

Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México

Adolfo R. de Roodt,* Judith Estévez-Ramírez,** Jorge F. Paniagua-Solís,*** Silvana Litwin,* Alejandro Carvajal-Saucedo,**** Jorge A. Dolab,***** Luis E. Robles-Ortiz,*** Alejandro Alagón****

Recepción: 29 de junio de 2004

aceptación: 08 de julio de 2004

Resumen

La caracterización de las actividades tóxicas de los venenos de serpientes es necesaria para el cabal entendimiento de los procesos fisiopatológicos que se producen ante su mordedura, como también para evaluar la potencia neutralizante de los antivenenos utilizados para tratar estos envenenamientos. A causa de los pocos datos disponibles sobre la toxicidad del veneno de serpientes con importancia sanitaria en México, estudiamos las actividades tóxicas de los venenos de Bothrops asper, Athropoides nummifer, Agkistrodon billineatus, Crotalus durissus durissus, Crotalus basiliscus, Crotalus scutulatus, Crotalus atrox y Micrurus nigrocinctus. A los venenos se les realizaron los siguientes estudios: SDS-PAUE, determinación de la potencia letal, y de las actividades hemorrágica, necrotizante, coagulante en plasma y fibrinógeno, fosfolipásica y fibrinogénolítica. Se estudió además la capacidad neutralizante de un antiveneno de uso corriente para la terapéutica de las mordeduras de serpientes venenosas en México, sobre varias de estas actividades. Los venenos de vipéridos mostraron actividades hemorrágicas, necrotizante, coagulante sobre plasma, protrombínica, fibrinogénolítica y fosfolipásica importantes. Los venenos de mayor potencia letal fueron los de Micrurus nigrocinctus y Crotalus scutulatus, sin embargo el veneno que presentó en general potencias tóxicas mayores fue el de Bothrops asper. Las diferentes potencias tóxicas halladas se encontraron dentro de los márgenes descritos para especies de vipéridos y elápidos de Sudamérica. La actividad sobre el plasma y el fibrinógeno fue muy diferente en los diferentes venenos viperinos, sin embargo todos mostraron ser capaces de afectar componentes del sistema de la coagulación. El antiveneno probado no sólo neutralizó la letalidad del veneno sino también sus actividades tóxicas.

Palabras clave: Agkistrodon, Bothrops, Crotalus, serpientes, toxicidad, veneno, terapéutica

* Área de Investigación y Desarrollo / Serpentario. Instituto Nacional de Producción de Biológicos – A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G Malbrán”, Buenos Aires, Argentina.

** Investigación y Desarrollo, Instituto Bioclón S.A. de C. V., México DF, México.

*** Dirección de Investigación y Desarrollo. Laboratorios Silanes S.A de C.V., México, D.F. México.

**** Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México.

***** Departamento Vacunas y Sueros. Instituto Nacional de Producción de Biológicos – A.N.L.I.S. “Dr. Castillo G. Malbrán”, Buenos Aires, Argentina.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Alejandro Alagón Cano, Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, México, 62210. Alagón@ibt.unam.mx.

Summary

The characterization of the toxic activities of snake venoms is necessary to understand the physiopathology of the envenomation and to test the potency of the antivenoms used to treat this pathology. Because of the lack of data on the toxic activities of venoms from Mexican snakes of medical importance, we studied the venoms from Bothrops asper, Athropoides nummifer, Agkistrodon billineatus, Crotalus durissus durissus, Crotalus basiliscus, Crotalus scutulatus, Crotalus atrox and Micrurus nigrocinctus. The studies performed were: SDS-PAOE, determination of lethal potency, hemorrhagic, necrotizing, coagulation on plasma and fibrinogen, phospholipasic and fibrinolytic activities. In addition we studied the neutralizing capacity of the toxic activities of an antivenom currently used for the treatment of snakebites in Mexico. The venom from viperids showed important hemorrhagic, necrotizing, coagulative on plasma, prothrombinic, fibrinogenolytic and phospholipase activities. The venoms with the highest lethal potency were those of Micrurus nigrocinctus and Crotalus scutulatus; however, the viperine venom that globally displayed the most potent toxic activities was from Bothrops asper. All the venoms showed toxic activities of similar range to those described for other American venomous snakes. The activity on plasma or fibrinogen varied widely among the different venoms but all displayed capacity to act on the coagulation system. The antivenom tested not only neutralized the lethality B. asper venom but also its other toxic activities.

Key Words: Agkistrodon, Bothrops, Crotalus, snakes, toxicity, venom, therapeutics

Introducción

El ofidismo en el mundo es un problema sanitario al que debe prestársele especial atención a causa de las características clínicas y situaciones epidemiológicas en que se presentan las mordeduras de serpientes venenosas. Este problema posee el agravante adicional de que generalmente es sufrido por individuos de escasos recursos económicos y de poblaciones marginales.^{1,2}

En América existen dos Familias de serpientes venenosas, la Viperidae representada por las "víboras" y la Elapidae representada por las "corales" o "coralillos", si bien los accidentes por éstas últimas son muy raros debido al carácter poco agresivo, tímido y huidizo de estos ofidios y sus hábitos cavícolas. Los responsables de más de 90% de los accidentes ofídicos en América pertenecen a la Familia Viperidae.³⁻⁶

Las especies de Vipéridos pertenecientes a los Géneros *Crotalus* y *Bothrops* pueden encontrarse a lo largo de todo el continente mientras que los otros Géneros de esta Familia tienen una distribución más limitada: *Lachesis* se encuentra en Sur y Centroamérica, *Agkistrodon* y *Sistrurus* en Norteamérica y *Athropoides*, *Bothriopsis*, *Bothriechis* y *Porthidium* en Centroamérica y Norte de Sudamérica.³⁻⁵

En México, si bien no representan uno de los mayores problemas sanitarios, las mordeduras por serpientes venenosas son comunes en determinadas zonas poniendo en peligro la vida de los pacientes.⁶⁻⁹ Las principales responsables de los accidentes ofídicos en México son especies de los Géneros *Bothrops* y *Crotalus*, por lo que los antivenenos utilizados para el tratamiento de las mordeduras de las mismas debe neutralizar venenos de serpientes de estos dos Géneros.¹⁰

Las mordeduras de los vipéridos producen en Centro y Norteamérica cuadros predominantemente histotóxicos y hemotóxicos, causando extensas lesiones locales (que pueden conducir a la amputación de miembros) y hemorragias incoercibles por diferentes mecanismos que actúan sobre el sistema hemostático. Estos efectos, conjuntamente a fenómenos hipotensivos provocados por mecanismos directos (hemorragias) e indirectos (activación del sistema caliceína - bradiquinina, péptidos hipotensores) pueden conducir a la muerte.

