Salud “Guía de Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio: RATÓN”, 2008).

Muestra:

- Veneno de Serpiente (*Bothrops atrox*)

Se empleó veneno liofilizado de especímenes de *Bothrops atrox* de la zona. Se emplearon 120 ejemplares jóvenes provenientes de un zoocriadero de la zona (Rioja, Bagua, Condorcanqui, Pucallpa, Iquitos).

- Suero de Llama (*Lama glama*)

Se extrajo sangre y se obtuvo suero pre inmune y post inmune de *Lama glama* inmunizada con veneno de *Bothrops atrox*.

3.1.4 Criterios de inclusión y exclusión

a) Llama (*Lama glama*)

Criterios de inclusión: Macho, de 2,5 a 4 años, entero, saludable y dócil.

Criterios de exclusión: Hembra, menor a 2 años y mayor a 4 años, enfermo y agresivo.

b) Ratones (*Mus musculus*)

Criterios de inclusión: Machos, peso de 17 - 19 g. raza BALB/c y saludables.

Criterios de exclusión: Hembras, peso menor a 17 g. y mayor a 19 g., otras razas que no sean BALB/c y enfermos.

3.1.5 Materiales

- Adyuvante GERBU LQ 3000
- Forraje y alimento concentrado
- Tubos para bioquímica sanguínea, hemograma y separador de suero.

- Algodón
- Alcohol, Alcohol Yodado
- Agujas y tubos al vacío Vacutainer
- Kit para la prueba de Elisa
- Guantes de látex.
- Jeringas de tuberculina con agujas descartables 26G x 1/2".
- Micropipetas de 200 uL y 100 -1 000 uL calibradas.
- Tips amarillos y azules con filtro.
- Frascos de 50 mL estériles.
- Tubos para microcentrífuga de 1,5 mL.
- Gradilla.
- Plumón indeleble.
- Hielo.
- Balanza analítica calibrada.
- Cabina de flujo laminar.

- Suero fisiológico estéril al 0,85 % (v/v).

3.2 Métodos

3.2.1 Tipo y diseño de investigación

El tipo y diseño es experimental porque se manipulan las variables consideradas en el proyecto.

3.2.2 Método de investigación

- Técnica de efecto letal en ratón
- Inmunización de *Lama glama*
- Prueba inmunoenzimática: ELISA
- Técnica de neutralización del efecto letal en ratón

3.2.3 Metodología de la investigación

3.2.3.1 Obtención y caracterización del veneno de *Bothrops atrox*

Obtención y conservación del veneno

- Las muestras de veneno se tomaron por extracción manual, y fueron recogidas en un vaso de precipitados mantenido en un baño de hielo.

- Se colocó el veneno en un tubo de centrifuga graduado donde se midió el volumen extraído (volumen total en mL) y los cuales serán congelados en nitrógeno líquido para su posterior análisis.
- Las muestras de veneno fueron transportadas a Lima por vía aérea en cajas especiales con hielo seco.
- En el laboratorio, el veneno se descongeló hasta los 4°C y centrifugado a 5000 rpm por 20 min, para eliminar los componentes extraños al veneno.
- Se midió el volumen del sobrenadante obtenido y se alicuotó en fracciones de 2 mL en viales de vidrio (tarados: Peso Inicial Vial), tapón y precinto de paredes siliconadas.
- Los viales fueron congelados a –80°C toda la noche, luego fueron colocados en la liofilizadora hasta la formación de una tableta homogénea del líofilo, se taparon, precintaron, pesaron los viales con el veneno liofilizado y finalmente se almacenaron en un gabinete desecador hasta su caracterización.

Estos viales constituyeron el veneno de *Bothrops atrox* a emplear en la presente investigación.

3.2.3.2 Determinación del efecto letal (DL₅₀)

Material biológico:

- Veneno liofilizado de *Bothrops atrox* (resuspendido en 10 mg/mL).
Se filtró por filtro de jeringa de 0,2 µm.
- Ratones Balb/c machos de 17 - 19 g. aprox. Se consideró grupos de doce ratones por dilución de veneno.

Procedimiento:

Preparación de la solución madre del veneno

1. Se preparó la solución madre a una concentración de 1 mg/mL, empleando como disolvente solución fisiológica estéril y luego se disolvió el veneno con agitación suave. (Se homogenizó agitando por vórtex y luego centrifugación breve (spin)).

Ensayo:

1. Se tomó de referencia los valores de DL₅₀ que figure en la literatura científica para veneno de *Bothrops atrox* peruano.
2. La DL₅₀ para el veneno de *Bothrops atrox* se encuentra en un rango de 3 a 6 µg/g de ratón.

3. Se preparó solución mayor, solución menor como el valor de referencia, manteniendo un factor de dilución constante de 1,22 ($\mu\text{g/g}$ ratón).

Tabla 1. Concentración de veneno de *Bothrops atrox*

CAJA	μg veneno por gramo de peso de ratón
0	Grupo control
1	2,500
2	3,050
3	3,721
4	4,539
5	5,538
6	6,757

Fuente: Elaboración propia

4. Se determinó la cantidad de veneno (μg) para inocular por ratón; producto del peso promedio de los ratones (por cada caja) por la dilución para cada caja. (μg veneno/ ratón).
5. Se determinó la cantidad de veneno en miligramos (mg), dividir la cantidad de veneno en microgramos (μg) entre 1 000. (mg veneno/ ratón).
6. Se determinó el volumen total de veneno (mL) por ratón, dividir mg veneno/ ratón entre 1 considerando la solución madre de (1 mg/mL). (ml veneno/ ratón).
7. Se determinó la cantidad de veneno (mL) a emplear en cada caja, producto de la cantidad de veneno (mL) por ratón por 14 (12 ratones

por cada solución + 2 márgenes de error). (mL veneno para 14 ratones).

8. El volumen de inoculación por cada ratón es de 0,5 mL de solución de veneno y para 14 ratones (una caja), se tiene un volumen total de 7 mL.
9. Se determinó el volumen de solución fisiológica, se restó el volumen total menos el volumen de la solución de veneno (mL) para los 14 ratones.
10. Se realizó los mismos cálculos para todas las cajas.
11. Se determinó el volumen de solución fisiológica, se restó el volumen total menos el volumen de la solución de veneno (mL) para los 14 ratones.
12. Se realizó los mismos cálculos para todas las cajas.
13. Se homogenizó agitando por vórtex y luego por centrifugación breve (spin) las soluciones preparadas y colocadas inmediatamente en baño de hielo.
14. Se inoculó por vía intraperitoneal un volumen de 0,5 mL por ratón de solución de veneno por grupo.

15. Se observó a los ratones en las siguientes horas.
16. Se registró la cantidad de animales vivos/muertos (V/M) de cada grupo a las 24 y 48 horas, se empleó la cantidad de ratones muertos de cada caja a las 48 horas para el cálculo estadístico.

Cálculos

- El modelo PROBITS, dio un valor medio y un rango o límite de confianza superior e inferior al 95 %.

3.2.3.3 Obtención de suero preinmune de *Lama glama*

Se tomó una muestra de sangre (20 mL aprox.) de la vena yugular derecha con una jeringa de 20 mL y una aguja N° 18, colectándola en tubos vacutainer que contienen un gel separador para colección de suero; se transportaron las muestras al laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular y se procedió a centrifugar a 3 000 x g (RCF) por 5 minutos. Se colectaron los sobrenadantes (suero pre-inmune) en tubos de microcentrífuga y se guardaron en un criobox para su criopreservación a – 80°C.

3.2.3.4 Inmunización de *Lama glama* con veneno de *Bothrops atrox*

Para la inmunización de la llama, ésta se encontró en condiciones sanitarias óptimas de acuerdo con la evaluación del médico veterinario.

La llama fue inmunizada con el veneno completo de *B. atrox* junto al adyuvante GERBU.

El adyuvante comercial GERBU (Gerbu Biotechnik GmbH) es un estimulante de la respuesta inmune humoral cuya fórmula contiene tres componentes principales, una suspensión coloidal de macropartículas cationizadas, un dipéptido glucosaminilmuramil (GMDP) y Cimetidina (Grubhofer, N., 2008). Este adyuvante GERBU ha demostrado ser mejor que el adyuvante de Freund y otros adyuvantes comerciales, y ha sido recomendado como un adyuvante para la producción de nanoanticuerpos de llama (Pardon, E. et al., 2014).

Para cada inmunización se siguió el siguiente procedimiento:

- El personal encargado del manejo y cuidado de la llama, trasladó al animal hasta el área de Inoculación, lugar destinado para este fin (manga de inoculación).
- Se cortó la lana de la zona de inoculación (dorso de la llama).

