

## Actividad letal de seis venenos de serpientes de importancia médica en el Ecuador

María del Carmen Terán <sup>1</sup> ✉ y Bruno Lomonte <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Empresa Pública de Fármacos ENFARMA EP, Guayaquil, Ecuador

<sup>2</sup> Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José 11501, Costa Rica

✉ macateza11@hotmail.com

Recibido 01-03-2016, Aceptado 30-05-2016

**RESUMEN.-** Se determinó la actividad letal de los venenos de serpientes de seis especies de vipéridos colectadas en Ecuador, a través de ratones CD-1. La especie más abundante fue *Bothrops asper* de la cual se analizaron adultos y juveniles provenientes de distintas localidades del país. Los resultados mostraron variaciones importantes en la actividad letal de los venenos, tanto a nivel interespecie como intraespecie, esta última relacionada con factores como la variabilidad individual, la procedencia geográfica o la edad de las serpientes. Estas diferencias estarían asociadas con variaciones en la composición proteica de los venenos y podrían ser de relevancia en la selección de las muestras para la producción y control de los antivenenos de uso terapéutico.

**PALABRAS CLAVES:** DL<sub>50</sub>, letalidad, serpiente, venenos, Viperidae.

**ABSTRACT.-** The lethal activity of venoms from six viperid snake species found in Ecuador was determined in CD-1 mice. Venoms of *Bothrops asper* from different localities of the country, adults and juvenile individuals, were included. Results showed important variations in the lethal activity of the venoms, both at the interspecific and intraspecific level, the latter related to factors such as individual variability, geographic origin, or age of snakes. These differences could be associated with variations in the protein composition of venoms, and could be of relevance in the selection of samples for the production and control of therapeutic antivenoms.

**KEYWORDS:** DL<sub>50</sub>, lethality, snake, venoms, Viperidae.

### INTRODUCCIÓN

Los envenenamientos debidos a mordeduras de serpientes constituyen una patología relevante en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, como lo evidencian las estimaciones de morbilidad y mortalidad (Chippaux 1998, WHO 2007, Kasturiratne *et al.* 2008, Gutiérrez *et al.* 2010).

En el continente americano, las serpientes venenosas de importancia médica pertenecen a dos familias: Viperidae, representada por las “víboras”, y Elapidae, representada por las “corales” o “coralillos” (Bucarechi *et al.* 2016). Más del 95% de los casos de ofidismo en las Américas son causados por serpientes de la familia Viperidae, destacándose las pertenecientes al género *Bothrops* (Fan y Cardoso 1995, Russell 1997, Holstege *et al.* 1997, Gutiérrez 2011). Los envenenamientos por vipéridos se caracterizan por un prominente daño tisular local y alteraciones fisiopatológicas sistémicas que, en los casos más graves, pueden llevar a la muerte (Gutiérrez y Lomonte 2009).

La atención médica de los pacientes que sufren envenenamientos por mordedura de serpientes requiere de la pronta administración de antivenenos apropiados y eficientes, que neutralicen las acciones lesivas de las distintas toxinas en el organismo (Warrell 2010). Dadas las notables variaciones que pueden existir en la composición proteica de los venenos de distintas especies de serpientes, o incluso de distintos individuos de una misma especie (Chippaux *et al.* 1991), la caracterización de los venenos de las principales serpientes halladas en cada región se vuelve una tarea relevante. Dicha información es fundamental para la adecuada valoración preclínica de los antivenenos que se van a utilizar en la terapia antiofídica. La principal prueba para evaluar los antivenenos a nivel preclínico es la neutralización de la actividad letal de los venenos, usualmente realizada en ratones. Para ello, es necesario conocer la potencia letal de cada veneno en dicho modelo animal. En el presente trabajo se investigó la actividad letal de los venenos de seis de las 17 especies de vipéridos halladas en Ecuador, con el fin de obtener un mayor conocimiento sobre sus potencias y comparar sus variaciones geográficas e interespecíficas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Venenos.-** Las muestras de venenos fueron obtenidas de serpientes mantenidas en la colección del Serpentario de ENFARMA EP, mediante extracción manual. Los venenos fueron desecados inmediatamente con carbonato de sodio anhidro y conservados en refrigeración (4°C) hasta su utilización en las pruebas de letalidad. Se registró la procedencia geográfica y el tamaño de cada serpiente, así como el número de individuos que aportaron veneno para cada mezcla correspondiente a distintas especies o a distintas localidades de una misma especie.