Los venenos de serpientes son las secreciones más ricas en enzimas y toxinas en la naturaleza^{11,12} y están compuestos por múltiples moléculas tóxicas. Como la excepción más destacable entre los vipéridos se puede mencionar a la "cascabel" sudamericana, *Crotalus (C.) durissus (d.) terrificus*, de veneno fuertemente neurotóxico y miotóxico. La mordedura de esta serpiente no produce lesiones locales, su componente mayor es una b-

neurotoxina (crotoxina) que posee actividad miotóxica, constituye 30-50% de la masa total del veneno. Es una de las neurotoxinas más potentes y si bien no es el único componente tóxico del veneno, es el mayor responsable de la actividad tóxica del mismo.¹³ En otros vipéridos americanos se pueden encontrar 13-neurotoxinas, como la mojavetoxina de *C. scutulatus* ("cascabel del mojavave").¹⁴⁻¹⁶ Si bien la cantidad de éstas en la masa total del veneno no llega a ser de la misma magnitud que en la "cascabel sudamericana", las mordeduras de estas serpientes pueden igualmente producir cuadros de neurotoxicidad^{17,18} y a diferencia de *C. d. terrificus* pueden causar lesiones locales.

Debido a esto, la toxicidad de los venenos viperinos, se debe a la sumatoria de la acción de sus componentes sobre diferentes sistemas y tejidos. Esta complejidad de mecanismos pone en evidencia la importancia del conocimiento de las características tóxicas y enzimáticas de los venenos, para entender mejor la fisiopatología de los envenenamientos y evaluar las capacidades neutralizantes de los antivenenos utilizados para tratarlos.^{1,19}

Se han realizado estudios de caracterización de las actividades tóxicas de venenos de serpientes de diferentes regiones del mundo,^{1,17-19} sin embargo, sólo se dispone de pocos estudios sobre actividades enzimáticas y tóxicas parciales del veneno de algunas serpientes que pueden encontrarse en México.²²⁻²⁴ Hasta la fecha, no se disponen de datos sobre las características bioquímicas y tóxicas de los venenos crudos de las serpientes de mayor importancia sanitaria de México, sobre todo de aquellas actividades relevantes en los procesos fisiopatológicos en los envenenamientos por Vipéridos.^{1,19}

Debido a esto, en este trabajo, se estudiaron ciertas actividades tóxicas y enzimáticas de algunas de las serpientes mexicanas de importancia sanitaria. Se determinaron las potencias letal, hemorrágica, necrotizante, fibrinolítica, procoagulante en plasma, protrombínica, fosfolipásica y fibrino(geno)lítica. Se trabajó con veneno de *Bothrops (B.) asper*, *Agkistrodon (Agk.) billineatus*, *Athropoides (Ath., ex Bothrops) nummifer*, *C. d. durissus*, *C. scutulatus*, *C. basiliscus*, *C. atrox*, y *Micrurus (M.) nigrocinctus*. Adicionalmente se estudió el patrón electroforético de los venenos por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Dado que el único tratamiento probado como eficiente para la mordedura de serpientes es el uso de antivenenos²⁵⁻²⁷ se determinó la capacidad neutralizante de uno de los antivenenos utilizados terapéuticamente en México sobre la potencia letal y las actividades hemorrágica, necrotizante y procoagulante del veneno de *B. asper* ("nauyaca"), una de las serpientes responsable del mayor número de mordeduras por serpientes venenosas de México.^{6,9,27}

Materiales y métodos

Venenos

Los venenos utilizados en este estudio provinieron de ejemplares en buen estado de salud de *B. asper*, *Ath. nummifer*, *C. basiliscus*, *C. durissus durissus*, *C. scutulatus*, *C. atrox*, *Agk billineatus billineatus* y *M nigrocinctus*, propiedad del Serpentario "La Nauyaca", Cuernavaca, Morelos, México. Los ofidios se mantuvieron alojados en cajas individuales, a una temperatura de 24 - 30°C. Los Vipéridos fueron alimentados con uno o dos ratones o ratas o cobayos quincenales de acuerdo a su tamaño y los ejemplares de *Micrurus* con un colúbrido semanal o quincenalmente. Todos los ofidios recibieron agua *ad libitum*. El veneno se extrajo manualmente y fue inmediatamente desecado al vacío y guardado a -20°C.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Las muestras se prepararon con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y no reductoras. Se corrieron 25 µg de cada veneno en geles homogéneos de acrilamidabisacrilamida al 12.5 % en el sistema de buffer discontinuo descrito por Laemmli,²⁸ utilizando una cuba Miniprotean II (BioRad). Los geles una vez corridos se fijaron y colorearon con Azul brillante de Coomassie (BioRad).

Animales de experimentación

Se utilizaron ratones de la cepa CF-1 (18-20 g de peso) provistos por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos - A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán" (INPB), Buenos Aires, Argentina. Los animales se mantuvieron dentro de condiciones ambientales controladas, recibieron alimento sólido y agua *ad libitum*. Se cumplieron los requisitos éticos respecto al manejo y cantidad de animales utilizados para las determinaciones de actividades tóxicas y ensayos de seroneutralización.

Potencia letal

Se utilizó el método de estimación de la DL₅₀ en ratones descrito por Meier y Theakston.²⁹ La potencia letal intraperitoneal se calculó extrapolando los valores de dosis (1 a 20 µg.g⁻¹ por ratón) en función de la relación dosis/tiempo de muerte (mg.min⁻¹) mediante análisis por regresión lineal.

Actividad hemorrágica y necrotizante

Se determinaron de acuerdo a la técnica descrita por Theakston y Reid,¹⁹ con algunas modificaciones. Brevemente, se inyectaron ratones (3 por nivel de dosis), por vía intradérmica (i.d.) con 100 µl de veneno en dosis que variaron entre 1 y 300 µg en 100 µl de NaCl 0.15 M. Las lesiones fueron medidas tras el sacrificio de los animales con éter etílico a las 3 horas (para la actividad hemorrágica) o a las 72 horas (para la actividad necrotizante). Se definió como Dosis Mínima Hemorrágica (DMH) a la dosis de veneno que produce un halo hemorrágico con diámetro mayor perpendicular de 1 cm promedio y como Dosis Mínima Necrotizante (DMN) a la dosis de veneno que resulta en un área necrótica con un diámetro mayor promedio de 0.5 cm.¹⁹

Actividad procoagulante en plasma humano y fibrinógeno

Se determinó tratando 0.2 ml de plasma humano normal conteniendo 2.8 g de fibrinógeno o una solución de fibrinógeno bovino al 2% en NaCl 0.15 M (Sigma) con diferentes concentraciones de veneno en 50 µl de NaCl 0.15 M. Una dosis procoagulante mínima en plasma humano (DMP-P) o en fibrinógeno (DMP-F) se definió como la dosis de veneno que produce la formación de un coágulo evidente en 60 segundos y se expresó en mg/l

