

QUIMICA Y FARMACOLOGIA DEL VENENO DE SERPIENTES
(II PARTE):
EFECTOS SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO Y CARDIOVASCULAR

Alfonso Zavaleta Martínez-Vargas^{1, 2, 3}

ABSTRACT

A multidisciplinary revision of snake venoms include its chemical, pharmacological, toxicological and immunological aspects. In the first part, the chemical composition of venoms and local effects of venom poisoning in human and experimental models are reviewed. In the second part, the systemic effects of snake venoms, including both neurotoxicity and cardiovascular failure effects, and the nature, function and classification of the polypeptide neurotoxins and cardiotoxins are reviewed; and a comparison with the Peruvian *Lachesis muta muta* snake venom effects upon both nervous and cardiovascular systems is discussed.

KEYWORDS: SNAKE VENOM, CHEMISTRY, PHARMACOLOGY, NEUROTOXICITY, CARDIOVASCULAR TOXICITY.

* Este trabajo recibió financiación parcial de la International Foundation for Sciences (Suecia), y fue realizado cuando el autor se encontraba recibiendo una subvención especial al investigador del CONCYTEC-PERU.

1. Laboratorio de Farmacología, Departamento Académico de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias y Filosofía.
2. Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, A.P. 5045, Lima 100, Perú.
3. Laboratorio Afiliado, Centro de Investigación en Salud "Hugo Lumbrellas Cruz", Instituto Nacional de Salud, Lima Perú.

INTRODUCCION

Los animales venenosos, entre ellos las serpientes venenosas, han sido considerados como agentes dañinos y letales para el hombre en todas las etapas históricas de la humanidad. Algunas culturas como la egipcia y maya las han considerado seres divinos, y otras culturas, tanto en el medioevo como en la actualidad, utilizan el veneno, así como extractos corporales de serpientes venenosas, como agentes afrodisíacos, analgésicos, o medicamentosos [39].

Los envenenamientos producidos por mordeduras de ofidios, más conocidos bajo la denominación genérica de ofidismo, han ocurrido desde la antigüedad, y actualmente constituyen un importante problema de salud pública, produciéndose de 30,000 a 40,000 muertes anuales [1, 8, 14, 24, 39, 40, 48].

El Perú cuenta con más de 60 especies de serpientes venenosas conocidas, agrupadas en 3 familias: Viperidae, Elapidae e Hydrophyidae respectivamente, incluyendo los géneros *Bothrops*, *Lachesis*, *Crotalus*, *Micrurus*, *Leptomicrurus* y *Pelamis*, cuya distribución geográfica, característica del envenenamiento, y su tratamiento han sido revisadas recientemente [10, 7, 35, 36].

En la primera parte de este estudio nos ocupamos del veneno ofídico en sus diferentes aspectos: biológico, bioquímico, farmacológico e inmunológico, y delineamos las principales características químicas y farmacológicas de las fracciones biológicas presentes en estos venenos, responsables de los efectos observados a nivel local (citotoxicidad, hemorragia, necrosis y mio-necrosis), ocupándonos en detalle del veneno de *Lachesis muta muta*. En este trabajo, revisaremos los principales efectos sistémicos del envenenamiento por serpientes de la Familia Viperidae, incluyendo los efectos sobre el sistema nervioso y cardiovascular.

EFFECTOS SISTEMICOS DEL ENVENENAMIENTO POR MORDEDURA DE SERPIENTES.

Dentro de los efectos sistémicos del veneno de serpiente, se clasifican a todos aquéllos que afectan órganos o sistemas a distancia del sitio de inoculación del veneno, incluyéndose entre ellos a los siguientes:

- Acciones sobre el sistema nervioso (central ó periférico, neurotoxicidad).

- Acciones sobre el sistema cardiovascular (cardiotoxicidad y alteraciones de la presión arterial).
- Acciones sobre el aparato respiratorio (alteración de la dinámica respiratoria).
- Acciones sobre el sistema hematológico, incluyendo al sistema de la coagulación sanguínea (efectos sobre diferentes constituyentes de la sangre responsables de la hemólisis y sobre la cascada de la coagulación), al sistema plaquetario y a los glóbulos rojos y blancos.
- Acciones sobre el aparato excretor (nefrotoxicidad).
- Acciones sobre el sistema endocrino (alteraciones metabólicas inducidas por el veneno).

