

Producción de anticuerpos policlonales contra tres venenos de serpientes peruanas y su evaluación por métodos inmunoenzimáticos

Production of polyclonal antibodies against three Peruvian snake venoms and its evaluation by immunoenzymatic methods

Gustavo Sandoval¹, Julio Mendoza², Dan Vivas³, Fanny Lazo⁴, Edith Rodríguez⁵, Yrma Espinoza⁶ y Armando Yarleque⁷*

Universidad Nacional Mayor de San Marcos

RESUMEN

Los envenenamientos por serpientes de los géneros *Bothrops* y *Lachesis* son los más frecuentes registrados en el país, por lo que se hace necesario desarrollar métodos inmunoenzimáticos para identificar el tipo de serpiente responsable. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue producir anticuerpos policlonales en modelos experimentales contra los venenos de *B. atrox*, *B. barnetti* y *L. muta* y evaluar su reactividad cruzada por métodos inmunoenzimáticos. Para este fin, se siguió un protocolo de inmunización en conejos albinos (2 kg) por 90 días utilizando venenos completos de las tres especies de serpientes. Los venenos fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida, mientras que las IgG obtenidas al final de los protocolos fueron analizadas por ELISA y Western Blot. Dentro de los resultados obtenidos, el esquema de inmunización permitió obtener anticuerpos a partir del día 20 del protocolo y el título de los sueros al final del proceso fue calculado en 64000. Los valores de reactividad cruzada por ELISA utilizando el suero anti-*B. atrox* alcanzaron valores de 25% y 4% contra los venenos de *B. barnetti* y *L. muta*, respectivamente. De los experimentos de Western Blot se obtuvieron bandas de reactividad en el rango de 14.3 a 97 kDa. Por esta razón, se concluye que los venenos en estudio son altamente inmunogénicos por lo que las IgG obtenidas pueden ser utilizadas para la evaluación de la reactividad cruzada y la posterior elaboración de un kit de diagnóstico rápido del envenenamiento por estas serpientes.

PALABRAS CLAVE: ELISA, inmunización, *Bothrops*, *Lachesis*, anticuerpos policlonales

ABSTRACT

In Peru, bites caused by snakes of genus *Bothrops* and *Lachesis* are the most important recorded, and the identification of responsible snake is a poorly attended issue, so it is highly recommended to develop immunochemical methods for this purpose. The aim of this research was to produce polyclonal antibodies against venoms of *B. atrox*, *B. barnetti* and *L. muta*, and to evaluate its cross-reactivity by immunoenzymatic methods. To reach this objective, an immunization protocol using New Zealand white rabbits (2 kg) was followed, using complete venoms of three snake species. Venom content was analyzed by SDS-PAGE, while IgGs obtained at the final of protocol were analyzed by ELISA and Western Blot. As part of the results, the immunization schedule allowed producing antibodies from day 20 and sera titer was 64000. Cross-reactivity values were 25% and 4% using anti-*B. atrox* serum against *B. barnetti* and *L. muta* venoms, respectively. In Western Blot experiments, reactivity bands were obtained in a range of 14.3 and 97 kDa. In conclusion, the venoms in study are highly immunogenic and produced IgGs could be used to evaluate cross-reactivity and to elaborate a kit for rapid diagnosis of envenomation by these snake's bites.

KEYWORDS: ELISA, immunization, *Bothrops*, *Lachesis*, polyclonal antibodies

Recibido: 4/2/15

Aceptado: 30/4/15

* 1) Biólogo, magíster en Biología Molecular <gsandovalp@unmsm.edu.pe>. 2) Biólogo, egresado de la Maestría en Biología Molecular (FCB). 3) Biólogo, magíster en Biología Molecular <dvasr@unmsm.edu.pe>. 4) Bióloga, magíster en Biotecnología <fabeth14@gmail.com>. 5) Bióloga, magíster en Bioquímica <erodriguezq@unmsm.edu.pe>. 6) Bióloga, IMT Daniel Alcides Carrión. 7. Biólogo, doctor en Ciencias Biológicas <ayarleque48@gmail.com>.

