

VARIABILIDAD DE LA COMPOSICIÓN PROTEICA DEL VENENO DE *BOTHROPS ALTERNATUS* DE ARGENTINA Y SU POSIBLE RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Lucía AVILA^{1,#}, Carlos PAVÁN^{3,#}, José Christian DOKMETJIAN¹, Osvaldo CASCONE^{1,2,*}, Mirtha Josefa BISCOGLIO^{1,2} & Matías FINGERMANN¹

1 Instituto Nacional de Producción de Biológicos (ANLIS-Dr. Carlos G. Malbrán), Vélez Sársfield 573, (1281) Buenos Aires, Argentina

2 Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina

3 LANAIS PRO-EM, UBA-CONICET, Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina.

Estos autores han contribuido equitativamente a este trabajo.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: osvaldocascone@yahoo.com.ar

RESUMEN	19
SUMMARY:	20
INTRODUCCIÓN	20
<i>Bothrops Alternatus</i> en Argentina	21
SDS-PAGE de venenos individuales de <i>Bothrops alternatus</i>	23
Actividades biológicas	25
Agradecimientos	25
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

RESUMEN

En esta revisión se pone de manifiesto la variabilidad en la composición proteica de los venenos de *Bothrops alternatus* entre distintas poblaciones de América, inclusive Argentina y entre ejemplares de la misma población, la cual refleja posibles diferencias funcionales. Los perfiles de proteínas de SDS-PAGE uni o bidimensionales del veneno de *B. alternatus* muestran una variabilidad significativa no sólo entre las diferentes poblaciones sino también entre venenos de individuos de una misma región. Las proteínas contenidas en las principales bandas de geles 1D SDS-PAGE o 2D SDS-PAGE fueron identificadas por espectrometría de masas. La variabilidad en la composición de los venenos se refleja también en diferencias en las actividades biológicas: dosis letal, actividad hemolítica indirecta, actividad coagulante, actividad hemorrágica y actividad proteolítica. Las proteínas identificadas involucran principalmente a fosfolipasas, Factor GPIIb-BP, botrocetina, Factor IX/X de coagulación y metalo- y serin-proteinasas. Estos estudios pueden ser importantes para ser considerados en la producción de antivenenos más específicos.

PALABRAS CLAVE: *Bothrops alternatus*, relaciones, variaciones individuales, veneno de serpiente.

SUMMARY: VARIABILITY OF THE PROTEIN COMPOSITION OF ARGENTINIAN BOTHROPS ALTERNATUS VENOM AND ITS POSSIBLE RELATIONSHIP WITH THE BIOLOGICAL ACTIVITY.

Studies on variability in the protein composition of *Bothrops alternatus* venoms from american regions – including Argentina – were reviewed. The main objective is to explore if such variability is responsible for functional differences. 1 or 2D SDS-PAGE indicate that variability exists not only between different regions but also between specimens of the same region. Proteins contained in the main gel bands of 1D SDS-PAGE or in some spots of 2D SDS-PAGE were identified by mass spectrometry. They involve mainly phospholipases, glycoprotein 1b binding factor, bothroctin, coagulation factors IX/X, and metallo and serin proteinases. As expected, structural differences are reflected in biological activities such as lethal dosis, indirect haemolytic activity, coagulant activity and proteolytic activity. These studies are important for the production of more specific antivenoms.

KEY WORDS: biological activity, *Bothrops alternatus*, snake venom, variability.

