

ARTÍCULO INVITADO

REVISIÓN

Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina

José María Gutiérrez

Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Fax 506-2920485; jgutierrez@icp.ucr.ac.cr

Recibido 02-XI-2001. Corregido 18-I-2002. Aceptado 24-I-2002.

Abstract: As a tribute to Revista de Biología Tropical in its 50th anniversary, this review describes some of the main research efforts carried out in the study of the chemical composition and the mechanism of action of toxins present in the venoms of snakes distributed in Latin America. Venom proteins involved in neurotoxicity, coagulopathies, hemorrhage and muscle necrosis are discussed, together with a description of the inflammatory reactions elicited by these venoms and toxins. In addition, the search for inhibitory substances present in plants and animals that may be utilized in the neutralization of venoms is analyzed. Some of the clinical studies performed on snakebite envenomations in Latin America are also reviewed, together with the development of technologies aimed at improving the quality of antivenoms produced in the region. Toxinology has become a fruitful and stimulating research field in Latin America which has contributed to a better understanding of snake venoms as well as to an improved management of snakebitten patients.

Key words: Snake venoms, toxins, antivenoms, neurotoxicity, coagulopathies, necrosis.

América Latina posee una fauna de serpientes rica y variada. Algunas especies clasificadas en la familia Colubridae y todas las especies de las familias Hydrophiidae, Elapidae y Viperidae producen venenos y son capaces de inyectar estas secreciones en humanos, generando cuadros clínicos de envenenamiento (Campbell y Lamar 1989). Los envenenamientos por mordeduras de serpiente constituyen un problema de salud pública relevante en la región latinoamericana (Fan y Cardoso 1995, Gutiérrez 1995, Chippaux 1998). Estos accidentes afectan fundamentalmente a la población rural involucrada en faenas agrícolas y se caracterizan por una fisiopatología compleja. La enorme mayoría de los envenenamientos ofídicos en América Latina son causados por especies de la familia Viperidae. El cuadro clínico que se desarrolla en estos casos se asocia con daños locales rápidos y prominentes (edema, dolor, sangrado, necrosis), seguidos de al-

teraciones sistémicas (sangrado, coagulopatías, choque cardiovascular, insuficiencia renal aguda) (Otero 1992, Fan y Cardoso 1995, Gutiérrez 1995). La incidencia de mordeduras por serpientes coral (familia Elapidae) es baja y estos casos se asocian con neurotoxicidad debida a la acción de toxinas que actúan en la unión neuro-muscular (Vital Brazil 1987a). Por otra parte, se han descrito muy pocos casos de mordeduras por la serpiente marina *Pelamis platurus*, la única especie de la familia Hydrophiidae en América, y las mordeduras por especies de la familia Colubridae, aunque ocurren, casi nunca se asocian con alteraciones fisiopatológicas relevantes (Gutiérrez y Sasa 2001).

La relevancia de los envenenamientos ofídicos en el ámbito de la salud pública latinoamericana, aunada a la fascinación que provoca la complejidad bioquímica y farmacológica de los venenos de serpientes, ha motivado un gran interés científico en América Latina alrededor

de este tema. Como homenaje a la Revista de Biología Tropical en su 50 aniversario, este trabajo presenta una visión retrospectiva de algunos de los logros efectuados en la comprensión de la naturaleza química y del mecanismo de acción de los venenos de serpientes de América Latina, así como en el desarrollo de tecnologías para producción de antivenenos. La revisión no pretende ser exhaustiva, sino que se concentra en algunos de los principales desarrollos en los que han participado investigadores de la región latinoamericana durante los últimos 50 años.

LOS CIMIENTOS DE LA TOXINOLOGÍA LATINOAMERICANA

Los primeros esfuerzos científicos en el tema de los venenos de serpientes en América Latina se desarrollaron en Brasil, gracias al trabajo de J.B. de Lacerda y Vital Brazil, hacia fines del siglo XIX y principios del XX (Lacerda 1884, Brazil 1911). Vital Brazil fue un auténtico pionero, ya que a su interés científico por este tema se unió una enorme capacidad de gestión tecnológica que lo llevó a producir los primeros antivenenos (o sueros antiofídicos) en América, pocos años después de la invención de la seroterapia antiofídica en Francia (Vital Brazil 1987b, Bon 1996). Vital Brazil describió las actividades fisiopatológicas de los venenos de las principales serpientes brasileñas y demostró claramente la necesidad de producir antivenenos específicos para Sudamérica. Más aún, este destacado científico sentó las bases de la producción en gran escala de este inmunoterápico en el prestigioso Instituto Butantan, institución de la que fue su primer Director.

Varios científicos latinoamericanos dedicaron atención al estudio de los venenos durante la primera mitad del siglo XX, incluyendo en este grupo al investigador argentino Bernardo Houssay, eminente endocrinólogo y Premio Nóbel de Fisiología y Medicina. En América Central, la labor de Clodomiro Picado sobresale por su relevancia y calidad. Picado contribuyó al estudio de la biología de las

serpientes venenosas de Costa Rica y a la caracterización de las actividades tóxicas de sus venenos. Además, fue el responsable de la introducción y uso de los antivenenos brasileños en Costa Rica (Picado 1931), sentando las bases para futuros desarrollos en este país, los cuales estuvieron liderados por Róger Bolaños, fundador del Instituto Clodomiro Picado (Bolaños 1984). La investigación sobre venenos en América Latina durante la primera mitad del siglo XX forma parte de una rica tradición de investigación en Medicina Tropical en nuestra región, tradición que ha dado aportes de impacto mundial al conocimiento de las patologías tropicales.

HACIA UNA MEJOR COMPREENSIÓN DE LA NATURALEZA QUÍMICA Y LOS MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS VENENOS: ESTUDIOS EN BIOQUÍMICA, FARMACOLOGÍA Y PATOLOGÍA EXPERIMENTAL

Las neurotoxinas

Contrario a la enorme mayoría de los venenos de serpientes de la familia Viperidae, los cuales carecen de neurotoxicidad y basan su acción en la destrucción tisular y las alteraciones cardiovasculares y de coagulación, el veneno de la cascabel sudamericana *Crotalus durissus terrificus* posee una acción fundamentalmente neurotóxica y miotóxica, originando cuadros clínicos frecuentemente severos. Uno de los principales hitos en la Toxinología lo constituyó la purificación y cristalización de la 'crotoxina', que es el principal componente tóxico de dicho veneno. Este logro, efectuado en el Instituto Butantan por Slotta y Fraenkel-Conrat (1938-1939), representa el inicio del estudio de la bioquímica de proteínas tóxicas de los venenos. Estudios posteriores han permitido conocer que esta toxina es en realidad un complejo bimolecular formado por una fosfolipasa A₂ y por una proteína no tóxica denominada 'crotapotina' o 'subunidad A'. Esta subunidad actúa como una molécula 'chaperona',

impidiendo que la subunidad fosfolipasa se una a sitios inespecíficos y dirigiéndola a su verdadero blanco: la membrana plasmática de la terminal axonal presináptica y la membrana de las células musculares, ya que la crotovina posee acciones neurotóxica y miotóxica.

Además del veneno de esta cascabel, los de las serpientes coral (género *Micrurus*) inducen también cuadros fisiopatológicos caracterizados por el bloqueo de la unión neuromuscular, con los consecuentes problemas de parálisis flácida típicos de estos envenenamientos (Bolaños 1984, Fan y Cardoso 1995, Gutiérrez 1995). Los estudios efectuados por el grupo de Oswaldo Vital Brazil, hijo del fundador del Instituto Butantan, demostraron las bases farmacológicas de las acciones de estos venenos, utilizando preparaciones neuro-musculares *in vitro* (Vital Brazil 1987a). El veneno de *C. d. terrificus* actúa a nivel presináptico, afectando la liberación del neurotransmisor en las terminales nerviosas (Vital Brazil 1966), en tanto los venenos de *Micrurus* tienen una acción principalmente postsináptica, debida a la unión de polipéptidos neurotóxicos, denominados 'α-neurotoxinas', al receptor de acetilcolina de la placa motora de la fibra muscular (Vital Brazil 1987a). No obstante, varios investigadores han mostrado evidencias de la presencia de neurotoxinas de acción presináptica en algunos venenos de *Micrurus* (Vital Brazil 1987a, Goularte *et al.* 1995). Se ha determinado la secuencia completa de aminoácidos de una α-neurotoxina de acción postsináptica del veneno de la coral *Micrurus nigrocinctus* (Rosso *et al.* 1996) y las secuencias parciales de otras neurotoxinas del mismo veneno (Alape-Girón *et al.* 1996). Asimismo, se ha clonado el ADNc de una neurotoxina del veneno de *M. corallinus* (de Oliveira *et al.* 2000).