Determinación de la actividad fibrinogenolítica

Muestras conteniendo 1.8 ml de fibrinógeno bovino al 2.0% (Sigma) se trataron con 200 µl de NaCl 0.15M conteniendo 400 µg de veneno. Las muestras se incubaron a 37°C durante 120 minutos. Tras la incubación se tomaron muestras para realizar el SDS-PAGE y observar el patrón de degradación del fibrinógeno. El SDS-PAGE se realizó en condiciones reductoras y no reductoras, en geles con una concentración de acrilamida de 10%. Tras la electroforesis se realizó la fijación y la coloración con Azul brillante de Coomassie.³⁰

Actividad de fosfolipasa A₂

El estudio de la actividad de fosfolipasa A₂ se realizó mediante la determinación de la hidrólisis radial de fosfolípidos cuan sustento conteniendo agarosa (Sigma) al 1% y yema de huevo al 2.5%. Se colocó la mezcla anterior en placas de Peen para lograr una capa gelificada de 2.5 mm de espesor; se realizaron perforaciones en las que se colocaron diferentes dosis de cada veneno (1-200 µg en 10

μl de NaCl 0.15 M). Tras una incubación de 24 horas a temperatura ambiente se midieron los halos de hidrólisis radial y se estimó la dosis de veneno que produjo un halo de hidrólisis de 2 cm de diámetro mediante el análisis de la curva dosis-respuesta.

Seroneutralización de las actividades tóxicas

Para todos los ensayos de neutralización se utilizó el antiveneno Antivipmyn® (Instituto Bioclon, México D.F.), lote B6G02 con vencimiento 07/2001. La concentración proteica de ese antiveneno fue de 20 mg/ml.

Seroneutralización de la actividad letal. Se realizó preincubando varias dosis de antiveneno frente a 5.0 DL₅₀ del veneno de *B. asper*. Para cada nivel de dosis de antiveneno se utilizaron grupos de 6 ratones CF-1 de 18-22g que se inyectaron por vía i.p. con 5.0 DL₅₀ de veneno diluido en NaCl 0.15 M (control positivo) o con las mezclas de veneno -antiveneno preincubadas 30 min a 37°C. La curva de supervivencia en función de la dosis de antiveneno utilizada se estudió por regresión no lineal y la DE₅₀ se definió como la dosis de antiveneno que protege al 50% de los animales desafiados.

Seroneutralización de la actividad hemorrágica y de la actividad necrotizante. Cinco grupos de ratones CF-1 de 25 g de peso (n = 3 por nivel de dosis) se inyectaron por vía i.d. con 10 DMH o 3 DMN de veneno, preincubados 30 min. a 37°C con NaCl 0.15 M (control positivo) o con distintas cantidades del antiveneno. La determinación de las áreas hemorrágicas o necróticas se realizó de la forma mencionada anteriormente.^{19,31} Se asignó un valor de 100% a la media del área hemorrágica o necrótica determinada en el grupo control positivo. Se determinó la DE₅₀ (dosis de veneno que reducen la mitad el área hemorrágica o necrotizada) mediante el estudio por regresión no lineal de la curva dosis de antiveneno versus inhibición porcentual de las áreas hemorrágicas o necrotizadas.

Seroneutralización de la actividad procoagulante. Se preincubaron distintas dosis del antiveneno con cinco DMP de veneno durante 30 minutos a 37°C. La mezcla se adicionó a 500 μl de plasma humano normal (contenido de fibrinógeno 2.8 g/dl) y se determinó el tiempo de coagulación de los controles positivos (veneno en NaCl) y de las muestras preincubadas con antiveneno. La inhibición de la actividad procoagulante se estimó a partir del incremento en el tiempo requerido para la formación del coágulo, considerándose la dosis inhibitoria a aquella que retrasó al menos 10 veces la formación de un coágulo evidente respecto a los controles.^{32,33}

Estadísticos. Todos los experimentos fueron realizados al menos por triplicado y los resultados expresados como media \pm desviación estándar. Los intervalos de confianza (i.c.) de 95% se expresan entre paréntesis. Para determinar

la significación estadística de los resultados se utilizó la *t* de Student. Los análisis de regresión lineal y regresión no lineal se realizaron por medio de la combinación del software Prisma y Stat Mate (GraphPad Inc. San Diego, California, USA).

Resultados

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Los venenos de vipéridos presentaron componentes desde los 83 KDa a 6.5 KDa. En condiciones reductoras presentaron bandas fuertemente teñidas entre los 83.0 - 47.5, 25 - 32.5 KDa y los 16.5 - 6.5 KDa. Los venenos de *B. undulatus* y *C. scutulatus* mostraron menor cantidad de componentes que los otros vipéridos entre los 25 y 32.5 KDa. El veneno de *Agk billineatus* presentó un perfil muy diferente al de los otros vipéridos, presentando la mayor cantidad de componentes entre los 6.5 - 16.5 KDa y entre 32.5-47.5 KDa (Figura 1.a). En condiciones no reductoras el veneno de *Agk billineatus* fue también el que presentó el patrón más diferenciado (Figura 1.b). En estas condiciones el veneno de *B. asper* presentó las bandas más fuertemente teñidas entre los 16.5 y 25 KDa y el de *B. undulatus* por debajo de los 32.5 KDa a diferencia de los restantes venenos que mostraron las bandas más fuertemente teñidas entre los 32-47.5 y 16.5-25 KDa. Todos los venenos presentaron material entre los 6.5 y 16.5 KDa, tanto en condiciones reductoras como en no reductoras (Figuras 1.a y 1.b). El veneno de *M. nigrocinclus* mostró un patrón muy diferente al de los vipéridos, observándose la mayor cantidad de material por entre los 16.5 y 6.5 y por debajo de los 6.5 KDa, con muy escaso material entre los entre los 47.5-83 KDa (Figura 1.c).

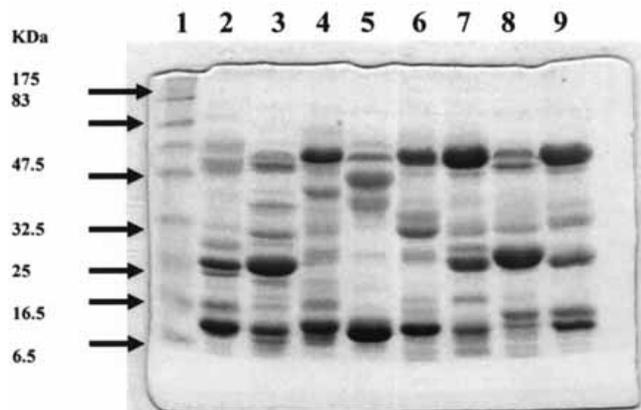


Figura 1.a: Electroforesis en gel de poliacrilamida de venenos de serpientes mexicanas. Se realizó en un gel al 12.5% en condiciones reductoras. En cada carril se corrieron 25 μg de proteínas. Carril 1: Marcadores de peso molecular; Carril 2: *B. Asper*; Carril 3: *B. Nummifer*; Carril 4: *B. Undulatus*; Carril 5: *A. bilineatus*; Carril 6: *C. scutulatus*; Carril 7: *C. Atrox*; Carril 8: *C. basiliscus*; Carril 9: *C. D. Durissus*.