INTRODUCCIÓN

Los venenos de serpientes son mezclas muy complejas que comprenden péptidos, enzimas y proteínas no enzimáticas, además de compuestos no proteicos; aquéllos provenientes de ejemplares de la familia Viperidae poseen una composición química tal que afecta a varios procesos fisiológicos (Rojas *et al.*, 2001). Los antivenenos son reactivos terapéuticos obtenidos a partir del plasma de animales inmunizados con los venenos cuya actividad tóxica se desea neutralizar (WHO, 2018). Un antiveneno específico protege frente al envenenamiento por aquellos grupos de serpientes cuyo veneno está representado en el pool de antígenos usados durante su producción (Brazil V, 1918). Diferencias en la composición del veneno pueden relacionarse con alteraciones en las manifestaciones clínicas del envenenamiento (Glenn *et al.*, 1983; Saravia *et al.*, 2002; Flight *et al.*, 2006). Por esa razón, su estudio es relevante para el diagnóstico, el tratamiento y, consecuentemente, la producción de antivenenos (Chippaux & Goyffon, 1998). Resulta entonces crucial poseer un profundo conocimiento de la composición de los venenos para la producción de antivenenos más específicos (Guércio *et al.*, 2006; Öhler *et al.*, 2010).

La mayoría de los accidentes por mordedura de serpientes en América Latina son producidos por miembros del género *Bothrops* (Ortiz *et al.*, 2012). Debido a la gran diversidad de serpientes, las relaciones de la sistemática y la filogenética de este grupo no están completamente resueltas. Por estas razones se ha sugerido su diferenciación en términos de género. Inicialmente Wüster *et al.* (2002), basados en criterios morfológicos y de mADN, propusieron una clasificación del complejo *Bothrops* en dos géneros independientes: *Bothrops* y *Bothrocopias*. Luego Castoe & Parkinson (2006) propusieron la clasificación del complejo en tres géneros *Bothrops*, *Bothrocopias* y *Bothriopsis*. Finalmente, Fenwick *et al.* (2009) dividieron el género *Bothrops* en *Bothropoides*, *Rhinoceropsis* y *Bothrops*, que representan a los grupos de “*jararaca/neuwiedii*”, “*alternatus*” y “*jararacussu/atrox*”. De esta manera, *Bothrops alternatus* pasó a llamarse *Rhinoceropsis alternatus*. A efectos de facilitar el análisis, se decidió mantener la nomenclatura tradicional en el presente texto.

La variabilidad en los venenos del género *Bothrops* afecta la capacidad neutralizante de los antivenenos. Queiroz *et al.* (2008) reportaron importantes diferencias en la composición de los venenos de 19 especies de *Bothrops* de Brasil y demostraron que el suero antibotrópico en uso no neutraliza completamente todas las actividades tóxicas de los venenos analizados. En Argentina, *B. alternatus* es una

de las especies del género con mayor distribución, siendo una de las especies de serpientes venenosas que más frecuentemente suele hallarse en relación con núcleos urbanos y ocasionando cerca del 97% de los casos de envenenamiento (de Roodt *et al.*, 2006; Lanari *et al.*, 2010, 2014).

Las diferencias en los síntomas clínicos que se observan en las víctimas de accidentes por envenenamiento son la resultante de la heterogeneidad inter e intraespecie de los venenos.

El veneno de *B. alternatus* induce un cuadro complejo de efectos locales que incluyen hemorragia, mionecrosis y edema, y efectos sistémicos tales como hemorragia general, desórdenes en la coagulación, shock cardiovascular y falla renal aguda. Varios autores demostraron que la actividad biológica y, por lo tanto, la toxicidad del veneno está asociada a proteínas y péptidos que pertenecen a unas pocas familias, como metaloproteinasas, serinproteinasas, L-aminoácido oxidasas, fosfolipasas A2 y enzimas tipo trombina, entre otras (Gay *et al.*, 2005; Fox & Serrano, 2008).

La identificación y caracterización de péptidos y proteínas contenidos en los venenos de serpientes facilita el diseño racional de nuevas estrategias en la producción de antivenenos, el diagnóstico clínico y el desarrollo de drogas de potencial uso terapéutico, así como también la comprensión de la evolución de los venenos (Alape-Giron *et al.*, 2008). Es importante destacar que actualmente el único tratamiento asequible y efectivo ante un envenenamiento por mordedura de serpiente es la administración de un antiveneno específico. En la Argentina, el criterio seguido para la selección del pool de antígenos a emplear durante la producción de sueros anti-bothrópicos se basa en la inclusión de venenos de serpientes provenientes de diferentes regiones del país (de Roodt *et al.*, 2011). Sin embargo, la procedencia de las serpientes no es el único factor responsable de la variabilidad existente entre venenos de ejemplares de una misma especie; esto sugiere que otros criterios de selección deben ser considerados para producir antivenenos más específicos (Chippaux *et al.*, 1991). En este sentido, los venenos de *B. alternatus* han mostrado variabilidad interregional e intrarregional tanto en ensayos de toxicidad (letalidad, actividad procoagulante y hemorrágica) como en pruebas de neutralización de estas actividades por antisueros específicos (de Roodt *et al.*, 2011).

