

## Venenos de serpiente: de la investigación al tratamiento

### Snake venoms: from research to treatment

Bruno Lomonte

#### Resumen

El presente trabajo ofrece una breve visión de cómo se ha enfrentado el problema del ofidismo en Costa Rica, y en especial, de cómo la investigación científica y tecnológica ha contribuido a tal fin. Se resumen los orígenes de la lucha antiofídica en el país y de la creación del Instituto Clodomiro Picado en la Universidad de Costa Rica, en 1970. Se describen las primeras etapas de su labor, y la evolución de distintas líneas de investigación sobre serpientes, venenos y antivenenos, que por espacio de cuatro décadas han contribuido a que en el país y en la región centroamericana, existan recursos terapéuticos adecuados y suficientes para enfrentar el ofidismo.

**Descriptor:** venenos de serpiente, toxinas, antivenenos, sueros antiofídicos, ofidismo

#### Abstract

The present work offers a brief overview on how the problem of ophidism has been confronted in Costa Rica, and especially, on how scientific and technological research has contributed to this goal. The origins of the antiophidic struggle in the country and the creation of the Instituto Clodomiro Picado, at the University of Costa Rica in 1970, are briefly summarized. The first stages of its work are described, as well as the evolution of different research areas on snakes, venoms and antivenoms; which have contributed during four decades to the existence of adequate and sufficient therapeutic resources to tackle ophidism in Costa Rica and in the Central American region.

**Keywords:** snake venoms, toxins, antivenoms, anti-ophidic sera, ophidism

**Fecha recibido:** 10 de octubre de 2011

**Fecha aceptado:** 1 de diciembre de 2011

Cada año se estima que no menos de 400.000 personas sufren un envenenamiento ofídico en el mundo, principalmente en países de las regiones tropicales y subtropicales de África, Asia, y Latinoamérica.<sup>1-3</sup> La cifra real de casos puede ser más alta, dado que esta patología adolece importantes problemas de subregistro, por afectar en su mayoría a habitantes de zonas con poca accesibilidad a los sistemas de salud y, por ende, al ingreso en las estadísticas oficiales. Una proporción de los casos de envenenamiento culmina en decesos, estimados en al menos 20.000 anuales, según cálculos conservadores.<sup>1</sup> Además de poner en riesgo la vida, estos envenenamientos pueden ocasionar lesiones

tisulares con secuelas permanentes tan graves como amputaciones y discapacidad.<sup>4,5</sup>

La situación mundial con respecto a este problema de salud no es halagadora. A pesar de que el tratamiento mediante la pronta administración de un antiveneno (suero antiofídico) se conoce desde hace más de 120 años, existe una grave escasez de antídotos en muchos países. La producción de antivenenos no es comercialmente atractiva para las grandes industrias farmacéuticas, cuyas prioridades se centran en medicamentos con un mercado más amplio y enfocados a patologías que afectan a las naciones con alto nivel de ingresos. Por otra

Instituto Clodomiro Picado,  
Facultad de Microbiología,  
Universidad de Costa Rica, San  
José, Costa Rica.

**Afiliación de los autores:**  
Instituto Clodomiro Picado,  
Facultad de Microbiología,  
Universidad de Costa Rica.

**Correspondencia:**  
[bruno.lomonte@ucr.ac.cr](mailto:bruno.lomonte@ucr.ac.cr)

parte, los esfuerzos de las instituciones públicas rectoras de la Salud en países de las regiones más afectadas por el ofidismo, no siempre han logrado resolver el problema de la producción y abastecimiento de antivenenos.<sup>6,7</sup> A esto se debe sumar que los antivenenos poseen limitaciones de regionalidad, ya que su cobertura terapéutica se restringe a un grupo de especies de serpientes venenosas cuyas toxinas comparten similitudes inmunológicas. En consecuencia, un antiveneno preparado contra las especies de serpientes de una región geográfica determinada, podría tener poca o ninguna eficacia neutralizante en otra región, debido a la variabilidad antigénica de los venenos de las distintas especies.

La escasez de antivenenos en algunas regiones del mundo ha sido motivo de preocupación durante décadas, y llevó a la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) a clasificar el envenenamiento ofídico en la categoría de las patologías tropicales desatendidas (*neglected tropical diseases*), en 2009. Aún así, el apoyo político y económico para resolver este problema no ha mejorado de forma significativa.

En Centroamérica, los accidentes ofídicos alcanzan una incidencia anual cercana a los 4 000 casos, siendo Panamá el país mayormente afectado, con unos 2 000 envenenamientos, seguido por Costa Rica, Nicaragua, Honduras y Guatemala, con cerca de 500 accidentes anuales cada uno, mientras las cifras en El Salvador y Belice rondan los 50 casos, respectivamente.<sup>8</sup> En Costa Rica se ha podido resolver el problema del abastecimiento de antivenenos desde hace cuatro décadas, gracias a la creación del Instituto Clodomiro Picado, que ha beneficiado no solo a su población, sino también a la de la región centroamericana y de algunos otros países de Latinoamérica. Este trabajo ofrece una breve visión de cómo se ha enfrentado el problema del ofidismo en Costa Rica, y en especial, de cómo la investigación científica y tecnológica ha contribuido a tal fin.

### **Legado científico del Dr. Clodomiro Picado, pionero de la lucha antiofídica en Costa Rica**

Clodomiro Picado Twilight (1887-1944) es ampliamente conocido en Costa Rica como uno de los científicos más eminentes de la historia nacional. Su vida y obra han sido objeto de numerosos análisis, que dibujan con claridad su brillantez, agudeza, tesón, y compromiso para contribuir a solucionar problemas de la población mediante los caminos de la investigación científica y sus aplicaciones.<sup>9</sup> Entre los muy diversos temas científicos que apasionaron al Dr. Picado en su laboratorio, ubicado en lo que es hoy el Hospital San Juan de Dios, los venenos de serpiente ocuparon un lugar prioritario. Su obra magistral de 1931, titulada “Serpientes venenosas de Costa Rica, sus venenos, seroterapia antiofídica” es un compendio formidable de observaciones y experimentos que, pese a su realización en condiciones muy precarias, incluso hoy, asombran a los expertos. El Dr. Picado sembró la semilla que germinaría en la creación de un proyecto para combatir el flagelo del ofidismo en el país. Así, no es de extrañar que un hijo de Luis Bolaños, cercano colaborador suyo, fuera convocado a mediados de la década de 1960 para dirigir un “Programa de Sueros Antiofídicos”, y luego, fundar y dirigir el Instituto Clodomiro Picado.

### **El Dr. Róger Bolaños y la creación del Instituto Clodomiro Picado (ICP)**

Róger Bolaños Herrera (1931-2007) conoció desde muy joven el tema de las serpientes venenosas, gracias a que su padre trabajaba con Clodomiro Picado. El Dr. Bolaños, formado como microbiólogo en la Universidad de Costa Rica, y con posteriores estudios de maestría y doctorado en Brasil y EUA, respectivamente, fue llamado a dirigir una iniciativa para producir, por vez primera en Costa Rica, los antídotos necesarios para brindar tratamiento a las víctimas de envenenamiento ofídico. La historia de la creación del Programa de Sueros Antiofídicos en 1966, y la posterior fundación del Instituto Clodomiro Picado en la Universidad de Costa Rica, el 13 de abril de 1970, han sido objeto de una reciente recopilación y análisis,<sup>10</sup> por lo que no se repetirá en este trabajo. Sin embargo, cabe destacar algunas de las características que imprimió el Dr. Bolaños al Instituto, como su director fundador, y que marcaron a profundidad su evolución histórica y sus líneas de pensamiento.