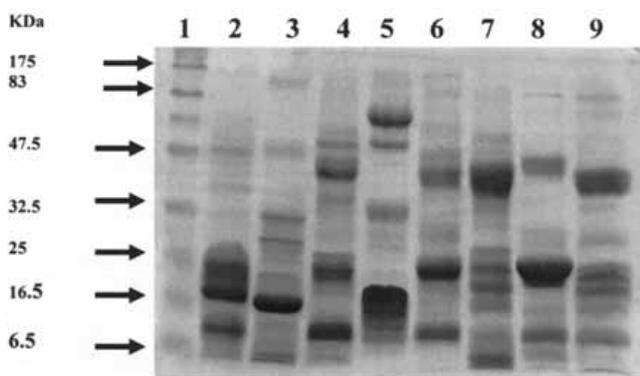


Figura 1.b Electroforesis en gel de poliacrilamida de venenos de serpientes mexicanas. Se realizó en un gel al 12.5% en condiciones no reductoras. En cada Carril se corrieron 25 μ g de proteínas. Carril 1: Marcadores de peso molecular; Carril 2: *B. Asper*; Carril 3: *B. Nummifer*; Carril 4: *B. Undulatus*; Carril 5: *A. Bilineatus*; Carril 6: *C. Scutulatus*; Carril 7: *C. Atrox*; Carril 8: *basiliscus*; Carril 9: *C. D. Durissus*.

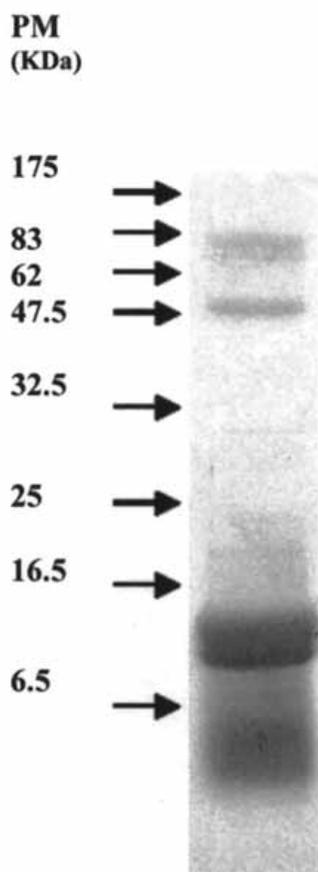


Figura 1.c. Electroforesis en gel de poliacrilamida del veneno de *Micrurus nigrocinctus*. Se realizó en un gel al 12.5% en condiciones reductoras. Se corrieron 25 μ g de proteínas. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda.

Potencia letal. La potencia letal de los venenos fue de $2.3 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$ para *M. nigrocinctus*, $5.7 \pm 0.8 \mu\text{g/g}$ para *C. d. durissus*, $2.3 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$ para *C. scutulatus*, $10.6 \pm 2.8 \mu\text{g/g}$ para *C. basiliscus*, $5.8 \pm 1.0 \mu\text{g/g}$ para *Agk. billineatus*, $2.4 \pm 2.0 \mu\text{g/g}$ para *C. atrox*, $7.0 \pm 1.7 \mu\text{g/g}$ para *Ath. nummifer* y de $2.9 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$ para *B. asper*. Estas actividades se pueden comparar en el cuadro I.

Actividad hemorrágica: Las actividades hemorrágicas halladas expresadas como DMH fueron $77.0 \pm 16.0 \mu\text{g}$ para el veneno de *C. durissus durissus*, $29.0 \pm 4.0 \text{ mg}$ para *C. basiliscus*, 63.8 ± 5.9 para *C. atrox*, $11.5 \pm 4.1 \mu\text{g}$ para *Agk billineatus*, $44.0 \pm 9.4 \mu\text{g}$ para *C. scutulatus scutulatus*, $28.0 \pm 4.8 \mu\text{g}$ para *B. nummifer* y $5.8 \pm 2.0 \mu\text{g}$ para *B. asper*. Estas actividades se pueden comparar en el cuadro I. La actividad hemorrágica no se determinó en el veneno de *M. nigrocinctus* ya que es predominantemente neurotóxico y con este se alcanzan dosis letales antes que se observe alguna alteración en el lugar de inoculación.

Actividad Necrotizante. Las actividades necrotizantes determinadas se expresaron en DMN fueron de $90 \pm 30 \mu\text{g}$ para *Agk billineatus* $59 \pm 7 \mu\text{g}$ para *B. asper*, $82 \pm 24 \mu\text{g}$ para *Ath. nummifer*, $107 \pm 10 \mu\text{g}$ para *C. basiliscus* y de $91 \pm 6 \mu\text{g}$ para *C. d. durissus*. Aunque se ensayó la medición de los venenos de *M. nigrocinctus* y *C. scutulatus*, no se pudo determinar la dosis de veneno requerida para producir necrosis dérmica dado que se produjo la muerte de los animales antes de observar alguna lesión necrótica en la zona de inoculación. (Cuadro I).

Actividad procoagulante en plasma humano. Las dosis halladas para los diferentes venenos fueron de 1.2 mg/l para *B. asper*, 456 mg/l para *C. d. durissus*, 262 mg/l para *Agk billineatus* y 56 mg/l para *Ath. nummifer*. Los venenos de *C. basiliscus*, *C. atrox* y *C. scutulatus* aún con dosis de veneno de $1,500 \text{ mg/l}$ fueron incapaces de producir un coágulo evidente antes de un minuto. Cuadro I.

Actividad procoagulante en fibrinógeno bovino. Las dosis halladas para los diferentes venenos fueron de 259 mg/l para *B. asper*, 623 mg/l para *C. d. durissus* y 386 mg/l para *Ath. nummifer*; los venenos de *C. basiliscus*, *C. scutulatus*, *C. atrox* y *Agk billineatus* no formaron coágulos tras 20 minutos de observación aún con dosis de 7500 mg/l . (Cuadro I).

Actividad fosfolipásica. Todos los venenos mostraron actividad de fosfolipasa A_2 . Las potencias expresadas como la cantidad de veneno (μg) necesaria para producir un halo de hidrólisis de 2 cm de diámetro, fueron $5.8 \pm 0.1 \mu\text{g}$ para *M. nigrocinctus*, $5.6 \pm 0.2 \mu\text{g}$ para *B. asper*, $7.1 \pm 1.4 \mu\text{g}$ para *C. basiliscus*, $7.9 \pm 2.5 \mu\text{g}$ para *Agk. billineatus*, $11.0 \pm 4.5 \mu\text{g}$ para *C. scutulatus*, $14.2 \pm 4.2 \mu\text{g}$ para *C. d. durissus* y $34.4 \pm 9.5 \mu\text{g}$ para *Ath. nummifer*. Los venenos que produjeron la mayor hidrólisis fueron los de *M. nigrocinctus* y *B. asper*, y los que produjeron menor hidrólisis fueron los de *C. scutulatus* y *Ath. nummifer*. Los venenos de *Agk. billineatus*, *C. basiliscus* y *C. scutulatus* mostraron actividades muy parecidas. (Cuadro I).