Introducción

La Selva peruana cuenta con una gran variedad de animales venenosos, las serpientes constituyen el grupo más representativo. Hasta la fecha, se han identificado casi 40 especies de serpientes venenosas, la mayoría de las cuales pertenecen a la familia Viperidae, caracterizada por su peligrosidad, y en algunos casos su agresividad. Estas serpientes incluyen a *Bothrops brazili*, *Bothrops pictus*, *Bothrops barnetti* y *Bothrops atrox* "Jergón", siendo esta última responsable del 90% de accidentes ofídicos reportados a nivel nacional; asimismo se incluye a la especie *Lachesis muta* "Shushupe", la cual presenta una mordedura muy tóxica y su presencia causa pánico en las poblaciones nativas, y a *Crotalus durissus*, una especie con un veneno fuertemente neurotóxico y se le encuentra frecuentemente en la región de Sandia, Puno y Madre de Dios, al sureste del Perú (1).

El envenenamiento por serpientes es considerado un problema de salud pública en el Perú, afectando a las poblaciones rurales, comunidades nativas, así como granjeros, madereros, mineros y turistas (2). Este panorama se agrava debido a la falta de conocimiento y herramientas de diagnóstico apropiadas para determinar la especie de serpiente responsable de una mordedura y, por supuesto, establecer el tratamiento óptimo que permita a las personas mordidas una rápida recuperación.

En el tratamiento de mordedura de serpientes, el mejor método es la terapia específica con antivenenos o sueros antiofídicos. Entre estos, los antivenenos polivalentes, preparados usando una mezcla de venenos para la inmunización en caballos, son efectivos en este procedimiento. Sin embargo, la recuperación de la víctima es lenta y se necesita de grandes volúmenes de antivenenos, por el retraso en la atención del paciente, principalmente debido a una incorrecta identificación de la serpiente responsable (3). Por ello, es

necesario el empleo de herramientas de diagnóstico temprano que permitan identificar a la serpiente responsable de una mordedura, con lo cual se puede asegurar una correcta administración de los antivenenos correspondientes con la máxima eficiencia (4,5).

Hasta la fecha hemos podido desarrollar técnicas bioquímicas destinadas a la identificación y neutralización de los venenos (5,6,7,8). Así también se ha logrado obtener importante información sobre las características bioquímicas y biológicas de algunas enzimas que tienen particular acción durante el envenenamiento como la fosfolipasa A₂ (6,9) y las enzimas similares a trombina (8). Sin embargo, un conocimiento más profundo de las características de una ponzoña se logra a través de su utilización en la inmunización de animales de experimentación a fin de obtener anticuerpos policlonales específicos y así estudiar las posibles reacciones cruzadas entre estos venenos y los antivenenos producidos (16). Esto nos permitirá abrir un camino para el diseño y formulación de un kit de detección del envenenamiento por serpientes peruanas.

Por esta razón, el objetivo del presente estudio fue obtener de forma experimental anticuerpos policlonales específicos contra las ponzoñas de *Bothrops atrox* "jergón", *Bothrops barnetti* "sancarranca" y *Lachesis muta* "shushupe", y estudiarlas mediante las técnicas inmunoquímicas de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) y Western Blot.

Materiales y métodos

Material biológico

Se utilizaron los venenos de las serpientes *Bothrops atrox*, *Bothrops barnetti* y *Lachesis muta*, obtenidos de especímenes mantenidos en el Serpentario "Oswaldo Meneses" (UNMSM) (Fig. 1). Estos venenos fueron extraídos por presión manual de las glándulas