Como centro productor de antivenenos, el ICP es un caso muy particular, por haber sido creado dentro de una universidad pública, la Universidad de Costa Rica (UCR). Al encontrarse inmerso en un entorno netamente académico desde sus orígenes (en contraste con otras instituciones públicas en Salud), y gracias a la visión y espíritu que inculcó el Dr. Bolaños a todas las tareas que debían realizarse allí, se logró que el ICP nunca fuera esbozado como una mera fábrica de un producto inmunoterapéutico, sino que se concibiera como un centro universitario que combinara las labores productivas con una intensa investigación científica y tecnológica, unida con la docencia de grado y postgrado, y con diversas actividades de extensión social, manteniendo todas estas tareas estrechamente relacionadas. En especial el binomio “producción-investigación”, de claro beneficio mutuo, se constituyó en un elemento clave para el desarrollo, consolidación, competitividad, y crecimiento del ICP en estas cuatro décadas de labor en beneficio de la salud nacional y regional. Desde su posición de administrador, pero a la vez de guía intelectual e investigador, el Dr. Bolaños tuvo la visión requerida para valorar las investigaciones científicas básicas (por ejemplo, el estudio de los cariotipos de las serpientes de Costa Rica),<sup>11</sup> con igual importancia e interés que las investigaciones tecnológicas (por ejemplo, el desarrollo de un antiveneno de cobertura panamericana contra las serpientes de coral).<sup>12</sup> Esta actitud no es la más común en la cultura general costarricense (incluso en ciertos sectores académicos), que tiende a sobrevalorar las aplicaciones inmediatas de la investigación, en menoscabo del trabajo que persigue respuestas a preguntas científicas fundamentales. La influencia de los medios periodísticos, que fomentan tal cultura, sumada al discurso promovido por las instituciones gubernamentales rectoras de las políticas científicas, constituyen elementos que podrían socavar la filosofía de balance armonioso entre ciencia y tecnología promovida por el Dr. Bolaños a las diversas actividades investigativas que, en forma creciente, se desarrollarían en el ICP.

### **De la investigación al tratamiento: las primeras etapas**

Los principios básicos de la terapia antiofídica, descubiertos a finales del s. XIX, se han mantenido invariables: los antivenenos

se preparan a partir del plasma de animales inmunizados con uno o más venenos, y que desarrollan una respuesta de anticuerpos adecuada para lograr su neutralización.<sup>13</sup> Tecnológicamente, se han logrado avances en la purificación de los anticuerpos a partir del plasma completo, en comparación con los rudimentarios métodos originales. No obstante, en esencia, los antivenenos se producen bajo el mismo principio, constituyéndose en la herramienta fundamental que posee el médico para tratar a los pacientes que han sufrido una mordedura de serpiente venenosa, y por lo tanto, emergiendo como un elemento indispensable en el inventario de medicamentos de cualquier sistema de Salud.

Para llegar a implementar la producción de los primeros antivenenos autóctonos, el Dr. Bolaños y su reducido grupo de colaboradores -que formaron el personal inicial del ICP-, se dedicaron en las primeras etapas a investigar sobre varias preguntas fundamentales, necesarias para estructurar la plataforma de conocimientos que permitiría enfrentar el problema del ofidismo de manera comprensiva. Por una parte, se investigó cuáles son las especies de serpientes venenosas que habitan en Costa Rica, dónde se distribuyen,<sup>14</sup> cuál es la epidemiología de los accidentes ofídicos y cuáles son las especies más relevantes desde el punto de vista médico.<sup>15</sup> Por otra, se inició la recolección de serpientes procedentes de distintos puntos del país y se estableció una colección viva en cautiverio, que dio pie a la obtención y conservación de los diferentes venenos. Con estos valiosos materiales biológicos, siguió una serie de estudios muy importantes que revelarían

el rendimiento promedio por extracción en cada especie, su potencia letal en modelos experimentales, o las cantidades teóricas de antiveneno necesarias para garantizar el éxito terapéutico en los pacientes.<sup>16</sup> Adicionalmente, se realizaron los primeros análisis inmunológicos y bioensayos para determinar las relaciones antigénicas entre los venenos de las distintas especies, y sus neutralizaciones cruzadas, con lo cual se llegó a establecer una fórmula de inmunización que permite obtener un antiveneno polivalente, es decir, capaz de neutralizar los venenos de todas las serpientes de la familia Viperidae halladas en Costa Rica (Cuadro 1). Esta fórmula, desarrollada durante las primeras etapas investigativas del ICP con herramientas muy limitadas, se mantiene vigente, e incluye los venenos de las especies *Bothrops asper* (terciopelo), *Crotalus simus* (cascabel) y *Lachesis stenophrys* (cascabel muda). La primera es causante del mayor número de envenenamientos en Costa Rica.<sup>15</sup> Paralelamente, se realizaron trabajos similares al estudiar los venenos de las serpientes coral, pertenecientes a la familia Elapidae, los cuales poseen diferencias antigénicas muy marcadas con respecto a los de la familia Viperidae. Con ello, se llegó a una fórmula de inmunización que utiliza una mezcla de los venenos de *Micrurus nigrocinctus* y *Micrurus mosquitensis*, con la que se obtiene un antiveneno que cubre todas las especies de serpientes coral del país (Cuadro 1), aunque con una excepción: la coral gargantilla *Micrurus mipartitus* (*multifasciatus*);<sup>17</sup> no se dispone de un antiveneno para esta especie, que por fortuna es muy escasa en Costa Rica (razón que dificulta acceder el veneno para la producción del antídoto correspondiente). Lo mismo sucede con la única

**Cuadro 1:** Serpientes venenosas de Costa Rica.\*

<b><u>Familia Viperidae (víboras)</u></b>	<b><u>Familia Elapidae (corales y serpiente de mar)</u></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bothrops asper</i></li> <li>• <i>Crotalus simus</i> (<i>Crotalus durissus durissus</i>)</li> <li>• <i>Agkistrodon bilineatus</i></li> <li>• <i>Lachesis stenophrys</i> (<i>Lachesis muta</i>)</li> <li>• <i>Lachesis melanocephala</i> (<i>Lachesis muta</i>)</li> <li>• <i>Porthidium ophryomegas</i> (<i>Bothrops ophryomegas</i>)</li> <li>• <i>Porthidium volcanicum</i></li> <li>• <i>Porthidium nasutum</i> (<i>Bothrops nasutum</i>)</li> <li>• <i>Porthidium porrasi</i></li> <li>• <i>Atropoides picadoi</i> (<i>Bothrops picadoi</i>)</li> <li>• <i>Atropoides mexicanus</i> (<i>Bothrops nummifer</i>)</li> <li>• <i>Cerrophidion godmani</i> (<i>Bothrops godmani</i>)</li> <li>• <i>Bothriechis nigroviridis</i> (<i>Bothrops nigroviridis</i>)</li> <li>• <i>Bothriechis schlegelii</i> (<i>Bothrops schlegelii</i>)</li> <li>• <i>Bothriechis lateralis</i> (<i>Bothrops lateralis</i>)</li> <li>• <i>Bothriechis supraciliaris</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Micrurus nigrocinctus</i></li> <li>• <i>Micrurus mosquitensis</i></li> <li>• <i>Micrurus multifasciatus</i> (<i>Micrurus mipartitus</i>)</li> <li>• <i>Micrurus alleni</i></li> <li>• <i>Micrurus clarcki</i></li> <li>• <i>Pelamis platura</i> **</li> </ul>

\* entre paréntesis se indican sinonimias con designaciones taxonómicas previas

\*\* algunas clasificaciones taxonómicas incluyen a esta especie marina en la familia Hydrophiidae



Figura 1. Especies representativas de las dos familias de serpientes venenosas que se encuentran en Costa Rica. A. *Bothrops asper* y B. *Micrurus nigrocinctus*.

especie de serpiente marina en el país, *Pelamis platura*, que habita en las aguas del Pacífico. El factor limitante para elaborar un antiveneno contra esta especie es la difícil obtención de su veneno.