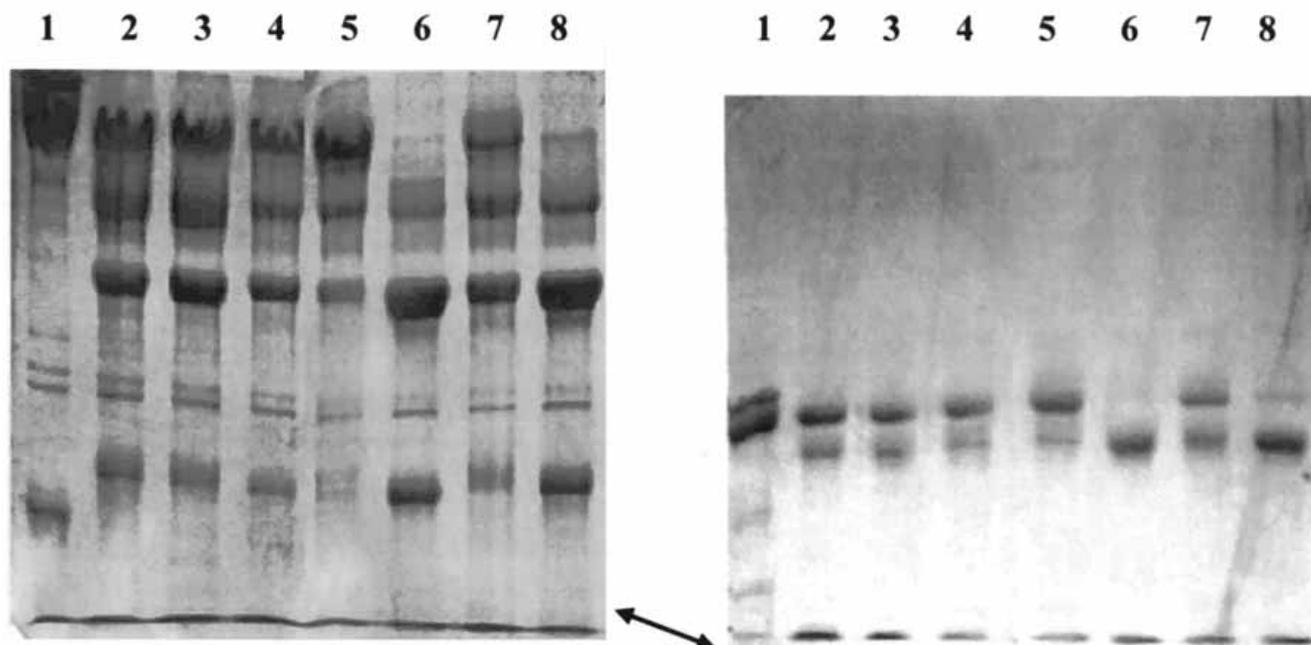


Figura 2. SDS-PAGE de fibrinógeno bovino incubado a 37°C con venenos de las diferentes especies de Crotálidos (90mg de fibrinógeno por µg de veneno). El gel de la izquierda se realizó en condiciones no reductoras y el de la derecha en condiciones reductoras. Siembra: 20 µg de fibrinógeno por Carril. En el medio de ambos gels la flecha inferior indica el frente de corrida en correspondiente a los 14kDa. Carrils: 1- Fibrinógeno en NaCl 0.15 M; 2- C. D. Durissus; 3- C. Basiliscus; 4- C. scutulatus; 5- Bitis gabónica (viérdo africano); 6- Bothrops (Athropoides) nummifer; 7- Agkistrodon billineatus; 8- B. Asper.

Cuadro I.

Veneno	DL ₅₀ (µg/g)	DMH (µg)	DMN (µg)	DMC-P (mg/l)	DMC-F (mg/l)	PLA2 (µg)
<i>B. asper</i>	2.5 ± 0.4	5.8 ± 2.0	59 ± 7	1.15	259.1	5.6 ± 0.2
<i>Ath. Nummifer</i>	7.0 ± 1.7	28.0 ± 14.8	82 ± 24	55.9	386.1	34.4 ± 9.5
<i>C. d. durissus</i>	5.7 ± 0.8	77.0 ± 116.0	91 ± 6	455.6	622.5	14.2 ± 4.2
<i>C. basiliscos</i>	10.6 ± 2.8	29.0 ± 14.0	107 ± 10	ND (#)	ND	7.1 ± 1.4
<i>C. atrox</i>	2.4 ± 3.0	63.8 ± 15.9	NR	ND (*)	ND	1.4 ± 0.4
<i>C. scutulatus</i>	2.3 ± 0.5	44.0 ± 19.4	NR	ND (#)	ND	11.0 ± 4.5
<i>Agk. billineatus</i>	5.8 ± 1.0	11.5 ± 4.1	90 ± 30	262.2	ND	7.9 ± 2.5
<i>M. nigrocinctus</i>	2.3 ± 0.5	ND	ND	ND	ND	5.8 ± 0.1

Actividades biológicas de venenos de serpientes mexicanas de importancia medica. DL₅₀ (dosis letal 50%), DMH (dosis mínima hemorrágica), DMN (dosis mínima necrotizante), DMC-P (dosis mínima coagulante en plasma), DMC-F (dosis mínima coagulante en fibrinógeno). Las DL₅₀, DMH y DMN se expresan en microgramos. Las DMC-P y DMC-F se expresan en mg/l. Los desvíos estándar se expresan con 1. NR: no realizado. ND: no detectable en las condiciones de estudio. (#) Se observó coagulación con tiempos superiores a los 10 minutos. (*) Se observó coagulación con tiempos superiores a los 3 minutos.

Determinación de la actividad sobre el fibrinógeno. Todos los venenos probados hidrolizaron al fibrinógeno (Figura 3). Los venenos de *B. asper* y *Ath. nummifer* fueron los que produjeron la mayor degradación de fibrinógeno, la que se pudo visualizar fácilmente en los gels corridos tanto en condiciones reductoras como no reductoras. Los controles en condiciones reductoras presentaron bandas mayores en el orden de los 40-70 kDa, en correspondencia a las subunidades a, b y g del fibrinógeno bovino, mientras

que en las muestras tratadas con veneno, las bandas más fuertemente teñidas fueron inferiores a los 45 kDa. (Figura 3).

Seroneutralización de las actividades biológicas. Las DE₅₀ del antiveneno probado frente a las diferentes actividades biológicas estudiadas del veneno de *B. asper* fueron: 68 µl (41-114 µl) para la potencia letal (1.36 mg de proteína), 10 ± 3 µl para la potencia hemorrágica (0.2 mg de proteína) y 17 ± 3 µl para la potencia necrotizante (0.34

mg de proteína). La formación de un coágulo evidente en las condiciones de estudio fue inhibida con 200 µl de antiveneno (4mg de proteína).