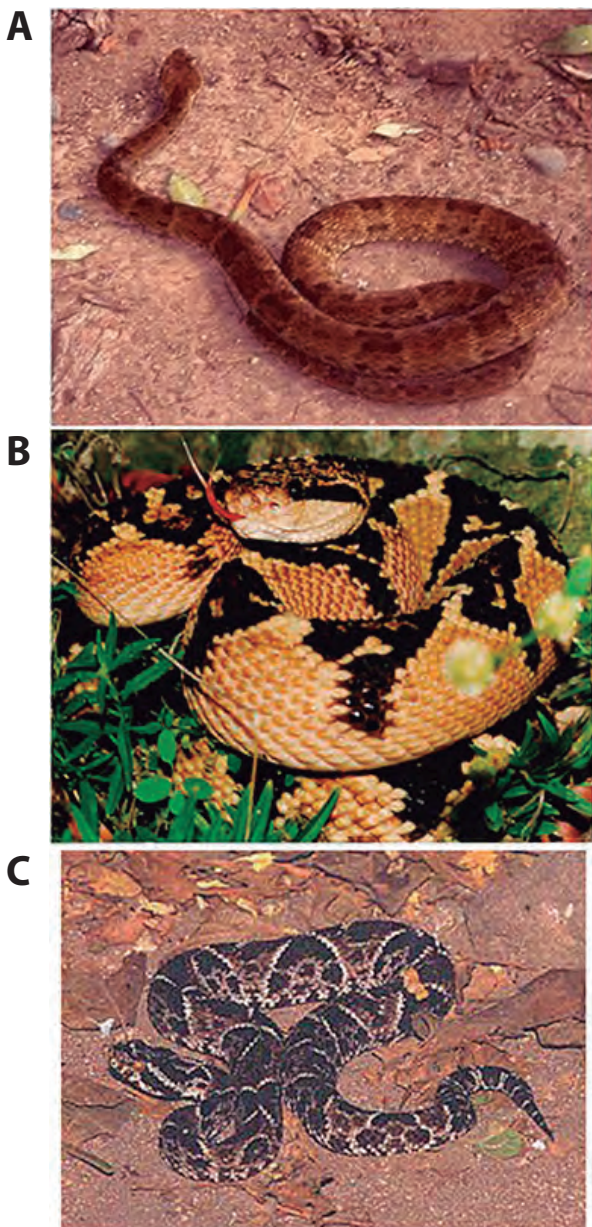


Fig. 1. Serpientes venenosas de importancia en salud pública: A) *Bothrops atrox* "jergón", B) *Lachesis muta* "shushupe", C) *Bothrops barnetti* "sancarranca"

venenosas, para luego ser liofilizados y posteriormente mantenidos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Para la obtención del suero hiperinmune se emplearon conejos albinos machos Nueva Zelanda (2.5 kg de peso aproximadamente), los cuales fueron mantenidos en el Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión" - UNMSM.



Fig. 2. Procedimiento para la estandarización de la técnica de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti-veneno. El antígeno (veneno) es colocado en las placas y se cubre con el suero problema (suero de conejo), para luego detectar los inmunocomplejos formados mediante un conjugado (anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina) y el empleo del sustrato respectivo (p-nitrofenil fosfato).

Determinación de proteínas

Las proteínas analizadas fueron cuantificadas mediante la absorbancia a 280 nm empleando un espectrofotómetro UV-VIS de acuerdo al método de Warburg y Christian (10). Así también se empleó el método de Lowry (11), modificado por nuestro laboratorio (19). En ambos casos se usó a la proteína albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

Protocolo de inmunización

Los venenos completos de *B. atrox*, *L. muta* y *B. barnetti* a una concentración de 1 mg/mL, fueron preparados en buffer fosfato salino (PBS) 0.15 M pH 7.4, y posteriormente combinados con un volumen equivalente de adyuvante de Freund completo (CFA, Sigma-Aldrich). La mezcla fue emulsificada completamente e inyectada por vía intradérmica, en el dorso de cada uno de los conejos albinos de raza Nueva Zelanda (2 kg, aproximadamente) en volúmenes de 0.25 mL. Luego de 10 días se