### Dos tipos de antivenenos, el polivalente y el anticoral, simplifican el tratamiento

En algunas regiones del mundo, las serpientes venenosas forman grupos antigénicos complejos, lo que dificulta el diagnóstico clínico y la elección del antiveneno apropiado. En cambio, en Costa Rica, los dos antivenenos producidos gracias a las fórmulas desarrolladas en las investigaciones iniciales del ICP, simplifican el tratamiento. El clínico no requiere conocer cuál fue la especie particular de serpiente que ocasionó el envenenamiento, sino solo distinguir si este fue causado por un vipérido o por un elárido, para aplicar el antiveneno polivalente o el anticoral, respectivamente. Los cuadros clínicos que inducen estas dos familias de serpientes venenosas son característicos y distinguibles.

Los venenos de los vipéridos (como la terciopelo, cascabel, bocaracá, lora, etc.) producen manifestaciones locales evidentes, que pueden llegar a ser muy marcadas, incluyendo: edema, dolor, hemorragia, dermonecrosis, mionecrosis, y formación de ampollas.<sup>18,19</sup> La intensidad de estos signos depende de la cantidad de veneno inyectada en la mordedura, y en cierta medida, de la especie agresora, pues algunos venenos son más destructivos que otros. Sin embargo, el edema es un signo casi omnipresente en las mordeduras por vipéridos.<sup>20</sup> A nivel sistémico, los venenos de vipéridos inducen otras manifestaciones, tales como: alteraciones de la coagulación (prolongación del tiempo de coagulación, consumo de fibrinógeno), trombocitopenia, sangrados a distancia, equimosis, y pueden cursar con hipotensión importante e insuficiencia renal, en los casos más graves.<sup>21-23</sup> De nuevo, pueden existir excepciones a alguna o varias de estas manifestaciones, dependiendo de la especie agresora. Por

ejemplo, algunos venenos de vipéridos carecen de actividad procoagulante y no alteran marcadamente los parámetros de coagulación.<sup>24</sup> Sin embargo, en términos generales, se reconoce el cuadro clínico inducido por vipéridos con base en las características mencionadas, sin considerar la identidad particular de la especie agresora, para fines de dar tratamiento específico con antiveneno polivalente, lo antes posible.

En contraste con lo anterior, los envenenamientos por serpientes coral no inducen manifestaciones locales de importancia, salvo alguna sensación de parestesias o de dolor leve, sino que se caracterizan por un cuadro de neurotoxicidad periférica, con la instauración de un bloqueo neuromuscular progresivo que conduce a un síndrome miasténico característico o parálisis flácida.<sup>15,25</sup> La ptosis bupalpebral es signo de un estado avanzado de envenenamiento, en donde el riesgo de un fallo respiratorio es significativo. El antiveneno apropiado (anticoral) debe administrarse rápidamente para prevenir, en la medida de lo posible, la ocupación de los receptores de acetilcolina de la unión neuromuscular, por las potentes neurotoxinas de estos venenos, entre otros blancos farmacológicos.

Con la amplia disponibilidad de los dos tipos de antivenenos en Costa Rica, y con las experiencias acumuladas en los centros hospitalarios que atienden el mayor número de casos de ofidismo, en años recientes los protocolos de tratamiento se han visto beneficiados por una creciente uniformidad o estandarización<sup>26</sup> (Cuadro 2). Las pruebas intradérmicas para tratar de predecir una eventual reacción alérgica a las proteínas equinas (especie en la cual se producen los antivenenos en Costa Rica y en la mayoría de centros productores), han sido abandonadas a nivel internacional por carecer de suficiente valor predictivo.<sup>27</sup> Sin embargo, una vez determinado el envenenamiento en el paciente, sea por un vipérido o por un elárido, la administración urgente del tratamiento respectivo se realiza con todos los cuidados necesarios para afrontar posibles reacciones adversas de

**Cuadro 2:** Tratamiento hospitalario del envenenamiento ofídico (adaptado de Ref.<sup>26</sup>)

### 1. Diagnóstico y valoración

Determinar si existe envenenamiento y si corresponde a una serpiente de la familia Viperidae (víboras) o Elapidae (corales) con base en los signos y síntomas (ver Sección 5 del texto). En el primer caso se administra antiveneno polivalente, y en el segundo caso, anticoral.

### 2. Preparación

- Disponer de acceso intravenoso inmediato, mediante dos vías (una para el antiveneno y otra para medicamentos y fluidos)
- Diluir 100 mL del antiveneno apropiado (10 frascos de 10 mL) en 500 mL de solución fisiológica de NaCl 0,9% (200 mL si se trata de niños).

### 3. Infusión

- Asegurar la disponibilidad de epinefrina y de equipo para asistencia cardiorrespiratoria básica, para contrarrestar una eventual reacción adversa. La prueba intradérmica de hipersensibilidad carece de confiabilidad.
- Iniciar la infusión i.v. a goteo lento (1-2 mL en 3-5 min), asegurando la observación médica directa del paciente. Si no se presenta reacción adversa en los primeros 5-15 min, aumentar el flujo para que toda la solución sea infundida en 1 hora.
- En el caso de presentarse una reacción adversa (urticaria, hipotensión, cefalea, náuseas, broncoespasmo, escalofríos), suspender la infusión y valorar la aplicación de epinefrina 1:1000 vía subcutánea, así como antihistamínicos y corticosteroides vía i.v.
- Una vez controlada la reacción, en unos 15-20 min, reiniciar la infusión del antiveneno.

