

CARACTERIZACIÓN TOXINOLÓGICA DEL VENENO TOTAL DE LA SERPIENTE DE CASCABEL *Crotalus durissus cumanensis* (VIPERIDAE), PRESENTE EN LA LOCALIDAD DE PORSHOURE, GUAJIRA VENEZOLANA

Toxinological Characterization of the Whole Venom of the Rattlesnake *Crotalus durissus cumanensis* (Viperidae) from Porshoure, Venezuelan Guajira

Rafael del Carmen Pirela De las Salas¹, Juan Carlos López-Jonsthon² y Jim Lenrry Hernández Rangel¹

¹Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. ²Laboratorio de Investigaciones, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Teléfonos: Int-58-261-7831476, 58-414-3640345. Fax: int-58-261-7598109. E-mail: rafael_pirela@walla.com

RESUMEN

En el presente trabajo se caracterizó toxinológicamente el veneno total de la serpiente de cascabel *Crotalus durissus cumanensis* presente en la localidad de Porshoure, Guajira venezolana, determinando: dosis letal cincuenta (DL₅₀), actividad hemorrágica, actividad edematizante, actividad hemolítica indirecta, actividad coagulante sobre plasma humano (*in vitro*) y actividad desfibrinante (*in vivo*), según las metodologías establecidas por la Organización Mundial de la Salud. Los resultados obtenidos mostraron que el veneno de esta subespecie es altamente tóxico, de naturaleza neurotóxica y coagulante. A nivel local produjo poca hemorragia y edema al compararlo con el veneno de otras serpientes de la misma subespecie, entre ellas *Crotalus durissus cumanensis* de la Villa del Rosario, estado Zulia; *Crotalus durissus terrificus* y *Crotalus durissus durissus* de Costa Rica y Brazil; *Crotalus durissus terrificus* de Colombia; *Crotalus durissus ruruima*, *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus collilineatus*, entre otras. También resultó ser poco hemolítico y con características desfibrinantes (*in vivo*); efecto que hasta ahora no había sido reportado para serpientes pertenecientes al género *Crotalus*, lo que sin duda alguna constituye un valioso aporte para el diagnóstico y tratamiento del accidente crotálico en Venezuela.

Palabras clave: *Crotalus durissus cumanensis*, Viperidae, guajira venezolana, veneno, caracterización toxinológica.

ABSTRACT

The whole venom of the rattlesnake *Crotalus durissus cumanensis* (Viperidae) from Porshoure, Venezuelan Guajira, was characterized toxinologically in this research, determining: lethal dose 50 (LD₅₀), bleeding, edematous and hemolytic activity, coagulant activity on human plasma (*in vitro*) and fibrinolytic activity, according to the methodologies outlined by the World Health Organization. The results demonstrated that the venom of the studied species is highly toxic, neurotoxic and coagulant. Local effects such as the hemorrhage and edema were not highly marked in comparison with other snakes' venoms of the same subspecies as *Crotalus durissus cumanensis* from La Villa del Rosario, Zulia state; *Crotalus durissus terrificus* from Costa Rica and *Crotalus durissus durissus* from Brazil; *Crotalus durissus terrificus* from Colombia and *Crotalus durissus ruruima*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. The venom was slightly hemolytic and with fibrinolytic characteristic (*in vivo*). This effect has not yet been described within the genus *Crotalus*, what is a significant addition to the information of diagnosis and treatment of the rattlesnake bites in Venezuela.

Key words: *Crotalus durissus cumanensis*, Viperidae, Venezuelan guajira, venom, toxinological characterization.

INTRODUCCIÓN

El accidente ofídico representa un importante problema de salud pública en las zonas tropicales y subtro-