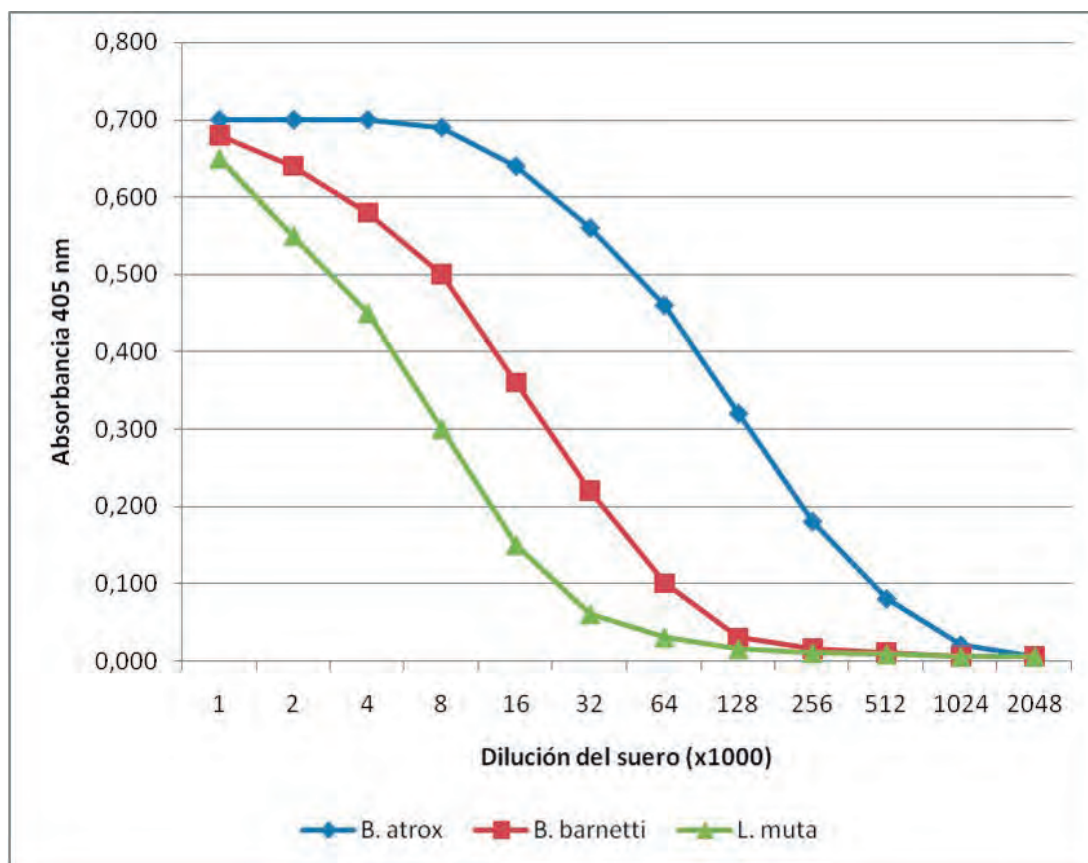


Fig. 3. Detección cruzada del suero anti-*B. atrox* con otros venenos de serpientes peruanas mediante la técnica de ELISA indirecta

aplicaron tres dosis de refuerzo preparadas con adyuvante incompleto de Freund (IFA, Sigma-Aldrich) a intervalos de 30 días. Diez días después de aplicada cada dosis de refuerzo, se extrajo sangre a partir de la vena marginal de la oreja, a fin de evaluar la presencia de anticuerpos reactivos en el suero contra el veneno en estudio.

Detección y cálculo del título de anticuerpos contra los venenos

Se realizó mediante la "técnica de ELISA" (12) (Fig. 2), siguiendo el método de titulación a punto final (13). En primer lugar se estandarizó la cantidad de antígeno a emplear abarcando un rango de concentración de 0.065 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Luego, se cubrieron placas de 96 pocillos (Nunc-Immuno™, Dinamarca) con 100 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de los venenos de *B. atrox*, *B. barnetti* y *L. muta* (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectivamen-

te, disueltos en buffer de cubierta, durante una noche a 4 °C. Después de tres lavados sucesivos empleando buffer de lavado, se aplicó en los pocillos buffer de bloqueo por 1 h a 37 °C. Luego de tres lavados, se aplicaron 100 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ del respectivo suero de conejo obtenido al final del protocolo de inmunización (día 90), diluido seriadamente con factor 2 a partir de 1/1000 en el buffer de bloqueo, e incubados durante 1 h a 37 °C. Las placas fueron lavadas nuevamente y los anticuerpos unidos fueron detectados empleando anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (1/4000 en buffer de bloqueo) seguido de la adición del sustrato respectivo (100 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de *p*-nitrofenil fosfato disuelto en buffer Tris). Después de 30 min a 20-22 °C, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de NaOH 3 M registrándose la absorbanza a 405 nm en un lector de placas Titertek Multiskan PLUS

MKII. El título del suero respectivo correspondió a la inversa de la dilución del mismo la cual produjo un 50% de la máxima absorbancia registrada (Fig. 3).

Evaluación de la reactividad cruzada entre los sueros hiperinmunes obtenidos y los venenos de serpientes en estudio

La reactividad cruzada del suero hiperinmune anti-*B. atrox* contra los venenos de *B. atrox*, *L. muta* y *B. barnetti* fue evaluada mediante la técnica de ELISA para lo cual se emplearon placas de 96 pocillos cubiertas con 100 µL/pocillo de los respectivos venenos (0.25 µg/mL). Luego se siguieron los pasos establecidos en el procedimiento anterior empleando el mismo suero de conejo diluido a partir de 1/1000. La reactividad cruzada fue expresada como porcentaje de las densidades ópticas resultantes de la reacción entre los mencionados venenos y el suero anti-*B. atrox* considerando como 100% el valor de absorbancia obtenido entre el veneno de *B. atrox* y su respectivo suero a una dilución equivalente al título obtenido previamente (Fig. 3).