### 4. Tratamiento complementario

Fluidos i.v., profilaxis con toxoide tetánico y antibióticos, diuréticos para el manejo de la función renal.

tipo inmediato. Estas pueden corresponder, aunque raramente, a una reacción anafiláctica verdadera (hipersensibilidad tipo I, mediada por la preexistencia de anticuerpos IgE contra las proteínas equinas en el paciente), o, con más frecuencia, a una reacción de tipo anafilactoide, que no involucra a la IgE, sino a la activación del sistema de complemento y la liberación de varios mediadores inflamatorios, directamente por el antiveneno.<sup>27</sup> Algunos estudios clínicos que han evaluado los antivenenos producidos en el ICP, describen una frecuencia de reacciones adversas inmediatas cercana al 15-25%, aceptable para productos terapéuticos de esta naturaleza.<sup>28-30</sup>

A diferencia de las reacciones adversas tempranas hacia la seroterapia antiofídica, las reacciones tardías son más comunes, y son mediadas por un mecanismo de hipersensibilidad tipo III (enfermedad del suero), causado por la formación de abundantes complejos inmunes entre las proteínas equinas y sus respectivos anticuerpos, que alcanzan un pico entre la primera y segunda semanas después del tratamiento. La frecuencia de estas reacciones es más difícil de establecer, ya que el cuadro se presenta cuando los pacientes, en su mayoría, han abandonado los centros de tratamiento. Este cuadro es generalmente muy benigno y autolimitado, y responde bien al tratamiento con antihistamínicos y esteroides.<sup>27</sup>

#### Los antivenenos continúan evolucionando mediante la investigación

Los antivenenos polivalente y anticoral,<sup>31</sup> preparados en el ICP desde sus orígenes hasta la fecha, han experimentado

mejoras a lo largo de los años, gracias al tesonero trabajo de investigación del personal académico y técnico. Uno de los principales cambios consistió en la sustitución de la técnica de precipitación de inmunoglobulinas basada en el sulfato de amonio, utilizada inicialmente, por el empleo del ácido caprílico (ácido octanoico) para la eliminación de la albúmina y otras proteínas plasmáticas. Este método, adaptado y optimizado para las inmunoglobulinas equinas,<sup>32</sup> permite obtener un antiveneno de mayor pureza y con un perfil físico-químico superior al del sulfato de amonio, además de proporcionar un mayor rendimiento final y un menor tiempo de procesamiento. Los antivenenos actuales se comparan favorablemente con los producidos décadas atrás, y continúan experimentando una serie de mejoras graduales, cautelosamente evaluadas, en aspectos tales como: potencia, inocuidad, estabilidad, liofilización, contenido de agregados proteicos, y otros. Además de las mejoras tecnológicas introducidas en el procesamiento del plasma hiperinmune de los equinos, se han logrado también cambios en los procedimientos de inmunización,<sup>33</sup> que redundan en un mejor estado general de los animales, así como la introducción de diversas técnicas acordes con las modernas prácticas de manufactura y control de calidad del producto final.

Uno de los retos actuales para el mejoramiento de los antivenenos, como se describe adelante, es conseguir una mayor respuesta de anticuerpos contra toxinas ofídicas que poseen baja inmunogenicidad, pero gran relevancia clínica. La identificación de componentes de los venenos que tienen un pobre reconocimiento por los antivenenos, ha avanzado significativamente gracias

a la introducción de una estrategia analítica conocida como antivenómica,<sup>34,35</sup> basada en las modernas técnicas de proteómica, de reciente introducción en el ICP.

### **Líneas de investigación en torno al ofidismo.**

A lo largo de sus cuatro décadas, el ICP ha mantenido una gama de líneas de investigación en torno a su objetivo central: contribuir a la solución del problema del ofidismo en Costa Rica y en la región. Esta variedad abarca, principalmente, los siguientes temas:

**(a) Epidemiología del accidente ofídico:** se realizan recopilaciones y análisis estadísticos sobre el número, características y consecuencias de los envenenamientos por serpientes registrados en el país.<sup>36-42</sup> Recientemente, se ha estudiado también la epidemiología de otros envenenamientos, como los ocasionados por ataques masivos de abejas africanizadas.<sup>43</sup> Un aspecto novedoso en el campo de la epidemiología ofídica es la aplicación de técnicas de georeferenciación para construir mapas de riesgo y procurar el reforzamiento de los centros de atención médica con mayores incidencias, así como la distribución y uso racional del valioso recurso terapéutico que representan los antivenenos. Este tipo de análisis, ya realizados en países como Nicaragua y Argentina,<sup>44,45</sup> se encuentran en curso en Costa Rica.

**(b) Estudios herpetológicos y de historia natural de las serpientes:** se efectúan análisis de la herpetofauna nacional, su distribución, ecología, biología reproductiva, cambios ontogenéticos, taxonomía, mejoramiento de la sobrevivencia en cautiverio, producción de veneno, y otros.<sup>46-60</sup> Tales estudios de corte biológico se están ampliando también a las principales especies de escorpiones de Costa Rica, con miras al eventual desarrollo de un antiveneno.

**(c) Estudios clínicos y de respuesta inmune de equinos inmunizados para la producción de antivenenos:** se han logrado avances al optimizar el proceso de inmunización de caballos con venenos de serpiente, lo que ha conducido a una reducción de las dosis (con la consecuente disminución en las lesiones inducidas por los venenos), así como a un diseño racional de los esquemas de sangría para obtener el plasma hiperinmune como materia prima del proceso de elaboración de antivenenos. Dichos estudios se han basado en parámetros clínicos, hematológicos, serológicos y de química sanguínea de los equinos.<sup>33,61-64</sup> Paralelamente, se investiga el efecto de nuevos adyuvantes inmunológicos,<sup>65</sup> de opciones como la inmunización con ADN codificante para toxinas,<sup>66</sup> y de combinaciones de venenos sobre la respuesta inmune en los equinos,<sup>67</sup> con la meta de obtener mayores niveles de anticuerpos y una cobertura más completa hacia los diversos antígenos (toxinas) en los venenos.

**(d) Estudios sobre técnicas de procesamiento de plasmas y mejoramiento de las características finales de los antivenenos:** se investiga sobre nuevas técnicas de purificación de inmunoglobulinas a escala industrial, así como acerca de formas alternas de procesamiento y estabilización de estas proteínas, sea en solución o liofilizadas.<sup>68-71</sup> En esta área, se

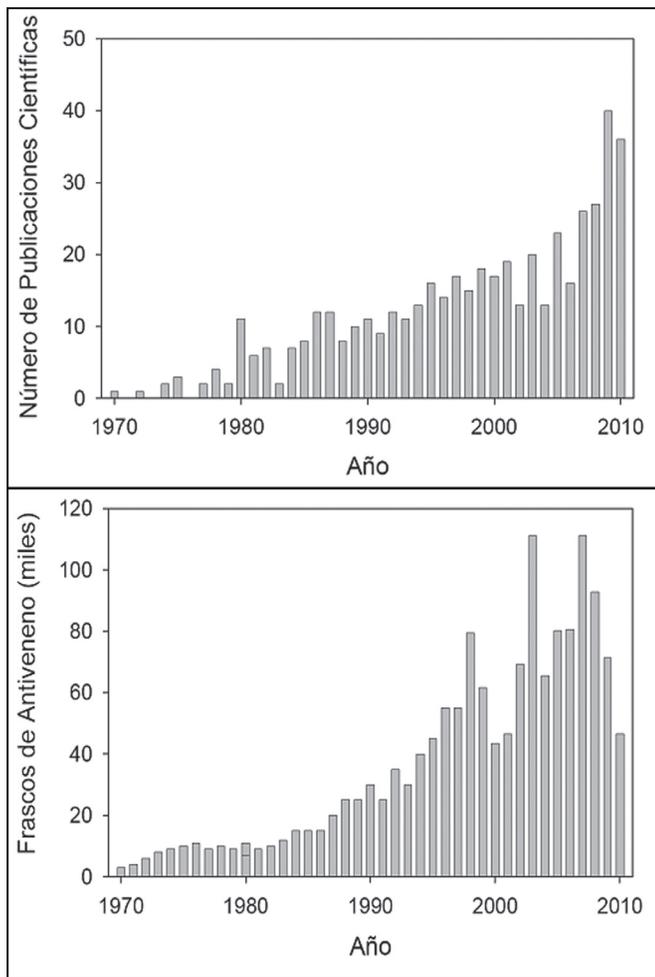
realizan también estudios básicos que tienen como objetivo comprender los mecanismos que conducen al desarrollo de reacciones adversas tempranas, en un porcentaje de los pacientes tratados con antivenenos.<sup>72-75</sup>