picales del mundo. Se estima que a lo largo del mundo, cada año más de 2,5 millones de personas son mordidas por serpientes venenosas resultando en alrededor de 120.000 muertes en las regiones tropicales de Asia, África y América Latina, afectando con mayor frecuencia a la población de trabajadores rurales, sobre todo a campesinos jóvenes que se encuentran en plena actividad productiva [18, 35]. Considerando la data proporcionada por la Dirección de Epidemiología y Análisis Estratégico (DEAE) del Ministerio de Sanidad y Desarrollo Social (MSDS) de Venezuela, divididas por entidades federales, se estimó que en el país para el lapso 1999-2003 se presentó una tasa de morbilidad por mordedura de serpiente, de 4.536 casos por cada 100.000 habitantes, siendo el estado Zulia la entidad federal con mayor índice y en la que las mordeduras por serpientes de cascabel son muy frecuentes [5]. Para el año 2001, en los primeros seis meses (enero-Junio) se registraron un total de 32 casos de mordedura por serpiente para el municipio Páez [28]. Esta cifra no representa la totalidad de los casos puesto que en la mayoría de los afectados por mordedura de serpientes no acuden a los centros asistenciales de esta región ya que, al ser zona fronteriza con la República de Colombia, permite el éxodo hacia los centros asistenciales de ese país.

La serpiente *Crotalus durissus cumanensis* es una de las dos subespecies de *Crotalus durissus* presentes en Venezuela, junto con la *Crotalus durissus ruruima* que se encuentra en el estado Bolívar. Su distribución comprende gran parte del país, desde el nivel del mar hasta unos 2.500 metros sobre el mismo [20].

Clínicamente, los efectos causados por envenenamiento por serpientes, se clasifican en sistémicos y locales [10]. Los envenenamientos por mordeduras de serpientes de la familia *Viperidae*, subfamilia *Crotalinae* son caracterizados por prominentes alteraciones a nivel local; incluyendo hemorragia, edema y necrosis, efectos que pueden resultar en secuelas permanentes; desarrollándose muy rápidamente después del envenenamiento [15]. Estos no sólo son los venenos más complejos, en comparación con los de los venenos de otras familias, sino también contienen las proteínas de mayor peso molecular. El cuadro clínico manifestado resulta de la combinación de los diferentes efectos producidos por los componentes proteicos presentes en el veneno [3, 14, 17, 21, 22, 26, 27].

Los efectos tóxicos de mordeduras de las serpientes de cascabel, principalmente son debido a las proteinasas presentes en el veneno. Algunas de ellas causan daño considerable del tejido a nivel local como edema, formación de ampollas, hemorragias y mionecrosis tisular [38]. Los fenómenos de sangrado y exudación que se producen a niveles local y sistémico originan un cuadro hipovolémico que puede evolucionar hacia un choque cardiovascular [4].

Como los venenos de las serpientes poseen una composición variable, también existen diferencias importantes en las actividades enzimáticas y en los efectos locales y sis-

témicos no sólo entre distintas especies de la misma familia, sino también diferencias intraespecíficas entre poblaciones de distintas zonas geográficas [9, 26, 36]. Como consecuencia, los venenos de las diferentes especies y entre individuos de la misma especie, pero de distintas poblaciones, producen distintos efectos locales y sistémicos, por lo que se requiere un tratamiento clínico diferente para cada caso [7]. La presente investigación tiene como objetivo caracterizar toxicológicamente el veneno total de la serpiente de cascabel *Crotalus durissus cumanensis* presente en la localidad de Porshoure guajira venezolana; empleando las pruebas biológicas recomendadas por la World Health Organization (WHO) [39] y el Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica [18]; entre las que figuran la determinación de la DL₅₀, actividad hemolítica indirecta, hemorragia, edema, actividad coagulante y actividad desfibrinante. Los valores reportados serán utilizados como referencia para la caracterización del veneno de esta subespecie y será un importante aporte en el estudio de las serpientes venenosas de esta zona. Así mismo, esta información permitirá que este veneno, según sus características toxicológicas, sea considerado para su inclusión como inmunógeno en la formación de anticuerpos para la producción de antiveneno ofídico en nuestro país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación geográfica

La Guajira venezolana está adjudicada al municipio Páez, situado en el extremo noroccidental del estado Zulia. Su superficie es de 2.369 km² y sus tierras circundan por su parte occidental las aguas del Golfo de Venezuela. Se encuentra políticamente dividida en cuatro parroquias: Sinamaica, Elías Sánchez Rubio, Guajira y Alta Guajira. La localidad de Porshoure es un asentamiento indígena de la etnia wayúu perteneciente a la parroquia Alta Guajira, ubicado entre las coordenadas 11°42'55" N 071°33'50" W y a 2 m.s.n.m.