- Se rasuró cuatro regiones específicas (zonas desprovistas de lana).
- Se lavó con agua y jabón carbólico la zona de inoculación (las cuatro regiones de inoculación).
- Se desinfectaron las regiones con alcohol yodado o solución de vanodine al 0,3%.
- Se cargó la jeringa de 5 mL y aguja N° 21 con el inóculo que consiste en una mezcla de relación 1:1 entre el veneno y adyuvante GERBU, siendo el volumen total del inóculo 4 mL. (2 mL de veneno y 2 mL. de adyuvante GERBU).
- Se inyectó el inóculo por vía subcutánea con aguja de tuberculina (distribuido proporcionalmente en las cuatro regiones rasuradas).
- Se descartó el material empleado.
- Se realizó la limpieza del área (manga de inoculación).

Protocolo de Inmunización de *Lama glama*:

El protocolo de inmunización constó de 6 inmunizaciones de veneno de *Bothrops atrox* con el adyuvante GERBU (v/v), cada 7 días.

Tabla 2. Protocolo de inmunización de llama para la obtención de suero hiperinmune Antibotrópico.

Nº	Día	Veneno completo	Adyuvante	Observaciones
	1	0 mg.		Sangría y obtención de suero pre-inmune
1	7	0,5 mg.	GERBU	obtención de suero
2	14	1 mg.	GERBU	obtención de suero
3	21	2 mg.	GERBU	obtención de suero
4	28	3 mg.	GERBU	obtención de suero
5	35	4 mg.	GERBU	obtención de suero
6	42	4 mg.	GERBU	obtención de suero
7	49			Prueba de ELISA y prueba de POTENCIA: Alcanzados los títulos adecuados de anticuerpos se procederá a la sangría

Fuente: Elaboración propia

- Para la primera inmunización, se tomó 0,3 mL del stock de veneno de *Bothrops atrox* de 10 mg/mL y se diluyó con 5,7 mL de buffer HEPES. Luego se mezcló con 6 mL del adyuvante GERBU y se inoculó 2 mL de esta mezcla, que contiene 0,5 mg de veneno de *Bothrops atrox*.
- Para la segunda inmunización, se tomó 0,15 mL del stock de veneno de *Bothrops atrox* de 10 mg/mL y se diluyó con 2,85 mL de buffer HEPES. Luego se mezcló con 3 mL del adyuvante GERBU y

se inoculó 4 mL de ésta mezcla, que contuvo 1 mg de veneno de *Bothrops atrox*.

- Para la tercera inmunización, se tomó 0,3 mL del stock de veneno de *Bothrops atrox* de 10 mg/mL y se diluyó con 2,7 mL de buffer HEPES. 2,5 mL de ésta mezcla se combinó con 2,5 mL del adyuvante GERBU y se inoculó 4 mL de ésta mezcla, que contuvo 2 mg de veneno de *Bothrops atrox*.
- Para la cuarta inmunización, se tomó 0,45 mL del stock de veneno de *Bothrops atrox* de 10 mg/mL y se diluyó con 2,55 mL de buffer HEPES. 2,5 mL de ésta mezcla se combinó con 2,5 mL del adyuvante GERBU y se inoculó 4 mL de ésta mezcla, que contuvo 3 mg de veneno de *Bothrops atrox*.
- Para la quinta y sexta inmunización, se tomó 0,6 mL del stock de veneno de *Bothrops atrox* de 10 mg/mL y se diluyó con 2,4 mL de buffer HEPES. 2,5 mL de ésta mezcla se combinó con 2,5 mL del adyuvante GERBU y se inoculó 4 mL de ésta mezcla, que contuvo 4 mg de veneno de *Bothrops atrox*.

Al término de las inmunizaciones no se logró la potencia esperada del antisuero, por lo tanto se procedió a cinco re – inmunizaciones de 4 mg de

veneno en volumen de 5 mL, hasta lograr que la potencia neutralizante o DE₅₀, fuese igual o mayor a 2,5 mg/mL.

Protocolo de re - inmunización de Llama (*Lama glama*):

Fueron cinco inmunizaciones de 4 mg cada una.

Tabla 3. Protocolo de re-inmunización del refuerzo de *Lama glama* con veneno de *Bothrops atrox*.

<i>Nº</i>	<i>Día</i>	<i>Veneno completo</i>	<i>Adyuvante</i>	<i>Observaciones</i>
8	56	4 mg.	GERBU	obtención de suero
9	63	4 mg.	GERBU	obtención de suero
10	70	4 mg.	GERBU	obtención de suero
11	77	4 mg.	GERBU	obtención de suero
12	84	4 mg.	GERBU	obtención de suero
13	91			Prueba de ELISA y prueba de POTENCIA: Alcanzados los títulos adecuados de anticuerpos se procederá a la sangría.

Fuente: Elaboración propia

- Se tomó 0,6 mL del stock de veneno de *Bothrops atrox* de 10 mg/mL y diluir con 2,4 mL de buffer HEPES. 2,5 mL de ésta mezcla combinar con 2,5 mL del adyuvante GERBU e inocular 4 mL de esta mezcla, que contiene 4 mg de veneno de *Bothrops atrox*.

3.2.3.5 Obtención de suero inmune

Una semana después de cada inmunización se tomó una muestra de sangre (20 mL aprox.) de la vena yugular derecha de la llama, colectándola en tubos vacutainer que contienen un gel separador para colección de suero. Se llevó las muestras rápidamente al laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular para ser centrifugadas a 3 000 x g por 5 minutos. Se colectó el sobrenadante en tubos de microcentrífuga y se llevó a criopreservar a – 80 °C. Obteniendo once muestras distintas de suero inmune al término de las inmunizaciones.

3.2.3.6 Prueba inmunoenzimática: ELISA

Preparación de Soluciones:

- **Preparación de Buffer Carbonato, pH 9,6**

Se agregó 150 µL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 1 M y 350 µL de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 1 M. Se llevó el volumen hasta 10 mL con H₂O Milli-Q. Se filtró en 0,22µm y se almacenó a temperatura ambiente.

Cálculos:

Carbonato de sódio:

Na₂CO₃ 1M:

$$M = \frac{g}{V \times PM}$$

PM: 106 g/mol

$$1 = \frac{g}{0,01 \times 106}$$

Molaridad: 1 M

$$g = 1,06g$$

Volumen: 10 mL

Na₂CO₃ 0,015 M:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$1M \times V_i = 0,015M \times 10ml$$

$$V_i = 150\mu L$$

Bicarbonato de sodio:

NaHCO₃ 1 M:

$$M = \frac{g}{V \times PM}$$

PM: 84 g/mol

$$1 = \frac{g}{0,01 \times 84}$$

Molaridad: 1 M

$$g = 0,84g$$

Volumen: 10 mL

NaHCO₃ 0,035 M:

$$C_i x V_i = C_f x V_f$$

$$1M x V_i = 0,035M x 10ml$$

$$V_i = 350\mu L$$

- **PBS 10X (stock)**

Se disolvió 2,4 g de KH₂PO₄, 14,1 g de Na₂HPO₄·H₂O, 2 g de KCl y 80 g de NaCl en 700 mL de agua destilada, se llevó a volumen cercano de 1 000 mL y se ajustó el pH a 7,4, se completó a 1 L y se esterilizó por autoclave. Se almacenó a temperatura ambiente.

- **Buffer de Bloqueo**

PBS 1X con 2 % de leche descremada.

- **Buffer de lavado**

PBS 1 X	1000 mL
---------	---------

Tween 20	500 μL
----------	--------

- **Buffer de dilución de suero y conjugado.**

PBS 1X/Tween₂₀ 0,05 % / leche descremada 0,1 %

- **Preparación de Tetrametilbenzidina (TMB):**

El sustrato se encontró listo para utilizar. Se añadió 100 µL de solución TMB por cada pocillo. Antes de usar se dejó a temperatura ambiente la solución de TMB durante 30 minutos.

- **Ácido sulfúrico: (H₂SO₄, 0,5 M)**

Se agregó 6 mL de H₂O Milli-Q, y luego se añadió 266 µL de H₂SO₄ puro. Se ajustó el volumen a 10 mL con H₂O Milli-Q. Se almacenó a temperatura ambiente y se cubrió el tubo con aluminio.

** Se eliminaron los componentes no solubles de las soluciones que contuvieron leche mediante centrifugación a 3 000 g (RCF) por 10 min. a temperatura ambiente.

Estandarización de ELISA para la titulación de anticuerpos de *Lama glama* contra el veneno de *Bothrops atrox*:

- Se diluyó el veneno en buffer carbonato (Na₂CO₃ 0,015 M, NaHCO₃ 0,035 M) a una concentración final de 0,5 µg/mL.
- Se aplicó a cada pocillo 100 µL/pocillo de la dilución del veneno, se cubrió la placa con papel aluminio y se incubó toda la noche a 4 °C.