Discusión

Los venenos poseen las principales actividades tóxicas descritas para los venenos de vipéridos americanos.¹⁹⁻²¹ Las potencias de las actividades tóxicas en general estuvieron dentro de los rangos descritos para venenos de vipéridos de América.¹⁹⁻²¹

Los patrones electroforéticos mostraron diferencias entre los Géneros y entre las especies, tanto en los estudios realizados en condiciones reductoras (Figura 1.a) como en condiciones no reductoras (Figura 1.b). El veneno de *Agk. billineatus* muestra un patrón muy diferente al resto de los Vipéridos. El veneno de *M. nigrocinctus* presentó un patrón muy diferente al de los de vipéridos (Figura 1.c), mostrando la mayoría del material por debajo de los 16 KDa, posiblemente debido a la presencia de α -neurotoxinas las que poseen alrededor de 7 KDa y de fosfolipasas, las que poseen una masa molecular de 13-15 KDa.

Los venenos de *M. nigrocinctus* y *C. scutulatus* fueron los de mayor potencia letal, hecho relacionado con sus características neurotóxicas. El veneno de *C. scutulatus* posee una β -neurotoxina ("mojavetoxina") en cantidades variables, mientras que los componentes neurotóxicos mayores de los venenos de los Elápidos son las α -neurotoxinas que serían las principales causantes de la muerte en estos envenenamientos.³⁴

El veneno de *C. scutulatus scutulatus* puede variar mucho en su composición^{16,35} y esta diferencia puede existir inclusive entre el veneno de la madre y el de sus crías.³⁶ Los venenos de *C. scutulatus* tipo A poseen una cantidad importante de mojavetoxina y su actividad hemorrágica es baja o nula mientras que los del tipo B poseen alta actividad hemorrágica y poca cantidad de esa neurotoxina.³⁷⁻³⁹ Por la presencia de actividad hemorrágica parecería que el veneno con que se trabajó aquí sería del tipo B.

Los venenos de vipéridos que mostraron mayor actividad tóxica en general fueron los de *B. asper* y *C. atrox*. El veneno de *B. asper* en general fue el que presentó las actividades tóxicas más potentes (Cuadro I).

Uno de los fenómenos más conspicuos en el envenenamiento por Vipéridos es la presencia de hemorragias incoercibles por lesiones vasculares e incoagulabilidad sanguínea por afibrinogenemia y/o inhibición de los sistemas hemostáticos y/o trombocitopenia. Todos los venenos estudiados mostraron actividad hemorrágica, hecho esperable si consideramos que los venenos de vipéridos son ricos en hemorraginas⁴⁰⁻⁴² y dado

que del veneno de algunas de las especies estudiadas se han aislado y caracterizado varias hemorraginas.^{38,43-47}

Los venenos mostraron actividad coagulante por mecanismos directos (sobre el fibrinógeno) y indirectos (sobre plasma), siendo especialmente destacable la actividad del veneno de *B. asper*. Los venenos de *B. asper*, *C. d. durissus* y *Ath. nummifer* mostraron tener capacidad coagulante sobre el plasma y sobre el fibrinógeno poniendo en evidencia la presencia de enzimas similares a la trombina. El veneno de *Agk. b. billineatus* solamente mostró actividad coagulante sobre el plasma tal como se observa con el veneno de *Agk. contortrix* que no posee actividad similar a la trombina pero sí posee enzimas que actúan sobre esta última.⁴⁸ En el veneno de *Agk. billineatus* se ha descrito la presencia de una enzima (la bilineobina) que convierte al fibrinógeno en fibrina pero por un mecanismo diferente al de la trombina.⁴⁹ Sin embargo, nosotros no pudimos observar actividad coagulante sobre el fibrinógeno con el veneno de *Agk. billineatus* estudiado. Una explicación pudiera ser una acción fibrinógenolítica en el veneno que no le permita al fibrinógeno formar puentes para convertirse en fibrina estable, tal como se observa con factores hemorrágicos provenientes del veneno de *Lachesis muta muta*, que no forma coágulo con el fibrinógeno pero sí lo hidroliza.⁵⁰⁻⁵² Otra posibilidad pudiera ser que este veneno posea factores que inhiban su acción tipo trombina *in vitro* o que estas enzimas necesiten de algún factor plasmático para poder actuar sobre el fibrinógeno. Los venenos de *C. basiliscus*, *C. atrox* y *C. scutulatus* no produjeron la formación de coágulos sobre plasma o fibrinógeno en las condiciones de estudio.

Si bien las técnicas utilizadas no pueden discriminar si las enzimas fibrinógenolíticas son también fibrinolíticas, es posible afirmar que todos los venenos estudiados poseen actividad fibrino(geno)lítica directa importante, sin intervención de la plasmina. Los venenos que produjeron mayor degradación del fibrinógeno fueron los de *B. asper* y *Ath. nummifer*, es decir, aquéllos con mayores potencias coagulantes sobre el plasma y sobre el fibrinógeno. Por otro lado, estos dos venenos fueron los que presentaron mayor actividad hemorrágica.

En algunos de estos venenos ya se han descrito enzimas fibrinolíticas como es el caso de la basilasa en *C. basiliscus*,⁵³ la atroxasa en *C. atrox* y otras en el veneno de *Agk. billineatus*.⁵⁴⁻⁵⁶ Por otro lado las enzimas hemorrágicas (hemorraginas) poseen actividad sobre el fibrinógeno y se les atribuye un papel importante en la génesis y mantenimiento de los procesos hemorrágicos.^{41,42,57-59}

Si bien los venenos de *C. basiliscus*, *C. scutulatus* y *C. atrox* no produjeron coágulos evidentes por las técnicas utilizadas, todos fueron capaces de actuar sobre el fibrinógeno hidrolizándolo. Por otro lado, en los venenos de *C. atrox* y *C. basiliscus* se han descrito la presencia de componentes con fuerte actividad protrombínica⁶⁰ y

también la de componentes fuertemente fibrinolíticos.⁵⁶ Esto complica el análisis de los resultados obtenidos con estos venenos, siendo que pudimos observar actividad fibrinolítica o fibrinogénolítica, pero no la actividad protrombínica descrita para los mismos. Una explicación parcial podría encontrarse en la alta variabilidad descrita para los venenos provenientes de diferentes regiones,⁶¹ aún considerando una misma especie de serpiente.

Por los métodos de estudio utilizados todos los venenos mostraron al menos dos de las actividades relacionadas con los procesos hemorrágicos en los envenenamientos por viperinos (actividad hemorrágica, coagulante en plasma, protrombínica y fibrinolítica).