Obtención de la muestra de veneno

El veneno fue obtenido por extracción manual (ordeño), cada veintiún (21) días, durante los meses de mayo, junio y julio de 2003 de trece (13) individuos adultos de *Crotalus durissus cumanensis* colectados en la localidad de Porshoure, Guajira Venezolana. El veneno fue cristalizado al vacío, en un desecador de cristal provisto de sílica gel como agente higroscópico y almacenado en refrigeración a 4°C, hasta el momento del análisis.

Animales de experimentación

Se emplearon ratones albinos (*Mus musculus*) de la cepa BALB/C, con pesos y sexos preestablecidos en cada prueba, del bioterio del Instituto de Biomedicina, del Hospital Vargas, Universidad Central de Venezuela, Caracas-Venezuela.

Determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀) y sintomatología

La DL₅₀ se determinó mediante el método de Spearman & Karber, propuesto por la WHO [39], inyectando por la vía intraperitoneal (*i.p*) un volumen de 0,2 mL de diluciones seriadas de veneno, en ratones machos albinos, con pesos entre 18 y 20 g. Se emplearon cuatro ratones por dosis para un total de cinco dosis a ensayar. Los animales fueron mantenidos en observación durante un período de 48 horas y se anotaron sus signos clínicos. Los animales del grupo control se inyectaron con solución salina isotónica.

Determinación de la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM)

La actividad hemorrágica se expresa como Dosis Hemorrágica Mínima (DHM), que es la dosis mínima de veneno capaz de producir una lesión hemorrágica subcutánea con un diámetro de 10 mm, en un tiempo de dos horas. Se utilizó el método propuesto por el Instituto Clodomiro Picado [18], basado en el método de Kondo y col. [19]. Se inyectaron dosis seriadas sub-letales de 0,1 mL de veneno disuelto en solución fisiológica, por la vía intradérmica (*i.d*), en la zona abdominal de ratones albinos de laboratorio machos, con pesos entre 26 y 28 g. Se utilizaron cuatro ratones por dosis ($n = 4$), para un total de seis (6) dosis más control negativo de hemorragia. Los controles de hemorragia se inyectaron con solución fisiológica. Transcurrida una hora de la última inyección, se procedió a sacrificar los ratones por dislocación cervical mecánica; se descubrieron las zonas internas de la piel donde se administró la solución de veneno y se midieron las áreas hemorrágicas para determinar el diámetro de las mismas.

Determinación de la Dosis Hemolítica Indirecta Mínima (DH_{IM})

Se empleó la técnica descrita por el Instituto Clodomiro Picado [18] y modificada por Gutiérrez y col. [12].

El soporte utilizado consistió en una mezcla de agar sangre y yema de huevo en placas de petri. Luego se procedió a realizar perforaciones empleando un sacabocado de 3 mm de diámetro, en las cuales fueron dispensados 15µl de las dosis de veneno disueltas en solución fisiológica.

Las placas se incubaron en una estufa a una temperatura de 37°C durante 24 horas, se midieron los diámetros de las áreas de hemólisis de cada una de las dosis. Para la realización de los experimentos se emplearon 5 placas ($n = 5$), cada una con 5 perforaciones donde fueron colocadas las diferentes dosis y una perforación adicional fue utilizada para la solución fisiológica, como control negativo de hemólisis.

Determinación de la Dosis Coagulante Mínima (DCM) sobre plasma humano

Se utilizó el método propuesto por el Instituto Clodomiro Picado [18]. La actividad coagulante se determinó agregando un volumen de 0,1 mL de cada una de las diluciones seriadas de veneno a las alícuotas de plasma humano citratado (0,2 mL),

mezclando suavemente por inversión y midiendo el tiempo de aparición de un coágulo sólido, empleando para esto un cronómetro.

Determinación de la Dosis Desfibrinante Mínima (DDM)

Se utilizó el método propuesto por el Instituto Clodomiro Picado [18]. Se prepararon 5 dosis de diluciones seriadas de las muestras de veneno, se inyectaron 0,2 mL de cada dilución en grupos de cuatro ratones ($n = 4$) hembras, con pesos comprendidos entre los 18 y 20 g, por la vía intravenosa (*i.v.*). Como control negativo se utilizó solo solución fisiológica. Una hora posterior a las inyecciones y bajo anestesia con éter, se extrajeron 200 µL de sangre, a través de un corte de la arteria braquial. Las muestras de sangre se colocaron en tubos de vidrio y se incubaron a temperatura ambiente. Se define como Dosis Desfibrinante Mínima (DDM) a la cantidad de veneno que produjo incoagulabilidad en todos los ratones inyectados después de dos horas.

