

Determinación de la DL50 del veneno de serpientes adultas de la especie *Bothrops atrox* en ratones albinos

Sanjuán-Galindez Julián A.^{1*}, Vargas Jairo A.¹, Ortiz Fernando I.², Gonzalez-Herrera Luis G.³, Watanabe-Minto Bruno⁴, Granja-Salcedo Yury T.⁵

¹Estudiante de V año de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de la Amazonia, Florencia (Caquetá), Colombia

²Profesor del programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de la Amazonia, Florencia (Caquetá), Colombia.

³Estudiante de Doctorado en Genética y Mejoramiento Animal FCAV/UnespJaboticabal, Bolsista CAPES

⁴Profesor Doctor de Clínica Quirúrgica de Pequeños Animales Hospital veterinario de, FCAV/Unesp, Jaboticabal (São Paulo), Brasil.

⁵MVZ Universidad de la Amazonia, Estudiante de Maestría en Producción Animal, Unesp, Jaboticabal (São Paulo), Brasil. Bolsista: FAPESP

Recibido 25 de septiembre de 2012; Aceptado 10 de diciembre 2012

Resumen

El presente estudio se realizó con el objetivo de calcular la dosis letal media (DL50) del veneno de serpientes adultas de la especie *Bothrops atrox* sobre ratones de laboratorio. El trabajo fue desarrollado en el serpentario de la Universidad de la Amazonia de Florencia, Caquetá, Colombia. El veneno de las serpientes fue inoculando por vía intraperitoneal a un total de 144 ratones albinos de la especie *Mus musculus* con un peso medio de 18g, mediante tres ensayos que constituyeron una prueba gruesa, una fina y una superfina, usando dosis de veneno desde 20 hasta 80 μ g por ratón. El periodo de observación se realizó durante los primeros quince minutos y 48 horas siguientes a la aplicación. Fue utilizada la regresión de la transformación Probit para estimar la DL50 y también el test de Chi-Cuadrado para determinar diferencias entre valores observados y estimados por el modelo. Para el test de Chi-Cuadrado de las pruebas gruesa y fina fueron encontradas diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) para el intercepto y el coeficiente angular de la regresión, mientras que para la prueba superfina no fueron constatadas diferencias significativas. El valor de la DL50 fue de 78,3, 72,86 y 64,98 g de veneno para las pruebas gruesa, fina y superfina respectivamente utilizadas para estimar la dosis letal 50. Se comprobó que existe gran relación entre la concentración de la dosis del veneno y el efecto que causa a los ratones, notándose mayores efectos a mayores dosis. Los ensayos realizados y la prueba de regresión probit, fueron suficientes para estimar la dosis letal media 50 que fue de 64,98 g/ratón y de 3,61 mg/kg.

Palabras claves: *Bothrops atrox*, dosis letal media, *Mus musculus*.

Abstract

A study was carried out in order to calculate the mean lethal dose (DL50) of venom from adult snakes of the specie *Bothrops atrox* in laboratory mice. The work was performed in the snake's lab of the Universidad de la Amazonia in Florencia, Caquetá, Colombia. Poison of the snakes was injected via intra-peritoneal to 144 albino mice of the specie *Mus musculus* weighting on average 18g each, by means of three essays consisting of a gross test, a fine test, and a superfine test, using venom doses between 20 to 80 μ g per mouse. The observation period was during the first fifteen minutes and 48 h after the injection. The results were analyzed using the regression of the transformation Probit to estimate the DL50 and the Chi-square test to determine differences between observed and estimated values for the model. The gross and fine tests were significantly different ($p < 0.05$) both for the intercept and for the angular coefficient of the regression, but not for the superfine test. The values for the DL50 were 78,3, 72,86, and 64,98 g of venom for the gross, fine, and superfine tests, respectively. A great relationship between the concentration of the venom dose and the effect to mice was proved, showing greater effects at greater doses. The essays and the Probit regression, were effective to estimate mean lethal dose DL50 being 64,98 g/mouse and of 3,61 mg/kg.