Exceptuando el veneno de *Ath. nummifer*, el estudio de la regresión lineal entre las potencias necrotizantes y las fosfolipásicas mostró una buena correlación ($r^2=0.9$). Sin embargo, en los venenos de *Bothrops* existen miotoxinas que, aun perteneciendo a la familia de las fosfolipasas A_2 , no tienen actividad catalítica (fosfolipasas K49).^{62,63} Por otro lado, los fenómenos necróticos pueden deberse no sólo a la acción de componentes citotóxicos sino también a fenómenos isquémicos.^{64,65} Adicionalmente, los venenos de Crotálidos de Norteamérica son una fuente rica de alfa-miotoxinas,⁶⁶ componentes que se encuentran en mucha menor cantidad en los venenos de los Crotálidos de Sudamérica.⁶⁷ A causa de esto, no se debe correlacionar necesariamente a la actividad fosfolipásica con la ocurrencia de necrosis *in vivo*. Por otro lado, la técnica utilizada para la determinación de la necrosis en piel no indica necesariamente la actividad miotóxica del veneno.

La potencia letal de los venenos viperinos tuvo una buena correlación con la capacidad necrotizante en piel de los venenos ($r^2=0.8$) de manera similar a la que se observa con algunos venenos de Crotálidos de Sudamérica.^{20,68} No se encontró buena correlación entre las demás actividades y la potencia letal de estos venenos.

El antiveneno inhibió de forma eficiente las actividades tóxicas probadas del veneno de *B. asper*, un hecho esperable, dado que éste es uno de los antivenenos de uso rutinario para tratar los envenenamientos por serpientes en México, y se produce utilizando como uno de sus inmunógenos principales el veneno de *B. asper*.

Los resultados contenidos en este trabajo son un aporte para el mejor conocimiento de la toxicidad de los venenos de serpientes de esta parte de Norteamérica y posiblemente alienten y brinden una base a los interesados en el estudio de la toxicidad de los venenos de serpientes mexicanas y de la capacidad neutralizante de los antivenenos utilizados para el tratamiento de sus mordeduras.

Referencias

- World Health Organization. Progress in the Characterization of Venoms and Standardization of Antivenoms. Offset Publication, WHO, Geneva, 1981.
- Reid HA, Theakston RDG. The management of snake bite. Bulletin of the World Health Organization 1983;61:885-895.
- Russell FE, Walter FG, Bey TA, Fernández MC. Snakes and snakebite in Central America. Toxicon 1997;35:1469-1522.
- Costa Cardoso JL, Fan HW. Snakebites in South America. En: Mejer J, White J. (eds.): Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. CRC Press, Boca Raton. 1995.PP. 261-329.
- Sasa M, Vazquez S. Snakebite envenomation in Costa Rica: a revision of incidence in the decade 1990-2000. Toxicon 2003;41:19-22.
- Julia Zertuche J. Mexican reptiles of significance for public health and their geographic distribution. Salud Pública Mex 1981;23:329-343.
- Sotelo Cruz N, Cruz-Ozuna SL. Rattlesnake bites in children. Bol Med Hosp Infant Mex 1986;43:558-564.
- Sotelo Cruz N. Envenenamiento por mordedura de serpiente de cascabel, años a la salud y su tratamiento en edad pediátrica. Gac Méd Méx 2003;139:347-324.
- Tay Zabala J, Díaz Sánchez JG, Sánchez Vega JT, Ruiz Sánchez D, Castillo L. Serpientes y reptiles de importancia médica en México: Revista de la Facultad de Medicina 2002;45:212-219.
- Farmacopea de los Estados Mexicanos. 70 Edición. Dirección General de Control de Insumos para la Salud y Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Mexicanos. 2002. PP. 1803-185.
- Vidal JC. Venenos de serpientes. Bioquímica y Farmacología. Ciencia e Investigación 1976;32:3-23.
- Mebis D. Pharmacology of reptilian venoms. En Biology of the reptilia, Carl Gans, Ed. Vol.VIII, Cap.4., Acad. Press, N. York-London. 1989. PP. 437-559
- Hawgood BJ. Crotoxin, the phospholipase A_2 neurotoxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. Mem. Inst. Butantan 1990;52(supl.):21-22.
- Kaiser II, Aird SD. A crotoxin homolog from the venom of the uracoan rattlesnake (*Crotalus vegrandis*). Toxicon 1987;25:1113-1120.
- Rael ED, Knight RA, Zepeda H. Electrophoretic variants of Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) venoms and migration differences of Mojave toxin. Toxicon 1984;22:980-985.
- Glenn JL, Straight RC. Venom characteristics as an indicator of hybridization between *Crotalus viridis viridis* and *Crotalus scutulatus scutulatus* in New Mexico. Toxicon 1990;28:857-862.
- Bush SP, Cardwell MD. Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) identification. Wilderness Environ Med 1999;10:6-9.
- Farstad D, Thomas T, Chow T, Bush S, Stiegler P. Mojave rattlesnake envenomation in southern California: a review of suspected cases. Wilderness Environ Med 1997;8:89-93.
- Theakston RDG, Reid HA. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. Bulletin of the World Health Organization 1983;61:949-956.
- Ferreira ML, Moura Da Silva AM, Franca FOS, Cardoso JL, Mota I. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. Toxicon 1992;30:1063-1068.
- Sanchez EF, Freitas TB, Ferreira-Alves DL, Velarde DT, Diniz MR, Cordeiro MN, Agostini-Cotta G, Diniz CR. Biological activities of venoms from South American snakes. Toxicon 1992;30:95-103.
- Minton SA. Toxicity of venoms from some little known Mexican rattlesnakes. Toxicon 1977;15:580-581.
- Possani LD, Sosa BP, Alagon AC, Burchfield PM. The venom from the snakes *Agkistrodon bilineatus Taylori* and *Crotalus durissus Totonacus*: lethality, biochemical and immunological properties. Toxicon 1980;18:356-360.
- Glenn JL, Straight RC. Venom properties of the rattlesnakes (*Crotalus*) inhabiting the Baja California region of Mexico. Toxicon 1985;23:769-775.
- Russell FE. Snake venom immunology: historical and practical considerations. J. Toxicol -Toxin Rev 1989;7:1-82.
- Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. Toxicon 1998;36:823-846.
- García Willis CE. Treatment evolution Using Fabootherapics in Patients Suffering from Snakebites at the General Hospital of Tampico, Tamaulipas State. México. J Venom Anim Toxins 2001;7:336.
- Laemmli UK. Cleavage of structural during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685.
- Santoro ML, Sano Martins I. Different Clotting mechanisms of *Bothrops jararaca* snake venom on human and rabbit plasmas. Toxicon 1993;31:733-742.
- Meier J, Theakston RDG. Aproximate LD_{50} determinations of snakes venoms using eight to ten experimental animals. Toxicon 1986;24:395-401.
- Ferreira ML, Moura Da Silva AM, Mota I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. Toxicon 1992;30:1591-1602.
- de Roodt AR, Dolab JA, Fernández T, Segre L, Hajos SE. Cross reactivity and heterologous neutralization of crotaline antivenoms used in Argentina. Toxicon 1998;36:1025-1038.
- de Roodt AR, Vidal JC, Litwin S, Dolab JA, Hajos SE, Segre L. Neutralización cruzada del veneno de *Bothrops jararacussu* por sueros antiofídicos heterólogos. Medicina (Buenos Aires), 1999;59:238-242.
- Tu A, Miller RA. Biochemical studies of the sea snake neurotoxins. Mem. Inst. Butantan 1989;51:177-193.