Determinación de la Dosis Edematizante Mínima (DEM)

Se utilizó el método propuesto por el Instituto Clodomiro Picado [18]. Se prepararon cinco (5) dosis de veneno a ensayar, utilizando solución salina isotónica como diluyente. Se inyectó 0,05 mL de cada solución en la almohadilla plantar del miembro posterior derecho a grupos de cuatro ratones albinos ($n = 4$), hembras, con pesos comprendidos entre los 20 y 22 g. En la almohadilla plantar del miembro posterior izquierdo se inyectó con 0,05 mL de solución fisiológica como control. Una hora después de las inyecciones, se procedió a sacrificar los animales por dislocación cervical mecánica, seguidamente, se cortó a la altura de la articulación tarsal, los dos miembros posteriores inyectados, empleando una tijera. Se define como Dosis Edematizante Mínima (DEM) a la cantidad de veneno que induce un incremento del 30% de edema, con respecto al miembro posterior control.

Análisis estadístico

Para las pruebas de determinación de la dosis hemorrágica, hemolítica indirecta y coagulante, se construyeron gráficas dosis-respuesta con curvas de regresión lineal con transformaciones semilogarítmicas, utilizando la hoja de cálculo Microsoft Excel para Windows. Cada una de las dosis fue calculada a través de la ecuación de la recta obtenida a partir de los valores de la gráfica. Se calcularon los valores de "r" y "r²", considerándose regresiones significativas a un intervalo de confianza del 95% ($P < 0,05$).

Igualmente se calculó la media aritmética y la desviación estándar de cada una de las determinaciones, empleando estadística descriptiva.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La TABLA I muestra los valores obtenidos en la determinación de las actividades farmacológicas para el veneno total de la serpiente de cascabel *Crotalus durissus cumanensis* pre-

TABLA I
ACTIVIDADES FARMACOLÓGICAS DEL VENENO TOTAL
DE LA SERPIENTE DE CASCABEL *Crotalus durissus*
***cumanensis*, PRESENTE EN LA LOCALIDAD**
DE PORSHOURE, GUAJIRA VENEZOLANA /
FARMACOLOGICALS ACTIVITIES OF THE TOTAL VENOM
OF THE RATTLESNAKE *Crotalus durissus cumanensis*, PRESENT
IN PORSHOURE, VENEZUELAN GUAJIRA

Actividades	Veneno total
DL ₅₀ i.p	0,210 (mg/Kg)
DHM	78,22 ± 2,18* (µg/ratón)
DHeIM	379,51 ± 67,67*
DCM (µg/t)	13, 5 ± 0,79*
DDM	5 (µg/ratón)
DEM	(-)(µg/ratón)

Resultados: Media ± desviación estándar; i.p: vía de administración intraperitoneal; (-): No presenta actividad; *Límite de confianza 95% (P<0,05).

DL₅₀= Dosis letal 50. DHM= Dosis hemorrágica mínima. DHeIM= Dosis hemolítica indirecta mínima. DCM= Dosis coagulante mínima. DDM= Dosis desfibrinante mínima. DEM= Dosis edematizante mínima.

sente en la localidad de Porshoure, guajira venezolana. El veneno presentó una Dosis Letal 50 (*i.p.*) de 0,210 mg/Kg, mostrándose altamente tóxico, al compararlo con los reportados por Grillo y col. [16] (54,428 mg/Kg) con el veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de la localidad de Clarines, estado Anzoátegui, Venezuela. Por otro lado Montilla y col. [24] reportan un valor de 0,789 mg/Kg, de un pool de veneno obtenido de serpientes de cascabel de distintas zonas del estado Zulia, mientras que Saravia y col. [31] obtienen un valor de DL₅₀ de 0,176 mg/Kg, con *Crotalus durissus cumanensis* de la Villa del Rosario, estado Zulia; siendo estos valores muy cercanos al obtenido en este estudio. Los signos observados, fueron: convulsiones tónico-clónicas, incoordinación motora y disnea, típicos para un veneno neurotóxico.