Key words: *Bothrops atrox*, mean lethal dose, *Mus musculus*

Introducción

El accidente ofídico es un importante problema a nivel mundial, de América Latina y de Colombia. Se estima que en el mundo ocurren 5.400.000 mordeduras de serpientes al año, de las cuales 2.682.500 producen envenenamiento y 125.345 llegan a ser letales. En Latinoamérica se reportan aproximadamente 150.000 personas por año que

sufren accidentes con envenenamiento de los cuales 5.000 terminan en la muerte de la víctima. En el caso de Colombia cada año se reportan de 2.000 a 3.000 accidentes, con una tasa de mortalidad de 7,5/100.000 habitantes según Medical Kit Ltda (2011); es así como en el año de 2010 llegaron a notificarse 3.783 casos (PANI-ZOO 2010). El accidente ofídico en Colombia es un problema de salud pública, siendo de notificación

*Autor para Correspondencia: julianandres12@hotmail.com

obligatoria a partir de octubre de 2004, donde se estableció como evento de interés en salud pública según el Grupo de Zoonosis (2010).

Dentro de la amazonia colombiana habitan varias especies de ofidios venenosos, entre ellos la comúnmente llamada “X” o “Pelo de gato”, serpiente de la especie *Bothrops atrox*, siendo esta reconocida como el agente agresor de mayor importancia médica de la región, ya que ha llegado a causar 95% de las mordeduras en el territorio amazónico, como ocurrió en el año 2006 (Otero et al., 2007). Generalmente los venenos deben ser sometidos a estudios toxicológicos y farmacológicos mediante la estimación de la dosis letal media (DL50) (Roder 2003), la cual es utilizada para evaluar la letalidad del veneno y la dosis en microgramos capaz de matar al 50% de los animales con el fin de tener una idea del peligro relativo que causa un agente; asimismo, esta técnica se emplea para todas las pruebas de toxicidad y para cuantificar la potencia del veneno (OMS 1991) citado por Sarmiento en el (2006). Este trabajo fue desarrollado con el objetivo de evaluar la dosis letal del veneno de serpientes adultas de la especie *B. atrox* del Departamento del Caquetá capaz de matar al 50% de ratones albinos de la especie *Mus musculus*.

Materiales y métodos

El estudio fue realizado en el serpentario de la Universidad de La Amazonia, municipio de Florencia-Caquetá, entre los meses de octubre y noviembre de 2011. La precipitación anual promedio es de 3,793 mm, la temperatura media es de 25°C y la humedad relativa anual del 92% según Mora & Velásquez (2010).

Fueron utilizadas 5 hembras adultas de la especie *Bothrops atrox* de 125cm de largo, las cuales eran mantenidas en cautiverio en el serpentario de la Universidad de la Amazonia. Estos ejemplares permanecían en vitrinas de vidrio individuales de 1,2 m² condicionadas con una capa de 10 cm de cascarilla de arroz seca, la cual era removida cada siete días y cambiada cada 30 días. La alimentación de estas serpientes era cada 25 días con cuatro ratones albinos jóvenes *mus musculos* vivos de aproximadamente 20g de peso y una edad promedio de 25 días. La obtención del veneno se hizo por el método de ordeño manual por compresión de las glándulas de veneno (Maruñak et al., 2006) a las 7:00 horas con un tiempo medio de

1,5 minutos por serpiente. Posteriormente las muestras de veneno fueron secadas en una estufa a 37°C por 48 horas como fue desarrollado por Monje (2007). La solución madre de veneno bothropico se preparó en solución salina 0,9% conteniendo 15mg/ml; este producto se utilizó como diluyente gracias a que es una solución isotónica; es decir, que tiene la misma concentración molecular que el plasma sanguíneo, manteniendo la misma presión osmótica (Artunduaga 2008). Posteriormente fue almacenado en tubos Eppendorf® de 1,5 ml de capacidad y mantenido a temperatura ambiente; cada que se hacía una prueba se hacían nuevas diluciones.