**Ratones.-** En todo el estudio se utilizaron ratones de la cepa CD-1 de ambos sexos, de 16 a 18g de peso

## RESULTADOS

Se estimó la actividad letal de un total de 16 muestras de venenos de seis especies de vipéridos colectados en Ecuador (Tabla 1). Cuatro de estas muestras fueron obtenidas de serpientes individuales, mientras 12 estuvieron conformadas por mezclas de los venenos de 2 o más individuos de una misma especie.

Para la especie más común, *Bothrops asper*, fue posible obtener un número considerable de especímenes (87 individuos) de diversas localidades del país. Los valores de DL<sub>50</sub> intraperitoneal para las muestras de veneno de esta especie variaron desde 47.6µg/ratón (Baba, Los Ríos) hasta 191.1µg/ratón (Progreso, Guayas).

**Tabla 1.** Dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de seis venenos de serpientes de la familia Viperidae de Ecuador.

Especie	Localidad/provincia	Número de individuos	Tamaño (mm)	DL <sub>50</sub> en µg/ratón (límites de confianza 95%)	DL <sub>50</sub> en µg/g (límites de confianza 95%)
<i>Bothrops asper</i>	Balzar/Guayas	1	1 210	145.7 (124.2-182.0)	8.57 (7.31-10.70)
<i>Bothrops asper</i>	Guale (juveniles)/Manabí	10	495-695	65.7 (25.9-107.9)	3,8 (1.5-6.34)
<i>Bothrops asper</i>	Echandia/Bolívar	3	1 410	156.9 (131.1-175.4)	9.2 (7.71-10.31)
<i>Bothrops asper</i>	La Unión/Esmeraldas	2	980-1 300	91.9 (81.4-108.7)	5.4 (4.78-6.39)
<i>Bothrops asper</i>	Cumandá (juveniles) /Chimborazo	4	350-360	75.6 (67.3-87.5)	4.4 (3.95-5.14)
<i>Bothrops asper</i>	Progreso/Guayas	2	1 110-1 510	191.1 (157.0-241.2)	11.2 (9.23-14.18)
<i>Bothrops asper</i>	Flavio Alfaro/Manabí	6	730-1 580	119.5 (81.4-153.7)	7 (4.78-9.04)
<i>Bothrops asper</i>	Machala/El Oro	1	1 350	89.6 (73.6-106.2)	5.2 (4.3-6.24)
<i>Bothrops asper</i>	Cerecita/Guayas	1	892	52.2 (43.9-68.1)	3 (2.58-4)
<i>Bothrops asper</i>	Baba/Los Ríos	3	1 010-1 290	47,6 (29.5-59.2)	2.8 (1.73-3.8)
<i>Bothrops asper</i>	Varias localidades (Manabí, Bolívar, Chimborazo, Los Ríos)	54	322-1 580	69.3 (59.8-77.8)	4 (3.51-4.57)
<i>Bothrops atrox</i>	Bomboiza/Morona Santiago	25	280-1 380	89.0 (69.9-108.9)	5.2 (4.11-6.40)
<i>Lachesis muta</i>	Bomboiza/Morona Santiago	5	1 400-1 850	139.7 (99.7-165.9)	8.2 (5.86-9.75)
<i>Bothrocophias microphthalmus</i>	Bomboiza/Morona Santiago	5	575-970	225 (192-262)	13.2 (11.2-15.41)
<i>Bothriopsis taeniata</i>	Bomboiza/Morona Santiago	1	1 150	77.2 (37.8-111.0)	4.5 (2.22-6.52)
<i>Porthidium arcossae</i>	Bahía de Caráquez/Manabí	2	315-530	60.1 (28.3-92.7)	3.5 (1.66-5.45)

corporal, proporcionados por el bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública (INSPI), Ministerio de Salud, Ecuador. Los ratones fueron mantenidos con agua y alimento *ad libitum* durante el desarrollo de las pruebas.