Análisis electroforético

Los venenos en estudio (20-25 µg) fueron tratados con buffer de muestra bajo condiciones no reductoras durante 5 min a 100 °C para luego ser sometidos a PAGE-SDS al 12% durante 1 h a 100 voltios constantes (Laemmli, 1970). Se utilizaron como proteínas patrones: fosforilasa b (97 kDa), albúmina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa) y lisozima (14.3 kDa). Después de la corrida, los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie R-250 0,1% durante 2 h y lavados con solución decolorante conteniendo metanol, ácido acético y agua (4:3:4) hasta evidenciar las bandas proteicas (Fig. 4A).

Análisis por Western Blot

Los venenos en estudio (10-15 µg) separados previamente mediante PAGE-SDS, fueron transferidos a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) en buffer de transferencia durante 50 min a 100 voltios (14). Las membranas fueron bloqueadas usando el buffer respectivo durante una noche a 4 °C. Después se procedió al tratamiento con buffer de lavado y luego las membranas fueron enfrentadas con el suero hiperinmune de conejo (1/1000) diluido en buffer de bloqueo. Luego de 1 h de exposición a 20-22 °C, las membranas fueron lavadas nuevamente y esta vez expuestas a anti-IgG de conejo ligada a fosfatasa alcalina (1/4000) durante 1 h a 20-22 °C, para luego de lavados sucesivos incubarlas con una solución de revelado. Posteriormente, las membranas fueron sumergidas en agua destilada para detener el desarrollo de color y finalmente se procedió al análisis visual de los patrones de reactividad del suero hiperinmune, obtenido experimentalmente contra los diferentes venenos (Fig. 4B-D).

Resultados

Detección de anticuerpos mediante la técnica de ELISA indirecta

A partir de las muestras de suero obtenidas al final del protocolo de inmunización, se evaluaron los niveles de producción de anticuerpos IgG específicos realizando dilución seriada del suero a partir de 1/1000 hasta 1/2048000. En la Fig. 3, se muestran los niveles de producción de anticuerpos IgG específicos contra los venenos de *B. atrox*, *B. barnetti* y *L. muta*, determinados por la técnica de ELISA. Se observa que a una dilución de 1/64000 se alcanza el 50% del máximo valor de absorbancia. Así se determinó que el título de anticuerpos anti-*B. atrox*, anti-*B. barnetti* y anti-*L. muta* en los respectivos

sueros obtenidos al final del protocolo de inmunización mediante la técnica de ELISA correspondieron al valor de 64000 (Fig. 3).

Reactividad cruzada del suero experimental anti-*B. atrox* contra los venenos en estudio por ELISA

Al evaluarse la reactividad de los venenos en estudio contra el suero hiperinmune anti-*B. atrox* se alcanzaron valores altos de densidad óptica a 405 nm, donde el máximo valor correspondió a la reacción entre el veneno de *B. atrox* y su correspondiente suero (Fig. 3). Además, se observó que el suero reaccionó de forma cruzada con los otros venenos de serpientes, pero con diferente intensidad, siendo los valores de reactividad cruzada para los venenos de *B. barnetti* y *L. muta*, de 25% y 4%, respectivamente.

Reactividad cruzada del suero anti-*B. atrox* contra los venenos en estudio por Western Blot

La Figura 4 muestra que los sueros anti-*B. atrox*, anti-*B. barnetti* y anti-*L. muta*, reaccionaron respectivamente con los componentes proteicos de los venenos de *B. atrox*, *B. barnetti* y *L. muta*, lo cual se evidencia por la formación de bandas coloreadas. Para el caso del veneno de *B. atrox* se obtuvo una intensa reactividad comprendiendo bandas en el rango de 14.3 a 97 kDa. Por otro lado, este suero reaccionó de forma cruzada con los componentes del veneno de *B. barnetti* abarcando un rango de pesos moleculares similar al anterior, pero con menor intensidad y a su vez mostrando un número menor de bandas coloreadas. El veneno de *L. muta* reaccionó con menor intensidad frente al suero anti-*B. atrox*, donde la reactividad de este último se encontró en los componentes alrededor de los 66 kDa y a otros comprendidos en el rango de 14.4 a 20.1 kDa.

Discusión

El envenenamiento por serpientes constituye un problema de salud muy importante en muchas partes del mundo, especialmente en los países en desarrollo y con una vasta selva como es nuestro país (2). En este aspecto se han desarrollado numerosos ensayos bioquímicos e inmunológicos con la finalidad principal de identificar a la especie de serpiente responsable de una mordedura, ya que su reconocimiento por parte de las víctimas es muy difícil y las manifestaciones clínicas de los accidentados no son confiables debido a la complejidad de los síntomas. Por esta razón la detección de los componentes del veneno de serpiente en los fluidos corporales juega un rol importante en el manejo del envenenamiento, lo cual permitirá optimizar el uso de los respectivos antivenenos y se generarán datos epidemiológicos correctos sobre la distribución geográfica de las principales especies de serpientes de importancia en salud pública.