**(e) Estudios sobre control de calidad y evaluación preclínica de la capacidad neutralizante de los antivenenos:** el control de un producto inmunobiológico de uso terapéutico, como los antivenenos, es complejo, por lo que requiere de una cuidadosa estandarización, así como de una evaluación preclínica en modelos animales, empleando técnicas que predigan con confiabilidad su posterior desempeño clínico. Dentro de esta línea de investigación,<sup>76-81</sup> además, se ha trabajado sobre las propiedades comparativas de antivenenos preparados como IgG completas (sin digerir) o sus fragmentos proteolíticos F(ab')<sub>2</sub> y Fab, en modelos animales.<sup>82</sup> Los antivenenos son producidos en el ICP bajo la primera modalidad (IgG), dado que las investigaciones realizadas hasta la fecha no muestran una superioridad en la utilización de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> o Fab.<sup>82</sup>

**(f) Estudios de investigación clínica sobre antivenenos:** en las últimas dos décadas se han desarrollado algunos ensayos clínicos para evaluar el desempeño y otras características de los antivenenos producidos en el ICP, en pacientes que han sufrido un envenenamiento ofídico. Tales estudios se han realizado fundamentalmente en colaboración con clínicos de Colombia y de Nigeria.<sup>28-30,83,84</sup> Aunque hasta la fecha no existen ensayos clínicos con antivenenos hechos en Costa Rica (en parte debido a la confusa situación reglamentaria prevaleciente), ello sería idóneo para el abordaje de importantes preguntas en el campo de la seroterapia.

**(g) Estudios sobre la composición de los venenos:** la compleja constitución proteica de los venenos de serpientes halladas en Costa Rica se ha estudiado en forma permanente desde 1960, y de una manera más acelerada y precisa con el advenimiento de mejores técnicas de separación cromatográfica y de bioquímica de proteínas. La introducción de las nuevas tecnologías de la proteómica, basadas en el desarrollo de la espectrometría de masas, ha acelerado significativamente esta área de investigación. Gracias al apoyo de CONARE y la UCR, a partir de 2010 el ICP inauguró un moderno laboratorio de análisis proteómicos, mediante el cual es posible conocer en detalle la composición completa de los venenos,<sup>34</sup> así como de otras muestras biológicas de interés para la comunidad científica del país. Una derivación muy útil de los análisis proteómicos de los venenos (venómica) ha sido el desarrollo de una estrategia para determinar el reconocimiento de cada componente de los venenos por parte de los anticuerpos presentes en los antivenenos, denominada "antivenómica".<sup>34,35</sup>

**(h) Aislamiento, caracterización, y estudio del mecanismo de acción de toxinas ofídicas:** con el objeto de comprender mejor los venenos de serpiente y sus acciones patológicas en el organismo, se aíslan las diferentes toxinas y se estudian en una variedad de modelos experimentales que han permitido profundizar en el conocimiento de sus mecanismos de acción y de la fisiopatología de los envenenamientos ofídicos.<sup>85-91</sup>



**Figura 2: Publicaciones científicas y producción de antivenenos en el ICP (1970-2010).**

(i) *Patología experimental del envenenamiento ofídico:* con la utilización de los venenos completos y sus componentes aislados, se investiga la patogénesis de los efectos tóxicos en modelos animales experimentales, aplicando técnicas de histología, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y proteómica de exudados inflamatorios.<sup>19, 92,93</sup>

(j) *Búsqueda, caracterización y evaluación de inhibidores con potencial terapéutico hacia venenos de serpientes:* la posibilidad de contar con toxinas purificadas a partir de los venenos ha posibilitado trabajar en una línea de investigación cuyo objetivo es hallar sustancias alternativas a los anticuerpos, sean de origen natural o sintético, que también sean capaces de inhibir sus efectos tóxicos.<sup>94-98</sup> Tales estudios han proporcionado algunos compuestos prometedores como candidatos para una eventual aplicación terapéutica, la cual podría complementar el uso de los antivenenos. Sin embargo, esa meta dependería de la posibilidad de realizar ensayos clínicos controlados, una vez superadas las etapas de investigación preclínicas. Como se mencionó (sección f), se requeriría de un mayor apoyo para este fin.

(k) *Desarrollo de nuevos tipos de antivenenos:* aunque se encuentran aún en etapas incipientes de su desarrollo, se investiga en el ICP la posible elaboración de antivenenos

equinos contra abejas y escorpiones. Se ha investigado, en una primera etapa, las características del envenenamiento por abejas en un modelo experimental<sup>99</sup> y la respuesta inmune hacia sus principales toxinas, así como los efectos que causan los venenos de escorpiones de Costa Rica y su composición bioquímica-proteómica. Por otra parte, la experiencia acumulada en la elaboración de antivenenos ofídicos para la región, ha permitido desarrollar y producir en el ICP dos nuevos antivenenos para serpientes relevantes en Nigeria<sup>100</sup> y Papúa Nueva Guinea<sup>101</sup>, y así contribuir a aliviar este problema de salud en esas regiones de alta incidencia de envenenamientos.

### De la investigación al tratamiento: una mirada hacia el futuro

Vistas a lo largo de su evolución histórica, las actividades científicas y tecnológicas llevadas a cabo en el ICP revelan índices positivos, tanto en la generación de conocimientos (publicaciones científicas), como en el aspecto productivo (cantidad de frascos de antiveneno), como se muestra en la Fig.2. Mirando hacia el futuro, en el corto y mediano plazos, y con base en la investigación autóctona y foránea, cabe preguntarse qué mejoras y cambios se podrían esperar en relación con los antivenenos, el elemento terapéutico clave para afrontar el problema del ofidismo. Aunque es difícil hacer predicciones en temas que involucran aspectos científico-tecnológicos, dados los cambios radicales y repentinos que pueden ocurrir a consecuencia de un hallazgo fundamental o una innovación de gran impacto, se podría esbozar algunas suposiciones. El uso de productos terapéuticos biotecnológicos, como anticuerpos humanos recombinantes, o sus fragmentos, como scFv u otros, producidos en distintos sistemas de expresión procarióticos o eucarióticos, probablemente no se constituirá aún en una opción viable como antivenenos, en el corto plazo. Las razones para ello se relacionan, por un lado, con los elevados costos de producción para elementos de esta naturaleza que cumplan con los requisitos de un producto inyectable, a escala industrial, y por otro, con la compleja composición de los venenos, la cual obligaría a desarrollar un “coctel” de anticuerpos recombinantes o sus fragmentos. Sin embargo, no se debe descartar la posibilidad de que antídotos de esta naturaleza puedan llegar a desarrollarse para combatir ciertos envenenamientos particulares, como los causados por algunas serpientes de la familia Elapidae, en especies donde se llegara a demostrar que la toxicidad del veneno es atribuible a uno o dos componentes principales. Un buen candidato para ello podría ser el caso de la coral gargantilla, *Micrurus mipartitus*, para la cual no se dispone de un antiveneno en Costa Rica. El reciente análisis proteómico de su veneno ha revelado la presencia de una neurotoxina mayoritaria<sup>100</sup> que podría constituir un blanco adecuado para el desarrollo de un anticuerpo monoclonal neutralizante, y su eventual producción masiva para fines terapéuticos.