La variabilidad en la composición de los venenos de las serpientes del género *Bothrops* está relacionada a la filogenia, edad, sexo, distribución geográfica y dieta (Sousa *et al.*, 2013). Sin embargo, dicha variabilidad está mayoritariamente relacionada con el nivel de expresión de cada grupo de toxina más que con la presencia o ausencia de las principales familias de proteínas del veneno. Incluso, dentro de una misma familia de toxinas puede también ocurrir variabilidad en su toxicidad por presencia de distintos motivos funcionales, incrementando así la diversidad de blancos que pueden ser afectados (Calvete *et al.*, 2005; Moura da Silva *et al.*, 1996). Entonces, la relevancia de la variabilidad en la composición del veneno debería también ser reflejada en su reactividad hacia el antiveneno y su eficacia.

***Bothrops Alternatus* EN ARGENTINA**

Los primeros estudios respecto a la variabilidad de venenos de *B. alternatus* en Argentina fueron realizados por Barrio & Miranda (1966). Estos autores describieron algunas diferencias inmunoquímicas entre los venenos de ejemplares de diferentes regiones de Argentina, pero sin mostrar datos comparativos sobre diferencias en su toxicidad. Las variaciones intraespecíficas en serpientes pueden ser consecuencia de

diferencias de origen ontogenético, geográfico o estacional (Chippaux *et al.*, 1991).

Con sus trabajos pioneros, de Roodt *et al.* (1998) fueron los primeros en realizar estudios comparativos de características tóxicas y bioquímicas de venenos de *B. alternatus* de diferentes regiones del país. Estudiando venenos de individuos de 9 regiones de la Argentina [Córdoba, Misiones, Entre Ríos (Gualeguay y Concordia), Corrientes y Buenos Aires (San Nicolás, Baradero, Dock Sud y Olavarría)], reportaron perfiles de SDS-PAGE similares, con las bandas principales entre 32 y 47 kDa y 16 y 25 kDa, con algunas bandas ausentes o disminuidas. La comparación de las potencias tóxicas entre los venenos individuales y un pool de las 9 regiones reveló importantes diferencias. El análisis de los principales componentes mostró que un pool no necesariamente representa a todos los venenos incluidos, aunque para los protocolos de inmunización sea necesario inyectar *pooles* de venenos para contar con la cantidad suficiente para inyectar un caballo, por ejemplo. Los resultados de este estudio sugieren que no sólo la región de origen de las serpientes usadas para obtener el veneno sino también las características toxicológicas de esos venenos deben ser tenidas en cuenta para la producción de antivenenos. Se estudiaron la DL50, la potencia hemorrágica, la potencia coagulante y la actividad hemolítica indirecta de los *pooles* regionales. Sin embargo, no se intentó relacionar las diferencias en las proteínas individuales de los venenos con las actividades biológicas estudiadas.

Por otra parte, la cantidad de veneno producida por serpientes suele estar correlacionada en forma directa con el tamaño de los ejemplares (de Roodt *et al.*, 1998; Mirtschin *et al.*, 2002; Furtado *et al.*, 2006). De Roodt *et al.* (2012) realizaron un estudio comparativo de la cantidad de veneno y su contenido proteico, normalizados por el largo corporal y el peso para ejemplares de *B. alternatus* provenientes de dos regiones diferentes de Argentina (Olavarría y Concordia). Los autores no observaron diferencias significativas entre ambas poblaciones respecto a esas variables. Lanari *et al.* (2006) caracterizaron el veneno de *B. alternatus* de diferentes zonas de Buenos Aires desde el punto de vista de su toxicidad.