Los ensayos diseñados para la detección de venenos de serpientes y sus respectivos anticuerpos tienen que cumplir ciertos requerimientos los cuales incluyen altos niveles de sensibilidad, buena especificidad (es decir, la capacidad de diferenciar con alta precisión entre venenos y anticuerpos producidos por especies de serpientes cercanamente relacionadas), rapidez en la obtención de resultados, reproducibilidad, simplicidad y facilidad en la toma de muestra. Hasta la fecha se han desarrollado numerosos ensayos bioquímicos e inmunológicos, entre ellos inmunodifusión, inmunoelectroforesis, inmunofluorescencia, hemaglutinación, radioinmunoensayo (RIA) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) (12). Luego de haber sido ampliamente revisadas por numerosos investigadores, se ha encontrado a la técnica de ELISA como el método más idóneo para la detección de venenos de serpientes y sus respectivos an-

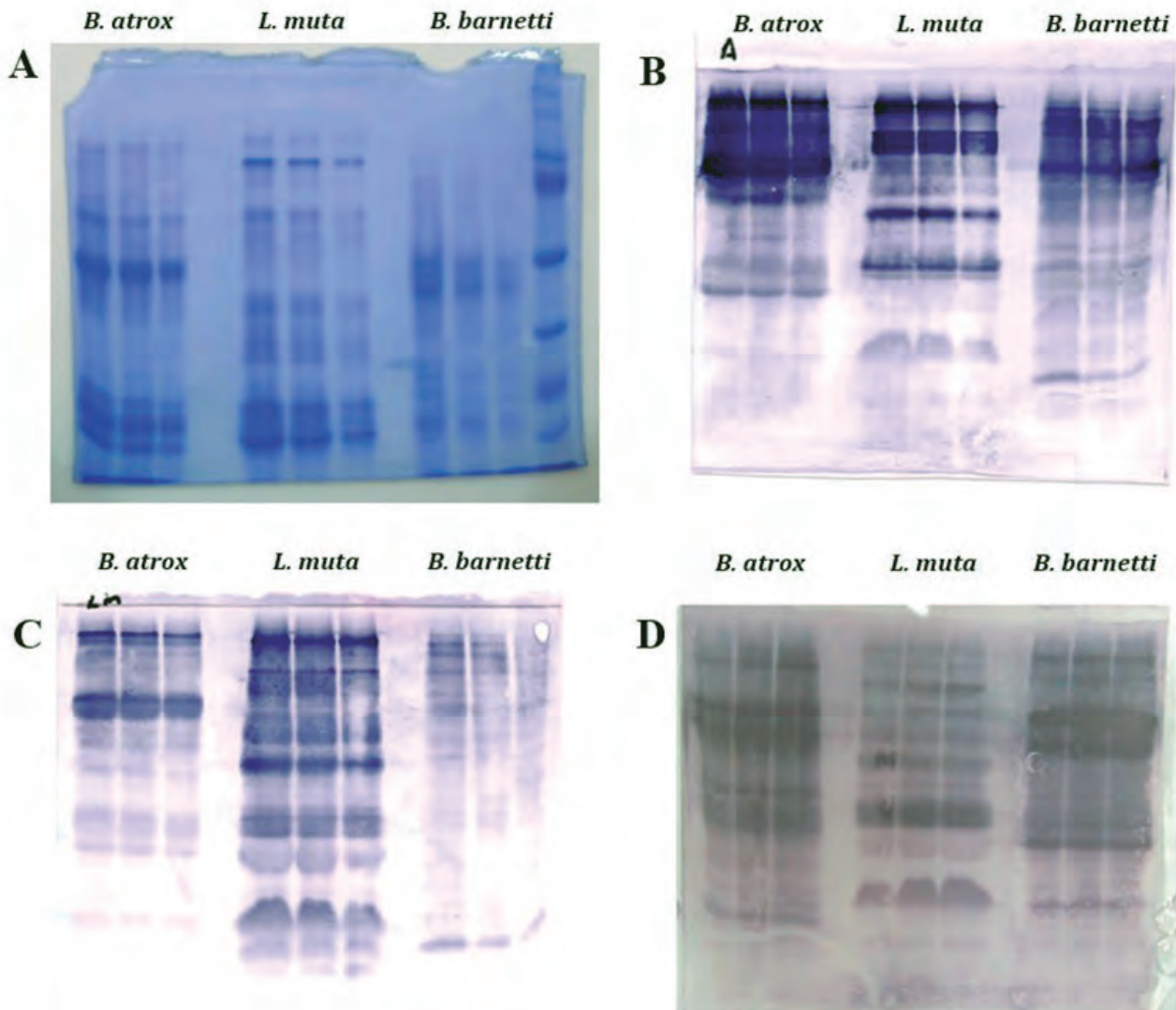


Fig. 4. (A) Electroforesis de los venenos en estudio. Detección cruzada de los sueros anti-*B. atrox* (B), anti-*L. muta* (C) y anti-*B. barnetti* (D) con otros venenos de serpientes peruanas mediante la técnica de Western Blot

ticuerpos (15), ya que permite discernir con gran especificidad el tipo de serpiente responsable de un accidente, logrando superar el problema de reacción cruzada de los antígenos.

En el presente estudio se ha utilizado el método de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG específicos presentes en el suero de conejos inmunizados experimentalmente contra los venenos de las serpientes *Bothrops atrox*, *Bothrops barnetti* y *Lachesis muta*. Para esto se siguieron los lineamientos establecidos por la Escuela

de Medicina Tropical de la Universidad de Liverpool - Inglaterra, centro de referencia a nivel mundial en el desarrollo de sistemas de detección de venenos y sus anticuerpos, los cuales fueron modificados para su aplicación en este laboratorio (16). Si bien el método de ELISA indirecto tiene un rol importante tanto en el laboratorio como en el campo, hay que tener en cuenta sus alcances y limitaciones los cuales fueron tomados en cuenta durante el desarrollo de este trabajo. Durante la realización de estos ensayos se mantuvieron constantes las condiciones de tempera-

tura a 37 °C y tiempos de incubación de 1h, los cuales fueron suficientes para observar la seroconversión de los conejos. Estos resultados son importantes ya que una de las principales aplicaciones de este método sería la detección rápida de antígenos de veneno bajo la forma de kits de diagnóstico lo cual permitiría facilitar su uso por el personal médico encargado de la atención primaria de las personas accidentadas (17).