**Actividad letal.-** Para la estimación de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de cada veneno, se inyectaron diversas dosis por la vía intraperitoneal (i.p.) en grupos de 6 ratones/dosis. Las muertes ocurridas se registraron hasta un tiempo de observación de 48 horas y los valores de DL<sub>50</sub> se calcularon por el método de próbitos, mediante el programa PASW STATISTICS 18.

Sin embargo, cabe destacar que en la muestra más representativa, correspondiente al veneno obtenido de 54 serpientes de varias localidades, se obtuvo un valor de DL<sub>50</sub> de 69.3µg/ratón (Tabla 1).

Además, se observó un valor cercano de actividad letal en la muestra procedente de Guale, Manabí, compuesta por 10 individuos (65.7µg/ratón). En conjunto, los resultados revelan que la actividad letal de los venenos de *B. asper* obtenidos de distintas localidades, o de distintos individuos, puede variar hasta cuatro veces en la magnitud de sus valores de DL<sub>50</sub>.

**Tabla 2.** Valores de dosis letal media (DL<sub>50</sub>) intraperitoneal descritos en la literatura para venenos de ejemplares adultos de la serpiente *Bothrops asper* de distintos orígenes geográficos.

Origen	DL <sub>50</sub> i.p. en µg/ratón (16-18g)	Referencia
México (Veracruz)	38.3 ± 2.5 *	Segura <i>et al.</i> 2012
México (-)	42.5 ± 6.8	de Roodt <i>et al.</i> 2005
Guatemala (-) **	56.8 (44.5-72.4)	Saravia <i>et al.</i> 2001
Costa Rica (-)	62.5 ± 7.5	Bolaños 1972
Costa Rica (región Caribe)	67.0 (64.2-69.9)	Gutiérrez <i>et al.</i> 1980
Costa Rica (región Pacífico)	65.0 (62.1-68.1)	Gutiérrez <i>et al.</i> 1980
Colombia (Antioquia y Chocó)	66.2 (49.5-88.6)	Otero <i>et al.</i> 2002
Colombia (Antioquia)	67.1 (60.1-74.1)	Saldarriaga <i>et al.</i> 2003
Colombia (Cauca)	100.9 (83.2-122.8)	Mora-Obando <i>et al.</i> 2014
Ecuador (-)	91.0 (78.0-126.0)	Laines <i>et al.</i> 2014
Ecuador (varias provincias)	69.3 (59.8-77.8)	Terán y Lomonte (presente estudio)

\* los valores de DL<sub>50</sub> se presentan con ± D.E., o como límites de confianza del 95%, según la forma en que fueron expresados en cada referencia.

\*\* (-) indica que la localidad particular no fue definida en la referencia.

La actividad letal del veneno de *B. atrox*, determinada a partir de una mezcla de 25 individuos, mostró una potencia ligeramente menor (89.0µg/ratón) que la de la mezcla obtenida de 54 ejemplares de *B. asper*, aunque dentro de un ámbito similar, si se consideran los límites de confianza del 95%

Para las especies *Lachesis muta* y *Bothrocophias microphthalmus*, las muestras estudiadas podrían tener una representatividad aceptable, al estar conformadas por mezclas obtenidas de cinco individuos, en ambos casos. La actividad letal del veneno de *L. muta* no mostró una diferencia muy marcada en comparación con las observadas en algunas muestras de *B. asper*, aunque fue menor que el promedio para dicha especie (Tabla 1), mientras la de *B. microphthalmus* resultó mucho menos potente, con una DL<sub>50</sub> de 225µg/ratón.

Además, los valores obtenidos para los venenos de *Bothriopsis taeniata* y *Porthidium arcossae*, al provenir de apenas uno y dos ejemplares, respectivamente, deben considerarse solamente como aproximaciones preliminares. Sus actividades letales mostraron potencias cercanas a las de los venenos de *B. asper* y *B. atrox* (Tabla 1).

## DISCUSIÓN

La variación intraespecífica en la composición proteica de los venenos de serpiente es un fenómeno previamente observado, y particularmente notorio en las especies que poseen una distribución geográfica muy amplia (Chippaux *et al.* 1991, Tan *et al.* 2015). Más aún, se ha demostrado que ciertas especies experimentan cambios importantes en la composición de sus venenos durante la transición desde su etapa neonatal a la juvenil y adul-

ta (Mackessy 1988, Saravia *et al.* 2002, Alape-Girón *et al.* 2008, Zelanis *et al.* 2011, Durban *et al.* 2013), y se han observado también algunas diferencias menores asociadas al sexo (Menezes *et al.* 2006). Los recientes enfoques analíticos basados en técnicas proteómicas han incrementado sensiblemente el conocimiento detallado sobre las diferencias de composición entre los venenos (Calvete *et al.* 2007, 2009, Serrano y Fox 2008, Lomonte *et al.* 2014), las cuales se reflejan en sus diversas actividades tóxicas.