Rocco *et al.* (2013) estudiaron la potencia letal, la actividad hemorrágica, la coagulante de plasma y la trombina símil, y el patrón electroforético de ejemplares de tres regiones diferentes dentro de una misma provincia de Argentina (Córdoba). Los venenos de ejemplares provenientes de las regiones de Calamuchita, Traslasierra y Este de la provincia presentaron similares características bioquímicas y potencias tóxicas, a diferencia de lo observado con veneno de ejemplares de *B. alternatus* de distintas regiones de otras provincias de la Argentina. El patrón electroforético de las 3 muestras fue muy similar, observándose la mayoría del material entre los 30 y 40 kDa, y alrededor de los 20 kDa; esto es coincidente con los patrones electroforéticos de venenos de ejemplares individuales y del veneno de ejemplares de diferentes regiones de la Argentina (Lanari *et al.*, 2010). En este caso se comparan las actividades biológicas de los venenos totales sin tener en cuenta las diferencias en la composición proteica.

El estudio molecular de la composición de venenos ha avanzado sustantivamente en forma reciente gracias al aporte de la espectrometría de masas, introduciéndose el término “venómica” (Calvete *et al.*, 2007, 2011). A partir de la aparición de la venómica se ha podido estudiar con mayor especificidad el reconocimiento de epitopes en los venenos por parte de antivenenos, dando así origen a la “antivenómica” (Calvete *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2009). Todo esto orienta el diseño racional de sueros antiveneno con amplia especificidad por combinación de distintas familias de proteínas antigénicas en los *pooles* de inmunización (Gutiérrez *et al.*, 2011; Plá *et al.*, 2012)

Öhler *et al.* (2010) estudiaron el proteoma de *B. alternatus* por electroforesis bidimensional seguida de análisis por espectrometría de masas y determinación de actividades biológicas. Se identificaron 100 componentes del veneno con masas moleculares de 10 a 100 kDa, pertenecientes a 6 familias proteicas:

metaloproteinasas, serina/trombina-like proteinasas, fosfolipasas A2, L-aminoácido oxidasas, desintegrinas e inhibidores de trombina, entre las que las metaloproteinasas son predominantes. Los puntos isoeléctricos se distribuyen en el rango 4-7, no detectándose proteínas básicas.

Teniendo en consideración las cuestiones antes mencionadas, Ávila *et al.* (2013 & 2014) estudiaron la variabilidad en la composición del veneno de *B. alternatus* de ejemplares capturados en diversas zonas de Argentina y su posible relación con la actividad biológica, comparando los perfiles electroforéticos SDS-PAGE unidimensionales e identificando algunas proteínas contenidas en las distintas bandas para intentar relacionarlas con la actividad biológica de cada veneno. Ocho serpientes provenían de Balcarce, Provincia de Buenos Aires (BAL-1, BAL-2, BAL-5, BAL-6, BAL-8, BAL-11, BAL-13 and BAL-14); dos de Concordia, Provincia de Entre Ríos (CON-1 and CON-2) y 3 ejemplares nacidas en cautiverio en el ANLIS-INPB Dr. Carlos G. Malbrán (INPB-1, INPB-2 e INPB-4). La identificación de proteínas se realizó por espectrometría de masas.

SDS-PAGE DE VENENOS INDIVIDUALES DE *BOTHROPS ALTERNATUS*

La Figura 1 muestra los perfiles proteicos en 1D SDS-PAGE correspondientes a venenos de ejemplares de *B. alternatus* capturados en diferentes regiones de Argentina. En todos los perfiles puede observarse la típica complejidad de los venenos de serpientes; sin embargo, cuando se buscaron diferencias y similitudes se detectó una variabilidad importante sugiriendo por consiguiente una expresión disminuida o, inclusive, la posibilidad de ausencia de una o más proteínas del veneno. En la región centrada en 26 kDa, la proteína de mayor peso molecular (28 kDa) está presente en gran cantidad en CON-1 y en INPB-1, mientras que se encuentra en menor cantidad en el resto de los venenos estudiados (BAL-1, SI-1, CON-2, INPB-2, INPB-4 and BAL-8). Además, la proteína de 23 kDa está presente en todos los venenos estudiados, excepto en BAL-8. Con respecto a la región de alrededor de 14 kDa, hay una banda de proteínas sólo en BAL-1, INPB-2 y BAL-8, mientras que en el resto de los venenos está ausente.