- Se removió la solución de veneno (se volteó la placa rápidamente y se secó sacudiéndola sobre papel absorbente).
- Se agregó 250 μ L del buffer de bloqueo en cada pocillo y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Se cubrió la placa con papel aluminio.
- Durante el tiempo de bloqueo, se diluyó los sueros a titular, suero diluido 1/800 en buffer de dilución de suero, también se colocaron los respectivos controles, control negativo (suero pre – inmune en las mismas diluciones que el suero inmunizado) y blanco (buffer carbonato sin antígeno).
- Se removió el buffer de bloqueo (se volteó la placa rápidamente y se secó sacudiéndola sobre papel absorbente); se lavó con 250 μ L del buffer de lavado por 5 veces.
- Se añadió a cada pocillo 100 μ L del suero a titular, y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, realizándolo por duplicado. Se tapó la placa con papel aluminio.
- Se removió el suero (se volteó la placa rápidamente y se secó sacudiéndola sobre papel absorbente), lavar 5 veces con 250 μ L de buffer de lavado.

- Se añadió en cada pocillo 100 μ L de conjugado (anti-Llama IgG (H+L)-Peroxidasa) diluido 1:10 000 en buffer de dilución de conjugado. Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se tapó la placa con papel aluminio.
- Se removió el conjugado y lavar por 5 veces con 250 μ L de buffer de lavado, luego de ello se secó la placa sacudiéndola sobre papel absorbente.
- Se añadió a cada pocillo 100 μ L del sustrato TMB y se incubó de 5 -15 minutos a temperatura ambiente, protegiendo la placa de la luz.
- Se añadió a cada pocillo 50 μ L/pozo de solución de parada (H_2SO_4) 0,5 M.
- Se hizo la lectura de la placa a una longitud de onda de 450 nm.

3.2.3.7 Determinación de la neutralización del efecto letal (DE_{50})

Se utilizaron ratones machos de 17 - 19 g de peso aprox., se consideró grupos de 6 ratones por cada caja y una caja de 6 ratones para el grupo control.

Preparación de la solución madre del veneno:

1. A partir de una alícuota de 20 mg/mL se preparó la solución madre a una concentración de 10 mg/mL, empleando como disolvente solución fisiológica estéril y luego se homogenizó agitando por vórtex y luego centrifugación breve (spin).

Ensayo:

Se determinó la dosis veneno o dosis reto, tomando en cuenta 4 DL₅₀ de modo tal que se tenga la seguridad de la muerte de todos los ratones a emplear.

1. Si la DL₅₀ es 3,96 µg, entonces: 4 DL₅₀ es 15,84 µg por cada gramo de ratón a inocular. (µg/g ratón).
2. Se determinó la cantidad de veneno (µg) para inocular por ratón; producto del peso promedio de los ratones (por cada caja) por 15,84 (4 DL₅₀). (µg veneno/ ratón).
3. Se determinó la cantidad de veneno en miligramos (mg), se dividió la cantidad de veneno en microgramos (µg) entre 1 000. (mg veneno/ ratón).
4. El volumen de veneno por cada ratón:

Solución de veneno: 10 mg/mL

10 mg ----- 1 mL

(mg veneno/ ratón) mg ----- X mL

X = (...) mL

5. Para cada nivel se consideraron inóculos para 8 ratones (6 ratones que se inoculan y 2 ratones como margen de seguridad): (...) mL x 8 = (...) mL.

6. A cada inóculo se le agregó un volumen constante de solución de veneno de modo que cada animal inoculado tenga 4 DL₅₀.

Se determinó el volumen de suero de cada inóculo.

1. Se estableció una serie de niveles de suero en donde se encuentra la especificación: 1 mL de suero debe neutralizar al menos 2,50 mg de veneno, entonces este valor debe encontrarse dentro de los niveles que se prueben. Se empleó un factor de dilución constante de 1,22 para obtener la serie de niveles de suero.

Tabla 4. Concentración de mg de veneno/ mL de suero

CAJA	Niveles de suero (mg/mL)
0	Grupo control
1	2,049
2	2,500
3	3,050
4	3,721
5	4,540
6	5,540
7	6,760
8	8,240

Fuente: Elaboración propia

2. Primer nivel: Se consideró que 1 mL de suero es capaz de neutralizar 2,049 mg de veneno y para cada ratón se requiere una cantidad de veneno en mg, entonces el cociente de esta cantidad en mg entre 2,049 mg dio como resultado el volumen de suero necesario en mL por cada ratón. Para 8 ratones (6 ratones que se inoculen y 2 ratones como margen de seguridad) se multiplicó el volumen de suero necesario en mL por 8.
3. Se realizó los mismos cálculos para los siguientes niveles (ver anexo 2).

Se determinó el volumen de solución fisiológica al 0,85 %.

1. Se completó el esquema:

$SF \text{ (ml)} = \text{Volumen final por nivel} - (\text{volumen de veneno} + \text{volumen de suero})$

2. Se realizó los mismos cálculos para los siguientes niveles (ver anexo 2).
3. Las soluciones de inoculación según niveles se prepararon agregando primero la Solución Fisiológica, luego el suero y finalmente la solución de veneno. El volumen final fue de 4 mL para cada inóculo.
4. Se sellaron los tubos de cada inóculo con parafilm, se homogenizó manualmente y se incubó a 37 °C por 30 minutos en baño maría.
5. Mientras duró la incubación se preparó la solución de veneno (sin suero) para los ratones control, la cual contiene 4 DL₅₀ de acuerdo al peso promedio de los ratones, completado con solución fisiológica.
6. Se inoculó por vía intraperitoneal un volumen de 0,5 mL de las soluciones preparadas a cada ratón.

7. Se observó a los ratones en las siguientes horas.
8. Se registró la cantidad de animales vivos/muertos (V/M) de cada grupo a las 24 y 48 horas, se empleó la cantidad de ratones muertos de cada caja a las 48 horas para el cálculo estadístico.

Cálculos:

- El modelo PROBITS, dio un valor medio y un rango o límite de confianza superior e inferior al 95 %.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Determinación de la Actividad Letal (DL₅₀) del veneno de serpiente (*Bothrops atrox*) en ratones (*Mus musculus*).

Tabla 5. Dosis letal media (DL₅₀) del veneno de *Bothrops atrox*.

24/48 h	Dosis del veneno (µg /g ratón)
Límite superior (95/100)	4,38
DL50 (µg/g)	3,96
Límite inferior (95/100)	3,57

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 5 se observa la DL₅₀ a un intervalo de confianza del 95 %. Este valor fue hallado por la regresión PROBIT mediante el programa SPSS y significa que 3,96 ug de veneno por gramo de ratón es necesario para llegar a la mortalidad del 50 %.

Además, la correlación probit indica un valor R² de 0,99 lo cual indica una alta correlación entre la dosis aplicada y el efecto letal del veneno.

En el anexo 3 se observa la mortalidad en ratones (*Mus musculus*) en diferentes dosis de veneno de serpiente (*Bothrops atrox*) para determinar

la dosis letal media (DL_{50}). La mortalidad fue evaluada a las 3; 24 y 48 horas post inoculación. Las dosis en μg de veneno inoculadas para cada ratón (ver anexo 3) se usaron para calcular la dosis en ng de veneno por gramo de ratón. El DL_{50} se halló mediante la regresión Probit con un intervalo de confianza de 95% y los valores usados fueron la dosis (ng/g de ratón) y % (porcentaje) a las 24 horas.