Las diluciones fueron calentadas a baño maría hasta llegar a una temperatura de 37,5°C para ser inoculadas, teniendo en cuenta que esta es la temperatura promedio de los ratones (Cardozo 2007); todas las inoculaciones fueron realizadas a las 15:00 horas siendo inyectado 0,5 ml de dilución a cada animal por vía intraperitoneal con jeringas de insulina. Después de la inoculación se realizó observación directa durante los primeros 15 minutos; una segunda observación fue realizada 48 horas después de los ratones haber sido inoculados.

Se utilizaron 144 ratones albinos pertenecientes al orden rodentia, familia muridae, genero *mus musculus* (ratón de laboratorio) con un peso vivo medio de 18g contemporáneos (vida media 23 días) y sin importar sexo. Los ratones fueron provenientes del bioterio de la Universidad de la Amazonia donde eran criados dentro de cajas plásticas con rejillas (cajas de 0,7 m²/10 ratones) acondicionadas con una capa de 8 cm de cisco de arroz, bebederos y comederos automáticos. Los ratones fueron alimentados ad libitum durante todo el experimento con concentrado para canidos marca DogChow® (Morales 2009).

Siguiendo la metodología desarrollada por Artunduaga (2008) fueron realizados tres ensayos cada uno con cuatro niveles crecientes de dilución de la solución madre (Tabla 1). El primer ensayo que constituyó la “Prueba Gruesa” fue realizado para buscar la concentración de veneno cercana a la DL50; a partir de este se determinaron las concentraciones a usar en el segundo ensayo “Prueba Fina”; de la misma manera se procedió para el tercer ensayo “prueba Superfina”. Para cada nivel de dilución se utilizaron doce ratones, para un total de 48 animales por prueba.

La Dosis Letal media 50 (DL50) fue estimada por

medio de regresión sobre la transformación probit haciendo uso del procedimiento *procprobit* del programa StatisticalAnalysesSystema (SAS). La regresión probit asume que la respuesta de los individuos se distribuye de manera normal, lo que corresponde a una curva de forma sigmoidea o función de distribución normal acumulativa (Gil-Criado & Muñiz 1978). Este procedimiento estima la máxima verosimilitud restringida de los parámetros de regresión y la tasa de respuesta natural de características “*threshold*” para respuestas cuantales provenientes de experimentos biológicos, es decir, para características cuya respuesta es binaria, con valores de cero y uno, en este caso murió= cero y sobrevivió= uno. La ecuación usa un algoritmo modificado de Newton-Raphson. De igual manera fue realizado el test de Chi-cuadrado el cual mide la asociación entre los valores observados y estimados mediante la aplicación de la regresión Probit, en este caso de variables discretas. La probabilidad estimada por el modelo versus los valores observados también son mostrados gráficamente.

La ecuación Probit puede ser descrita a continuación:

$$P = \Pr (y=0) = C + (1 - C) F (X')$$

Donde, P es el vector de la estimativa de los parámetros

F es una función de distribución acumulada (logística)

X es el vector de variables

P es la probabilidad de respuesta

C es la tasa natural de respuesta de la característica Threshold

Resultados y discusión

El análisis de los datos obtenidos después de la realización de las pruebas (Tabla 1), demuestra la posibilidad de estimar la DL50 del veneno de hembras adultas de la especie *Bothrops atrox*, a través del uso experimental de ratones de laboratorio, ya que la inoculación escalonada del veneno de la especie mencionada por vía intraperitoneal, mostró resultados que guardan relación entre el progreso del veneno y sus efectos, concordando con lo observado por Montilla et al (1994) en serpientes de la especie *Crotalus Durissus Cumanensis*, en el estado de Zulia en Venezuela. En general mayores efectos fueron observados a mayores dosis.

Tabla 1. Soluciones experimentales, composición de las mismas, número de individuos (N), número de sobrevivientes (S) y número de muertos (M) para las tres pruebas.