Además del cuadro de parálisis flácida no despolarizante inducido por la crotovina, los venenos de algunas poblaciones de la cascabel sudamericana presentan un componente que induce un cuadro de parálisis espástica en animales de laboratorio. Este efecto, descrito y caracterizado por farmacólogos brasileños, se debe a la 'crotamina', un péptido muy básico de

4.2 kDa que activa los canales de sodio dependientes de voltaje de las fibras musculares, induciendo una despolarización que culmina con contractura muscular (Laure 1975, Chang y Tseng 1978, Vital Brazil *et al.* 1979). Como consecuencia de esta acción farmacológica, se produce un influjo de sodio y de agua al citosol, con la consecuente dilatación del retículo sarcoplásmico, lo que ha motivado que esta toxina sea considerada por algunos como una 'miotoxina' (Cameron y Tu 1978).

Proteínas que afectan la coagulación sanguínea

Las alteraciones en la coagulación sanguínea constituyen una de las principales características de los envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae (Markland 1998). Dichas alteraciones, asociadas con cuadros de defibrinación, coagulación intravascular diseminada y trombocitopenia (Rosenfeld 1971, Fan y Cardoso 1995, Gutiérrez 1995) resultan de la acción de proteínas que afectan diversos componentes del sistema hemostático. Varios grupos de investigación han contribuido a esclarecer los mecanismos responsables de estas alteraciones. Por un lado, estos venenos presentan enzimas coagulantes y procoagulantes, tales como serina proteinasas 'tipo trombina' (Stocker y Barlow 1976, Aragón y Gubensek 1978, Raw *et al.* 1986, Selistre y Giglio 1987, Yarlequé *et al.* 1989) y metaloproteiniasas que activan los factores X y II de la cascada de coagulación (Hofmann *et al.* 1983). Estos componentes, de fuerte acción coagulante *in vitro*, consumen el fibrinógeno *in vivo*, induciendo defibrinación y alteraciones en las pruebas de coagulación (Peña-Chavarría *et al.* 1970, Cardoso *et al.* 1993). Se han purificado también componentes inhibidores de trombina, tales como la 'bothrojaracina', del veneno de *B. jararaca* (Zingali *et al.* 1993), el cual forma un complejo equimolar no covalente con la a-trombina y la 'bothroalternina', del veneno de *B. alternatus* (Castro *et al.* 1998).

Los venenos de serpientes vipéridas latinoamericanas afectan las plaquetas de maneras

diversas. Se han descrito componentes como la 'botroctina' y la 'aspercetina' que se unen al factor de von Willebrand e inducen agregación plaquetaria, produciendo *in vivo* un cuadro de trombocitopenia trombótica (Andrews *et al.* 1989, Rucavado *et al.* 2001). Por otra parte, la 'convulxina', purificada del veneno de la cascabel *Crotalus durissus terrificus*, se describió inicialmente con base en su acción convulsivante (Prado-Franceschi y Vital Brazil 1981), pero luego se caracterizó como un potente agente agregante de plaquetas (Vargaftig *et al.* 1980, Francischetti *et al.* 1998). Los venenos de víperidos presentan también un grupo de moléculas denominadas 'disintegrinas', las cuales tienen una región con la secuencia Arg-Gli-Asp (RGD) que se une a la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ de las plaquetas, causando inhibición de la agregación plaquetaria y afectando el proceso hemostático (Markland 1998). Las disintegrinas se han convertido en importantes herramientas para el estudio de la adhesión celular en diversos modelos patológicos y se ha demostrado que estos péptidos son sintetizados como parte de algunas metaloproteinasas en estos venenos, liberándose como consecuencia de proteólisis (Moura da Silva *et al.* 1996). Se han purificado además fosfolipasas A_2 que afectan los procesos de coagulación, ya sea alterando la agregación plaquetaria (Fuly *et al.* 1997) o inhibiendo la cascada de la coagulación (Díaz *et al.* 1991). También estos venenos poseen proteinasas fibrinolíticas, de la familia de las metaloproteinasas, capaces de hidrolizar la fibrina que forma los trombos (Markland 1998). Algunas de estas proteínas se utilizan en terapia antitrombótica en la clínica, tales como la serina proteínasa 'batroxobina' del veneno de *Bothrops atrox* (Braud *et al.* 2000), en tanto otros se emplean en procedimientos diagnósticos, como es el caso de la 'botroctina', utilizada en el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand y del síndrome de Bernard-Soulier (Braud *et al.* 2000). En suma, los venenos de serpientes de América Latina presentan una variadísima gama de componentes que afectan los procesos hemostáticos.

La inflamación

Los estudios farmacológicos del proceso inflamatorio tuvieron un desarrollo temprano de muy alto nivel en América Latina, especialmente en Brasil, donde grupos de excelencia efectuaron aportes de impacto mundial. En este contexto, cabe mencionar el importante trabajo liderado por Mauricio Rocha e Silva, en São Paulo, el cual tuvo como uno de sus primeros logros el descubrimiento de la bradicinina, un nonapéptido liberado de un precursor plasmático que juega un papel central en la inflamación y en diversos procesos fisiológicos. Este hallazgo, efectuado trabajando con el veneno de *Bothrops jararaca* (Rocha e Silva *et al.* 1949), sirvió de base para una línea de investigación fructífera que trajo, entre otros logros, el importante descubrimiento de los péptidos potenciadores de bradicinina, también presentes en el veneno de *B. jararaca* (Ferreira 1965, Ferreira *et al.* 1970). Estos péptidos sirvieron de base para la síntesis, en la industria farmacéutica de países desarrollados, de medicamentos antihipertensivos muy efectivos, como el Captopril.

Diveros grupos de investigación en la región han utilizado los venenos como herramientas para estudiar la inflamación, no sólo para comprender mejor las bases del envenenamiento, sino también para dilucidar los mecanismos de la reacción inflamatoria en general. En años recientes se han logrado avances importantes en la comprensión de la inflamación en modelos experimentales de envenenamiento ofídico, tanto en lo referente al edema (Trebien y Calixto 1989, Chaves *et al.* 1995, Landucci *et al.* 2000), como a la participación del infiltrado celular (Farsky *et al.* 1997) y a la hiperalgesia resultante de la acción de los venenos (Teixeira *et al.* 1994, Chacur *et al.* 2001), así como al rol de las citoquinas en estos cuadros (Lomonte *et al.* 1993, Barros *et al.* 1998, Petricevich *et al.* 2000). Estos estudios han continuado con el análisis del papel que tiene la reacción inflamatoria en la patogénesis del daño tisular local, un tema estrechamente relacionado con la posibilidad de que el control

farmacológico de dicha reacción inflamatoria redunde en una disminución de la magnitud del daño tisular. Los avances logrados demuestran que el ingreso de los venenos de vipéridos a los tejidos pone en marcha un complejo proceso inflamatorio, asociado con la liberación y/o síntesis de numerosos mediadores, los cuales interactúan de manera compleja, afectando múltiples procesos celulares y tisulares y redundando en edema, infiltrado celular, dolor y adquisición de un fenotipo pro-inflamatorio y pro-coagulante en las células endoteliales. En contraposición con la gran mayoría de los venenos de vipéridos, los cuales inducen un potente efecto hiperalérgico, el de la cascabel *Crotalus durissus terrificus* se caracteriza por presentar una acción antinociceptiva (Giorgi *et al.* 1993), lo cual lo convierte en una fuente de sustancias analgésicas de potencial interés farmacéutico.

Las metaloproteinasas y la hemorragia

Una de las consecuencias más comunes de los envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae lo constituye el sangrado local y sistémico, el cual contribuye a lesión tisular permanente en el tejido muscular, así como a hipovolemia y choque cardiovascular (Fan y Cardoso 1995, Gutiérrez 1995). La identificación de las proteínas responsables de estos efectos tuvo un gran impulso en los estudios de Mandelbaum y su grupo, en el Instituto Butantan, quienes lograron purificar y caracterizar varios componentes hemorrágicos de los venenos de las especies *Bothrops jararaca*, *B. moojeni* y *B. neuwiedi* (Mandelbaum *et al.* 1976, 1984, Assakura *et al.* 1985). Posteriormente otros investigadores purificaron, secuenciaron y clonaron la 'jararagina' (Paine *et al.* 1992), una metaloproteinasa hemorrágica presente en el veneno de *B. jararaca* y que fue recientemente cristalizada (Souza *et al.* 2001). La jararagina ha sido muy utilizada en investigaciones bioquímicas, moleculares y farmacológicas (Kamiguti *et al.* 1996). Del veneno de *Lachesis muta* se purificaron dos metaloproteinasas hemorrágicas, las cuales han sido secuenciadas y estudiadas en cuanto

a sus efectos sobre la hemostasia (Sánchez *et al.* 1987, 1991a, 1991b).