Las manifestaciones sistémicas comunes a los géneros *Bothrops*, *Crótalus* y *Lachesis* incluyen hipotensión y “shock”, trastornos de la coagulación y alteraciones en las células hemáticas [39]. Los efectos locales incluyen edema y hemorragia debida a exudación de plasma o sangre total a nivel de los capilares, presuntamente provocada por una acción citotóxica a nivel del endotelio vascular [8, 14, 15, 19, 24]. La necrosis es la manifestación local más seria, pudiendo ocasionar lesiones tróficas prolongadas y/o incapacitación motora permanente por la amputación de miembros [12, 14, 16]. En el envenenamiento por *Crotalus durissus terrificus* “Cascabel”, se observan, además de los fenómenos antes descritos, la ocurrencia de trastornos neurológicos [20, 39]. El accidente lachésico ocurre en zonas rurales y está asociado a una elevada mortalidad inmediata, lo que ha motivado la casi total ausencia de reportes de envenenamientos en humanos [46]. En 1981, Silva Haad reportó dos casos humanos en Leticia (Colombia), describiendo los síndromes coagulante, hipotensivo, hematológico y gastrointestinal de este envenenamiento [46], los cuales fueron previamente descritos por Vellard en modelos animales, en la década de los 50 [49].

NEUROTOXICIDAD Y CARDIOTOXICIDAD

Las neurotoxinas y cardiotoxinas del veneno de serpiente son factores polipeptídicos, algunos de los cuales poseen capacidad enzimática de fosfolipasa A₂ [24], y pueden ser detectadas utilizando modelos *in vivo* o *in vitro*. Chen Yuan Lee ha utilizado preferentemente modelos *in vitro*, como la preparación de diafragma aislado de rata o de músculo biventer de pollo, para la identificación de neurotoxinas y cardiotoxinas [23].

Las neurotoxinas pueden clasificarse, según su sitio de acción, en toxinas activas sobre el sistema nervioso central o activas sobre el sistema nervioso periférico. Estas últimas son las más conocidas en los venenos de serpientes. Las toxinas de acción periférica por lo general afectan las uniones neuromusculares y/o ganglionares, y a su vez pueden tener tres sitios principales de acción [48]:

- A nivel presináptico (neurotoxinas que impiden o aumentan la liberación del neurotransmisor). Estas son neurotoxinas obtenidas del veneno de elápidos y del veneno de serpientes vipéridas como la *Crotalus durissus terrificus* "Cascabel". Algunas de ellas poseen actividad fosfolipásica como la Notexina de *Notechis scutatus* y la crotoxina de *C. durissus terrificus* [24, 39]. Otras neurotoxinas están libres de actividad fosfolipásica, y poseen acción facilitatoria de la liberación de neurotransmisores. En la Tabla 1 se muestra algunas neurotoxinas presinápticas, agrupadas según su composición polipeptídica.

TABLA 1: Neurotoxinas de acción presináptica obtenidas de veneno de serpientes (Según Mebs, 1988).

NEUROTOXINA	SERPIENTE
TOXINAS DE CADENA UNICA	
Caudoxina	<i>Bitis caudalis</i>
Notexina	<i>Notechis s. scutatus</i>
Notechis II-5	<i>Notechis s. scutatus</i>
Ammodytoxina	<i>Vipera ammodytes</i>
Fosfolipasa j	<i>Vipera ammodytes</i>
TOXINAS DE DOBLE CADENA	
Beta Bungarotoxina	<i>Bungarus multicinctus</i> .
COMPLEJOS DE 2 PROTEINAS TOXICAS	
Crotoxina	<i>Crotalus d. terrificus</i>
Toxina mojave	<i>Crotalus scutulatus</i>
Pseudocerastes neurotoxina cb	<i>Pseudocerastes fieldi</i>
<i>Vipera palestinae</i> toxina de dos componentes	<i>Vipera palestinae</i>
COMPLEJOS DE MULTIPLES PROTEINAS TOXICAS	
Taipoxina	<i>Oxyuranus s. scutellatus</i>
Paradoxina	<i>Oxyuranus microlepidotus</i>
Textilotoxina	<i>Pseudonaja textilis</i>

— A nivel postsináptico existen dos sitios principales de acción:

A nivel del receptor postsináptico: neurotoxinas que interactúan selectivamente sobre el receptor para acetilcolina, bloqueándolo en forma irreversible [27]. Esta acción semeja al efecto del curare, y son denominadas Alfa neurotoxinas. Estas se han descrito en los venenos de elápidos como las serpientes del género *Micrurus*, así como también en los hiprofidios (serpientes marinas) del género *Pelamis*. Cerca de 50 de estos polipéptidos neurotóxicos han sido obtenidos en forma pura y secuenciados [33]. Todos ellos guardan gran similitud estructural entre sí: son moléculas básicas, y en función de su peso molecular son clasificadas en dos grandes grupos: toxinas de cadena corta (grupo I, 60 a 62 aminoácidos, 4 puentes disulfuro) y toxinas de cadena larga (grupo II, 71 a 74 aminoácidos, 5 puentes disulfuro). Ambas variedades de toxinas presentan diferencias inmunológicas entre sí, espectros de difracción circular muy diferentes, y diferencias en estabilidad frente a liofilización, y modificaciones químicas [24]. Dos subgrupos inmunológicos se han reportado a su vez para las toxinas de cadena corta [8]. En la figura 1 se muestran los esquemas estructurales de las dos variedades de neurotoxinas activas sobre receptores colinérgicos.

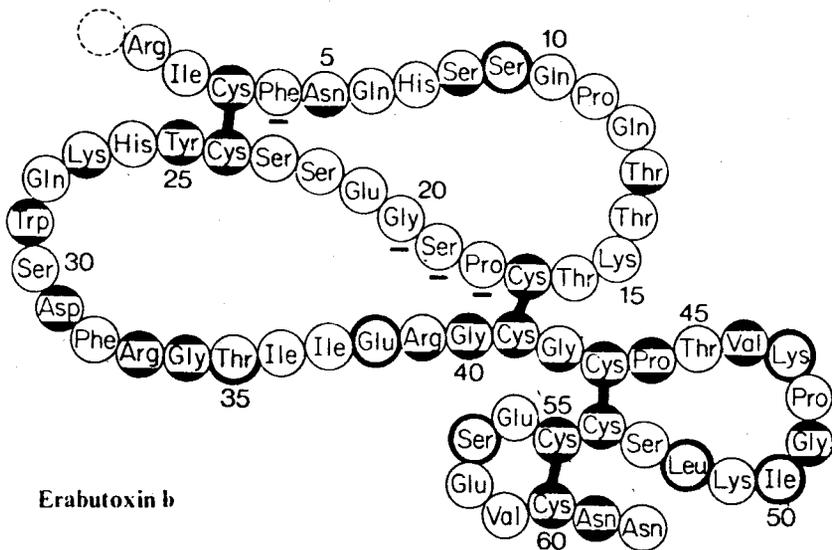
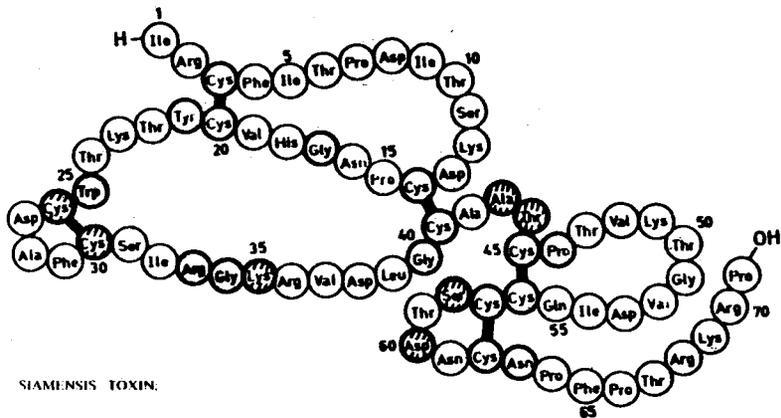


Fig. 1: Esquemas estructurales de las dos variedades de neurotoxinas activas sobre receptores colinérgicos. (Fuente: Lee, C.Y. referencia 24 y Tu, A.T. referencia 48).

- A nivel de la enzima acetilcolinesterasa. Estas neurotoxinas actúan inhibiendo a esta enzima. Un ejemplo lo constituyen las toxinas denominadas dendrotoxinas, obtenidas del veneno de las mambas africanas pertenecientes al género *Dendroaspis* [24].

Eventualmente, otras denominaciones son empleadas para identificar grupos de proteínas activas, como las “neurotoxinas tipo *Angusticeps*”, “tipo sinérgico” o “toxinas similares a las de *Vipera russelli*” [11].