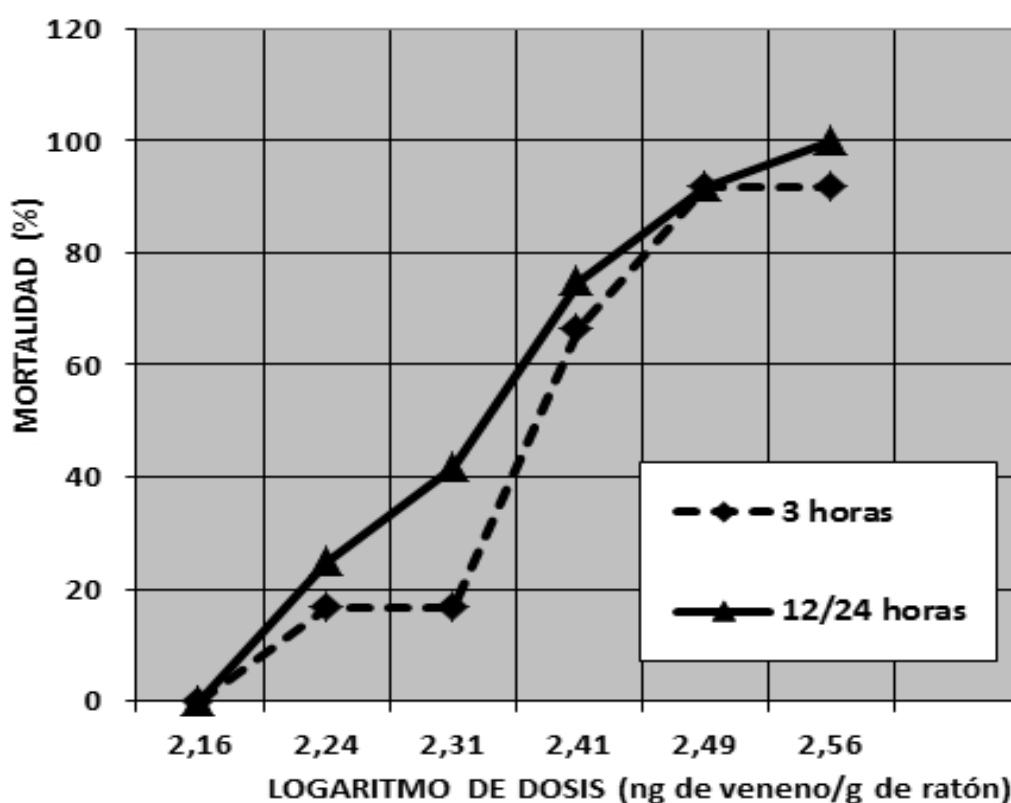


Figura 3. Curvas de dosis (ng de veneno/g de ratón) comparado con el porcentaje de mortalidad del veneno de *Bothrops atrox*.

Fuente: Elaboración propia

En la figura 3 se graficaron las evaluaciones a las 3 h (línea continua) y a las 24 y 48 h post inoculación del veneno (línea punteada, no hubo variación pasada las 24 h). Se observa una curva sigmoidea que cuando la dosis es de 143 ng de veneno por gramo de ratón ($\log_{143}=2,16$) la mortalidad es 0 y no hay muertos; pero la mortalidad va aumentando conforme aumenta la dosis hasta llegar a un umbral de 362 ng de veneno por gramo de ratón ($\log_{362}=2,56$) en donde todos los ratones mueren. Se observa diferencia entre la curva de la evaluación a las 3 horas post inoculación y las curvas de las evaluaciones de 12/24 horas post inoculación, esto se debe a que a estas dosis el veneno de *Bothrops atrox* tardan un tiempo en causar efecto, a las tres horas la mortalidad todavía varía sin embargo a las 12 horas la mortalidad obtenida deja de variar. Por este resultado y los encontrados en bibliografía las evaluaciones de mortalidad se realizan a las 12 o 24 horas.

A la necropsia, los ratones presentaron hemorragia en el músculo y sangre en la cavidad abdominal, sin necrosis cutánea. Los órganos internos presentaron frecuentemente lesiones hemorrágicas, en especial en los pulmones y ocasionalmente en el cerebro. En casi todos los animales envenenados se observó convulsiones y dificultad respiratoria por envenenamiento (ver anexo 4).

4.2 Estandarización de un protocolo de inmunización de veneno de serpiente (*Bothrops atrox*) a un ejemplar de llama (*Lama glama*).

Al término de las seis inmunizaciones no se logró la potencia esperada del antisuero, por lo tanto se procedió a cinco re – inmunizaciones de 4 mg de veneno cada una; hasta lograr que la potencia neutralizante o DE₅₀, fuese igual o mayor a 2,5 mg/mL (ver anexo 5).

4.3 Determinación de la curva de aparición de anticuerpos en llama (*Lama glama*) mediante la técnica de ELISA

Se realizó el seguimiento de la respuesta inmune de la llama mediante la técnica de ELISA.

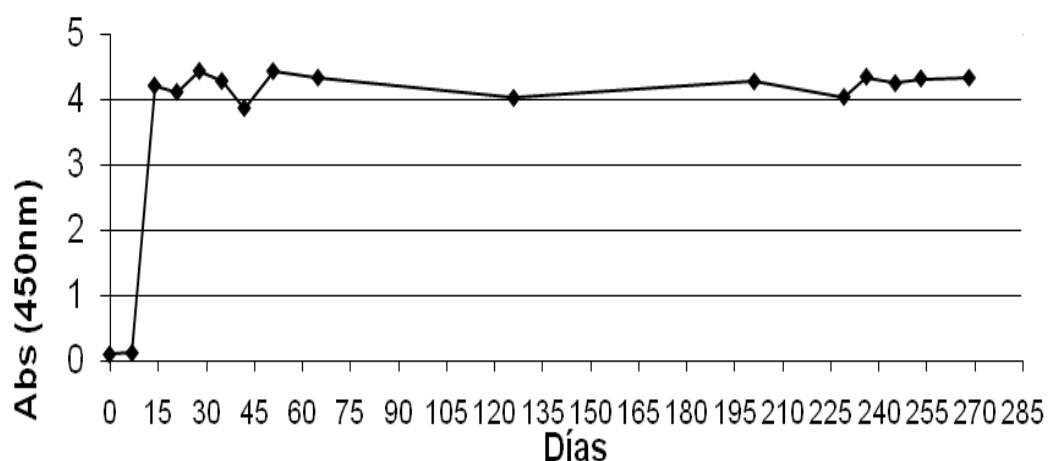


Figura 4. Título de suero de llama a una dilución de 1:800 para medir la concentración de anticuerpos post-inoculación.

Fuente: Elaboración propia

4.4 Determinación de la Neutralización de la Actividad Letal (DE₅₀) del veneno de serpiente (*Bothrops atrox*) en ratones (*Mus musculus*).

Tabla 6. Dosis efectiva media (DE₅₀) del suero de llama (*Lama glama*) inmunizado contra el veneno de *Bothrops atrox*.

24/48h	Dosis de suero de llama (<i>Lama glama</i>) (μL/g ratón)
Límite superior (95/100)	3,860
DE50 (μL /g de ratón)	3,301
Límite inferior (95/100)	2,901

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla 6 se observa que la DE₅₀ fue determinada con el programa SPSS por la regresión PROBIT con límites de confianza del 95 %. Los datos que se emplearon en el PROBIT fueron calculados en μL/g ratón obtenidos a partir del anexo 3.

Así mismo, en el anexo 6 se observa los resultados de mortalidad medidos a 24 y 48 horas en ratones (*Mus musculus*) para suero de llama (*Lama glama*) contra veneno de serpiente (*Bothrops atrox*) para determinar la dosis efectiva. La primera columna indica la cantidad de suero (μL) por mg de veneno que se inocula y se observa que a mayor cantidad de suero inoculado disminuye la mortalidad de los ratones, esto se debe a que el suero de la llama tiene anticuerpos contra el veneno ya que ha sido inmunizada.

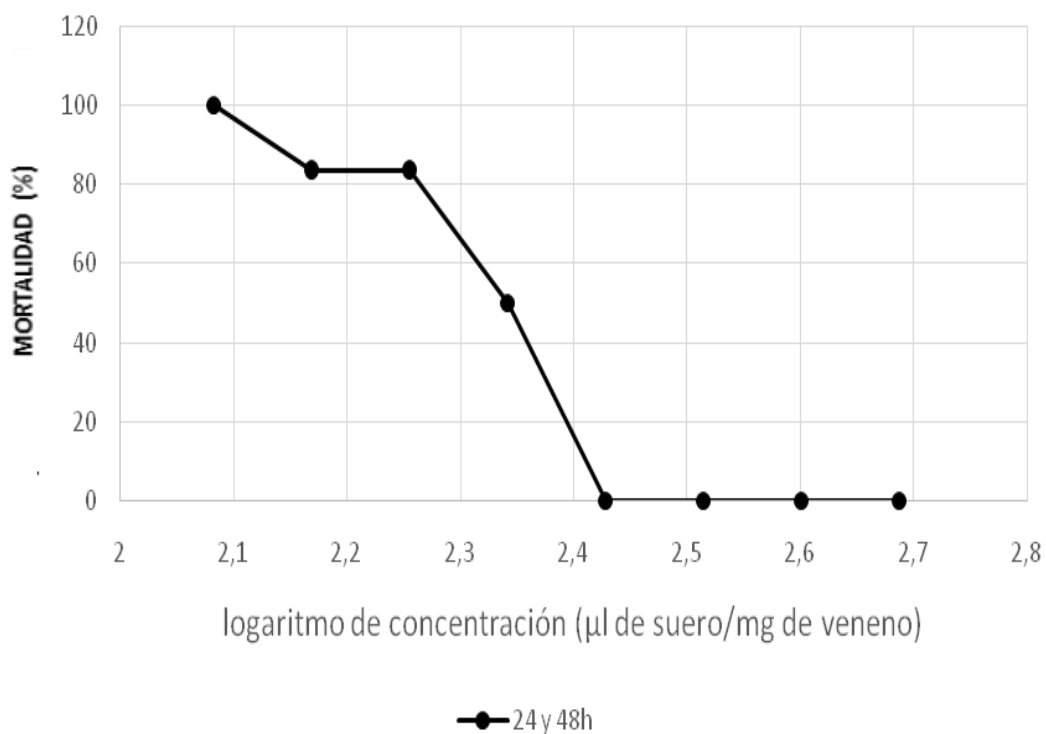


Figura 5. Curva de dosis del antisuero en relación con el porcentaje de mortalidad pos-inyección del veneno de *Bothrops atrox* neutralizado “in vivo” con distintas dosis de suero de llama inmunizado contra este veneno a las 24 y 48 horas.