Recientemente se han aislado y caracterizado parcialmente varias metaloproteinasas hemorrágicas del veneno de *Bothrops asper*, la principal serpiente venenosa en la región centroamericana (Borkow *et al.* 1993, Gutiérrez *et al.* 1995, Franceschi *et al.* 2000). Aunque el mecanismo de acción de estas toxinas no está totalmente dilucidado, los estudios efectuados permiten proponer la hipótesis siguiente: estas enzimas, que son metaloproteinasas dependientes de zinc, hidrolizan algunas proteínas que componen la lámina basal que rodea las células endoteliales de los vasos capilares y de las vénulas. Como consecuencia de esta hidrólisis, las células endoteliales se ven afectadas, desarrollando una serie de vesículas y reduciendo su grosor, hasta el punto en que su integridad se interrumpe y se producen rupturas a través de las que se produce la extravasación (Moreira *et al.* 1994, Gutiérrez y Rucavado 2000). Esta hipótesis es apoyada por observaciones bioquímicas y ultraestructurales diversas, aunque aún no está claro cómo se traducen las alteraciones en la lámina basal a la lesión endotelial (ver revisión de Gutiérrez y Rucavado 2000). A la par de esta hipótesis de hemorragia por 'rexis', también se ha propuesto que el veneno de *Bothrops jararaca* induce hemorragia por 'diapedesis', al inducir la apertura de las uniones intercelulares de las células endoteliales como consecuencia de una fuerte reacción inflamatoria, permitiendo la extravasación por esa ruta (Gonçalves y Mariano 2000).

Las metaloproteinasas hemorrágicas se clasifican, desde el punto de vista estructural, en cuatro grupos, con base en los dominios que poseen (Bjarnason y Fox 1994). Las de la clase P-I presentan únicamente el dominio metaloproteínasa, caracterizado por una secuencia consenso HEXXHXXGXXH responsable de la unión al zinc. Las metaloproteinasas de las otras clases presentan, además el dominio catalítico, dominios 'tipo disintegrina' (clase P-II), 'tipo disintegrina' y 'rico en cisteína' (clase P-III) y estos dos dominios más un dominio lectina (clase P-IV). Los estudios con la jararagina y

con otras metaloproteinasas han demostrado que la presencia de estos dominios adicionales, especialmente el 'tipo disintegrina', le confieren a estas metaloproteinasas la capacidad de reconocer receptores de la familia de las integrinas en las membranas de las plaquetas y de otros tipos celulares, afectando el proceso de agregación plaquetaria y la adhesión de otras células a sustratos de matriz extracelular (Kamiguti *et al.* 1996, Souza *et al.* 2000, Moura da Silva *et al.* 2001). Se ha propuesto que la presencia de estos dominios adicionales es responsable de la mayor actividad hemorrágica que caracteriza a estas metaloproteinasas cuando se las compara con las de la clase P-I. Es evidente, por otra parte, que a la acción vasculotóxica de las metaloproteinasas se suma el efecto de las toxinas que inducen coagulopatías, para producir un sangrado profuso a nivel sistémico, aunque el tema de los sinergismos entre estos tipos de toxinas no ha sido explorado aún con suficiente detalle.

Los estudios de patología experimental efectuados con diversas metaloproteinasas en América Latina han demostrado que estas enzimas no sólo son responsables de hemorragia, sino que también inducen mionecrosis, edema, formación de bulas, dermonecrosis, activación de complemento, fibrinólisis, fibrinogenólisis, liberación de TNF- α y degradación de la matriz extracelular, por lo que desempeñan un rol muy relevante en la patogénesis de diversos efectos asociados con estos envenenamientos (ver la revisión de Gutiérrez y Rucavado 2000). La relevancia de las metaloproteinasas en los envenenamientos ofídicos plantea la posibilidad de utilizar inhibidores sintéticos potentes, como los hidroxamatos peptidomiméticos, en la terapia antiofídica, hipótesis que ha sido validada en estudios experimentales con el veneno de *Bothrops asper* y el inhibidor 'batimastat' (Escalante *et al.* 2000, Rucavado *et al.* 2000).

Fosfolipasas A₂ y necrosis muscular

La necrosis de tejido muscular o mionecrosis es uno de los efectos más conspicuos de los envenenamientos por serpientes de la fami-

lia Viperidae (Gutiérrez y Lomonte 1989). En caso de no ser neutralizado por los antivenenos, este efecto redundará en una pérdida importante de tejido muscular, lo cual se asocia con una deficiente regeneración muscular y con secuelas permanentes en la víctima. Diversos grupos, especialmente en Costa Rica y Brasil, han desarrollado investigaciones diversas dirigidas a una comprensión del tipo de toxinas responsables de estos efectos y de su mecanismo de acción. La primera miotoxina de venenos de serpientes del género *Bothrops* fue purificada en 1984, a partir del veneno de *B. asper* (Gutiérrez *et al.* 1984a). En años posteriores se logró purificar una gran cantidad de miotoxinas de este y otros venenos de serpientes de la región, tales como *Bothrops moojeni*, *B. neuwiedi*, *B. jararacussu*, *B. pirajai*, *Bothriechis schlegelii* y *Atropoides nummifer* (ver revisión de Gutiérrez y Lomonte 1997). Todas estas miotoxinas son proteínas con estructura de fosfolipasa A₂ de la clase II, muy básicas y que afectan las células musculares rápidamente después de su inyección.

Los estudios de las secuencias de estas miotoxinas han permitido dividirlas en dos subtipos: aquellas que presentan aspartato en el residuo 49 y las que presentan lisina en dicha posición. Esta diferencia tiene implicaciones drásticas en la catálisis, ya que el aspartato en el residuo 49 juega un papel central en la capacidad de estas proteínas de unir el ion calcio, el cual es requisito para la actividad catalítica al estabilizar el intermediario tetrahédrico característico de esta reacción (Arni y Ward 1996). La sustitución de aspartato por lisina tiene como consecuencia una incapacidad de la molécula para ligar calcio y, por lo tanto, la pérdida de la actividad enzimática. Las primeras lisinas 49 aisladas y secuenciadas fueron la miotoxina II de *B. asper* y la bothropstoxina de *B. jararacussu* (Francis *et al.* 1991, Cintra *et al.* 1993). Lo interesante de este grupo de Lis49 es que, pese a ser inactivas enzimáticamente, poseen una fuerte acción miotóxica. Esta observación demuestra que la actividad de hidrólisis de fosfolípidos no es estrictamente necesaria para lesionar la integridad de la

membrana plasmática de las fibras musculares, evidenciando que otras regiones moleculares diferentes del sitio catalítico son las responsables de este efecto.

Los estudios de secuencias han sido complementados por importantes investigaciones cristalográficas, las cuales han permitido dilucidar la estructura de algunas de estas proteínas (Arni *et al.* 1995, 1999, da Silva Giotto *et al.* 1998, Lee *et al.* 2001). Se ha demostrado que todas ellas tienen una estructura similar, caracterizada por varias regiones de hélice alfa, una pequeña región de hojas beta denominada 'ala beta' y algunas asas, presentando siete puentes disulfuro. Además, se ha determinado que la mayoría de estas fosfolipasas miotóxicas existen como homodímeros. Muchos de estos estudios han sido fruto de colaboraciones entre grupos de investigación costarricenses y brasileños en importantes esfuerzos cooperativos regionales. Este ejemplo ilustra el gran potencial que tienen los empeños conjuntos en una región donde es difícil contar con equipo muy costoso en cada país y donde se requiere desarrollar una división del trabajo solidaria que permita enfrentar retos académicos relevantes.

El contar con diversas fosfolipasas A_2 miotóxicas purificadas ha permitido estudiar el mecanismo de acción de las mismas y los determinantes estructurales de la miotoxicidad. Se ha demostrado que las miotoxinas, sean éstas Asp49 o Lis49, afectan directamente la integridad de la membrana plasmática de las células musculares, originando un influjo de calcio hacia el citosol, lo cual pone en marcha una serie de eventos degenerativos que culminan con lesión celular irreversible (Gutiérrez *et al.* 1984b, Gutiérrez y Lomonte 1997). El sitio de unión de estas miotoxinas a la membrana plasmática no se ha establecido claramente, aunque se plantea la existencia de dos tipos de sitios de unión: (a) fosfolípidos negativos (Díaz *et al.* 2001), presentes en las membranas de muchos tipos celulares, lo cual explica la amplia acción citolítica de estas proteínas *in vitro* (Lomonte *et al.* 1994a); y (b) receptores proteicos, presentes en células musculares, lo cual hace a estas células más susceptibles a la ac-

ción de las miotoxinas (Lomonte *et al.* 1999). Sin embargo, la identidad de estos receptores proteicos para las miotoxinas aún no ha sido establecida.