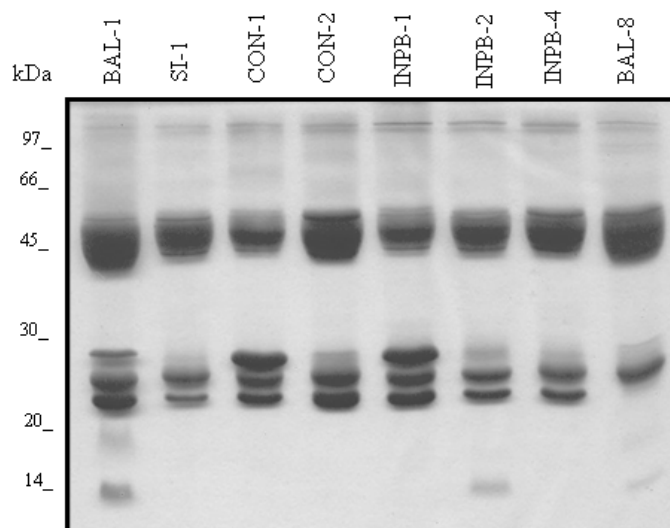


Figura 1. SDS-PAGE 15% bajo condiciones no reductoras de veneno de *B. alternatus* (10 µg de proteína/calle) de serpientes capturadas en diferentes regiones de Argentina: Balcarce, BAL-1 y BAL-8; San Isidro, SI-1; Concordia, CON-1 y CON-2; y tres nacidas en el serpentario del Instituto Nacional de Producción de Biológicos, INPB-1, INPB-2 y INPB-4. El gel se tiñó con Azul de Coomassie R-250.

La mencionada variabilidad es evidente no sólo entre venenos de ejemplares de regiones diferentes de Argentina sino también en aquellas serpientes provenientes de la misma región. La Figura 2 muestra los patrones de SDS-PAGE obtenidos en un análisis comparativo entre venenos de individuos originales de la ciudad de Balcarce, al sur de Buenos Aires. Se estudiaron siete venenos: BAL-2, BAL-3, BAL-5, BAL-6, BAL-11, BAL-13 y BAL-14. Se añadió también en la comparación un pool representativo de veneno de *B. alternatus* (20 ejemplares), que se utiliza de rutina para la inmunización de caballos y obtención del antiveneno correspondiente.