Fuente: Elaboración propia

En la figura 4 se observa cómo conforme se va aumentando la cantidad de suero respecto al veneno la mortalidad va disminuyendo, esto se debe a que el suero de llama inmunizada está protegiendo a los ratones contra los efectos del veneno.

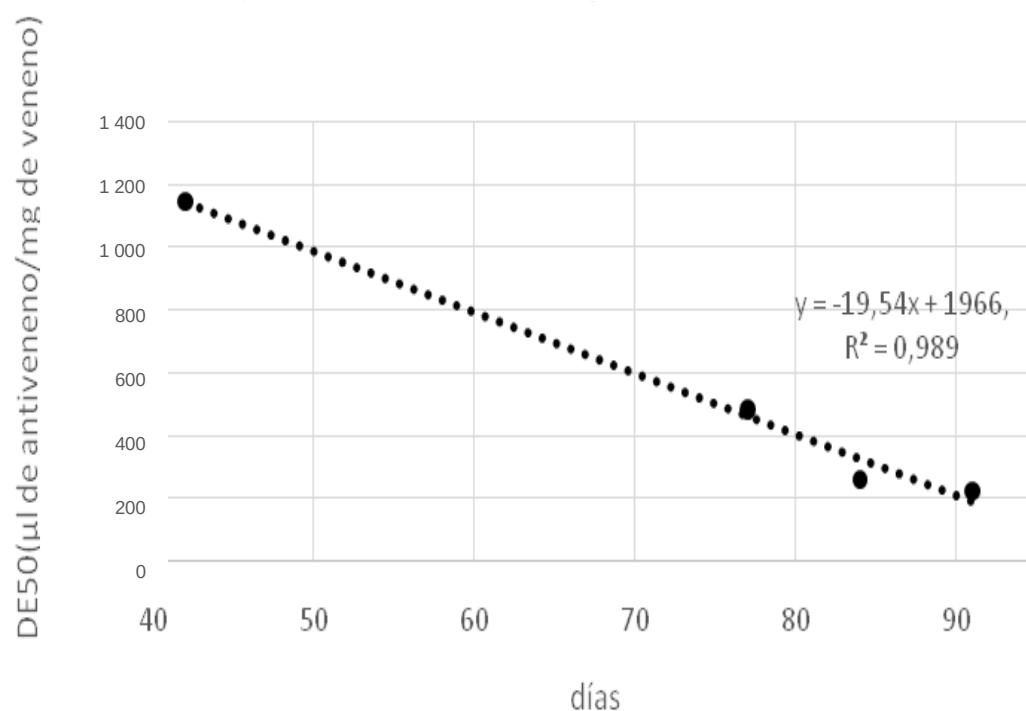


Figura 6. Dosis efectiva media en relación a los días de inoculación.
La dosis efectiva media fue hallada para 5 inmunizaciones.

Fuente: Elaboración propia

La relación de días y el protocolo de inmunización están detallados en el anexo 6. Para cada una de estas fechas se halló la DE_{50} mediante la regresión PROBIT en el programa SPSS con límites de confianza del 95%. En esta figura se observa que conforme pasan los días desde el inicio del esquema de inoculación la DE_{50} se va reduciendo, lo que quiere decir que para neutralizar una misma cantidad de veneno se requiere menos cantidad de suero, esto se debe a que conforme pasan las fechas

las inmunizaciones hacen que el suero y los anticuerpos van aumentando en especificidad y cantidad.

Determinación de la Potencia del suero hiperinmune de *Lama glama*:

$$\text{POTENCIA (mg/mL)} = \frac{A}{B} \times C$$

Donde:

A: Tv – 1

Tv: Número de DL₅₀ utilizadas en el ensayo.

B: DE₅₀ del suero

C: DL₅₀ del veneno

$$\text{Entonces: } \frac{3}{3,301 \text{ } \mu\text{L/g ratón}} \times 3,96 \text{ } \mu\text{g/g ratón} = 3,6 \text{ mg/mL}$$

Se interpreta que 1 mL de suero de *Lama glama* tiene la capacidad de neutralizar hasta 3,6 mg de veneno de *Bothrops atrox*.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

5.1 Determinar la Actividad Letal (DL₅₀) del veneno de serpiente (*Bothrops atrox*) en ratones (*Mus musculus*).

Aunque los antivenenos producidos en equinos resultan un gran avance todavía se presentan algunas dificultades, estos sueros hiperinmunes pueden producir reacciones adversas a los pacientes (Montilla, J. et al., 1999)

El resultado del presente estudio brinda información de la buena respuesta de un camélido (*Lama glama*) como productor de suero hiperinmune contra veneno de *Bothrops atrox* y una alternativa a la producción tradicional.

La dosis letal de *B. atrox* intraperitoneal a las 48 horas fue 2,3mg/Kg determinado por (Ruiz, R. et al., 1993). Por otro lado (Ohsaka, A., 1979) determinó el DL₅₀ de *Bothrops atrox* en 3,8 µg/g a las 48 horas y por vía intraperitoneal comparado a nuestros resultados de 3,96 µg/g estos valores se acercan mucho, debido a que el ensayo es el mismo y las

muestras biológicas son de la misma especie, las variaciones se puede deber a que pese a que se trata de la misma especie el veneno de serpiente varia de población a población incluso dentro de un individuo la composición del veneno puede variar según el estado fisiológico de este (Zelanis, A. & Tashima, A., 2014; Sousa, L. et al., 2017).

Trabajos previos (Olascoaga, M., 1987) muestran que los venenos botrópicos son entre 1,2 a 3,6 veces más tóxicos cuando se inoculan por la vía endovenosa que por la vía intraperitoneal. También los datos previos sugieren que la vía subcutánea no es recomendable para la evaluación de potencia tóxica de los venenos (Olascoaga, M., 1987) y se corroboró con nuestro trabajo que la vía de administración intraperitoneal es idónea para este tipo de ensayos (Neutralización).

Por la importancia que tiene el veneno de *Bothrops atrox* en el Perú ya ha habido varios trabajos en los que se halló la Dosis letal 50%, por ejemplo, a las 48 horas la DL_{50} fue de 6,85 $\mu\text{g/g}$ en *Bothrops atrox* (Barros, F. et al., 1998), (Meier, J. & Theakston, R., 1986) para las mismas condiciones determinó la DL_{50} en 3,95 $\mu\text{g/g}$ con un intervalo de confianza de 95% de 3,78 - 4,13 $\mu\text{g/g}$. A pesar de todo, los resultados encontrados difirieron de este y otros trabajos ligeramente lo que pone al relieve la variabilidad que

generan venenos de diferentes lotes y ratones de diferentes camadas o cepas (Zelanis, A. & Tashima, A., 2014; Sousa, L. et al., 2017).

5.2 Estandarización de un protocolo de inmunización de veneno de serpiente (*Bothrops atrox*) a un ejemplar de llama (*Lama glama*).

Se logra la potencia esperada del antiveneno (suero de llama) con un protocolo de 11 inmunizaciones (0,5 mg, 1 mg, 2mg, 3 mg, 4 mg, 4 mg) incluyendo las inmunizaciones de refuerzo de 4 mg. Estudios previos (Cook, D. & Owen, T., 2010) demuestran que los camélidos inmunizados con veneno de serpiente son capaces de producir IgG con una capacidad de neutralización similar al de las IgG de uso comercial derivado de equino u ovino. Considerando a un protocolo que logre la potencia de neutralización en ratones, ya que mediante esta técnica se mide anticuerpos específicos contra la fracción letal del veneno.