El tema de la relación estructura-función de estas miotoxinas ha recibido atención por parte de diversos grupos. Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que la actividad enzimática no es indispensable para la acción miotóxica, aunque la hidrólisis de fosfolípidos incrementa la capacidad citotóxica en las miotoxinas Asp49 catalíticamente activas. Uno de los avances más importantes en este tema lo constituyó la demostración de que un péptido sintético, correspondiente a un segmento de la región C-terminal de la miotoxina II de *B. asper* y constituido por residuos catiónicos e hidrofóbicos, reproduce la actividad citotóxica de la molécula completa (Lomonte *et al.* 1994b). Esta región está ubicada en la superficie de la molécula y se postula que, por su carácter hidrofóbico-catiónico, es capaz de penetrar y desorganizar la bicapa de fosfolípidos de las membranas. Estudios estructurales e inmunológicos apoyan esta hipótesis (da Silva Giotto *et al.* 1998, Calderón y Lomonte 1998). Recientemente se describió que péptidos sintéticos de la región C-terminal de dos toxinas Lis49 eran citotóxicos, en tanto los péptidos correspondientes a dos miotoxinas Asp49 carecieron de efectos tóxicos, evidenciando diferencias importantes en las regiones responsables de la toxicidad en estos dos tipos de fosfolipasas A_2 (Núñez *et al.* 2001). Es posible que otras regiones de la molécula, como el extremo N-terminal (Díaz *et al.* 1994), también contribuyan al daño en la membrana. Además de estos importantes trabajos con péptidos sintéticos, el tema de la relación estructura-función se ha enriquecido con estudios de modificaciones químicas de aminoácidos (ver por ejemplo Soares *et al.* 2000, 2001) y, más recientemente, por el clonaje y expresión de algunas de estas miotoxinas (Lizano *et al.* 2001, Ward *et al.* 2001, Giuliani *et al.* 2001), lo cual abre las posibilidades del uso de la mutagénesis dirigida en la identificación de las regiones responsables de este efecto.

Una consecuencia importante de esta línea de investigación de miotoxinas de venenos de serpientes lo constituye el hallazgo de que estas proteínas, así como algunos péptidos sintéticos de regiones de estas moléculas, tienen una potente acción bactericida (Páramo *et al.* 1998, Lomonte *et al.* 1999). Esto abre la posibilidad de utilizar péptidos sintetizados a partir de secuencias de estas proteínas en el diseño de nuevos antibióticos, un tema de gran relevancia dado el fenómeno de incremento en la resistencia a los antibióticos tradicionales por parte de muchas bacterias de importancia médica.

La crotoxina, principal componente del veneno de la cascabel *C. d. terrificus*, posee, además de actividad neurotóxica, una fuerte acción miotóxica, produciendo rabiomiolisis sistémica. Por otra parte, pese a que los venenos de serpientes coral (*Micrurus* sp.) no inducen miotoxicidad relevante desde el punto de vista clínico, estos venenos son muy miotóxicos en modelos experimentales (Gutiérrez *et al.* 1986). Este efecto, que también se ha descrito para otros venenos de elapídeos, se debe a la acción de fosfolipasas A₂ de clase I, las cuales difieren en varios aspectos estructurales de las fosfolipasas de vipéridos. Recientemente se determinó la secuencia completa de una fosfolipasa A₂ miotóxica del veneno de la coral centroamericana *Micrurus nigrocinctus* y, mediante análisis comparativo de secuencias, se identificó un grupo de residuos en las fosfolipasas de clase I que se agrupan en la superficie de la molécula y que están presentes únicamente en las enzimas que presentan actividad miotóxica (Alape-Girón *et al.* 1999). Además, se postuló un modelo de evolución molecular de las fosfolipasas A₂ miotóxicas de clase I, a partir de un precursor similar a la actual fosfolipasa A₂ de secreción pancreática (Alape-Girón *et al.* 1999). Resulta interesante que esta región es disímil a la región miotóxica de las fosfolipasas A₂ de clase II de venenos de vipéridos, evidenciando una evolución molecular diferente en estos dos tipos de miotoxinas, a partir de precursores no miotóxicos (Alape-Girón *et al.* 1999).

Variabilidad geográfica y ontogenética

En la década de los 60, Jiménez-Porras (1964a, 1964b) efectuó trabajos pioneros en el tema de la variabilidad geográfica de los venenos de *Bothrops* sp de Costa Rica, empleando técnicas electroforéticas. Se observaron diferencias intraespecíficas en los venenos de diferentes poblaciones de *Bothrops atrox* (hoy *B. asper*) y *B. nummifer* (hoy *Atropoides nummifer*) en Costa Rica. Anteriormente se había descrito un fenómeno de variación geográfica en el contenido de crotamina en venenos de poblaciones sudamericanas de *C. d. terrificus* (ver revisión de Jiménez-Porras 1970). Estos estudios, junto a otros efectuados posteriormente (Francischetti *et al.* 2000), demostraron la enorme complejidad en la composición de los venenos. A las variaciones poblacionales se une una interesante variación ontogenética en la bioquímica y la farmacología de los venenos (Gutiérrez *et al.* 1980, Furtado *et al.* 1991). Uno de los ejemplos más llamativos es el de la cascabel centroamericana *Crotalus durissus durissus*, ya que los venenos de ejemplares recién nacidos tienen un veneno con fuertes acciones neurotóxica y miotóxica, similares al veneno de la subespecie sudamericana, en tanto los ejemplares adultos presentan un veneno de acción local y hemorrágica, sin neurotoxicidad evidente (Lomonte *et al.* 1983).

INHIBIDORES DE VENENOS: APROVECHANDO LA BIODIVERSIDAD DE LA REGIÓN EN LA BÚSQUEDA DE NUEVAS TERAPIAS ANTIOFÍDICAS

Diversos grupos de investigación en la región se han ocupado de la búsqueda de sustancias con efecto inhibitorio sobre las acciones tóxicas de los venenos en plantas y animales de la región. Mucho se ha trabajado con plantas, demostrándose efectos inhibitorios con una serie de extractos crudos y con diversos componentes semipuros y puros, tales como la wedelolactona (Melo *et al.* 1994, Mors *et al.* 1989). Por otra parte, se ha demostrado la presencia de importantes inhibidores proteicos

presentes en los sueros sanguíneos de las mismas serpientes y de algunos mamíferos como los marsupiales del género *Didelphis*. Algunas de estas proteínas son inhibidores de proteinasas, altamente eficaces en la neutralización del efecto hemorrágico de los venenos (Neves-Ferreira *et al.* 2000, Valente *et al.* 2000), en tanto otras son inhibidores de fosfolipasas A₂ (Fortes Dias *et al.* 1994, Perales *et al.* 1995, Lizano *et al.* 1997, 1999).

Los inhibidores de fosfolipasas A₂ se clasifican en tres familias: (a) proteínas con homología con secuencias de unión a carbohidratos de lectinas tipo C, (b) proteínas con secuencias ricas en leucina, y (c) proteínas con el motivo de 'tres dedos', característico de diversos grupos de proteínas, como las α -neurotoxinas de venenos de elápidos (Lizano *et al.* 1999). Se ha demostrado que estos inhibidores no sólo neutralizan el efecto enzimático de las fosfolipasas A₂, sino también sus actividades tóxicas (Fortes Dias *et al.* 1994, Lizano *et al.* 1997, 1999). La existencia de este tipo de inhibidores plantea la posibilidad de su utilización en el mejoramiento de la terapia antiofídica en el futuro; además, permite su utilización como compuestos de base para la síntesis de nuevos inhibidores enzimáticos con posible aplicación farmacéutica más general, dada la importancia de las proteinasas y fosfolipasas endógenas en procesos como el cáncer y las enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas.

INVESTIGACIÓN CLÍNICA: HACIA LA COMPRENSIÓN DE LA FISIOPATOLOGÍA DE LOS ENVENENAMIENTOS OFÍDICOS EN HUMANOS

Los envenenamientos por mordeduras de serpientes de América Latina se asocian con cuadros fisiopatológicos complejos, en cuya caracterización han participado investigadores clínicos de la región. Muchos han sido los aportes en cuanto a análisis clínicos y epidemiológicos, pero cabe destacar la valiosa sistematización de las características de los envenenamientos ofídicos en la región sudeste de

Brasil, iniciada por Brazil (1911) y continuada por Rosenfeld (1971) y diversos clínicos brasileños, aprovechando la rica experiencia recopilada en el Hospital Vital Brazil, ubicado en el Instituto Butantan. Esta escuela ha sido continuada por investigadores actuales, quienes han efectuado diversos estudios relacionados con la clínica y el tratamiento de envenenamientos por *B. jararaca* (Cardoso *et al.* 1993) y *B. jararacussu* (Milani *et al.* 1997).

Otras investigaciones han enfocado aspectos más específicos de estos envenenamientos. Por ejemplo, los estudios de Azevedo-Marques y colaboradores demostraron claramente que los envenenamientos por la cascabel sudamericana *C. d. terrificus* se asocian con rhabdomiclisis y no con hemólisis, como se había supuesto hasta entonces, y que el pigmento oscuro presente en la orina de estos pacientes es mioglobina y no hemoglobina (Azevedo-Marques *et al.* 1987). También se han efectuado estudios sobre las alteraciones en la coagulación y las infecciones en pacientes mordidos por *B. jararaca* (Maruyama *et al.* 1990, Jorge *et al.* 1994), así como sobre las alteraciones renales en estos pacientes (Amaral *et al.* 1995).