Tres grupos de serpientes peruanas son típicamente neurotóxicas: *Crotalus durisus terrificus* (Familia Viperidae), las serpientes de los géneros *Micrurus* y *Leptomicrurus* (Familia Elapidae) y las serpientes marinas (Familia Hydrophiidae). Los componentes neurotóxicos del veneno de *C. durisus terrificus* se han aislado y caracterizado ampliamente. Ellos incluyen a la crotoxina, la convulxina y la giroxina. La crotoxina es la neurotoxina mayor, tiene un peso molecular de 30 Kd, y una LD50ip. de 35 ug/kg ratón. Esta toxina está compuesta de 2 subunidades, una tóxica y fuertemente básica de 14.5 Kd con actividad de Fosfolipasa A, y una subunidad no tóxica y acídica denominada crotapotina, de 9.5 Kd [48]. La interacción de ambos componentes incrementa grandemente la toxicidad de la fracción fosfolipásica. La convulxina y la giroxina son proteínas ácidas y no dializables. La convulxina produce convulsiones, y la giroxina movimientos en rodillo de los ratones envenenados; sin embargo, se conoce aún poco sobre sus aspectos químicos y farmacológicos [24].

Los componentes activos del veneno de las serpientes *Micrurus*, el segundo grupo neurotóxico, han sido poco estudiados. Estos venenos contienen toxinas polipeptídicas capaces de bloquear específicamente los receptores colinérgicos nicotínicos a nivel de las placas motoras (uniones nervio-músculo esquelético) [24, 27]. El tercer grupo está constituido por las serpientes marinas del género *Pelamis*, cuyas toxinas polipeptídicas poseen acción similar a las de *Micrurus*, perteneciendo al grupo de las alfa neurotoxinas [24, 48].

Vellard reportó en 1954 que el veneno de *L. muta muta* inyectado por vía ev. en perros provoca convulsiones tónico-clónicas generalizadas que preceden a la muerte del animal experimental. Debido a esta observación, Vellard asumió que dicho veneno posee acción neurotóxica [49]. Sin embargo, observaciones recientes han mostrado que este efecto convulsivante no se observa en las etapas iniciales del envenenamiento de ratones por vía intra-peritoneal, pero sí en las últimas etapas de envenenamiento. Asimismo, una

de las características de este envenenamiento es la ausencia de parálisis motora, a diferencia del efecto del veneno de *C. durissus terrificus*, el que por poseer una neurotoxina (la crotovina), produce parálisis flácida [24]. Con la finalidad de verificar la presencia de neurotoxinas con acción neurotóxica periférica (bloqueante neuromuscular), investigamos recientemente los efectos del veneno sobre la preparación neuromuscular de nervio frénico-diafragma de la rata. Los resultados mostraron que este veneno, aun a concentraciones sumamente elevadas (hasta de 5 mg/ml) fue incapaz de bloquear la placa neuromuscular de la rata [53]. Queda aún por descartarse la presencia de efectos convulsivantes resultantes de una acción neurotóxica central, cuya ausencia en perros tratados con barbitúricos fuera discutida en un reporte previo [52].

Las cardiotoxinas son polipéptidos fuertemente básicos (pHi cercano a 12), obtenidas de venenos de elápidos, y que a diferencia de las neurotoxinas, son capaces de afectar una amplia gama de células, tanto excitables como no excitables. Ellas causan contracción del músculo esquelético, arresto sistólico en el corazón aislado, contracción del músculo liso, bloqueo de la conducción axonal, irritación local y hemólisis directa de eritrocitos lavados [24]. Ellas poseen actividad contracturante sobre ambas preparaciones en ausencia de estimulación eléctrica [23, 24]. El veneno de *L. muta muta* no provoca contractura del músculo esquelético (diafragma) en ausencia de estimulación eléctrica, lo que sugiere la ausencia a su vez de cardiotoxinas [42, 52, 53, 54]. Salas ha empleado recientemente la preparación del músculo biventer de pollo en dosis de concentración elevada de veneno lachésico (rango 0.2 mg/ml), sin observar mayores efectos a nivel muscular, lo que apoya la hipótesis de la ausencia de cardiotoxinas polipeptídicas en este veneno [42].

La enzima acetilcolinesterasa, que cataliza la hidrólisis del grupo éster del neurotransmisor acetilcolina, se ha encontrado asociada a la actividad neurotóxica de los venenos de serpientes de las familias Elapidae e Hydrophiidae. La presencia de esta enzima es excepcional en los venenos de serpientes de la Familia Viperidae [24]. La ausencia de esta enzima en el veneno de *L. muta muta* confirmaría lo mencionado en la literatura y aleja la posibilidad de que el veneno de *L. muta muta* sea neurotóxico. Los resultados obtenidos por nosotros concuerdan con los obtenidos previamente por Avello y col. en 1985 [4] y Olascoaga en 1987 [37] para otros vipéridos peruanos no neurotóxicos. Avello y col. demostraron también que el veneno de *L. muta muta* no posee actividad inhibitoria sobre colinesterasa plasmática humana [4].