Los venenos polivalentes usados también son testeados (Otero-Patiño, R. et al., 2007) para evaluar su efectividad. Otero-Patiño encontraron una dosis efectiva contra el veneno de *Bothrops atrox* del antiveneno producidos por Antivipmyn-Tri® de 2,4 mg de veneno/1mL que comparado al presente resultado (3,6 mg/mL) resulta ser un poco menor indicando que 1 mL del suero hiperinmune producido en este trabajo puede neutralizar más veneno que Antivipmyn-Tri®. Esto se puede deber entre

otras cosas a los dos esquemas de inmunización o quizás a que los camélidos producen un tipo especial de anticuerpos (nanoanticuerpos) que no requieren de cadenas ligeras a diferencia de los demás mamíferos (Terreno, F., 2012) la evaluación de los antivenenos de caballos producidos los realizan las mismas instituciones que los fabrican en nuestro caso el INS (Instituto Nacional de Salud) pero adicional a esto hay trabajos para saber la efectividad que tienen y corroborar cuál es su rango de acción en cuanto a especies de serpientes y además verificar su poder de neutralización (Otero, R. et al., 2002) para nuestro trabajo se evaluó la neutralización que fue mayor a la que piden los estándares para el antiveneno de caballo (2,5 mg/mL) (Poggi, D., 2002). Las dosis efectivas media para algunos miembros de la familia *Bothrops*; fueron para *Bothrops asper* 333 µL de antiveneno/mg de veneno a las 48 horas e inoculado por vía intraperitoneal y para *Bothrops nummifer* 769 µL de antiveneno/mg de veneno a las 48 horas e inoculado por vía intraperitoneal aunque estos trabajos fueron realizados en caballos (Otero, R. et al., 2002) el resultado fue similar al obtenido en este trabajo.

En este trabajo se analizaron los datos dosis-respuesta con el estadístico Probit, aunque se encontró en referencias otros tipos más de análisis posibles, se optó por el probit por ser el más adecuado para el ensayo. Debido a la necesidad de obtener datos objetivos la estadística

se ha usado desde hace décadas y conforme ha ido avanzando se han ideado algunas formas de calcular el DL_{50} por ejemplo en 1985 Meier y Theakston propusieron un método de análisis estadístico para reducir la cantidad de ratones de experimentación de 30 a 10 que no diferían significativamente en sus resultados siendo más deseable por motivos económicos y éticos. Pero esto superado posteriormente por el estadístico probit que es muy útil frente a datos dosis-respuesta de este y otros tipos.

Se encontraron diferencias en las respuestas al veneno de *Bothrops atrox* dependiendo de la cepa isogénica de ratón en la que se realizaba el ensayo, por eso se decidió usar la cepa Balb/c para este trabajo, ya que trabajos similares usaron esta cepa y se comprobó que no representaron ninguna dificultad. Esto pone en evidencia la importancia de usar un tipo de cepa isogénica para el experimento, la más idónea sería en todo caso la que más se ha usado anteriormente para poder comparar resultados y que haya la menor cantidad de variables posibles.

5.3 Determinación de la curva de aparición de anticuerpos en llama (*Lama glama*) mediante la técnica de ELISA

Ya en trabajos anteriores se demostró el gran valor del uso de la técnica ELISA en ensayos in vitro para el título de anticuerpos, en comparación con otros métodos usados anteriormente (inmunodifusión,

hemaglutinación y otros) (Meier, J. & Theakston, R., 1986). Por otro lado una titulación de anticuerpos de ovinos contra el veneno de *Crotalus durissus cumanensis* realizado por (Montilla, J. et al., 1999) realizan una titulación de anticuerpos y señala cómo después de la primera inmunización los títulos van subiendo hasta llegar a un umbral y posteriormente van reduciéndose hasta acentuarse a un nivel constante, esta reducción del título no se vio en nuestro trabajo debido a que se realizaron dos esquemas de inmunización, pero si el análisis se extendiera por más tiempo se espera que el título baje debido a la nula exposición contra el antígeno.

5.4 Determinar la Neutralización de la Actividad Letal (DE₅₀) del veneno de serpiente (*Bothrops atrox*) en ratones (*Mus musculus*).

La capacidad de neutralizante del efecto letal en ratones (*Mus musculus*) del veneno de serpiente (*Bothrops atrox*) por suero hiperinmune de llama (*Lama glama*) en este trabajo fue de 3,301 µL/g de ratón o que equivale a una potencia de 3,6 mg/mL a las 48 horas y por vía intraperitoneal, en un trabajo anterior se encontró una neutralización de la letalidad de 6.5 mg/mL del veneno de *Bothrops asper* con el suero polivalente fabricado en el INS (Otero, R. et al., 2002) mientras que otros

sueros de marca PROBIOL y ANTIVIPMYN tienen capacidad neutralizante de menos de 1,33 y 7,2 mg/mL, respectivamente. Esto demuestra que el suero que se produjo en este trabajo tiene valores de neutralización semejantes a los producidos para el uso clínico contra las picaduras de serpientes (antiveneno polivalente) por el INS (Instituto Nacional de Salud) y esto soporta la idea de su posible aplicación como alternativa a la producción actual de antiveneno. A todo esto hay que añadir que hasta el día de hoy son escasos los reportes sobre el desarrollo de la respuesta inmune en animales diferente a los caballos inoculados con veneno de serpientes para la producción de antivenenos (Gutiérrez, J. et al., 1988) y en ocasiones el antiveneno ha producido shocks anafilácticos (Bolaños, R. & Cerdas, L., 1980) la necesidad de disminuir los posibles efectos adversos y en especial a las personas que son mordidas por una serpiente que están expuestas a otra mordida, ya que es común que ellos se mantengan en la misma zona geográfica porque tienen sus casas y trabajos dentro de las zonas donde habitan las serpientes, de darse el caso su cuerpo podría crear defensas contra el antiveneno y complicar más su estado en caso de una segunda mordida.

En la figura 5 se puede observar cómo va decayendo el DE_{50} que quiere decir que se requieren menos cantidad de suero de *Lama glama* (antisuero) para neutralizar 1 mg de veneno de *Bothrops atrox* conforme

van pasando los días, teniendo en cuenta que en este intervalo de tiempo se encuentra en refuerzo con un esquema de 5 fechas de inmunización se observa visualmente el aumento de la neutralización por la mayor presencia de anticuerpos neutralizantes contra 1 mg de veneno de *Bothrops atrox*.

CONCLUSIONES

1. Los resultados muestran que el antisuero de llama (*Lama glama*) tiene actividad neutralizante para el veneno liofilizado de *Bothrops atrox*, ya que 1 mL de suero hiperinmune de llama es capaz de neutralizar 3,6 mg de veneno liofilizado de *B. atrox*.
2. La dosis letal media (DL₅₀) para el veneno de *Bothrops atrox* en este trabajo fue de 3,96 µg/g de ratón.
3. El refuerzo de inmunización de la llama fue necesario para alcanzar la potencia (título de anticuerpos) de neutralización deseada del antisuero, obtenida con diez inmunizaciones con un intervalo de 7 días.
4. El ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) nos muestra un aumento rápido del título entre la segunda y tercera inoculación hacia los 14 días.
5. La dosis efectiva media (DE₅₀) del antisuero de *Lama glama* en este trabajo fue de 3,301 µL/g de ratón.

RECOMENDACIONES

- Para *Lama glama* se recomienda realizar un protocolo de inmunización más extenso que para caballos de más de 6 inmunizaciones ya que éstas no mostraron una potencia suficiente en el animal de experimentación.
- Se recomienda seguir usando en análisis probit pese a que hay otras formas de analizar los datos, estos métodos se usaron tradicionalmente en los primeros años de investigación, pero el análisis probit los superó y es útil en estos tipos de trabajo donde se analizan datos dosis - respuesta.
- Se recomienda usar ratones de la cepa Balb/c para trabajos posteriores ya que eso generaría una menor variabilidad en los resultados por factores externos a los que se quieren evaluar.
- Se recomienda el uso de veneno de *Bothrops atrox* en vida silvestre.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barros, S., Friedlanskaia, I., Petricevich, V., Kipnis, T. (1998). Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Mediators of inflammation*, 7(5), 339-346.
- Bermudez, F. (2010). Epidemiological Characteristics of Children with Snake Bite, Cartagena De Indias.
- Bolaños, R., Cerdas, L. (1980). Producción y control de sueros antiofídicos en Costa Rica.
- Cook, D., Owen, T. (2010). Analysis of camelid antibodies for antivenom development: Neutralisation of venom-induced pathology 373–380.
- Daley, L., Gagliardo, L., Duffy, M., Smith, M., JA. (2005). Application of Monoclonal antibodies in functional and comparative investigations of heavy-chain immunoglobulins in new world camelids. *Clin Diag Lab Immunol* 12(3):380-386.