En Colombia, Otero y colaboradores han efectuado diversos estudios clínico-terapéuticos controlados para caracterizar los envenenamientos por *Bothrops atrox*, la serpiente más importante de esa región, y para evaluar diversos antivenenos que se utilizan en dicho país (Otero *et al.* 1992, 1998, 1999). Un grupo de investigación clínica de Martinica estudió los envenenamientos por *Bothrops lanceolatus*, especie endémica en dicha isla, los cuales se asocian con trombosis severas, y demostró la eficacia de un antiveneno producido en Francia, el cual es específico para este veneno (Thomas *et al.* 1995).

ANTIVENENOS: APORTES TECNOLÓGICOS EN LA SOLUCIÓN DE UN PROBLEMA DE SALUD

La administración parenteral de antivenenos constituye el único recurso terapéutico

científicamente validado para el manejo de los envenenamientos ofídicos. Los primeros antivenenos latinoamericanos se produjeron en el Instituto Butantan pocos años después del desarrollo de los antivenenos en Francia (Vital Brazil 1987b). Actualmente varios países de la región tienen centros productores de antivenenos, la enorme mayoría de los cuales se ubica en el sector público, especialmente en Ministerios de Salud y en Universidades públicas, aunque también existen algunas empresas privadas involucradas en esta actividad (Meier 1995). La mayoría de los centros productores utilizan la metodología basada en la digestión de las proteínas plasmáticas con pepsina y la posterior precipitación de los fragmentos $F(ab')_2$ de las inmunoglobulinas mediante adición de sulfato de amonio (Raw *et al.* 1991). Sin embargo, las tecnologías utilizadas en este proceso productivo han evolucionado en la región y se han efectuado algunos desarrollos tecnológicos en el área. Uno de ellos lo constituye la introducción de una planta cerrada para el procesamiento de plasma hiperinmune en el Instituto Butantan. Esta paquete tecnológico, de creación brasileña, se implementó en la década de los 80, como respuesta a un importante problema de abastecimiento de este producto en Brasil. Este desarrollo, adaptado y utilizado en los tres grandes centros productores de antiveneno de ese país, permite procesar grandes volúmenes de plasma y garantiza el abastecimiento de todo el antiveneno requerido en Brasil.

Otro desarrollo tecnológico destacado en la región lo constituyó la introducción de una nueva metodología en el procesamiento del plasma equino para la purificación de las inmunoglobulinas, basada en la precipitación de las proteínas no-inmunoglobulínicas del plasma mediante adición de ácido caprílico (Rojas *et al.* 1994). Esta tecnología, adaptada para procesamiento industrial de plasma en el Instituto Clodomiro Picado, es muy simple y económica, y genera un producto de alta pureza, eficacia, estabilidad y seguridad. El antiveneno producido con esta tecnología ha sido utilizado exitosamente en Centroamérica y Colombia (Otero *et al.* 1999, Arroyo *et al.* 1999). Es

de destacar que la administración de este antiveneno se asocia con una incidencia muy baja de reacciones adversas tempranas en los pacientes, especialmente cuando se compara con antivenenos producidos mediante otras tecnologías (Otero-Patiño *et al.* 1998, Otero *et al.* 1999). Actualmente, esta tecnología está siendo utilizada exitosamente en otros países latinoamericanos.

Se han producido antivenenos contra los principales tipos de serpientes venenosas de la región. La mayoría de los centros productores se dedican a la producción de antivenenos eficaces contra venenos de especies de la familia Viperidae (Meier 1995), aunque algunos centros también producen antivenenos anti-elapídicos. Uno de los esfuerzos más destacados en este sentido lo constituyó la producción de un 'antiveneno anticoral panamericano', el cual es eficaz en la neutralización de los venenos de las más importantes serpientes *Micrurus* (Bolaños *et al.* 1978).

Otra línea de investigación importante la constituye el estudio de la capacidad neutralizante de los antivenenos, asociado con el desarrollo de técnicas de laboratorio que han permitido el análisis de la neutralización de efectos farmacológicos y enzimáticos específicos (Gutiérrez *et al.* 1996). Esta plataforma metodológica ha permitido evaluar, de manera rigurosa y detallada, la capacidad neutralizante de los antivenenos producidos en los diferentes países de la región. Estas técnicas constituyen un instrumento de gran utilidad para las autoridades de salud de la región para determinar cuáles antivenenos son eficaces en cada país (ver por ejemplo Otero *et al.* 1995). Finalmente, debe destacarse el empeño de diversos grupos por reducir el uso de ratones en las pruebas de potencia de los antivenenos, sustituyendo las pruebas in vivo por diversos métodos in vitro, tales como el ELISA (Maria *et al.* 1998).

CONSIDERACIONES FINALES

Este recorrido evidencia aportes importantes de los investigadores de la región en el

conocimiento de la estructura y función de proteínas tóxicas presentes en venenos de serpientes y en el estudio de la fisiopatología de los envenenamientos, así como en la búsqueda de inhibidores de esas toxinas y en el mejoramiento de las tecnologías para la producción de antivenenos. Quedan pendientes muchas preguntas e interrogantes por enfrentar, muchas más de las que se ha podido esclarecer. Pese a que se ha dilucidado algunos aspectos importantes en el tema, los venenos de serpientes siguen constituyendo una fuente inagotable de sorpresa y asombro, por su complejidad bioquímica y farmacológica, por su enorme variabilidad y por su impacto en la salud pública. El futuro ofrece una infinidad de retos para los estudiosos de los venenos de serpientes en América Latina.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al personal del Instituto Clodomiro Picado, así como a diversos investigadores latinoamericanos, por los múltiples esfuerzos compartidos en el campo de la investigación toxinológica. Asimismo, agradece a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, el CONICIT, la International Foundation for Science, la red NeTropica y el Wellcome Trust por el financiamiento de proyectos de investigación.

RESUMEN

La investigación científica sobre venenos de serpientes ha sido un campo de trabajo fructífero en América Latina. En la presente revisión se destacan algunos de los principales logros obtenidos en la comprensión de la estructura química y del mecanismo de acción de toxinas presentes en venenos de serpientes de la región. Además, se describen algunas líneas de trabajo en investigación clínica relacionada con el mejor conocimiento de la fisiopatología de estos envenenamientos en humanos y en el desempeño terapéutico de los antivenenos. También se destacan algunos logros en el desarrollo de tecnologías para la producción de antivenenos, así como en la caracterización de la capacidad neutralizante de estos inmunobiológicos.

REFERENCIAS

- Alape-Girón, A., B. Stiles, J. Schmidt, M. Girón-Cortés, M. Thelestam, H. Jornvall, T. Bergman. 1996. Characterization of multiple nicotinic acetylcholine receptor-binding proteins and phospholipases A₂ from the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus*. FEBS Lett. 380: 29-32.
- Alape-Girón, A., B. Persson, E. Cederlund, M. Flores-Díaz, J.M. Gutiérrez, M. Thelestam, T. Bergman & H. Jornvall. 1999. Elapid venom toxins: Multiple recruitments of ancient scaffolds. Eur. J. Biochem. 259: 225-234.
- Amaral, C.F., O.A. Da Silva, P. Goody & D. Miranda. 1985. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. Toxicon 23: 877-885.
- Andrews, R.K., W.J. Booth, J.J. Gorman, P.A. Castaldi & M.C. Berndt. 1989. Purification of botrocetin from *Bothrops jararaca* venom. Analysis of the botrocetin-mediated interaction between von Willebrand factor and the human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. Biochemistry 28: 8317-8326.
- Aragón, F. & F. Gubensek. 1978. Characterization of thrombin-like proteinase from *Bothrops asper* venom, p. 107-111. In P. Rosenberg (ed.). Toxins: Animal, plant and microbial. Pergamon, Oxford.
- Arni, R.K., R.J. Ward, J.M. Gutiérrez & A. Tulinsky. 1995. Crystal structure of a calcium-independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom. Acta Cryst. D51: 311-317.
- Arni, R.K. & R.J. Ward. 1996. Phospholipase A₂. A structural review. Toxicon 34: 827-841.
- Arni, R.K., M.R.M. Fontes, C. Barberato, J.M. Gutiérrez, C. Díaz & R.J. Ward. 1999. Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*. Arch. Biochem. Biophys. 366: 177-182.
- Arroyo, O., G. Rojas & J.M. Gutiérrez. 1999. Envenenamiento por mordedura de serpiente en Costa Rica en 1996: Epidemiología y consideraciones clínicas. Acta Méd. Cost. 41: 23-29.
- Assakura, M.T., A.P. Reichl, M.C.A. Asperti & F.R. Mandelbaum. 1985. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). Toxicon 23: 691-706.