Es probable que las mejoras y cambios en los antivenenos, producto de la investigación, se introduzcan de forma gradual y no radical. Algunos de los aspectos para los cuales cabría esperar una evolución en el corto plazo se relacionarían con mejoras en la inocuidad y seguridad de los antivenenos, gracias al desarrollo de métodos cada vez más eficientes para el procesamiento, purificación y

estabilización final de las inmunoglobulinas. De forma paralela, la eficacia terapéutica de los antivenenos podría verse incrementada mediante estrategias de inmunización que logren superar las limitaciones en la inmunogenicidad de algunas toxinas ofídicas, las cuales desempeñan un papel clave desde el punto de vista clínico. Asimismo, es de esperar que los análisis detallados sobre la composición venómica de serpientes de diversos orígenes geográficos, y el desarrollo de nuevas fórmulas antigénicas sobre tales bases racionales, conduzcan a una ampliación considerable de las áreas de cobertura de los antivenenos. Ello podría contribuir a mejorar la disponibilidad del tratamiento en países o regiones donde la escasez de antivenenos tiene consecuencias dramáticas para la población afectada, que sufre elevados índices de mortalidad y morbilidad. Finalmente, es posible la introducción de algunos inhibidores no inmunológicos en la práctica clínica, para bloquear toxinas específicas. Pero, para eso, será necesario lograr un mayor interés de la comunidad médica por la realización de estudios clínicos controlados, a pesar de no disponer del patrocinio y apoyo de las grandes empresas farmacéuticas internacionales.

---

## Referencias

---

1. Kasturiratne A, Wickremasinghe R, de Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med* 2008; 5:e218.
2. Chippaux JP. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bull WHO* 1998; 76: 515-524.
3. Harrison RA, Hargreaves A, Wagstaff SC, Faragher B, Laloo DG. Snake envenoming: a disease of poverty. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 3:e569.
4. Fan HW, Cardoso JL. Clinical toxicology of snake bites in South America. In: *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons* (Meier J, White J, eds.) CRC Press, Boca Ratón, 1995; 667-668.
5. Warrell DA. Clinical features of envenoming from snake bites. In: *Envenomings and their treatment* (Bon C, Goyffon M, eds.) Lyon, Fondation Marcel Mérieux, 1996; 63-76.
6. Gutiérrez JM, Theakston RDG, Warrell DA. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS Med* 2006; 3: e150.
7. Chippaux JP. Estimate of the burden of snakebites in sub-Saharan Africa: a meta-analytic approach. *Toxicon* 2011; 57: 586-599.
8. Gutiérrez JM, Higashi HG, Wen FH, Bornouf T. Strengthening antivenom production in Central and South American public laboratories: report of a workshop. *Toxicon* 2007; 49: 30-35.
9. Picado M. Dr. Clodomiro Picado, vida y obra. Editorial Universidad de Costa Rica, San José, 1964; 379 pp.
10. Gutiérrez JM. Los orígenes del Instituto Clodomiro Picado, 2010; Master Print, San José, 60 pp.
11. Gutiérrez JM, Taylor R, Bolaños R. Cariotipos de diez especies de serpientes costarricenses de la familia Viperidae. *Rev Biol Trop* 1979; 27: 309-319.
12. Bolaños R, Cerdas L, Abalos JW. Venenos de las serpientes coral (*Micrurus* spp.): informe sobre un antiveneno polivalente para las Américas. *Bol Of Sanit PanAm* 1978; 84: 128-133.
13. Theakston RDG, Warrell DA, Griffiths E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon* 2003; 41: 541-557.
14. Taylor RT, Flores A, Flores G, Bolaños R. Geographical distribution of Viperidae, Elapidae and Hydrophidae in Costa Rica. *Rev Biol Trop* 1974; 21: 383-397.
15. Bolaños R. Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Primera parte: aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. *Rev Cost Cienc Méd* 1982; 3: 165-184.
16. Bolaños R. Toxicity of Costa Rican snake venoms for the white mouse. *Am J Trop Med Hyg* 1972; 21: 360-363.
17. Bolaños R, Cerdas L, Taylor R. The production and characteristics of a coral snake (*Micrurus mipartitus hertwigi*) antivenin. *Toxicon* 1975; 13: 139-142.
18. Nishioka SA, Silveira PVP. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47: 805-810.
19. Gutiérrez JM, Lomonte B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem Inst Butantan* 1989; 51: 211-223.
20. Otero R. Manual de diagnóstico y tratamiento del accidente ofídico. Editorial Universidad de Antioquia, Colombia, 1994; 87 pp.
21. Barrantes A, Solís V, Bolaños R. Alteración de los mecanismos de la coagulación en el envenenamiento por *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 1985; 23: 399-407.
22. Cardoso JLC, Fan HW, França FOS, Jorge MT, Leite RP, Nishioka SA, et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *Quart. J. Med.* 1993; 86: 315-325.
23. Kamiguti AS, Cardoso JL, Theakston RD, Sano-Martins IS, Hutton RA, Rugman FP, et al. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. *Toxicon* 1991; 29: 961-972.
24. Gené JA, Roy A, Rojas G, Gutiérrez JM, Cerdas L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 1989; 27: 841-848.
25. Gutiérrez JM. Clinical toxicology of snakebite in Central America. In: *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons* (Meier J, White J, eds) CRC Press, Boca Ratón, 1995; 645-665.
26. Caja Costarricense de Seguro Social. Protocolo para uso institucional de sueros antiofídicos para el manejo del envenenamiento por mordedura de serpiente. *Boletín Terapéutico* 2008; 8: 1-10.
27. Warrell DA. Guidelines for the management of snake-bites. WHO, 2010, 162 pp.
28. Otero R, Gutiérrez JM, Rojas G, Núñez V, Díaz A, Miranda E, et al. A randomized blinded clinical trial of two antivenoms, prepared by caprylic acid or ammonium sulphate fractionation of IgG, in *Bothrops* and *Porthidium* snake bites in Colombia. Correlation between safety and biochemical characteristics of antivenoms. *Toxicon* 1999; 37: 895-908.
29. Otero-Patiño R, Cardoso JLC, Higashi HG, Nunez V, Diaz A, Toro M., et al. A randomized, blinded, comparative trial of one pepsin-