- Fernández, G., Segura, A., Herrera, M., Velasco, W., Solano, G., Gutiérrez, J., León, G. (2010). Neutralization of *Bothrops mattogrossensis* snake venom from Bolivia: Experimental evaluation of llama and donkey antivenoms produced by caprylic acid precipitation. *Toxicon*, 55(2010), 642-645.
- Gutiérrez, J., Chaves, F., Rojas, E., Elizondo, J., Avila, C., Cerdas, L. (1988). Production of monovalent anti-*Bothrops asper* antivenom: development of immune response in horses and neutralizing ability. *Revista de Biología Tropical*, 36(2B), 511-517.
- Harkness, J., Warner, J. (1980). *Manual Clínico de Procedimientos de Pequeñas Especies*. Editorial Acribia, España.
- Harrison R., Hasson S., Harmsen M., Laing G., Conrath K., Theakston R.D.G. (2006). Neutralisation of venom induced haemorrhage by IgG from camels and llamas immunised with viper venom and also by endogenous, non – IgG components in camelid sera. *Toxicon*, 47(2006), 364-368.
- Herrera, A. (2011). *Las inmunoglobulinas G de los camélidos y sus aplicaciones*, UNMSM.

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, Facultad de Microbiología.

Instituto Nacional De Salud (2008). “Guía de Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio: RATÓN”. Centro Nacional de Productos Biológicos, MINSA.

Lévano, J., Fernandez, R. (2004). Diagnóstico y tratamiento de los accidentes por animales ponzoñosos, Instituto Nacional de Salud – Centro Nacional de Productos Biológicos.

Meier, J., Theakston, R. D. G. (1986). Approximate LD₅₀ determinations of snake venoms using eight to ten experimental animals. *Toxicon*, 24(4), 395-401.

Mendoza, J., Vivas, D., Rodríguez, E., Inga, R., Sandoval, G., Lazo, F., Yarlequé, A. (2012). Eficacia experimental de anticuerpos IgY producidos en huevos, contra el veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*.

MINSA (2004). Norma Técnica Sobre Prevención Y Tratamiento De Accidentes Por Animales Ponzoñosos.

- Montilla, J., De Montilla, M., Díaz, E., Añez, M., Villavicencio, J. (1999). Hiperinmunización de ovinos contra veneno de *Crotalus durissus cumanensis* del estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica*, 9(5).
- Mora, D., Lai J Wo, T., Estrada, R. (2014). Productividad Antiofídica de Equinos destinados a la Industria Inmunobiológica en Costa Rica.
- Ohsaka, A. (1979). Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In *Snake venoms* (pp. 480-546). Springer Berlin Heidelberg.
- Olascoaga Mouchard, M. E. (1987). Estudio del veneno de *Bothrops pictus*: bioquímica, toxicidad, neutralización y efectos biológicos (No. QL666. O69 O4-T). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Perú). Facultad de Ciencias.
- Otero, R., Núñez, V., Barona, J., Díaz, A., & Saldarriaga, M. (2002). Características bioquímicas y capacidad neutralizante de cuatro antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum* de Antioquia y Chocó. *Iatreia*, 15(1), 05-15.
- Otero-Patiño, R., Silva-Haad, J., Acevedo, M., Castaño, M., Castillo, J., Cadavid, A., Audiber, S. (2007). Accidente bothrópico en Colombia:

estudio multicéntrico de la eficacia seguridad de Antivipmyn-Tri®, un antiveneno polivalente producido en México. *Iatreia*, 20(3), 244-262.

Pardon, E., Laeremans, T., Triest, S., Rasmussen, S. (2014). A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Natureprotocols*. Vol 9 N° 3.

Poggi, D. (2002). Veneno de serpiente en la industria e investigación farmacológica plan estratégico de desarrollo de la bioindustria en el eje amazonas – marañón – Perú.

Rodríguez, S. Negrin, A. Burger, M. (2004). Efecto adverso por suero antiofídico. *RevMed Uruguay* 2004; 20: 228-232

Ruiz, R., Ruiz, L., Martínez-Vargas, A., Arruz, M., Gutiérrez, J. (1993). Toxicidad y neutralización de venenos ofídicos peruanos de los géneros *Bothrops* y *Lachesis* (Serpentes: Viperidae). *Revista de biología tropical*, 41(3 A), 351-357.

Sandoval, G., Mendoza, J., Roldán, W., Espinoza, Y., Solis, H., Yarlequé, A. (2011). Inmunogenicidad del veneno de *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae) y su evaluación por métodos inmunoenzimáticos.

Sousa, L., Portes-Junior, J., Nicolau, C., Bernardoni, J., Nishiyama-JR, M., Amazonas, D., Moura-Da-Silva, A. (2017). Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. Journal of Proteomics.

Terreno, F. (2012). Desarrollo de nanoanticuerpos. Llamas contra el rotavirus humano (No. H2963). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires (Argentina).

Zavaleta, A. (2013). Nuevos aportes al uso racional de los sueros antiofídicos en el Perú. New contributions to the rational use of antiophidicserum in Perú.

Zelanis, A., Tashima, A. K. (2014). Unraveling snake venom complexity with 'omics' approaches: challenges and perspectives. Toxicon, 87, 131-134.

ANEXOS

Anexo 1. Cálculos de volúmenes de veneno y suero fisiológico que se inocularon en el ensayo DL₅₀.

<i>Caja</i>	<i>Veneno μg / g ratón</i>	<i>Veneno μg/ratón</i>	<i>Veneno mg/ratón</i>	<i>Veneno mL/ratón</i>	<i>mL de veneno x 14 ratones</i>	<i>mL de Suero Fisiológico x 14 ratones</i>	<i>Peso promedio por CAJA (g)</i>
0	-	-	-	-	-	7	17,5
1	2,500	43,75	0,0438	0,0438	0,6125	6,388	17,5
2	3,050	53,832	0,0538	0,0538	0,7537	6,246	17,65
3	3,721	67,722	0,0677	0,0677	0,9481	6,052	18,2
4	4,539	80,124	0,0801	0,0801	1,1217	5,878	17,65
5	5,538	100,022	0,1000	0,1000	1,4003	5,600	18,06
6	6,756	126,014	0,1260	0,1260	1,7642	5,236	18,65

Fuente: Elaboración propia

Anexo 2. Cálculos de volúmenes de veneno de *Bothrops atrox* y suero de *Lama glama* para inocular en el ensayo DE₅₀.

Caja	4 DL50 (µg/g ratón)	Veneno µg/ratón	Veneno mg/ratón	Veneno mL/ratón	mL de veneno x 8 ratones	Niveles de suero mg/mL	Suero mL/ratón	mL de Suero x 8 ratones	mL de veneno + mL de suero	mL de suero Fisiológico x 8 ratones	Peso promedio por CAJA (g)
c (-)		-	-	-	-	-	-	-	-	4	
c(+)	15,84	296,2	0,296	0,029	0,237	-	-	-	-	3,76	18,7
1	15,84	280,4	0,280	0,028	0,224	2,049	0,137	1,095	1,32	2,68	17,7
2	15,84	285,1	0,285	0,028	0,228	2,5	0,114	0,912	1,14	2,86	18
3	15,84	285,9	0,286	0,028	0,229	3,05	0,094	0,749	0,98	3,02	18,05
4	15,84	292,2	0,292	0,029	0,233	3,721	0,079	0,628	0,86	3,14	18,45
5	15,84	294,6	0,295	0,029	0,236	4,54	0,065	0,519	0,75	3,25	18,6
6	15,84	285,1	0,285	0,028	0,228	5,54	0,051	0,411	0,64	3,36	18
7	15,84	289,8	0,289	0,028	0,232	6,76	0,043	0,343	0,58	3,42	18,3
8	15,84	289,8	0,289	0,028	0,232	8,24	0,035	0,281	0,51	3,49	18,3