La determinación de la actividad hemorrágica arrojó un valor de 78,22 ± 2,18 µg de veneno para producir un halo hemorrágico de 10 mm de diámetro en un tiempo de 2 horas. Al comparar este resultado con el efecto hemorrágico obtenido por Saravia y col. [31] (24,0 ± 1,8 µg) para el veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de Villa del Rosario, estado Zulia, Venezuela, se observa que este último manifestó una mayor potencia. Franceschi y col. [8], señalan que el envenenamiento producido por serpientes pertenecientes a las subfamilias Crotalinae se caracteriza por un complejo cuadro fisiopatológico en el cual una hemorragia marcada a nivel local es frecuentemente observada [23, 32, 37].

La determinación de la actividad hemolítica indirecta arrojó un valor de 379,51 ± 67,67 µg de veneno para producir un halo hemolítico de 20 mm de diámetro. Resultados similares fueron los reportados por Dos Santos y col. [6], con *Crotalus durissus ruruima* de Brasil con un valor de 310 µg de veneno, para el veneno blanco y de 350 µg para el veneno amarillo,

seguidos por *Crotalus durissus terrificus* de Brasil con una dosis de 970 µg y finalmente el veneno de *Crotalus durissus durissus* de Guatemala, reportado por Rojas y col. [29], quienes necesitaron dosis mayores a los 1000 µg, para producir el efecto hemolítico sobre las células rojas. Con esta prueba se corrobora lo reportado por Otero y col. [26] y Dos Santos y col. [6]; en la que se demuestra que los venenos de muchas de las serpientes de cascabel suramericanas son poco activos en convertir la lecitina en lisolecitina y favorecer así la lisis de los eritrocitos [38].

La actividad coagulante del veneno estudiado fue dosis dependiente, con actividad pro coagulante en todas las concentraciones ensayadas y una dosis coagulante mínima de 13, 5 ± 0,79 µg, valor similar al de *Crotalus durissus terrificus* del nororiente de Argentina reportado por Sánchez y col. [32] (13,0 µg); y al de los adultos de *Crotalus durissus durissus* de Guatemala [31] (19,0 µg). Al ser comparado con el valor reportado por Saravia y col. [31] (31,4 µg), para la misma subespecie presente en La Villa del Rosario, estado Zulia, Venezuela, la dosis coagulante mínima obtenida en este trabajo requiere de una cantidad menor de veneno para lograr el efecto coagulante, aun cuando ambas subespecies están presentes en localidades relativamente cercanas, pero con características biogeográficas diferentes; lo que confirma que la composición de los venenos suelen presentar variaciones, no solo entre individuos de la misma especie; sino también, entre individuos de la misma subespecie de distintas zonas geográficas, así como está reportado en trabajos anteriores [1, 9, 25, 26].

En la prueba de desfibrinación determinada, *in vivo*, se reporta que el veneno total de la serpiente de cascabel estudiado es capaz de producir incoagulabilidad sanguínea, presentando una dosis desfibrinante mínima de 5 µg. El veneno total de la serpiente objeto de estudio demostró un claro efecto anticoagulante, a diferencia de los resultados reportados por Sánchez y col. [32] con distintos especímenes suramericanos del género *Crotalus* y del género *Bothrops* de Argentina, en los cuales ninguno produjo el efecto anticoagulante mínimo esperado. El veneno de las serpientes de cascabel pertenecientes al complejo *Crotalus durissus* es considerado neurotóxico, nefrotóxico, hemolítico y miotóxico [2, 11, 30]. La presente investigación demostró el efecto desfibrinante del veneno total de *Crotalus durissus cumanensis*, efecto que hasta la fecha no había sido reportado para los venenos de serpientes pertenecientes al género *Crotalus*, lo que sin duda alguna contribuye un valioso aporte para el diagnóstico y tratamiento del accidente crotálico en Venezuela.