En el presente estudio, se agruparon individuos de *Bothrops asper* correspondientes a diferentes localidades de siete provincias de Ecuador y se determinaron las potencias letales de sus venenos. Se comparó también la actividad letal del veneno de ejemplares de esta especie cuyo tamaño las define como juveniles, y se evaluó la potencia letal del veneno de otras cinco especies de vipéridos epidemiológicamente relevantes. Los resultados confirman que los venenos presentan variaciones importantes en su actividad letal para el ratón, tanto interespecífica como intraespecífica, esta última relacionada con factores como la variabilidad individual, la procedencia geográfica o la edad de las serpientes.

*Bothrops asper* es uno de los vipéridos de mayor importancia médica en América Latina, a lo largo de su amplia distribución geográfica que abarca desde el sur de México hasta regiones del norte de Sudamérica (Campbell y Lamar 2004, Gutiérrez 2011). La potencia letal descrita para el veneno de *B. asper* de diferentes regiones geográficas (Tabla 2) muestra similitud con el valor de DL<sub>50</sub> observado en la muestra con mayor representatividad estadística (n=54; 69.3µg/ratón) del presente estudio, en la mayoría de los casos, con excepción de los venenos de

México, que poseen una potencia mayor (38.3 y 43.5 µg/ratón). También es de notar la diferencia con respecto a una  $DL_{50}$  de 91.0 µg/ratón, encontrada en un estudio previo para el veneno de *B. asper* de Ecuador (Laines *et al.* 2014) (Tabla 2). No obstante, tomando en consideración la variabilidad demostrada en el presente trabajo para la potencia letal de los venenos de *B. asper* de diferentes provincias de este país (Tabla 1), esta diferencia no sería sorprendente.

La actividad letal observada para el veneno de *B. atrox* de Ecuador (89.0 µg/ratón) aparece intermedia entre las descritas para esta especie en tres estudios realizados con serpientes de Perú, estimadas en 56.6 µg/ratón (García *et al.* 2008), 67.9 µg/ratón (Lovera *et al.* 2006) y 102.7 µg/ratón (Rojas *et al.* 2005), respectivamente. En el caso de *Lachesis muta*, cuyo veneno mostró una potencia letal de 139.7 µg/ratón, su valor es más cercano al obtenido para el veneno de *L. muta* de Colombia (121.6 µg/ratón) (Otero *et al.* 1998), que a los descritos para los venenos de *L. muta* de Brasil (Tucuruí, 107.2 µg/ratón; Cascalleiras, 72.7 µg/ratón) (Otero *et al.* 1998). Por otra parte, la actividad letal observada para el veneno de *Bothrocophias microphtalmus* (225 µg/ratón) es más débil que la reportada para otra especie de este género hallada en Ecuador, *B. campbelli* (150.0 µg/ratón) (Salazar-Valenzuela *et al.* 2014), cuyo veneno fue analizado en profundidad mediante técnicas proteómicas.

Finalmente, el veneno de *Porthidium arcosae* mostró una actividad letal de 60.1 µg/ratón; sin embargo, tanto el dato obtenido para *P. arcosae*, como el correspondiente a *Bothriopsis taeniata* (77.2 µg/ratón) requieren ser ampliados en estudios futuros basados en un mayor número de ejemplares.