- Azevedo-Marques, M.M., S.E. Hering & P. Cupo. 1987. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. *Toxicon* 25: 1163-1168.
- Barros, S.F., I. Friedlanskaia, V.L. Petricevich & T.L. Kipnis. 1998. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Med. Inflamm.* 7: 339-346.
- Bjarnason, J.B. & J.W. Fox. 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol. Ther.* 62: 325-372.
- Bolaños, R. 1984. Serpientes, venenos y ofidismo en Centroamérica. Universidad de Costa Rica, San José.
- Bolaños, R., L. Cerdas & J.W. Abalos. 1978. Venoms of coral snakes (*Micrurus* sp.): Report on a multivalent antivenin for the Americas. *Bull. Pan Am. Health Org.* 12: 23-27.
- Bon, C. 1996. Serum therapy was discovered 100 years ago, p. 3-9. In C. Bon & M. Goyffon (eds.). *Envenomings and their treatments*. Fondation Marcel Mérieux, Lyon.
- Borkow, G., J.M. Gutiérrez & M. Ovadia. 1993. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 31: 1137-1150.
- Braud, S., C. Bon & A. Wisner. 2000. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie* 82: 851-859.
- Brazil, V. 1911. A defesa contra o ophidismo. Pocaí and Weiss, São Paulo.
- Campbell, J.A. & W. Lamar. 1989. *The venomous reptiles of Latin America*. Comstock, Ithaca.
- Calderón, L. & B. Lomonte. 1998. Immunochemical characterization and role in toxic activities of region 115-129 of myotoxin II, a Lys49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 358: 343-350.
- Cameron, D.L. & A.T. Tu. 1978. Chemical and functional homology of myotoxin *a* from prairie rattlesnake venom and crotamine from South American rattlesnake venom. *Biochim. Biophys. Acta* 532: 147-154.
- Cardoso, J.L.C., H.W. Fan, F.O.S. Franca, M.T. Jorge, R.P. Leite, S.A. Nishioka, A. Avila, I.S. Sano-Martins, S.C. Tomy, M.L. Santoro, A.M. Chudzinski, S.C.B. Castro, A.S. Kamiguti, E.M.A. Kelen, M.H. Hirata, R.M.S. Miranda, R.D.G. Theakston & D.A. Warrrell. 1993. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *Q. J. Med.* 86: 315-325.
- Castro, H.C., D.L.S. Dutra, A.L. Oliverira-Carvalho & R.B. Zingali. 1998. Bothroaltermín, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon* 36: 1903-1912.
- Chacur, M., G. Picolo, J.M. Gutiérrez, C.F.P. Teixeira & Y. Cury. 2001. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 39: 1173-1181.
- Chang, C.C. & K.H. Tseng. 1978. Effect of crotamine, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. *Br. J. Pharmacol.* 63: 551-559.
- Chaves, F., M. Barboza & J.M. Gutiérrez. 1995. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon* 33: 31-39.
- Chippaux, J.P. 1998. Snake-bites: Appraisal of the global situation. *Bull. World Hlth. Org.* 76: 515-524.
- Cintra, A.C.O., S. Marangoni, B. Oliveira & J.R. Giglio. 1993. Bothropstoxin-I: Amino acid sequence and function. *J. Prot. Chem.* 12: 57-64.
- da Silva Giotto, M.T., R.C. Garrat, G. Oliva, Y.P. Mascarenhas, J.R. Giglio, A.C.O. Cintra, W.F. de Azevedo, R.K. Arni & R.J. Ward. 1998. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: Conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. *Proteins: Structure, function and genetics* 30: 442-454.
- de Oliveira, J.S., A.R.B.P. da Silva, M.B. Soares, M.A. Stephano, W.O. Dias, I. Raw & P.L. Ho. 2000. Cloning and characterization of an α -neurotoxin-type protein specific for the coral snake *Micrurus corallinus*. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 267: 887-891.
- Díaz, C., J.M. Gutiérrez, B. Lomonte & J.A. Gené. 1991. The effect of toxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: Relationship to phospholipase A₂, anticoagulant and myotoxic activities. *Biochim. Biophys. Acta* 1070: 455-460.
- Díaz, C., A. Alape, B. Lomonte, T. Olamendi & J.M. Gutiérrez. 1994. Cleavage of the NH₂-terminal octapeptide of *Bothrops asper* myotoxic lysine-49 phospholipase A₂ reduces its membrane-destabilizing effect. *Arch. Biochem. Biophys.* 312: 228-238.

- Díaz, C., G. León, A. Rucavado, N. Rojas, A.J. Schroit & J.M. Gutiérrez. 2001. Modulation of the susceptibility of human erythrocytes to snake venom myotoxic phospholipases A₂: Role of negatively charged phospholipids as potential membrane binding sites. *Arch. Biochem. Biophys.* 391: 56-64.
- Escalante, T., A. Franceschi, A. Rucavado & J.M. Gutiérrez. 2000. 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.* 60: 269-274.
- Fan, H.W. & J.L. Cardoso. 1995. Clinical toxicology of snake bites in South America, p. 667-688. *In* J. Meier & J. White (eds.). *Handbook of toxicology of animal venoms and poisons*. CRC, Florida.
- Farsky, S.H.P., J.W.M. Costa-Cruz, Y. Cury & C.F.P. Teixeira. 1997. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom. *In vivo* and *in vitro* studies. *Toxicon* 35: 185-193.
- Ferreira, S.H. 1965. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br. J. Pharmac.* 24: 163-169.
- Ferreira, S.H., D.C. Bartelt & L.J. Greene. 1970. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* 9: 2583-2593.
- Fortes Dias, C.L., Y. Lin, J. Ewell, C.R. Diniz & T.Y. Liou. 1994. A phospholipase A₂ inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *J. Biol. Chem.* 269: 15646-15651.
- Franceschi, A., A. Rucavado, N. Mora & J.M. Gutiérrez. 2000. Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 38: 63-77.
- Francis, B., J.M. Gutiérrez, B. Lomonte & I.I. Kaiser. 1991. Myotoxin II from *Bothrops asper* (terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. *Arch. Biochem. Biophys.* 284: 352-359.
- Francischetti, I.M., F.A. Ghazaleh, R.A. Reis, C.R. Carlini & J.A. Guimaraes. 1998. Convulxin induces platelet activation by a tyrosine kinase-dependent pathway and stimulates tyrosine phosphorylation of platelet proteins, including PLC gamma 2, independently of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *Arch. Biochem. Biophys.* 353: 239-250.
- Francischetti, I.M., M.E. Gombarovits, J.G. Valenzuela, C.R. Carlini & J.A. Guimaraes. 2000. Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 127C: 23-36.
- Fuly, A.L., O.L.T. Machado, E.W. Alves & C.R. Carlini. 1997. Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (bushmaster) snake venom. *Thromb. Haemost.* 78: 1372-1380.
- Furtado, M.F.D., M. Maruyama, A.S. Kamiguti & L.C. Antonio. 1991. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. *Toxicon* 29: 219-226.
- Giorgi, R., M.M. Bernardi & Y. Cury. 1993. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon* 31: 1257-1265.
- Giuliani, C.D., M.R.C. Iemma, A.C.V. Bondioli, D.H.F. Souza, L.L. Ferreira, A.C. Amaral, T.F. Salvini & H.S. Selistre de Araujo. 2001. Expression of an active recombinant lysine 49 phospholipase A₂ myotoxin as a fusion protein in bacteria. *Toxicon* 39: 1595-1600.
- Gonçalves, L.R.C. & M. Mariano. 2000. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: Relationship to neurogenic inflammation. *Med. Inflamm.* 9: 101-107.
- Goularte, F.C., M.A. Cruz-Hofling, J.C. Cogo, J.M. Gutiérrez & L. Rodrigues-Simioni. 1995. The ability of specific antivenom and low temperature to inhibit the myotoxicity and neuromuscular block induced by *Micrurus nigrocinctus* venom. *Toxicon* 33: 679-689.
- Gutiérrez, J.M. 1995. Clinical toxicology of snakebite in Central America, p. 645-665. *In* J. Meier & J. White (eds.). *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. CRC, Florida.
- Gutiérrez, J.M., F. Chaves & R. Bolaños. 1980. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Rev. Biol. Trop.* 28: 341-351.
- Gutiérrez, J.M., C.L. Ownby & G.V. Odell. 1984a. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: Partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon* 22: 115-128.
- Gutiérrez, J.M., C.L. Ownby & G.V. Odell. 1984b. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp. Mol. Pathol.* 40: 367-379.
- Gutiérrez, J.M., O. Arroyo, F. Chaves, B. Lomonte & L. Cerdas. 1986. Pathogenesis of myonecrosis induced by coral snake (*Micrurus nigrocinctus*) venom in mice. *Br. J. Exp. Pathol.* 67: 1-12.