La dosis edematizante mínima para el veneno total objeto de estudio no pudo ser determinada ya que a la dosis máxima del veneno total utilizada para la prueba (50 µg), el edema apenas alcanzó un 20,65% y al cabo de 30 minutos, los ratones de prueba, ya presentaban signos del efecto neurotóxico característico del veneno crotálico utilizado. Esta prueba se reportó positiva para serpientes de cascabel norteamericanas, centroamericanas y otras serpientes de la familia Viperidae

pertencientes al género *Bothrops* [33]. Efectos similares han sido reportados, en Costa Rica y Brasil, por Gutiérrez y col. [13] quienes obtuvieron una formación de edema de 27,3% y 7,9% para adultos de *Crotalus durissus durissus* y *Crotalus durissus terrificus*, respectivamente. Dos Santos y col. [6] con las dosis de veneno evaluadas para *Crotalus durissus ruruima* de Brasil, alcanzaron un aumento del edema en un 26%. Otero y col. [26] con *Crotalus durissus terrificus* de Colombia obtuvo un incremento del 23 % de actividad edematizante utilizando una dosis máxima de 32 µg, mientras que Santoro y col. [34], con los venenos de las serpientes de cascabel suramericanas de *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* y *Crotalus durissus collilineatus* notaron que el edema comenzaba a decrecer al cabo de 30 minutos.

CONCLUSIONES

El veneno total de la serpiente *Crotalus durissus cumanensis* presente en la localidad de Porshoure guajira venezolana, presenta características altamente procoagulantes, así como también pudo observarse su naturaleza neurotóxica. Los efectos a nivel local (edema, hemorragia) del veneno, aún cuando fueron observados, fueron mucho menos marcados al ser comparados con el de otras especies, entre ellas *Crotalus durissus cumanensis* de la Villa del Rosario, estado Zulia; *Crotalus durissus terrificus* y *Crotalus durissus durissus* de Costa Rica y Brazil; *Crotalus durissus terrificus* de Colombia; *Crotalus durissus ruruima* (Venezuela), *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus collilineatus*; en especial en el efecto edematizante, el cual fue casi nulo.

A nivel sistémico, el veneno total de la serpiente de cascabel *Crotalus durissus cumanensis* presente en la localidad de Porshoure, Guajira venezolana, presentó marcados efectos a nivel hemostático (hemorragia y coagulación) y neurotóxicos como disnea, incoordinación motora, espasmos musculares, postración, y finalmente la muerte por parálisis de los músculos respiratorios (apnea). La combinación de estos efectos explica la alta letalidad de su veneno.

AGRADECIMIENTO

Los autores quieren expresar su más profundo y sincero agradecimiento al laboratorio de Investigaciones de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela por todo el apoyo técnico y colaboración en el desarrollo del proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADAME, B.L.; SOTO, J.G.; SECRAW, D.J.; PEREZ, J.C.; GLENN, J.L.; STRAIGHT, R.C. Regional variation of biochemical characteristics and antigenicity in great basin rattlesnake (*Crotalus viridis lutosus*) venom. **Comp. Biochem. Physiol.** 97B(1): 95-101. 1990.
- [2] AMORIM, M. Intermediate nephron nephrosis in human and experimental crotalic poisoning. In: Bucherl, W and Buckley, E., (Eds.), **Venomous Animals and their Venoms**. New York: Academic Press. 319-343 pp. 1971.
- [3] BOGARÍN, G.; ROMERO, M.; ROJAS, G.; LUTSCH, Ch.; CASADAMONT, M.; LANG, J.; OTERO, R.; GUTIÉRREZ, M. Neutralization, by a monospecific *Bothrops lanceolatus* antivenom, of toxic activities induced by homologous and heterologous *Bothrops* snake venoms. **Toxicon** 37: 551-557. 1999.
- [4] CARLSON, R.W.; SCHAEFFER, R.J.; WHIGHAM, H.; MICHAELS, S.; RUSSELL, F.E.; WEIL, M.H. Rattlesnakes venom shock in the rat: development of a method. **Am J. Physiol.** 229 (6): 1668-1674. 1975.
- [5] DIRECCIÓN DE EPIDEMIOLOGÍA Y ANÁLISIS ESTRATÉGICO (DEAE). Dirección de vigilancia epidemiológica del Ministerio de Sanidad y Desarrollo Social (MSDS). **Morbilidad por mordedura de serpiente según entidades federales. Tasas por 100.000 habitantes**. Venezuela 1999-2003.1 pp. 2003.
- [6] DOS SANTOS, M.C.; FERREIRA, L.C.L.; DIAS DA SILVA, W.; DE FÁTIMA, M.; FURTADO, D. Caracterización de las actividades biológicas de los venenos "amarillo" y "blanco" de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon** 31: 1459-1469. 1993.
- [7] FERREIRA, M.L.; MOURA DA SILVA, A.M.; MOTA, I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. **Toxicon** 30, 1591-1602. 1992.
- [8] FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, A.; MORA, N.; GUTIÉRREZ, J.M. Purification and characterization of BaH₄, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon** 38: 63-77. 2000.
- [9] FRANCISCHETTI, I.M.; GOMBAROBITS, M.E.; VALENZUELA, J.G.; CARLINIS, C.R.; GUIMARAES, J.A. Intraspecific variation in the venom of the south american rattlesnake (*crotalus durissus terrificus*). **Comp Biochem Physiol (C) Toxicol Pharmacol.** 127(1): 23-36. 2000.
- [10] GALLACCI, M.; SOUZA, F.A.D.; SPENCER, P.; ROGERO, J.; NASCIMENTO, N.; DAL PAI-SILVA, M. Co gamma irradiation prevents *Bothrops jararacussu* venos neurotoxicity and myotoxicity in isolated mouse neuromuscular junction. **Toxicon** 40: 1101-1106. 2002.
- [11] GUTIÉRREZ, J.M. Venenos de serpiente de América: sus efectos en el organismo. **Cien. Vet.** 2: 277-289. 1980.
- [12] GUTIÉRREZ, J.M.; CHÁVEZ, F.; ROJAS, E.; ELIZONDO, J.; ÁVILA, C.; CERDAS, L. Production of monovalent anti- *Bothrops asper* antivenom: development of