Una vez optimizados los parámetros para la detección de los anticuerpos producidos, se procedió al cálculo del título para cada antiveneno el cual es considerado alto cuando su valor es mayor a 32000 (17). Nuestros resultados muestran un título de anticuerpos anti-*Bothrops atrox*, anti-*Bothrops barnetti* y anti-*Lachesis muta*, correspondiente al valor de 64000 (Fig. 3), lo que significa que el veneno analizado es altamente inmunogénico. La literatura reportada muestra títulos que pueden alcanzar valores de hasta 2048000 para los venenos de *Bothrops atrox* y *Lachesis muta* de especies provenientes de Brazil (18).

De los resultados de reactividad cruzada obtenidos utilizando la técnica de Western Blot, se observa que los sueros anti-*B. atrox*, anti-*B. barnetti* y anti-*L. muta*, reaccionan con los componentes proteicos de sus respectivos venenos, indicando que la mayoría de sus componentes son inmunogénicos, mostrando bandas con pesos moleculares de rangos similares pero de intensidades diferentes (Fig. 4).

En conclusión, el presente trabajo muestra que los venenos de las serpientes *Bothrops atrox*, *Lachesis muta* y *Bothrops barnetti* presentan un gran potencial inmunogénico al ser inoculados en conejos albinos e induciendo la seroconversión de estos animales, permitiendo una gran producción de anticuerpos policlonales. Asimismo, el empleo de la técnica de ELISA indirecto permitió la detección de los

anticuerpos policlonales específicos producidos, los cuales fueron luego analizados por el método de Western Blot para la evaluación de la reactividad cruzada entre los venenos en estudio.

A partir de los anticuerpos purificados anti-*B. atrox* utilizando cromatografía de afinidad con veneno inmovilizado, se puede preparar un conjugado altamente específico que puede utilizarse como un kit de diagnóstico para la detección de veneno de cualquiera de estas tres especies en sangre circulante. Dicho kit consistiría en tiras de poliestireno impregnadas con los anticuerpos específicos anti-*B. atrox* a las cuales se les adicionará una gota de sangre del paciente para luego agregar el conjugado específico que permita la detección del veneno de *B. atrox* mediante la técnica de ELISA sándwich. El ensayo de este kit de diagnóstico puede realizarse en ratas experimentalmente inoculadas con veneno de serpiente haciéndose la detección tal como se indica en estudios previos (17).