Soluciones experimentales	Veneno (µg/ratón)	Solución Madre (µL)	NaCl al 0,9% (µL)	N	S	M
Prueba gruesa	30	240	5760	12	12	0
	60	480	5520	12	6	6
	90	720	5280	12	6	6
	120	960	5040	12	3	9
Prueba fina	67,5	540	5460	12	6	6
	75	600	5400	12	9	3
	82,5	660	5340	12	2	10
	90	720	5280	12	0	12
Prueba Superfina	61,5	492	5508	12	7	5
	63	504	5496	12	6	6
	64,5	516	5484	12	6	6
	66	528	5472	12	6	6

Las pruebas indicaron una DL50 variando entre 60 y 90 µg para la primera, de 57,5 µg para la segunda y variando entre 63 y 66 µg para la tercera prueba respectivamente. En la segunda prueba fue observado un efecto del veneno que no era esperado en las dos primeras dosis, ya que cuando se aplicó la dosis de 75 µg murieron menos ratones cuando comparado con la aplicación de 67,5 µg. Las dos dosificaciones posteriores mostraron un comportamiento acorde con lo esperado, es decir, mayor mortalidad a mayores dosis. El efecto del veneno no esperado en la segunda prueba, puede deberse a que las propiedades individuales de un veneno pueden cambiar por la edad de la serpiente, el medio ambiente en que es conservado y el manejo del mismo (Meier 2003). Del mismo modo Rocha & Furtado (2005), afirman que las diferencias intraespecíficas en la composición del veneno de *Bothrops Alternatus* se deben a variaciones geográficas, sexuales, ontogénicas y estacionales. En nuestro caso creemos que principalmente pudo haber sido por una variación estacional o por alteración en el manejo del veneno. En la dosis inicial de la segunda prueba fue encontrada la DL50 motivo por el cual hubo necesidad de rebajar la dosis para realizar la última prueba, donde fue constatado que la DL50 era menor que 67,5 µg, el cual había sido el valor inicial de dosis en el segundo ensayo.

La media en términos de distribución de tolerancia estimada por la regresión probit (Tabla 2), fue de 77,621,44 µg (1,890,16 µg), 72,441,09 µg (1,860,04 µg) y 64,561,26 µg (1,810,10 µg) para los

ensayos uno, dos y tres respectivamente. Estos valores corresponden a una información de interés práctico en experimentos de dosis respuesta como lo es el actual estudio. Este valor medio de tolerancia puede ser entendido como el valor crítico a partir del cual se comienza a observar la DL50, es decir en nuestro caso, como la menor dosis capaz de matar el 50 de los individuos (De Souza *et al.*, 2000). La mayor desviación estándar observada para la media de tolerancia en la prueba 1, puede ser explicada por el hecho de ser esta la prueba inicial, en donde no se tenía información *a priori* de la DL50, existiendo un mayor intervalo entre las dosis estudiadas. Esta información puede ser comparada con el estudio de determinación de la dosis letal media (DL50) del veneno de cinco individuos juveniles de *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae) realizado por Artunduaga (2008), donde se puede observar que se utilizan una prueba gruesa y dos finas, siendo la primera importante para tener una información que permitiera arrojar datos rudimentarios y posteriormente llegar a la DL50 por medio de las pruebas finas.

Tabla 2. Valores estimados para la media (MU) y desviación estándar (SIGMA) en función del logaritmo de la dosis en términos de distribución de tolerancia de una población de 144 ratones inoculados con veneno de serpientes *Bothropsatrox* mediante tres pruebas

Prueba	MU	SIGMA
Gruesa	1,89	0,16
Fina	1,86	0,04
Ultrafina	1,81	0,10

La prueba de chi cuadrado (X^2) fue significativa para el intercepto y el coeficiente angular de la regresión para los dos primeros ensayos ($p < 0,01$) (tabla 3) mientras que para el tercero no hubo diferencias significativas para estos dos parámetros ($p = 0,69$). Esto quiere decir que en las dos primeras pruebas hubo diferencia en la mortalidad de ratones entre las dosis estudiadas, lo que sugiere que administrar una u otra dosis traerá como resultado diferentes tasas de mortalidad, mientras que para la tercera prueba donde no hubo diferencias significativas, el aplicar una u otra de las dosis estudiadas en la prueba no implicará en diferencias en la tasa de mortalidad. Valores negativos fueron encontrados para el intercepto siendo más negativos para la segunda prueba. La estimativa del coeficiente angular fue

superior para la tercera prueba.