- immune response in horses and neutralizing ability. **Rev. Biol. Trop.** 36(2B): 511-517. 1988^a.
- [13] GUTIÉRREZ, J.M.; DOS SANTOS, M.C.; DE FATIMA, M.; FURTADO, D.; ROJAS, G. Biochemical and pharmacological similarities between the venoms of newborn *Crotalus durissus durissus* and adult *Crotalus durissus terrificus* rattlesnakes. **Toxicon** 29: 1273-1277. 1991.
- [14] GUTIÉRREZ, J.M.; ROJAS, G.; AYMERICH, R. **El envenenamiento ofídico: Fisiología y tratamiento**. Publicaciones de la Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, Instituto Clodomiro Picado. 22 pp. 1996.
- [15] GUTIÉRREZ, J.M.; LEÓN, G.; VALVERDE, J.; ROJAS, G.; LOMONTE, B. Comparative study on the ability of IgG and Fab sheep antivenoms to neutralize local hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. **Toxicon** 38: 233-244. 2000.
- [16] GRILLO, R.O.; SCANNONE, H.; PARRA, N. Enzymatic activities and other characteristics of *Crotalus durissus cumanensis* venom. **Toxicon** 12: 297-302. 1974.
- [17] INCIO, R.; INCIO, L.; ZAVALA, A.; SALAS, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Toxicidad y neutralización de venenos ofídicos peruanos de los géneros *Bothrops* y *Lachesis* (Serpentes): Viperidae. **Rev. Biol. Trop.** 41(3):351-357. 1993.
- [18] INSTITUTO CLODOMIRO PICADO. **Manual de procedimientos para la determinación de actividades tóxicas de venenos y su neutralización por antivenenos**. Publicaciones de la Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología. 60 pp. 1988.
- [19] KONDO, H.; KONDO, I.K.; MURATA, R. "Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. **Jpn. Med. Sci. Biol.** 13: 43-51. 1960.
- [20] KORNACKER, P. M. **Lista sistemática y clave para las serpientes de Venezuela**. 1^{ra} Ed. Rheinbach, Germany: Pako-Verlag. 270 pp. 1999.
- [21] LANCINI, V. **Serpientes de Venezuela**. 2^{da} Ed. Ernesto Armitano (Ed). Venezuela. 262 pp. 1986.
- [22] LOMONTE, V.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation inflammatory cells and cytokine release in a mouse model. **Inflammat.** 17(2): 93 -105. 1993.
- [23] MARKLAND, F. Snake venom and the hemostatic system. **Toxicon**. 36(12): 1749-1800. 1998.
- [24] MONTILLA, J. Hiperinmunización de ovinos contra veneno de *Crotalus durissus cumanensis* del estado Zulia, Venezuela. **Rev. Cient. FCV-LUZ**. IX(5): 388-394. 1999.
- [25] MUKHERJEE, A.K.; MAITY, C.R. Biochemical composition, lethality and pathophysiology of venom from two cobras *Naja naja* and *N. kaouthia*. **Comp Biochem Physiol. (B) Biochem. Mol. Biol.** 131(2):125-32. 2002
- [26] OTERO, R.; OSÓRIO, R.G.; VALDERRAMA, R.; GIRALDO, C.A. Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Choco (Colombia). **Toxicon**. 30: 611- 620. 1992.