- digested and two whole IgG antivenoms for *Bothrops* snake bites in Uraba, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58: 183-189.
30. Otero R, León G, Gutiérrez JM, Rojas G, Toro MF, Barona J, et al. Efficacy and safety of two whole IgG polyvalent antivenoms, refined by caprylic acid fractionation with or without beta-propiolactone, in the treatment of *Bothrops asper* bites in Colombia. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 2006; 100: 1173-1182.
  31. Bolaños R, Cerdas L. Producción y control de sueros antiofídicos en Costa Rica. *Bol Of Sanit Panam* 1980; 88: 184-196.
  32. Rojas G, Jiménez JM, Gutiérrez JM. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon* 1994; 32: 351-363.
  33. Angulo Y, Estrada R, Gutiérrez JM. Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (Crotalinae) antivenom. *Toxicon* 1997; 35: 81-90.
  34. Calvete JJ, Sanz L, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Lett* 2009; 583: 1736-1743.
  35. Lomonte B, Escolano J, Fernández J, Sanz L, Angulo Y, Gutiérrez JM et al. Snake venomics and antivenomics of the arboreal neotropical pitvipers *Bothriechis lateralis* and *Bothriechis schlegelii*. *J Proteome Res* 2008; 7: 2445-2457.
  36. Bolaños R, Marín O, Mora-Medina E, Alfaro EA. El accidente ofídico por cascabela (*Crotalus durissus durissus*) en Costa Rica. *Acta Méd Costarricense* 1981; 24: 211-214.
  37. Bolaños R. Serpientes, venenos y ofidismo en Centroamérica. Editorial Universidad de Costa Rica, 1984.
  38. Cerdas L, Cornavaca A, López R. Ofidismo en la región Atlántica de Costa Rica: análisis de 164 casos. *Acta Méd Costarricense* 1986; 29: 113-117.
  39. Arroyo O, Rojas G, Gutiérrez JM. Envenenamiento por mordedura de serpiente en Costa Rica en 1996: epidemiología y consideraciones clínicas. *Acta Méd Costarricense* 1999; 41: 65-72.
  40. Saborío P, González M, Cambroner M. Accidente ofídico en niños en Costa Rica: epidemiología y detección de factores de riesgo en el desarrollo de absceso y necrosis. *Toxicon* 1998; 36: 359-366.
  41. Sasa M, Vazquez S. Snakebite envenomation in Costa Rica: a revision of incidence in the decade 1990-2000. *Toxicon* 2003; 41: 19-22.
  42. Fernández P, Gutiérrez JM. Mortality due to snakebite envenomation in Costa Rica (1993-2006). *Toxicon* 2008; 52: 530-533.
  43. Prado M, Quirós D, Lomonte B. Mortality by Hymenoptera stings in Costa Rica. *PanAm J Public Health* 2009; 25: 389-393.
  44. Leynaud GC, Reati GJ. Identificación de las zonas de riesgo ofídico en Córdoba, Argentina, mediante el programa SIGEpi. *Rev Panam Salud Pública* 2009; 26: 64-69.
  45. Hansson E, Cuadra S, Oudin A, de Jong K, Stroh E, Torén K, Albin M. Mapping snakebite epidemiology in Nicaragua. Pitfalls and possible solutions. *PLoS Negl Trop Di* 2010; 4: e896.
  46. Bolaños R, Flores A, Taylor R, Cerdas L. Color patterns and venom characteristics in *Pelamias platurus*. *Copeia* 1974; 4: 909-912.
  47. Moreno E, Bolaños R. Hemogregarinas en serpientes de Costa Rica. *Rev Biol Trop* 1977; 25: 47-57.
  48. Ayala S, Moreno E, Bolaños R. *Plasmodium pessoai* sp. from two Costa Rican snakes. *J Parasitol* 1978; 64: 330-335.
  49. Gutiérrez JM, Bolaños R. Cariotipos de las principales serpientes coral (Elapidae: *Micrurus*) de Costa Rica. *Rev Biol Trop* 1979; 27: 57-73.
  50. Arroyo O, Bolaños R. The bacterial flora of venoms and mouth cavities of Costa Rican snakes. *Bull Pan Am Health Org* 1980; 14: 280-284.
  51. Solórzano A, Cerdas L. Confirmación de la presencia de *Micrurus clarcki* Schmidt (Elapidae) en Costa Rica. *Rev Biol Trop* 1984; 32: 317-318.
  52. Martínez S, Cerdas L. Captive reproduction of the mussurana, *Clelia clelia* (Daudin) from Costa Rica. *Herpetological Rev* 1986; 17: 12.
  53. Solórzano A, Cerdas L. A new subspecies of the bushmaster, *Lachesis muta*, from southeastern Costa Rica. *J Herpetol* 1986; 20: 463-466.
  54. Solórzano A, Cerdas L. Reproductive biology and distribution of the terciopelo, *Bothrops asper* Garman (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. *Herpetologica* 1989; 45: 444-450.
  55. Sasa M, Solórzano A. The reptiles and amphibians of Santa Rosa National Park, Costa Rica, with comments about the herpetofauna of xerophytic areas. *Herpetol Nat Hist* 1995; 3: 113-126.
  56. Sasa M, Barrantes R. Allozyme variation in populations of *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. *Herpetologica* 1998; 54: 462-469.
  57. Lamar WW, Sasa M. A new species of hognose pitviper, genus *Porthidium*, from the southwestern Pacific of Costa Rica (Serpentes: Viperidae). *Rev Biol Trop* 2003; 51: 797-804.
  58. Urdaneta AH, Bolaños F, Gutiérrez JM. Feeding behavior and venom toxicity of coral snake *Micrurus nigrocinctus* (Serpentes: Elapidae) on its natural prey in captivity. *Comp Biochem Physiol* 2004; 138C: 485-492.
  59. Whitfield SM, Bell KE, Philippi T, Sasa M, Bolaños F, Chaves G et al. Amphibian and reptile declines over 35 years at La Selva, Costa Rica. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 8532-8536.
  60. Wasko DK, Sasa M. Habitat selection of the terciopelo (Serpentes: Viperidae: *Bothrops asper*) in a lowland rainforest in Costa Rica. *Herpetologica* 2010; 66: 148-158.
  61. Estrada R, Gutiérrez JM, Alvarado J, Robles A, Avila C, González N. Desarrollo de la respuesta inmune en caballos inoculados con venenos para la producción del suero antiofídico polivalente en Costa Rica. *Rev Biol Trop* 1989; 37: 187-191.
  62. Estrada R, Robles A, Alvarado J, Rojas E, González N, Segura E, et al. Development of antibody response and clinical and hematological alterations in horses immunized with snake venoms for the production of antivenom in Costa Rica. *Mem Inst Butantan* 1991; 53: 181-190.
  63. Estrada R, Chaves F, Robles A, Rojas E, Segura E, Gutiérrez JM. Valores hematológicos y de enzimas séricas en caballos inoculados con venenos de serpientes para la producción de antivenenos en Costa Rica. *Rev Biol Trop* 1992; 40: 95-99.
  64. Angulo Y, Estrada R, Gutiérrez JM. Effect of bleedings in horses immunized with snake venoms for antivenom production. *Rev Biol Trop* 1997; 45: 1215-1221.
  65. Rucavado A, Moreno E, Gutiérrez JM. (1996) Effect of adjuvants on the antibody response of mice to *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29: 1337-1340.