Tabla 3. Estimativas de los coeficientes de la regresión probit en función del logaritmo de la dosis (Est.), error estándar de las estimativas (E.S.) y prueba de chi-cuadrado (X^2) entre valores observados y estimados para las tres pruebas.

	Parámetro	Intercepto	Log10 (dosis)
		Est.	Est.
Prueba 1	Est.	-11,92	6,29
	E.S.	3,78	1,99
	Pr > X^2	0,0016	0,0016
Prueba 2	Est.	-46,42	24,92
	E.S.	15,49	8,23
	Pr > X^2	0,0027	0,0025
Prueba 3	Est.	-17,93	9,89
	E.S.	45,73	25,34
	Pr > X^2	0,69	0,69

La estimativa de probabilidad de la dosis letal varió entre 35,06 y 174,90, 59,47 y 89,25, y 38,97 y 108,36 con un 95% de confianza para la primera, segunda y tercera prueba respectivamente (tabla 4). Los intervalos de confianza fueron más estrechos para el segundo ensayo comparado con el primero.

Tabla 4. Estimativas de dosis letales a diferentes probabilidades y sus respectivos intervalos de confianza (I.C.) al 95% para las tres pruebas.

	Prueba 1		Prueba 2		Prueba 3	
	Dosis	I.C. 95%	Dosis	I.C. 95%	Dosis	I.C.
0,1	35,06	9,04 50,39	59,47	37,52 66,25	38,97	--
0,2	47,16	19,16 62,42	64,10	46,18 69,68	47,06	--
0,3	57,44	30,83 73,63	67,37	52,86 72,26	53,35	--
0,4	67,51	43,96 87,35	70,18	58,81 74,75	59,13	--
0,5	78,30	57,58 108,02	72,86	64,39 77,68	64,98	--
0,6	90,82	70,50 142,91	75,64	69,50 81,87	71,41	--
0,7	106,75	83,10 205,08	78,79	73,84 88,70	79,14	--
0,8	130,01	97,70 331,20	82,81	77,67 100,09	89,72	--
0,9	174,9	120,79 702,89	89,25	82,29 122,29	108,36	--

La Dosis Letal 50 fue de 78,3, 72,86 y 64,98 μg de veneno para las pruebas gruesa, fina y superfina respectivamente. Mediante la regresión probit fue posible constatar una disminución de la DL50 a través de los ensayos, debido a una mayor exactitud de las estimativas.

Los valores estimados por la regresión probit estuvieron más distantes de los observados para las primeras dos dosis y más ajustados para las últimas dos dosis en la primera prueba (Figura 1).

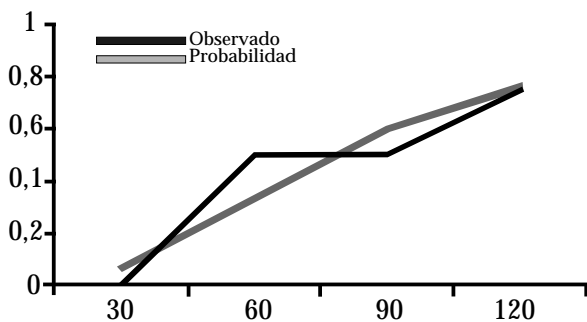


Figura 1. Probabilidad de mortalidad estimada por la regresión probit versus valores de mortalidad observados en la prueba 1.

En la segunda prueba hubo distanciamiento entre el valor estimado y el observado para la segunda dosis, por haberse presentado un comportamiento no esperado de la letalidad del veneno, como ya fue discutido anteriormente (Figura 2); sin embargo, se observó un mejor ajuste del modelo para las otras tres dosis. En el tercer ensayo hubo una mayor aproximación entre los valores observados y los estimados, indicando que se pudo encontrar la DL50 con precisión (Figura 3).