- Gutiérrez, J.M. & B. Lomonte. 1989. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. Mem. Inst. Butantan 51: 211-223.
- Gutiérrez, J.M., M. Romero, C. Díaz, G. Borkow & M. Ovidia. 1995. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). Toxicon 33: 19-29.
- Gutiérrez, J.M., G. Rojas, L. Bogarín & B. Lomonte. 1996. Evaluation of the neutralizing ability of antivenoms for the treatment of snake bite envenoming in Central America, p. 223-231. In C. Bon & M. Goyffon (eds.). Envenomings and their treatments. Fondation Marcel Mérieux, Lyon.
- Gutiérrez, J.M. & B. Lomonte. 1997. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms, p. 321-352. In R.M. Kini (ed.). Venom phospholipase A₂ enzymes. Structure, function and mechanism. Wiley, Chichester.
- Gutiérrez, J.M. & A. Rucavado. 2000. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. Biochimie 82: 841-850.
- Gutiérrez, J.M. & M. Sasa. 2001. Bites by colubrid snakes in Mexico and Central America. J. Toxicol. Toxin Rev. (en prensa).
- Hofmann, H., C. Dumarey & C. Bon. 1983. Blood coagulation induced by *Bothrops atrox* venom: Identification and properties of a factor X activator. Biochimie 65: 201-210.
- Jiménez-Porras, J.M. 1964a. Venom proteins of the fer-de-lance, *Bothrops atrox*, from Costa Rica. Toxicon 2: 155-166.
- Jiménez-Porras, J.M. 1964b. Intraspecific variations in composition of venom of the jumping viper, *Bothrops nummifera*. Toxicon 2: 187-196.
- Jiménez-Porras, J.M. 1970. Biochemistry of snake venoms (a review). Clin. Toxicol. 3: 389-431.
- Jorge, M.T., L.A. Ribeiro, M.L.R. da Silva, E.J.U. Kusano & J.S. de Mendonça. 1994. Microbiological studies of abscesses complicating *Bothrops* snakebite in humans: A prospective study. Toxicon 32: 743-748.
- Kamiguti, A.S., C.R.M. Hay, R.D.G. Theakston & M. Zuzel. 1996. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. Toxicon 34: 627-642.
- Lacerda, J.B. 1884. Leçons sur la venin des serpents du Brésil. Rio de Janeiro.
- Landucci, E.C., R.C. de Castro, M. Toyama, J.R. Giglio, S. Marangoni, G. De Nucci & E. Antunes. 2000. Inflammatory oedema induced by the lys-49 phospholipase A₂ homologue piratoxin-I in the rat and rabbit. Effect of polyanions and *p*-bromophenacylbromide. Biochem. Pharmacol. 59: 1289-1294.
- Laure, C.J. 1975. Die primärstruktur des crotamins. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 356: 213-215.
- Lee, W.H., M.T. da Silva Giotto, S. Marangoni, M.H. Toyama, I. Polikarpov & R.C. Garrett. 2001. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipase A₂- a hypothesis: The crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. Biochemistry 40: 28-36.
- Lizano, S., B. Lomonte, J.W. Fox & J.M. Gutiérrez. 1997. Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Bothrops asper*. Biochem. J. 326: 853-859.
- Lizano, S., Y. Angulo, B. Lomonte, J.W. Fox, G. Lambeau, M. Lazdunski & J.M. Gutiérrez. 1999. Two phospholipase A₂ inhibitors from the plasma of *Cerrophidion (Bothrops) godmani* which selectively inhibit two different group-II phospholipase A₂ myotoxins from its own venom: Isolation, molecular cloning and biological properties. Biochem. J. 346: 631-639.
- Lizano, S., G. Lambeau & M. Lazdunski. 2001. Cloning and cDNA sequence analysis of Lys49 and Asp49 basic phospholipase A₂ myotoxin isoforms from *Bothrops asper*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 33: 127-132.
- Lomonte, B., J.A. Gené, J.M. Gutiérrez & L. Cerdas. 1983. Estudio comparativo de los venenos de serpiente cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. Toxicon 21: 379-384.
- Lomonte, B., A. Tarkowski & L.A. Hanson. 1993. Host response to *Bothrops asper* snake venom: Analysis of edema formation, inflammatory cells and cytokine release in a mouse model. Inflammation 17: 93-105.
- Lomonte, B., A. Tarkowski & L.A. Hanson. 1994a. Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂ of *Bothrops asper* snake venom. Toxicon 32: 1359-1369.
- Lomonte, B., E. Moreno, A. Tarkowski, L.A. Hanson & M. Maccarana. 1994b. Neutralizing interaccion

- between heparins and myotoxin II, a Lys-49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *J. Biol. Chem.* 269: 29867-29873.
- Lomonte, B., Y. Angulo, S. Rufini, W. Cho, J.R. Giglio, M. Ohno, J.J. Daniele, P. Geoghegan & J.M. Gutiérrez. 1999. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A₂ on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells *in vitro*. *Toxicon* 37: 145-158.
- Lomonte, B., J. Pizarro-Cerdá, Y. Angulo, J.P. Gorvel & E. Moreno. 1999. Tyr→Trp-substituted peptide 115-129 of a Lys49 phospholipase A₂ expresses enhanced membrane-damaging activities and reproduces its *in vivo* myotoxic effect. *Biochim. Biophys. Acta* 1461: 19-26.
- Mandelbaum, F.R., A.P. Reichl & M.T. Assakura. 1976. Some physical and biochemical characteristics of HF2, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*, p. 111. *In A. Ohsaka, K. Hayashi & Y. Sawai (eds.)*. Animal, plant and microbial toxins. Plenum, New York.
- Mandelbaum, F.R., M.T. Assakura & A.P. Reichl. 1984. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pin-tada). *Toxicon* 22: 193-206.
- Maria, W.S., M.O. Cambuy, J.O. Costa, D.T. Velarde & C. Chaves-Olortegui. 1998. Neutralizing potency of horse antithrombotic antivenom. Correlation between *in vivo* and *in vitro* methods. *Toxicon* 36: 1433-1439.
- Markland, F.S. 1998. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36: 1749-1800.
- Maruyama, M., A.S. Kamiguti, J.L.C. Cardoso, I.S. Sano-Martins, A.M. Chudzinski, M.L. Santoro, P. Morena, S.C. Tomy, L.C. Antonio, H. Mihara & E.M.A. Kelen. 1990. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (jararaca). *Thromb. Haemost.* 63: 449-453.
- Meier, J. 1995. Commercially available antivenoms ("hyperimmune sera", "antivenins", "antisera") for antivenom therapy, p. 689-721. *In J. Meier & J. White (eds.)*. Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. CRC, Florida.
- Melo, P.A., M.C. Nascimento, W.B. Mors & G. Suárez-Kurtz. 1994. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. *Toxicon* 32: 595-603.
- Milani, R., M.T. Jorge, F.P. Ferraz de Campos, F.P. Martins, A. Bousso, J.L.C. Cardoso, L.A. Ribeiro, H.W. Fan, F.O.S. França, I.S. Sano-Martins, D. Cardoso, I. C.O.F. Fernández, J.C. Fernandes, V.L. Aldred, M.P. Sandoval, G. Puerto, R.D.G. Theakston & D.A. Warrell. 1997. Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. *Q. J. Med.* 90: 323-334.
- Moreira, L., G. Borkow, M. Ovadia & J.M. Gutiérrez. 1994. Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. *Toxicon* 32: 977-987.
- Mors, W.B., M.C. Nascimento, J.P. Parente, M.H. da Silva, P.A. Melo & G. Suárez-Kurtz. 1989. Neutralization of lethal and myotoxic activities of South American rattlesnake venom by extracts and constituents of plant *Eclipta prostrata* (Asteraceae). *Toxicon* 27: 1003-1009.
- Moura da Silva, A.M., R.D.G. Theakston & J.M. Cramp-ton. 1996. Evolution of disintegrin cysteine-rich and mammalian matrix-degrading metalloproteinases: Gene duplication and divergence of a common ancestor rather than divergent evolution. *J. Mol. Evol.* 43: 263-269.
- Moura da Silva, A.M., C. Marcinkiewicz, M. Marcinkiewicz & S. Niewiarowski. 2001. Selective recognition of α₂β₁ integrin by jararhagin, a metalloproteinase-/disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. *Thromb. Res.* 102: 153-159.
- Neves-Ferreira, A.G.C., N. Cardinale, S.L.G. Rocha, J. Perales & G. Domont. 2000. Isolation and characterization of DM40 and DM43, two snake venom metalloproteinase inhibitors from *Didelphis marsupialis* serum. *Biochim. Biophys. Acta* 1474: 309-320.
- Núñez, C.E., Y. Angulo & B. Lomonte. 2001. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: Synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. *Toxicon* 39: 1587-1594.
- Otero, R., G.S. Tobón, L.F. Gómez, R.G. Osorio, R. Valde-rrama, D. Hoyos, J.E. Urreta, S. Molina & J.J. Arboleda. 1992. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo de 1989-febrero de 1990). *Acta Méd. Colombiana* 17: 229-249.
- Otero, R., V. Núñez, R.G. Osorio, J.M. Gutiérrez, C.A. Giraldo & L.E. Posada. 1995. Ability of six Latin