- [27] OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.M.; NÚÑEZ, V.; ROBLES, A.; ESTRADA, R.; SEGURA, E.; TORO, M.F.; GARCÍA, M.E.; DÍAS, E.C.; GÓMEZ, G.; CASTAÑEDA, J.; MORENO, M.E. A randomized double-blind clinical trial of two antivenom in patients bitten by *Bothrops atrox* in Colombia. **Trans of the Royal Soc of Trop Med and Hyg.** 90: 696-700. 1996.
- [28] PIRELA, R. Caracterización toxinológica del veneno total de la serpiente de cascabel *Crotalus durissus cumanensis* (Viperidae), presente en la localidad de Porshoure, guajira Venezolana. Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias. (Trabajo Especial de Grado). 7-8 pp. 2004.
- [29] ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; GENÉ, J.A.; GÓMEZ, M.; CERDAS, L. Neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas de cuatro venenos de serpientes de Guatemala y Honduras por el antiveneno polivalente producido en Cosa Rica. **Rev. Biol. Trop.** 35(1): 59-67. 1987.
- [30] ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: Bucherl, W and Buckley, E. (Eds.), **Venous Animals and their Venoms**. New York: Academic Press. 345-381 pp. 1971.
- [31] SARAVIA, P.; ROJAS, E.; ARCE, V.; GUEVARA, C.; LÓPEZ, J.C.; CHAVES, E.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J.M. Geographic and ontogenic variability in the venoms of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. **Rev. Biol. Trop.** 50 (1): 337-346. 2002.
- [32] SÁNCHEZ, E.F.; FREITAS, T.V.; FERREIRA-ALVES, D.L.; VELARDE, D.T.; DINIZ, M.R.; CORDEIRO, M.N.; AGOSTINI-COTTA, G., DINIZ, C.R. Biological activities of venoms from South American Snake. **Toxicon** 30: 95-103. 1992.
- [33] SÁNCHEZ, E.F., RAMIREZ, M.S.; GALAN, J.A.; LOPEZ, G.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A.; PEREZ, J.C. Cross reactivity of three antivenoms against North American snake venoms. **Toxicon** 1; 41(3):315-20. 2003.
- [34] SANTORO, M.L.; SOUSA-E-SILVA, M.C.C.; GONCALVES, L.R.C.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; CARDOSO, D.F.; LAPORTA-FERREIRA, I.L.; SAIKI, M.; PERES,

- C.A.; SANO-MARTINS, I.S. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus collilineatus*). **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.** 122(1): 61-73. 1999.
- [35] SASA, M.; VAZQUEZ, S. Snakebite envenomation in Costa Rica: a revision of incidence in the decade 1990-2000. **Toxicon** 41: 19-22. 2003
- [36] SOTO, J.; PEREZ, J.; LOPEZ, M.; MARTINEZ, M.; QUINTANILLA-HERNANDEZ, T.; SANTA-HERNÁNDEZ, M.; TURNER, K.; GLENN, J.; STRAIGHT, R.; MINTON, S. Comparative enzymatic study of HPLC- fractioned *Crotalus* venoms. **Comp Biochem Physiol B.** 93 (4): 847-855. 1989.
- [37] TAEI, M.; YOSHIHIRO, F.; KOITI, T. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Bioch et Biophys Acta** 1477: 146-156. 2000.
- [38] TU, A. Hemolysis. In **Venoms: Chemistry and Molecular Biology** (Chapter 20). A Wiley Interscience publication John Wiley & Sons. 321-328 pp. 1976.
- [39] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. **Laboratory Manual.** Geneva. 5-44 pp. 1981.