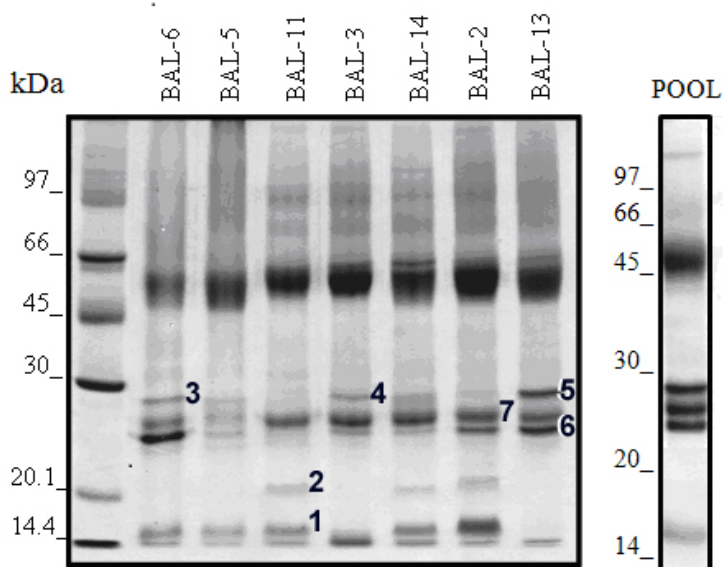


Figura 2. SDS-PAGE 15% bajo condiciones no reductoras de veneno de *B. alternatus* (10 µg de proteína/calle) de serpientes capturadas en los alrededores de la ciudad de Balcarce, Buenos Aires, Argentina y un pool de venenos de 20 ejemplares de la misma especie. Los números en negrita indican las bandas seleccionadas para su identificación por espectrometría de masas. El gel se tiñó con Azul de Coomassie G-250.

Las proteínas contenidas en las bandas electroforéticas fueron identificadas por espectrometría de masas (Tabla 1). Si bien las bandas de 1D-SDS-PAGE contienen –en su mayoría– más de una proteína, en este trabajo se identificaron algunas de ellas. Estos resultados coinciden con los del trabajo que informa que el veneno de *Bothrops* es rico en metalo- y serin-proteinasas (Öhler *et al.*, 2010).

Banda	Proteína
1	Fosfolipasa A ₂ ácida Tripsina
2	Fosfolipasa A ₂ básica
3	Botrocetina α_2 Proteína de unión de la glicoproteína Ib
4	Botrocetina α_2 Proteína de unión de la glicoproteína Ib
5	Metaloproteinasa Proteína de unión de la glicoproteína Ib
6	Proteína de unión del factor de coagulación IX/X
7	Metaloproteinasa Serinproteínasa

Tabla 1. Identificación de algunas proteínas contenidas en las bandas de 1D-SDS-PAGE por espectrometría de masas.

ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

Las diferencias en las actividades tóxicas podrían indicar que incluso en la misma especie los mecanismos de toxicidad no son idénticos, independientemente de que las manifestaciones clínicas del accidente sean similares.

En conjunto, los resultados de este trabajo evidencian la variabilidad en la composición de los venenos de *B. alternatus*, incluso cuando provienen de un área restringida. Además, se evidencia la relación existente entre la presencia/ausencia o diferente cantidad de las principales proteínas de los venenos en las actividades biológicas de los mismos (hemolítica indirecta, coagulante, hemorrágica, proteolítica y DL50).

El estudio de la composición proteica de venenos individuales debería ser un paso requerido en la preparación de los pools que se utilizan para la inmunización de caballos. En la medida en que las tecnologías “ómicas” permitan conocer la composición de los venenos en mayor detalle, la preparación de los pools será más racional y segura, generando antivenenos más eficientes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo contó con el apoyo de fondos del Ministerio de Salud de la República Argentina. MF, MB y OC son investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alape-Giron, A., L. Sanz, J. Escolano, M. Flores-Díaz, M. Madrigal, M. Sasa, *et al.* (2008) Snake venomics of the lancenhead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *J. Proteome Res.* **7**: 3556-71.