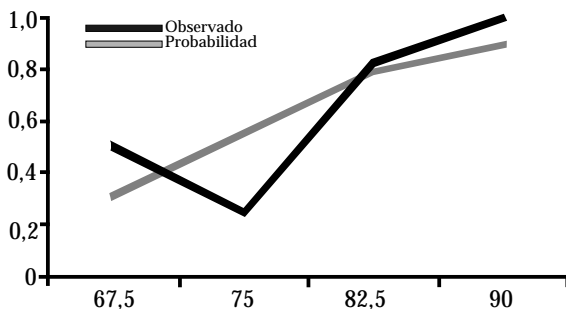


Figura 2. Probabilidad de mortalidad estimada por la regresión probit versus valores de mortalidad observados en la prueba 2.

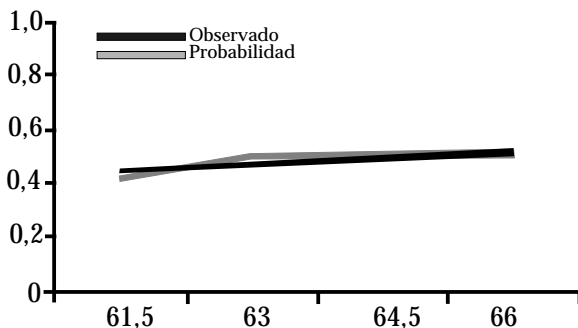


Figura 3. Probabilidad de mortalidad estimada por la regresión probit versus valores de mortalidad observados en la prueba 3

Es posible observar que en las dos primeras pruebas la recta del gráfico de regresión probit tuvo mayor inclinación. Este hecho indica que con menores variaciones del veneno de acuerdo al rango de dosis estudiadas en estas dos pruebas, mayores variaciones de tasa de mortalidad pueden ser encontradas cuando comparado con la prueba tres.

Finalmente se estableció que la dosis letal DL50 del veneno de serpientes adultas de la especie *Bothrops atrox* en ratones de laboratorio, la cual fue de de 64,98 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ y de 3,61 mg/kg . Esta dosis se acerca a las encontradas por Lovera (2006) quien reportó una DL50 de 67,87 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ para el veneno de *B. atrox*. Del mismo modo (Murillo & Prada 2009) reportaron una DL50 de 63,8 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ en la misma región, valor que también es próximo al encontrado en nuestra investigación.

Las pruebas gruesa, fina y superfina fueron claves para determinar la DL50. Sin embargo, la regresión probit se mostró adecuada para estimar con mayor exactitud la DL50. Entre tanto, las dos técnicas pueden ser utilizadas al mismo tiempo, de manera complementaria, ya que la primera de ellas es necesaria para poder estimar el porcentaje de letalidad de los individuos sometidos a las dosis de veneno.

Por medio de las pruebas realizadas y el empleo de la regresión probit fue posible establecer la DL50 del veneno de serpientes de la especie *Bothrops atrox* en ratones de laboratorio, la cual fue de de 64,98 μg .

Literatura Citada

- Artunduaga, M. 2008. Determinación de la dosis letal media (dl50) del veneno de cinco individuos juveniles de *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae). Tesis (Pregrado)-Universidad de la Amazonia, Florencia Caquetá, 2008.
- Cardozo, C. 2007. El animal como sujeto experimental aspectos técnicos y éticos. Editorial CIEB, Chile.
- Charry, H. 2006. "Aspectos biomédicos del accidente bothropico". En: Memorias del primer simposio de Toxinología Clínica "César Gómez Villegas". Laboratorios Probiol Ltda. Facultad de medicina Fundación Universitaria San Martín. Bogotá, diciembre de 2006.
- Gil-Criado, A., M. Muñoz. 1978. Nuevas transformaciones en experimentos biológicos basados en la respuesta cuantil. Bol. Ser. Plagas, v.4, p.89-229.
- Grupo de vigilancia y control de enfermedades transmisibles (grupo zoonosis). 2010. Protocolo de vigilancia de accidente