En conclusión, la actividad letal observada para los venenos de vipéridos de Ecuador de distintas especies, localidades, y edades, muestra que existen variaciones inter e intraespecíficas considerables. Estas diferencias estarían asociadas con variaciones en la composición proteica de los venenos y podrían ser de relevancia al momento de seleccionar las muestras que van a ser utilizadas en la producción y en el control de los antivenenos de uso terapéutico. Además, aunque las diferencias de actividad letal en el ratón no se pueden extrapolar directamente al ser humano, podrían tener un impacto en el cuadro clínico de los envenenamientos. Todo lo anterior subraya la importancia de contar con datos experimentales sobre las características básicas de los venenos ofídicos de mayor relevancia epidemiológica en una determinada región o país, fundamentales para una rigurosa evaluación preclínica de la eficacia de los antivenenos a ser utilizados en el tratamiento de los accidentes ofídicos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alape-Girón A, Sanz L, Escolano J, Flores-Díaz M, Madrigal M, Sasa M, y Calvete J. 2008. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: Geographic, individual, and ontogenetic variations. *Journal of Proteome Research* **7**: 3556–3571.
- Bolaños R. 1972. Toxicity of Costa Rican snake venoms for the white mouse. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **21**: 360–363.
- Bucarechi F, De Capitani EM, Vieira RJ, Rodrigues CK, Zannin M, Da Silva Jr, NJ, Casais-e-Silva LL and Hyslop S. 2016. Coral snake bites (*Micrurus* spp.) in Brazil: a review of literature reports. *Clinical Toxicology* **25**: 1–13.
- Calvete JJ, Sanz L, Angulo Y, Lomonte B and Gutiérrez JM. 2009. Venoms, venomomics, antivenomics. *FEBS Letters* **583**: 1736–1743.
- Calvete JJ, Juárez P and Sanz L. 2007. Snake venomomics: strategy and applications. *Journal of Mass Spectrometry* **42**: 1405–1414.
- Campbell JA and Lamar WW. 2004. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press. Ithaca NY, 774 pp.
- Chippaux JP. 1998. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bulletin of the World Health Organization* **76**: 515–524.
- Chippaux JP, Williams V and White J. 1991. Snake venom variability: methods of study, results, and interpretation. *Toxicon* **29**: 1279–1303.
- de Roodt A, Estevez-Ramírez J, Paniagua-Solís J, Litwin S, Carvajal-Saucedo A, Dolab J, Robles-Ortiz L y Alagón A. 2005. Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. *Gaceta Médica de México* **141**: 13–21.
- Durban J, Pérez A, Sanz L, Gómez A, Bonilla F, Rodríguez S, Chacón D, Sasa M, Angulo Y, Gutiérrez JM y Calvete JJ. 2013. Integrated “omics” profiling indicates that miRNAs are modulators of the ontogenetic venom composition shift in the Central American rattlesnake, *Crotalus simus simus*. *BMC Genomics* **14**: 234.

- Fan HW y Cardoso JLC. 1995. Clinical toxicology of snake bites in South America. En: Meier J, White J, Eds, Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons, Boca Raton. CRC Press 667–688.
- García P, Yarlequé A, Bonilla-Ferreira C, Pessah S, Vivas D, Sandoval G y Lazo F. 2008. Características bioquímicas y evaluación preclínica de un antiveneno Bothrópico liofilizado contra el veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* **25**: 386–390.
- Gutiérrez JM. 2011. Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: una visión integral de carácter regional. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* **60**: 1–16.
- Gutiérrez JM y Lomonte B. 2009. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. En: Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes (Costa Cardoso JL, de Siqueira França FO, Wen F.H., Sant’Ana Málaque CM & Haddad V, Eds.), Sarvier Editora, São Paulo, Brasil, 352–365.
- Gutiérrez JM, Chaves F y Bolaños R. 1980. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Revista de Biología Tropical* **28**: 341–351.
- Gutiérrez JM, Williams D, Fan HW and Warrell DA. 2010. Snakebite envenoming from a global perspective: towards an integrated approach. *Toxicon* **56**: 1223–1235.
- Holstege CP, Miler MB, Wermuth M, Furbee B and Curry SC. 1997. Crotalid snake envenomation. *Critical Care Clinics* **13**: 889–921.
- Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, de Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, Savioli L, Lalloo DG and de Silva HJ. 2008. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Medicine* **5**: e218.
- Laines J, Segura A, Villata M, Herrera M, Vargas M, Álvarez G, Gutiérrez JM and León G. 2014. Toxicity of *Bothrops* sp snake venoms from Ecuador and preclinical assessment of the neutralizing efficacy of a polyspecific antivenom from Costa Rica. *Toxicon* **88**: 34–37.
- Lomonte B, Fernández J, Sanz L, Angulo Y, Sasa M, Gutiérrez JM and Calvete JJ. 2014. Venomous snakes of Costa Rica: biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of “snake venomomics”. *Journal of Proteomics* **105**: 323–339.
- Lovera A, Bonilla C y Hidalgo J. 2006. Efecto neutralizador del extracto acuoso de *Dracontium lorentense* (Jergón Sacha) sobre la actividad letal del veneno de *Bothrops atrox*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* **23**: 177–181.
- Mackessy SP. 1988. Venom ontogeny in the Pacific rattlesnakes, *Crotalus viridis helleri* and *C. viridis oreganus*. *Copeia* 1988: 92–101.
- Menezes MC, Furtado MDF, Travaglia-Cardoso SR, Caramo AC y Serrano SMT. 2006. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon* **47**: 304–312.
- Mora-Obando D, Guerrero-Vargas J, Prieto-Sánchez R, Beltrán J, Rucavado A, Sasa M, Gutiérrez JM, Ayerbe S y Lomonte B. 2014. Proteomic and functional profiling of the venom of *Bothrops ayerbei* from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with *Bothrops asper* venom. *Journal of Proteomics* **96**: 159–172.
- Otero R, Furtado MFD, Gonçalves LR, Núñez V, García ME, Osorio RG, Romero M y Gutiérrez JM. 1998. Comparative study of the venoms of three subspecies of *Lachesis muta* (bushmaster) from Brazil, Colombia and Costa Rica. *Toxicon* **36**: 2021–2027.
- Otero R, Nuñez V, Barona J, Díaz A y 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**: 5–15.
- Rojas E, Quesada L, Arce V, Lomonte B, Rojas G and Gutiérrez JM. 2005. Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp. snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú and Costa Rica: preclinical assessment. *Acta Tropica* **93**: 85–95.