- American antivenoms to neutralize the venom of mapaná equis (*Bothrops atrox*) from Antioquia and Chocó (Colombia). *Toxicon* 33: 809-815.
- Otero, R., J.M. Gutiérrez, G. Rojas, V. Núñez, A. Díaz, E. Miranda, A.F. Uribe, J.F. Silva, J.G. Ospina, Y. Medina, M.F. Toro, M.E. García, G. León, M. García, S. Lizano, J. De La Torre, J. Márquez, Y. Mena, N. González, L.C. Arenas, A. Puzón, N. Blanco, A. Sierra, M.E. Espinal, M. Arboleda, J.C. Jiménez, P. Ramírez, M. Díaz, M.C. Guzmán, J. Barros, S. Henao, A. Ramírez, U. Macea & R. Lozano. 1999. 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* 37: 895-908.
- Otero-Patiño, R., J.L.C. Cardoso, H.G. Higashi, V. Núñez, A. Sierra, A. Díaz, M.F. Toro, M.E. García, A.M. Moreno, M.C. Medina, N. Castañeda, J.F. Silva-Díaz, M. Murcia, S.Y. Cárdenas & W. Dias da Silva. 1998. A randomized, blinded, comparative trial of one pepsin-digested and two whole IgG antivenoms for *Bothrops* snake bites in Urabá, Colombia. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 58: 183-189.
- Paine, M.J.I., H.P. Desmond, R.D.G. Theakston & J.M. Crampton. 1992. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight haemorrhagic metalloproteinase, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. *J. Biol. Chem.* 267: 22869-22876.
- Páramo, L., B. Lomonte, J. Pizarro-Cerdá, J.A. Bengoechea, J.P. Gorvel & E. Moreno. 1998. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. *Eur. J. Biochem.* 253: 452-461.
- Peña-Cavarría, A., V.M. Villarejos & M. Zomer. 1970. Clinical importance of prothrombin time determination in snake-venom poisoning. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 19: 342-344.
- Perales, J., C. Villela, G.B. Domont, V. Choumet, B. Saliou, H. Moussatché, C. Bon & G. Faure. 1995. Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. *Eur. J. Biochem.* 227: 19-26.
- Petricevich, V.L., C.F.P. Teixeira, D.V. Tambourgi & J.M. Gutiérrez. 2000. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon* 38: 1253-1266.
- Picado, C. 1931. Serpientes venenosas de Costa Rica. Sus venenos. Seroterapia Antiofídica. Alsina, San José.
- Prado-Franceschi, J. & O. Vital Brazil. 1981. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 19: 875-887.
- Raw, I., M.C. Rocha, M.I. Esteves & A.S. Kamiguti. 1986. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 19: 333-338.
- Raw, I., R. Guidolin, H.G. Higashi & E.M.A. Kelen. 1991. Antivenins in Brazil: Preparation, p. 557-581. In A.T. Tu (ed.). Handbook of natural toxins. Vol. 5. Reptile venoms and toxins. Marcel Dekker, New York.
- Rocha e Silva, M., W.T. Beraldo & G. Rosenfeld. 1949. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Amer. J. Physiol.* 156: 261-273.
- Rojas, G., J.M. Jiménez & J.M. Gutiérrez. 1994. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: Description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon* 32: 351-363.
- Rosenfeld, G. 1971. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America, p. 345-384. In W. Bucherl & E. Buckley (eds.). Venomous animals and their venoms. Vol. II. Venomous vertebrates. Academic, New York.
- Rosso, J.P., O. Vargas-Rosso, J.M. Gutiérrez, H. Rochat & P.E. Bougis. 1996. Characterization of α -neurotoxins and phospholipase A₂ activities from *Micrurus* venoms. Determination of the amino acid sequence and receptor-binding ability of the major α -neurotoxin from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. *Eur. J. Biochem.* 238: 231-239.
- Rucavado, A., T. Escalante, A. Franceschi, F. Chaves, G. León, Y. Cury, M. Ovidia & J.M. Gutiérrez. 2000. 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 CaNa₂EDTA. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 63: 313-319.
- Rucavado, A., M. Soto, A.S. Kamiguti, R.D.G. Theakston, J.W. Fox, T. Escalante & J.M. Gutiérrez. 2001. Characterization of aspercetin, a platelet aggregating component from the venom of the snake *Bothrops*

- asper* which induces thrombocytopenia and potentiates metalloproteinase-induced hemorrhage. *Thromb. Haemost.* 85: 710-715.
- Sánchez, E.F., A. Magalhaes & C.R. Diniz. 1987. Purification of a hemorrhagic factor (LHF-I) from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *Toxicol.* 25: 611-619.
- Sánchez, E.F., A. Magalhaes, F.R. Mandelbaum & C.R. Diniz. 1991a. Purification and characterization of the hemorrhagic factor II from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *Biochim. Biophys. Acta* 1074: 347-356.
- Sánchez, E.F., C.R. Diniz & M. Richardson. 1991b. The complete amino acid sequence of the hemorrhagic factor LHF-II, a metalloproteinase isolated from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *FEBS Lett.* 282: 178-182.
- Selistre, H.S. & J.R. Giglio. 1987. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). *Toxicol.* 25: 1135-1144.
- Slotta, K.H. & H.L. Fraenkel-Conrat. 1938-1939. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. 4. Purificação e cristalização do veneno de cobra cascavel. *Mem. Inst. Butantan* 12: 505-513.
- Soares, A.M., S.H. Andraio-Escarso, Y. Angulo, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, S. Marangoni, M.H. Toyama, R.K. Arni & J.R. Giglio. 2000. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 373: 7-15.
- Soares, A.M., S.H. Andraio-Escarso, R.K. Bortoleto, L. Rodrigues-Simioni, R.K. Arni, R.J. Ward, J.M. Gutiérrez & J.R. Giglio. 2001. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 387: 188-196.
- Souza, D.H.F., M.R.C. Iemma, L.L. Ferreira, J.P. Faria, M.L.V. Oliva, R.B. Zingali, S. Niewarowski & H.S. Selistre-de-Araujo. 2000. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloproteinase alternagin inhibits $\alpha_2\beta_1$ integrin-mediated cell adhesion. *Arch. Biochem. Biophys.* 384: 341-350.
- Souza, D.H.F., H.S. Selistre-de-Araujo, A.M. Moura-da-Silva, M.S. Della-Casa, G. Oliva & R.C. Garratt. 2001. Crystallization and preliminary X-ray analysis of jararhagin, a metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops jararaca* snake venom. *Acta Cryst.* D57: 1135, 1137.
- Stocker, K. & G.H. Barlow. 1976. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (Batroxobin). *Meth. Enzymol.* 45: 214-223.
- Teixeira, C.F.P., Y. Cury, S. Oga & S. Jancar. 1994. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: Role of eicosanoids and platelet activating factor (PAF). *Toxicol.* 32: 419-426.
- Thomas, L., B. Tyburn, B. Bucher, F. Pecout, D. Ketterle, D. Rieux, D. Smadja, D. Garnier & Y. Plumelle. 1995. Prevention of thromboses in human patients with *Bothrops lanceolatus* envenoming in Martinique: Failure of anticoagulants and efficacy of a monospecific antivenom. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 52: 419-426.
- Trebien, H.A. & J.B. Calixto. 1989. Pharmacological evaluation of rat paw edema induced by *Bothrops jararaca* venom. *Agents Actions* 26: 292-300.
- Valente, R.H., B. Dragulev, J. Perales, J.W. Fox & G. Domont. 2001. BJ64a, a snake venom metalloproteinase inhibitor. Isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action. *Eur. J. Biochem.* 268: 3042-3052.
- Vargaftig, B.B., J. Prado-Franceschi, M. Chignard, J. Lefort & G. Marlas. 1980. Activation of guinea-pig platelets induced by convulxin, a substance extracted from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. *Eur. J. Pharmacol.* 68: 451-464.
- Vital Brazil, O. 1966. Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. *Mem. Inst. Butantan (Simp. Int.)* 33: 981-992.
- Vital Brazil, O. 1987a. Coral snake venoms: Mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 29: 119-126.
- Vital Brazil, O. 1987b. History of the primordia of snake-bite accident serotherapy. *Mem. Inst. Butantan* 49: 7-20.
- Vital Brazil, O., J. Prado-Franceschi & C.J. Laure. 1979. Repetitive muscle responses induced by crotoamine. *Toxicol.* 17: 61-67.
- Ward, R.J., A.H. de Oliveira, R.K. Bortoleto, J.C. Rosc, V.M. Faca & I.J. Greene. 2001. Refolding and purification of bothropstoxin-I, a Lys49-phospholipase A₂ homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 21: 134-140.

- Yarlequé, A., S. Campos, E. Escobar, F. Lazo, N. Sánchez, S. Hyslop, N.A. Marsh, P.J. Butterworth & R.G. Price. 1989. Isolation and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake, *Lachesis muta muta* (Peruvian bushmaster). *Toxicon* 27: 1189-1197.
- Zingali, R.B., M. Jandron-Perrus, M.C. Guilin & C. Bon. 1993. Bothrojararacin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: Characterization and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry* 32: 10749-10802.