35. **Glenn JL, Straight RC, Wolfe MC, Hardy DL.** Geographical variation in *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) venom properties. *Toxicon* 1983;21:119-130.
36. **Rael ED, Lieb CS, Maddux N, Varela-Ramirez A, Perez J.** Hemorrhagic and Mojave toxins in the venoms of the offspring of two Mojave rattlesnakes (*Crotalus scutulatus scutulatus*). *Comp. Biochem Physiol B* 1993;106:595-600.
37. **Huang SY, Perez JC, Rael ED, Lieb C, Martinez M, Smith SA.** Variation in the antigenic characteristics of venom from the Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*). *Toxicon* 1992;30:387-396.
38. **Martinez M, Rael ED, Maddux NL.** Isolation of a hemorrhagic toxin from Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) venom. *Toxicon* 1990;28:685-694.
39. **Sanchez EE, Garcia C, Perez JC, De La Zerda.** The detection of hemorrhagic proteins in snake venoms using monoclonal antibodies against Virginia opossum (*virginiana*) serum. *Toxicon* 1998;36:1451-1459.
40. **Mandelbaum FR.** Snake venoms hemorrhagins. *Mem Inst Butantan* 1990;52(supl.):35-36.
41. **Bjarnasson JB, Fox JW.** Hemorrhagic metalloproteinases from snakes venoms. *Pharmac Ther.* 1994;62:325-372.
42. **Gutiérrez JM, Rucavado A.** Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 2000;82:841-850.
43. **Imai K, Nikai T, Sugihara H, Ownby CL.** Hemorrhagic toxin from the venom of *Agkistrodon bilineatus* (common cantil). *Int J Biochem* 1989;21:667-673.
44. **Lomonte B, Gutierrez JM, Borkow G, Ovadia M, Tarkowski A, Hanson LA.** Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH- 1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells in vitro. *Toxicon* 1994;32:505-510.
45. **Franceschi A, Rucavado A, Mora N, Gutiérrez JM.** Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 2000;38:63-78.
46. **Ownby CL, Nikai T, Imai K, Sugihara H.** Pathogenesis of hemorrhage induced by bililtoxin, a hemorrhagic toxin isolated from the venom of the common cantil (*Agkistrodon bilineatus bilineatus*). *Toxicon* 1990;28:837-846.
47. **Nikai T, Taniguchi K, Komori Y, Masuda K, Fox JW, Sugihara H.** Primary structure and functional characterization of bililtoxin- 1, a novel dimeric P-II snake venom metalloproteinase from *Agkistrodon bilineatus* venom. *Arch Biochem Biophys* 2000;378:6-15.
48. **Bajwa SS, Kirakossian H, Reddy KN, Markland FS.** Thrombin-like and fibrinolytic enzymes in the venoms from the Gaboon viper (*Bitis gabonica*), eastern cottonmouth moccasin (*Agkistrodon p. piscivorus*) and southern copperhead (*Agkistrodon c. contortrix*) snakes. *Toxicon* 1982;20:427-32.
49. **Komori Y, Nikai T, Ohara A, Yagihashi S, Sugihara H.** Effect of bilineobin, a thrombin-like proteinase from the venom of common cantil (*Agkistrodon bilineatus*). *Toxicon* 1993;31:257-270.
50. **Estevao-Costa MI, Diniz CR, Magalhaes A, Markland FS, Sanchez EF.** Action of metalloproteinases mutalysin I and II on several components of the hemostatic and fibrinolytic systems. *Thromb Res* 2000;99:363-76.
51. **Sanchez EF, Costa ME, Chavez Olortegui C, Assakura MT, Mandelbaum FR, Diniz CR.** Characterization of a hemorrhagic factor, LHF- 1, isolated from the Bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) venom. *Toxicon* 1995;33:1653-1667.
52. **Sanchez EF, Santos CI, Magalhaes A, Diniz CR, Figueiredo S, Gilroy J, Richardson M.** Isolation of a proteinase with plasminogen-activating activity from *Lachesis muta muta* (buslinmaster) snake venom. *Arch Biochem Biophys* 2000;378:131-41.
53. **Datta G, Dong A, Witt J, Tu AT.** Biochemical characterization of basilase, a new fibrinolytic enzyme from *Crotalus basiliscus basiliscus*. *Arch Biochem Biophys* 1995;317:365-373.
54. **Ramirez MS, Sanchez EE, Garcia-Prieto C, Perez JC, Chapa GR, McKeller MR, Ramirez R, De Anda Y.** Screening for fibrinolytic activity in eight Viperid venoms. *Comp Biochem Physiol C* 1999;124:91-98.
55. **Retzios AD, Markland FS Jr.** A direct-acting fibrinolytic enzyme from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix*: effects on various components of the human blood coagulation and fibrinolysis systems. *Thromb Res* 1988;52:541-552.
56. **Willis TW, Tu AT.** Purification and biochemical characterization of atroxase, a non hemorrhagic fibrinolytic protease from Western diamondback rattlesnake venom. *Biochemistry* 1988;27:4769-4777
57. **Markland FS.** Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 1998;36:1749-1800.
58. **Maruyama M, Sugiki M, Yoshida E, Shimaya K, Mihara.** Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in haemorrhage. *Toxicon* 1992;30:1387-1397
59. **Markland FS, Perdon A.** Comparison of two methods for proteolytic enzyme detection in snake venom. *Toxicon* 1986;24:385-393.
60. **Markland FS.** Crotalase. *Method of Enzymology* 1976;45:223-236.
61. **Chippaux JP, Williams V, White J.** Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 1991;29:1279-1303.
62. **Fletcher JE, Jiang MS.** Lys49 phospholipase A₂ lyse cell cultures by two distinct mechanisms. *Toxicon* 1998;36:1549-1556.
63. **Gutiérrez JM, Lomonte B.** Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 1995;33:1405-1424.
64. **Queiroz LS, Petta CA.** Histopatological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1984;26:247-253.
65. **Queiroz LS, Santo Neto H, Rodriguez-Simioni L, Prado-Franceschi J.** Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 1984;22:339-346.
66. **Mebs D, Ownby CL.** Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmacol Ther* 1990;48:223-236.
67. **Saravia P, Rojas E, Arce V, Guevara C, Lopez JC, Chaves E, Velasquez R, Rojas G, Gutierrez JM.** Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: pathophysiological and therapeutic implications. *Rev Biol Trop* 2002;50:337-346.
68. **de Roodt AR.** Estudio Inmunobiológico del Veneno de Serpientes de Importancia Sanitaria de la Argentina, Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, 2002.