- ofídico. www.minproteccionsocial.gov.co/comunicadosprensa/documents/documentos/accidente_ofidico.pdf. (02 de marzo de 2012).
- Lovera, A. Bonilla, C. Hidalgo, J. 2006. Efecto neutralizador del extracto acuoso de *dracontiumloretense* (jergón sacha) sobre la actividad letal del veneno de *bothropsatrox*. *revperumedexp salud publica* 23(3), pag. 177-181.
- Maruñak, S.L.; Ruiz de Torrent, R.M.; Teibler, G.P.; Gay, C.C.; Leiva, L.; Acosta de Pérez, O. 2006. Acción del veneno de *Bothrops jararacussu* de Argentina sobre la coagulación sanguínea. *Invet* 8: p.119-128.
- MEDICAL Kit Ltda. 2011. accidente ofídico, alacránico y arácnido aspectos generales, primeros auxilios y nuevas tecnologías para su tratamiento. <http://www.saludtolima.gov.co/portal/data/file/CRUET/PAACCIDENTEANIMALVENENOSO.pdf>. (15 de abril de 2012).
- Meier, J. 2003. Individual and age-dependent variations in the venom of the fer-de-lance (*Bothropsatrox*). *Elsevier* 24: 41-46.
- Monje, S. 2007. Determinación de la dosis letal media (DL50) de 5 especies del género *Micrurus* en estado de cautiverio en Nilo Cundinamarca (Colombia). Tesis (pregrado)- Universidad de la Amazonia, Florencia Caquetá, 2007.
- Mora-Montealegre, Y. & Velasquez-Valencia, A. 2010. Estado de conservación, preservación y organización de las colecciones zoológicas del Museo de Historia Natural en Florencia (Caquetá, Colombia). *Revista momentos de ciencia* 7 (2): 88-96.
- Morales, V. 2009. comparación de dos concentrados comerciales (perros - dogchow y vacas - italcol) en ganacia de peso y manejo en ratones juveniles (*mus musculus*) del serpentario uniamazonia. Tesis (pregrado)-Universidad de la Amazonia, Florencia Caquetá, 2009.
- Montilla, J.; Alvares, M.; Barros, T.; Negrón, G. Determinación de la DL50 del veneno de serpiente *crotalusdirissucumanensis* del estado de Zulia, Venezuela. *Revista Científica FCV/LUZ* 4: 153-156.
- Murillo, J.; Prada, E. Estudio químico y de toxicidad del veneno de serpientes de la familia viperidae *bothropsatrox* mantenidas en cautiverio en el serpentario de la universidad de la amazonia. Tesis (Pregrado)-Universidad de la Amazonia, Florencia Caquetá, 2009.
- Otero, R.; Silva, J.; Borona, M.; Toro, M.; Quintana, J.; Díaz, A.; Vásquez, I.; Rodríguez, V.; Delgado, C.; Fernández, M.; Ayala, S.; Conrado, N.; Marín, C.; Ramírez, C.; Arrieta, A.; Córdoba, E.; Ruiz, T.; García, M.; Aguirre, A.; Londoño, J.; Ospina, N.; Macías, D.; Jaramillo, O.; Agudelo, H.; Espinal, M.; Camargo, J. 2007. Accidente bothrópico en Colombia: estudio multicéntrico de la eficacia seguridad de AntivipmynTri®, un antiveneno polivalente producido en México. *Redalyc* 20: p. 244-262.
- Plan de acción nacional e intersectorial para la prevención, vigilancia y control de algunas zoonosis y manejo del accidente ofídico en Colombia (PANIZOO). 2010. <http://www.minproteccionsocial.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/PLAN%20DE%20ACCION%20ZONOSIS.pdf>. (11 de abril de 2012).
- Rocha, M.; Furtado, M. 2005. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 22: 383-393.
- Roder, J. 2003. Manual de toxicología veterinaria. Editorial multimedica, Barcelona. España.
- Sarmiento, K. 2006. Comparación de la técnica de seroneutralización o pruebas de potencia para sueros antiofídicos utilizados en los laboratorios PROBIOL LTDA. De Colombia y en el instituto Clodomiro picado de Costa Rica. Tesis FMVZ. UNAL. Pág. 4 - 27.
- Souza, D.H. 2000. Disintegrin-like Domain of the Snake Venom Metalloprotease Alternagin Inhibits $\alpha 2\beta 1$ Integrin-Mediated Cell Adhesion. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 384 (2). Pp 341-350.