- Russell FE, Walter FG, Bey TA and Fernández MC. 1977. Snakes and snakebite in Central America. *Toxicon* **35**: 1469–1522.
- Salazar-Valenzuela D, Mora-Obando D, Fernández ML, Loaiza-Lange A, Gibbs H y Lomonte B. 2014. Proteomic and toxicological profiling of the venom of *Bothrocophias campbelli*, a pitviper species from Ecuador and Colombia. *Toxicon* **90**: 15–25.
- Saldarriaga MM, Otero R, Núñez V, Toro MF, Díaz A and Gutiérrez JM. 2003. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon* **42**: 405–411.
- Saravia P, Rojas E, Escalante T, Arce V, Chaves F, Velásquez R, Lomonte B, Rojas G and Gutiérrez JM. 2001. The venom of *Bothrops asper* from Guatemala: toxic activities and neutralization by antivenoms. *Toxicon* **39**: 401–405.
- Saravia P, Rojas E, Arce V, Guevara C, López JC, Chaves E, Velásquez R, Rojas G and Gutiérrez JM. 2002. Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: pathophysiological and therapeutic implications. *Revista de Biología Tropical* **50**: 337–346.
- Segura A, Herrera M, Villata M, Vargas M, Usanga-Reynell A, de León-Rosales SP, Jiménez-Corona ME, Reta-Mares JF, Gutiérrez JM and León G. 2012. Venom of *Bothrops asper* from Mexico and Costa Rica: intraspecific variation and cross-neutralization by antivenoms. *Toxicon* **59**: 158–162.
- Serrano SMT and Fox JW. 2008. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics* **8**: 909–920.
- Tan KY, Tan CH, Fung SY and Tan NH. 2015. Venomics, lethality and neutralization of *Naja kaouthia* (monocled cobra) venoms from three different geographical regions of Southeast Asia. *Journal of Proteomics* **120**: 105–125.
- Warrell DA. 2010. Snake bite. *Lancet* **375**: 77–88.
- WHO. 2007. Rabies and envenomings. A neglected public health issue: Report of a consultative meeting. Geneva, W.H.O. Disponible en: [http://www.who.int/bloodproducts/animal\\_sera/Rabies.pdf](http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf).
- Zelanis A, Tashima AK, Pinto AF, Leme AF, Stuginski DR, Furtado MF, Sherman NE, Ho PL, Fox JW and Serrano SM. 2011. *Bothrops jararaca* venom proteome rearrangement upon neonate to adult transition. *Proteomics* **11**: 4218–4228