- Ávila, L., M. Fingerhann, M.B. De Marco, O. Cascone, M. Biscoglio, J.C. Dokmetjian, *et al.* (2013) Chemically-assisted fragmentation as a tool for identifying *bothrops alternatus* venom components. XLIX Reunión Anual SAIB, Buenos Aires, Argentina.
- Ávila, L., C. Paván, J.C. Dokmetjian, M. Biscoglio & O. Cascone (2014) Relationship between the protein profile and the biological activity of *bothrops alternatus* venom from a single region. III Congreso Panamericano de Zoonosis & VIII Congreso Argentino de Zoonosis, La Plata, Pcia. Buenos Aires, Argentina. Mención especial al trabajo libre.
- Barrio, A. & M. Miranda (1966) Las diferentes poblaciones de *Bothrops alternata* Dúmeril y *Bibron* (Ophidia, Crotalidae) de la Argentina, consideradas desde el punto de vista morfológico y antigénico. *Mem. Inst. Butantan Simp. Internac.* **33**: 887-92.
- Brazil V (1918) Do envenenamento ofídico e seu tratamento. Collectanea de trabalhos (1901-1917). *Instituto Butantan. Sao Paulo: Typographia do Diario Oficial*, pp.31-52.
- Calvete, J.J., C. Marcinkiewicz, D. Monleon, V. Esteve, B. Celda, P. Juárez, *et al.* (2005) Snake venom desintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon* **45**: 1063-74.
- Calvete, J.J., P. Juárez & L. Sanz (2007) Snake venomomics. Strategy and applications. *J. Mass Spectrom.* **42**: 1405-14.
- Calvete, J.J., L. Sanz, Y. Angulo, B. Lomonte & J.M. Gutiérrez (2009) Venoms, venomomics, antivenomics. *FEBS Lett.* **583**: 1736-43.
- Calvete, J.J. (2011) Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert Rev. Proteomics* **8**: 739-58.
- Castoe, T.A. & C.L. Parkinson (2006) Bayesian mixed models and the phylogeny of pitvipers (Viperidae: Serpentes). *Mol. Phylogenet. Evol.* **39**: 91-110.
- Chippaux, J.P. & M. Goyffon (1998) Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon* **36**: 823-46.
- Chippaux, J.P., V. Williams & J. White (1991) Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* **29**: 1279-1303.
- de Roodt, A.R., J.A. Dolab, P.P. Galarce, S. Litwin, E. Gould, J.C. Dokmetjian, *et al.* (1998) A study on the venom yield of venomous snake species from Argentina. *Toxicon* **36**: 1949-58.
- de Roodt, A.R., J. Estévez, J.A. Dolab, M.V. Manzanelli, Ñ. Piñeiro, J.F. Paniagua, *et al.* (2006) Características biológicas e inmunológicas del veneno de *Bothrops cotiara*. *Revista de Biología Tropical* **54**, 889-901.
- de Roodt, A.R., L.C. Lanari, V. Costa de Oliveira, R.D. Laskowicz & R.P. Stock (2011) Neutralization of *Bothrops alternatus* regional venom pools and individual venoms by antivenom: A systematic comparison. *Toxicon* **57**: 1073-80.
- de Roodt, A.R., L.C. Lanari, R.D. Laskowicz, S. Botassi, D.M. Rocco, V.C. de Oliveira, *et al.* (2012) Comparación de caracteres corporales y del veneno de *Bothrops alternatus* entre poblaciones de las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos, Argentina. *Cuad. Herpetol.* **26**: 5-12.
- Fenwick, A.M., R.L. Guberlet Jr, J.A. Evans & C.L. Parkinson (2009) Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis* and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zoological J. Linnean Soc.* **156**: 617-40.
- Flight, S., P. Mirtstchin & P.P. Masci (2006) Comparison of active venom components between Eastern Brown snakes collected from South Australia and Queensland. *Ecotoxicology* **15**: 133-41.
- Fox, J.W. & S.M. Serrano (2008) Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics* **8**: 909-20.
- Furtado, M.F.D., S.R. Travaglia-Cardoso & M.T. Rocha (2006) Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararacá* (Serpentes: Viperidae). *Toxicon* **48**: 401-10.
- Gay, C.C., L.C. Leiva, S. Maruñak, P. Teibler & O. Acosta de Pérez (2005) Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon* **46**: 546-54.
- Glenn, J.L., R.C. Straight, M.C. Wolfs & D.L. Hardy (1983) Geographical variation in *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) venom properties. *Toxicon* **21**: 119-30.
- Guércio, R.A., A. Shevchenko, A. Shevchenko, J.L. López-Lozano, J. Paba, M.V. Sousa, *et al.* (2006) Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Sci.* **11**: 4-11.