66. Azofeifa-Cordero G, Arce-Estrada V, Flores-Díaz M, Alape-Girón A. Immunization with cDNA of a novel P-III type metalloproteinase from the rattlesnake *Crotalus durissus durissus* elicits antibodies which neutralize 69% of the hemorrhage induced by the whole venom. *Toxicon* 2008; 52: 302-308.
67. Dos-Santos MC, Arroyo C, Solano S, Herrera M, Villalta M, Segura A, Estrada R, Gutiérrez JM, León G. Comparison of the effect of *Crotalus simus* and *Crotalus durissus ruruima* venoms on the equine antibody response towards *Bothrops asper* venom: implications for the production of polyspecific snake antivenoms. *Toxicon* 2011; 57: 237-243.
68. Gutiérrez JM, León G, Burnouf T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead. *Biologicals* 2011; 39: 129-142.
69. Rojas G, Espinoza M, Lomonte B, Gutiérrez JM. Effect of storage temperature on the stability of polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon* 1990; 28: 101-105.
70. Segura A, Herrera M, González E, Vargas M, Solano G, Gutiérrez JM, León G. Stability of equine antivenoms obtained by caprylic acid precipitation: towards a liquid formulation stable at tropical room temperature. *Toxicon* 2009; 53: 609-615.
71. Gutiérrez JM, Fan HW, Silvera CLM, Angulo Y. Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: report of a workshop. *Toxicon* 2009; 53: 625-630.
72. León G, Lomonte B, Gutiérrez JM. Anticomplementary activity of equine whole IgG antivenoms: comparison of three fractionation protocols. *Toxicon* 2005; 45: 123-128.
73. Herrera M, León G, Segura A, Meneses F, Lomonte B, Chippaux JP, Gutiérrez JM. Factors associated with adverse reactions induced by caprylic acid-fractionated whole IgG preparations: comparison between horse, sheep and camel IgGs. *Toxicon* 2005; 46: 775-781.
74. León G, Rodríguez MA, Rucavado A, Fernández I, Lomonte B, Gutiérrez JM. Anti-human erythrocyte antibodies in horse-derived antivenoms used in the treatment of snakebite envenomations. *Biologicals* 2007; 35: 5-11.
75. León G, Segura A, Herrera M, Otero R, França FOS, Barbaro KC, et al. Human heterophilic antibodies against equine immunoglobulins: assessment of their role in the early adverse reactions to antivenom administration. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 2008; 102: 1115-1119.
76. W.H.O. Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. W.H.O. 2010; Geneva.
77. Gutiérrez JM, Rojas G, Bogarín G, Lomonte B. 1996. Evaluation of the neutralizing ability of antivenoms for the treatment of snake bite envenoming in Central America. In: *Envenomings and their Treatments* (Bon C, Goyffon M, Eds.), Paris, Fondation Marcel Mérieux, 1996; 223-231.
78. García M, Monge M, León G, Lizano S, Segura E, Solano G, et al. Effect of preservatives on IgG aggregation, complement-activating effect and hypotensive activity of horse polyvalent antivenom used in snakebite envenomation. *Biologicals* 2002; 30: 143-151.
79. Solano G, Segura A, Herrera M, Gómez A, Villalta M, Gutiérrez JM, et al. Study of the design and analytical properties of the lethality neutralization assay used to estimate antivenom potency against *Bothrops asper* snake venom. *Biologicals* 2010; 38: 577-585.
80. Gutiérrez JM, Lomonte B, León G, Rucavado A, Chaves F, Angulo Y. Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. *Curr Pharmaceutical Design* 2007; 13: 2935-2950.
81. Gutiérrez JM, León G. Snake Antivenoms. Technological, clinical and public health issues. En: *Animal toxins: State of the art perspectives in health and biotechnology* (Lima ME, Pimenta AMC, Martin-Euclaire MF, Zingali RB, Eds). Editora UFMG, Brasil, 2009; pp.393-421.
82. Gutiérrez JM, León G, Lomonte B. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. *Clinical Pharmacokinetics* 2003; 42: 721-741.
83. Abubakar IS, Abubakar SB, Habib AG, Nasidi A, Durfa N, Yusuf PO, et al. Randomised controlled double-blind non-inferiority trial of two antivenoms for saw-scaled or carpet viper (*Echis ocellatus*) envenoming in Nigeria. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4:e767.
84. Abubakar SB, Abubakar IS, Habib AG, Nasidi A, Durfa N, Yusuf PO, et al. Pre-clinical and preliminary dose finding and safety studies to identify candidate antivenoms for treatment of envenoming by saw-scaled or carpet vipers (*Echis ocellatus*) in northern Nigeria. *Toxicon* 2010; 55: 719-723.
85. Gutiérrez JM, Cerdas L, Arroyo O, Rojas E, Lomonte B, Gené JA. Patogénesis y neutralización de los efectos locales inducidos por veneno de la serpiente "terciopelo" (*Bothrops asper*). *Acta Méd Costarricense* 1982; 25: 255-262.
86. Angulo Y, Lomonte B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 2009; 54: 949-957.
87. Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: *Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: structure, function, and mechanism* (Kini RM, Ed.), John Wiley & Sons, England 1997; pp. 321-352.
88. Gutiérrez JM, Lomonte B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. En: *Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Eds. Cardoso JLC, França FOS, Wen FH., Málaque CMS, Haddad Jr V, Eds). São Paulo, Brasil, 2009; pp. 352-365.
89. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 2005; 45: 997-1011.
90. Gutiérrez JM, Rucavado A, Chaves F, Díaz C, Escalante T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 2009; 54: 958-975.
91. Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 2009; 54: 976-987.
92. Escalante T, Rucavado A, Fox JW, Gutiérrez JM. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *J Proteomics* 2011; 74: 1781-1794.
93. Rucavado A, Escalante T, Shannon J, Gutiérrez JM, Fox JW. Proteomics of wound exudate in snake venom-induced pathology: search for biomarkers to assess tissue damage and therapeutic success. *J Proteome Res* 2011; 10: 1987-2005.
94. Lomonte B, León G, Angulo Y, Rucavado A, Núñez V. Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products, and synthetic drugs: contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. *Toxicon* 2009; 54: 1012-1028.

95. Escalante T, Franceschi A, Rucavado A, Gutiérrez JM. Effectiveness of batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, in neutralizing local tissue damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 269-274.
96. Rucavado A, Escalante T, Franceschi A, Chaves F, León G, Cury Y. et al. Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early *in situ* administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa<sub>2</sub>EDTA. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 63: 313-319.
97. Lizano S, Domont G, Perales J. Natural phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. *Toxicon* 2003; 42: 963-977.
98. Angulo Y, Lomonte B. Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1993-2000.
99. Prado M, Solano-Trejos G, Lomonte B. Acute physiopathological effects of honeybee (*Apis mellifera*) envenoming by subcutaneous route in a mouse model. *Toxicon* 2010; 56: 1007-1017.
100. Rey P, Núñez V, Gutiérrez JM, Lomonte B. Proteomic and biological characterization of the venom of the redtail coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. *J Proteomics* 2011; 75: 655-667
101. Segura A, Villalta M, Herrera M, León G, Harrison R, Durfa N, et al. Preclinical assessment of the efficacy of a new antivenom (EchiTAb-Plus-ICP) for the treatment of viper envenoming in sub-Saharan Africa. *Toxicon* 2010; 55: 369-374.
102. Vargas M, Segura A, Herrera M, Villalta M, Estrada R, Cerdas M et al. Preclinical evaluation of caprylic acid-fractionated IgG antivenom for the treatment of taipan (*Oxyuranus scutellatus*) envenoming in Papua New Guinea. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5:e1144.