Conclusiones

Los venenos de las serpientes *Bothrops atrox*, *Bothrops barnetti* y *Lachesis muta* son altamente inmunogénicos, por lo que los anticuerpos obtenidos pueden ser utilizados para la evaluación de la reactividad cruzada y la elaboración de un kit de diagnóstico rápido del envenenamiento por estas serpientes.

Agradecimientos

Los autores de la presente investigación agradecen a la Fundación Instituto "Hipólito Unanue" y al Vicerrectorado de Investigación (VRI-UNMSM) por el apoyo financiero otorgado para su ejecución.

Referencias bibliográficas

1. YARLEQUÉ A. (2000). *Las serpientes peruanas y sus venenos*. Lima: Fondo Editorial Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
2. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (2004). *Diagnóstico y tratamiento de los accidentes por animales ponzoñosos*. Lima: Instituto Nacional de Salud.
3. JELINEK GA, Tweed C, Lynch D *et al.* (2004). Cross reactivity between venomous, mildly venomous, and non-venomous snake venoms with the Commonwealth Serum Laboratories Venom Detection Kit. *Emerg Med Australas*, 16(5-6); pp. 459-64.
4. FELICORI LF, Chávez-Olórtegui C, Sánchez EF (2005). Specific identification of *Lachesis muta muta* snake venom using antibodies against the plasminogen activator enzyme, LV-PA. *Toxicon*, 45(6); pp. 803-806.
5. LAING GD, Yarlequé A, Marcelo A *et al.* (2004). Preclinical testing of three South American antivenoms against the venoms of five medically – important Peruvian snake venoms. *Toxicon*, 44; pp. 103-106.
6. MENDOZA J, Lazo F, Yarleque L *et al.* (2008) Efecto del antiveneno botrópico sobre las actividades de Fosfolipasa A2, L-aminoácido oxidasa y hialuronidasa de los venenos de serpientes peruanas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*, 25(2); pp.174-78.
7. GARCÍA P, Yarlequé A, Bonilla C *et al.* (2008) Biochemical characteristics and pre-clinical testing of a lyophilized bothropic antivenom against *Bothrops atrox* snake venom. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 25(4); pp.386-390.
8. YARLEQUÉ A, Vivas D, Inga R *et al.* (2008). Acción del antiveneno botrópico polivalente sobre las actividades proteolíticas presentes en los venenos de serpientes peruanas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*, 25(2); pp.169-173.
9. MEJÍA J, Inga R; Lazo F, Rodríguez E, Yarlequé A, Zavaleta A. (2006). Purificación y propiedades bioquímicas de una Fosfolipasa A del veneno de la serpiente *Lachesis muta* "Shushupe". *Rev Soc Quim Perú*, 72(2); pp.86-95.
10. WARBURG O, Christian W. (1941). Isolierung and Kristallisation der Garungs ferments enolase. *Biochem Z.*, 310; pp. 384-421.
11. LOWRY OH, Rosebrough NJ, Farr AL *et al.* (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, 193(1); pp. 265-75.
12. THEAKSTON RD. (1983). The application of immunoassay techniques, including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), to snake venom research. *Toxicon*, 21(3); pp. 341-352.
13. ALZAMORA L, Colona E, Vizcarra M. (2002). *Manual de prácticas de inmunoserología*. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
14. TOWBIN H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci*, 76(9); pp. 4350-4354.
15. SELVANAYAGAM ZE, Gopalakrishnakone P. (1999). Tests for detection of snake venoms, toxins and venom antibodies: review on recent trends" (1987-1997). *Toxicon*, 37(4); pp. 565-86.
16. SANDOVAL G, Lerma L, Rodríguez E *et al.* (2006). Purificación de anticuerpos policlonaes contra el veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* ("jergón") por cromatografía de afinidad. *Rev Soc Quim Perú*, 72(3); pp. 140-149.
17. VAN DONG L, Quyen le K, Eng KH *et al.* (2003). Immunogenicity of venoms from four common snakes in the South of Vietnam and development of ELISA kit for venom detection. *J Immunol Methods*, 282(1-2); pp. 13-31.
18. COLOMBINI M, Fernandes I, Cardoso DF *et al.* (2001). *Lachesis muta muta* venom: immunological differences compared with *Bothrops atrox* venom and importance of specific antivenom therapy. *Toxicon*, 39(5); pp. 711-719.
19. LOAYZA S, Morante Y, Campos S, Yarlequé A. (1985). Enzimas proteolíticas en el veneno de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Bol Soc Quim Perú*, 52(3); pp. 151-163.