- Gutiérrez, J.M., B. Lomonte, G. León, A. Alape-Girón, M. Flores-Díaz, L. Sanz, *et al.* (2009) Snake venomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *J. Proteomics* **72**: 165-82.
- Gutiérrez, J.M., G. León, B. Lomonte & Y. Angulo (2011) Antivenoms for snakebite envenomings. *Inflamm. Allergy Drug Targets* **10**: 369-80.
- Lanari, L.C., M. González, N. Liria, R.D. Laskowicz, V. Manzanelli, D. Hermann, *et al.* (2006) Caracterización tóxica del veneno de *Bothrops alternatus* de diferentes zonas de Buenos Aires. *Acta Toxicológica Argentina* **14**: 51.
- Lanari, L.C., S. Rosset, M.E. González, N. Liria & A.R. de Roodt (2010) A study on the venom of *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron and Duméril, from different regions of Argentina. *Toxicon* **55**: 1415-24.
- Lanari, L.C., A. Olvera, V. Costa de Oliveira, R.D. Laskowicz, L. Boyer, N.R. Lago, *et al.* (2014) Intraspecific differences in the immunochemical reactivity and neutralization of venom from Argentinean *Bothrops* (Rhinocerophis) *alternatus* by specific experimental antivenoms. *Toxicon* **85**: 31-45.
- Mirtschin, P.J., R. Shine, T.J. Nias, N.L. Dunstan, B.J. Hough & T.J. Mirtschin (2002) Influences on venom yield in Australian tigersnakes (*Notechis scutatus*) and brown snakes (*Pseudonaja textilis*: Elapidae, Serpentes). *Toxicon* **40**: 1581-2
- Moura da Silva, A.M., R.D.G. Theakston & J.M. Crampton (1996) Evolution of desintegrin cysteine-rich and mammalian matrix-degrading metalloproteinases: gene duplication and divergence of a common ancestor rather than convergent evolution. *J. Molec. Evol.* **43**: 263-9.
- Öhler, M., D. Georgieva, J. Seifert, M. von Bergen, R.K. Arni, N. Genov, *et al.* (2010) The venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. *J. Proteome Res.* **9**: 2422-37.
- Ortiz, C., F. Lazo, C. Bellido, E. Gonzales & A. Yarlequé (2012) Variaciones en las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* "Jergón", de tres zonas geográficas del Perú. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública* **29**: 198-205.
- Plá, D., J.M. Gutiérrez & J.J. Calvete (2012) Second generation snake antivenomics comparing immunoaffinity and immunodepletion protocols. *Toxicon* **60**: 688-99.
- Queiroz, G.P., L.A. Pessoa, F.C.V. Portaro, M.F.D. Furtado & D.V. Tambourgi (2008) Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon* **52**: 842:51.
- Rocco, D.M., G. Reati, V. Costa de Oliveira, L.C. Lanari, R.D. Laskowicz & A.R. de Roodt (2013) Caracterización tóxica del veneno de *Bothrops* (Rhinocerophis) *alternatus* de diferentes regiones de la provincia de Córdoba (Argentina). *Revista Facultad de Ciencias Médicas* **70**: 7-13.
- Rojas, E., P. Saravia, Y. Angulo, V. Arce, B. Lomonte, J.J. Chávez, *et al.* (2001) Venom of the crotaline snake *Atropoides nummifer* (jumping viper) from Guatemala and Honduras: comparative toxicological characterization, isolation of a myotoxic phospholipase A2 homologue and neutralization by two antivenoms. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **129**: 151-62.
- Saravia, P., E. Rojas, V. Arce, C. Guevara, J.C. López, E. Chaves, *et al.* (2002) Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. *Rev. Biol. Trop.* **50**: 337-46.
- Sousa, L.F., C.A. Nicolau, P.S. Peixoto, J.L. Bernardoni, S.S. Oliveira, J.A. Portes-Junior, *et al.* (2013) Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of *Bothrops* complex. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **7**, e2442.
- WHO (2018) Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. *WHO Technical Report Series N° 1004*.
- Wüster, W., M.G. Salomao, J.A. Quijada-Mascareñas & R.S. Thorpe (2002) "Origins and evolution of the South American pit viper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis", in: "Biology of the Vipers" (G.W. Schuett, M. Höggren, M.E. Douglas & H.W. Greene, eds.), Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountain, Utah, pp. 111-28.