Fuente: Elaboración propia

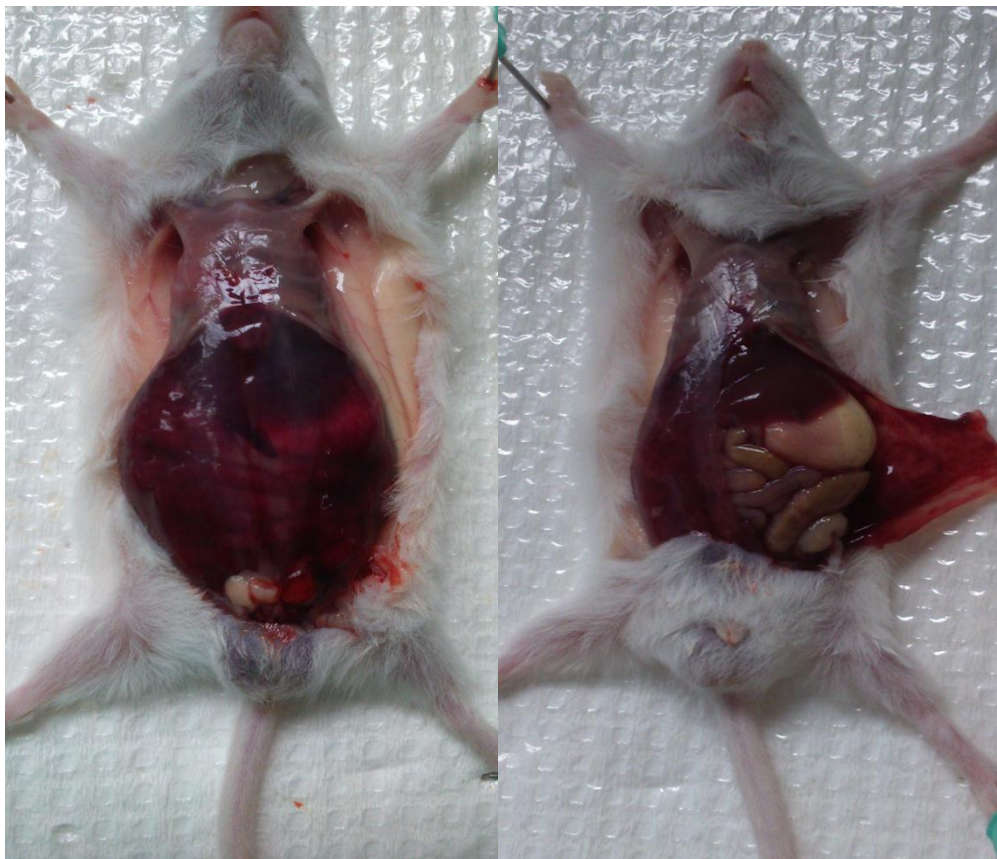
Anexo 3. Mortalidad a distintas dosis de veneno en el ensayo DL₅₀.

CAJA	Dosis		Mortalidad						Peso promedio por CAJA (g)
	µg / ratón	ng/g ratón	3 HORAS		24 HORAS		48 HORAS		
			M/T*	%	M/T	%	M/T	%	
0	-	-	0/12	00,00	0/12	00,00	0/12	00,00	17,5
1	2,500	143	0/12	00,00	0/12	00,00	0/12	00,00	17,5
2	3,050	173	2/12	16,67	3/12	25,00	3/12	25,00	17,65
3	3,721	204	2/12	16,67	5/12	41,67	5/12	41,67	18,2
4	4,539	257	8/12	66,67	9/12	75,00	9/12	75,00	17,65
5	5,538	307	11/12	91,67	11/12	91,67	11/12	91,67	18,06
6	6,756	362	11/12	91,67	12/12	100	12/12	100	18,65

*M/T=Muestras/Totales

Fuente: Elaboración propia

Anexo 4. Observación macroscópica del ensayo del DL₅₀.



Fuente: Elaboración propia

Anexo 5. Protocolo de inmunización (*) y re inmunización () de *Lama glama* con veneno de *Bothrops atrox*.**

N°	Día	Veneno completo o mezcla de proteínas**	Volumen de inoculación (mL)	Adyuvante	Observaciones	Potencia del antisuero (mg/mL)
	1	-	-	-	Sangría y obtención de suero preinmune	No medible
1*	7	0.5 mg.	2	GERBU	obtención de suero	No medible
2*	14	1 mg.	4	GERBU	obtención de suero	No medible
3*	21	2 mg.	4	GERBU	obtención de suero	No medible
4*	28	3 mg.	4	GERBU	obtención de suero	No medible
5*	35	4 mg.	4	GERBU	obtención de suero	No medible
6*	42	4 mg.	4	GERBU	obtención de suero	No medible
7	49	-	-	-	Prueba de ELISA y prueba de POTENCIA: Alcanzados los títulos adecuados de anticuerpos se procederá a la sangría	0,78
8**	56	4 mg.	4	GERBU	obtención de suero	No medible
9**	63	4 mg.	4	GERBU	obtención de suero	No medible
10**	70	4 mg.	4	GERBU	obtención de suero	1,27
11**	77	4 mg.	4	GERBU	obtención de suero	2,5
12**	84	4 mg.	4	GERBU	obtención de suero	3,6
13	91				Prueba de ELISA y prueba de POTENCIA: Alcanzados los títulos adecuados de anticuerpos se procederá a la sangría	-

Fuente: Elaboración propia

Anexo 6. Mortalidad obtenida con diferentes dosis de veneno y antisuero (DE₅₀).

Suero	Mortalidad			
	24 HORAS		48 HORAS	
μl/mg de veneno	M/T*	(%)	M/T	(%)
488,00	0/6	0,00	0/6	0,00
400,00	0/6	0,00	0/6	0,00
327,87	0/6	0,00	0/6	0,00
268,74	0/6	0,00	0/6	0,00
220,28	3/6	50,00	3/6	50,00
180,56	5/6	83,33	5/6	83,33
148,00	5/6	83,33	5/6	83,33
121,31	6/6	100,00	6/6	100,00

*M/T=Muestras/Totales

Fuente: Elaboración propia

Anexo 7. Prueba de chi – cuadrada y PROBIT.

Pruebas de chi-cuadrado

	Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT Prueba de bondad de ajuste de Pearson	2,102	6	0,910 ^a

a. Puesto que el nivel de significación es mayor que 0,150, no se utiliza el factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Las estadísticas basadas en casos individuales difieren de las estadísticas basadas en casos agregados.

Información de convergencia

	Número de iteraciones	Se ha encontrado la solución óptima
PROBIT	18	Sí

Estimaciones de parámetro

	Parámetro	Estimación	Error estándar	Z	Sig.	Intervalo de confianza de 95 %	
						Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a	ul_g	1,593	0,464	3,433	0,001	0,683	2,502
	Interceptación	-5,258	1,487	-3,535	0,000	-6,745	-3,771

a. Modelo PROBIT: PROBIT(p) = Interceptación + BX

Recuentos de casilla y residuos

	Número	ul_g	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuo	Probabilidad
PROBIT	1	7,730	6	6	6,000	0,000	1,000
	2	6,336	6	6	6,000	0,000	1,000
	3	5,193	6	6	5,992	0,008	0,999
	4	4,257	6	6	5,616	0,384	0,936
	5	3,489	6	3	3,707	-0,707	0,618
	6	2,860	6	1	1,447	-0,447	0,241
	7	2,344	6	1	0,383	0,617	0,064
	8	1,922	6	0	0,084	-0,084	0,014

Límites de confianza

	Probabilidad	95% de límites de confianza para ul_g		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	0,010	1,841	0,024	2,404
	0,020	2,012	0,410	2,525
	0,030	2,120	0,653	2,604
	0,040	2,202	0,835	2,665
	0,050	2,268	0,982	2,715
	0,060	2,325	1,106	2,759
	0,070	2,375	1,214	2,798
	0,080	2,419	1,310	2,833
	0,090	2,459	1,397	2,866
	0,100	2,497	1,477	2,897
	0,150	2,650	1,799	3,032
	0,200	2,773	2,044	3,149
	0,250	2,878	2,244	3,261
	0,300	2,972	2,413	3,371
	0,350	3,059	2,559	3,485
	0,400	3,142	2,686	3,603
	0,450	3,222	2,799	3,728
	0,500	3,301	2,901	3,860
	0,550	3,380	2,995	4,000
	0,600	3,460	3,083	4,151

Continúa pág. Sig.

Viene pág. Anterior

0,650	3,543	3,166	4,313
0,700	3,630	3,249	4,490
0,750	3,725	3,332	4,686
0,800	3,830	3,420	4,910
0,850	3,952	3,517	5,175
0,900	4,106	3,634	5,515
0,910	4,143	3,662	5,598
0,920	4,183	3,691	5,688
0,930	4,228	3,724	5,787
0,940	4,277	3,759	5,899
0,950	4,334	3,800	6,026
0,960	4,400	3,847	6,176
0,970	4,482	3,904	6,361
0,980	4,591	3,980	6,608
0,990	4,762	4,097	6,999

Conclusión: Se rechaza la H_0 , el suero de *Lama glama* (antisuero) si neutraliza el efecto letal del veneno de *Bothrops atrox*.