EFFECTOS SOBRE EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

La actividad proteolítica ha sido relacionada, por numerosos autores, con los fenómenos de necrosis [3, 8, 14, 17, 18, 21, 24, 32, 38, 41], incremento de permeabilidad capilar [19, 26, 38, 48], acción inflamatoria [29] y alteración de la dinámica cardiovascular mediada por liberación de péptidos vasoactivos [24, 29, 30, 52, 54].

El "shock" circulatorio con hemorragia interna es una causa frecuente de muerte en las mordeduras de serpientes de las familias Crotalidae y Viperidae. En animales experimentales, la administración de veneno de crotálicos provoca una dramática caída de la presión arterial, seguida por una recuperación parcial, pero eventualmente la presión vuelve a caer, terminando en paro cardíaco. La respiración artificial no impide la caída de la presión arterial [24, 39].

El veneno de *L. muta muta* inyectado por vía endovenosa provoca inmediatamente una caída dramática de la presión arterial en perros anestesiados con pentobarbital sódico. El mecanismo de producción, y sitio de acción de los componentes responsables de la hipotensión inducida por veneno de *L. muta muta*, fueron esclarecidos recientemente por nosotros, correspondiendo a un efecto mediado por una enzima proteolítica con acción kininogenástica, cuyo sitio de acción es el espacio intravascular [52, 54]. Se ha postulado que esta enzima actuaría sobre el plasma y liberaría péptidos vasoactivos, los que disminuirían la resistencia vascular periférica mediante una acción relajante de su musculatura lisa. Asimismo, se demostró que este efecto era bloqueado por la acción de aprotinina, un péptido inhibidor de kininogenasas y otras enzimas proteolíticas del grupo de las serino proteasas [44, 45], y que además era inhibido por los anticuerpos presentes en el antiveneno comercial, por lo que se trataría de una molécula antigénica [52, 54].

Los venenos de serpiente constituyen una de las principales fuentes de enzimas liberadoras de kininas [2, 5, 21, 24, 25, 28, 30, 31, 34, 43, 47, 50, 52]. Estas fueron descubiertas en la década del 50, por Rocha e Silva y otros durante el estudio de las acciones farmacológicas del veneno de *B. jararaca* [48, 51]. Estudios posteriores han permitido identificar un sistema enzimático, denominado sistema de las kininas, que posee importantes acciones sobre la coagulación sanguínea, presión arterial, permeabilidad capilar y respuesta inflamatoria local [44]. Varias enzimas liberadoras de kininas (kininogenasas) han sido purificadas de venenos de serpiente, pudiendo mencionarse a dos de

ellas como las más características: la kininogenasa del veneno de *Bitis gabónica*, una glicoproteína con actividad serinoesterásica que provoca hipotensión arterial luego de su aplicación en infusión ev. en perros [2, 9]. Otra kininogenasa de naturaleza sialoglicoproteica es la Crotalasa, aislada del veneno de *Crotalus adamanteus*, la que constituye una excepción debido a que posee, simultáneamente, actividad similar a Kalikreína y coagulante similar a trombina [31].

La crisis hipotensiva producida por el veneno lachésico es similar a la observada para otros venenos de crotálidos y vipéridos. Esta crisis no es de origen cardíaco primario, sino se debe a vasodilatación conducente a una drástica caída de la resistencia vascular periférica, cuyo sitio inicial aún es materia de controversia. Algunos autores sugieren que el sitio inicial para la disminución de la resistencia vascular periférica en el caso de los venenos de crotálidos sería la vasculatura muscular esquelética, mientras otros autores postulan que para el veneno de vipéridos correspondería a la vasodilatación en el área esplácnica [24]. Después de los cambios iniciales, el "shock" inducido por el veneno es caracterizado por hipotensión prolongada, disminución del gasto cardíaco, hipovolemia y hemoconcentración. El "shock" secundario puede ser causado por extravasación plasmática o de sangre en los tejidos blandos y en varios órganos internos, como pulmones, riñones y otros, además del aparato digestivo. El efecto liberador de kininas, responsable del "shock" hipotensivo inicial del envenenamiento lachésico, pudiera ser prolongado por la acción de péptidos con acción potenciadora de las acciones de las kininas sobre diferentes variedades de músculos lisos, tal como ha sido demostrado por Ferreira [13] en el veneno de *B. jararaca* y por Kato y Suzuki [22] en el veneno de *Aqkistrodon halys blohomfy*.

En el envenenamiento por mordedura de *Lachesis* tampoco se ha descartado la presencia de otros factores no proteicos, como los péptidos depresores miocárdicos identificados en el veneno de *Crotalus atrox* [24], o sustancias autofarmacológicas como la histamina, serotonina, prostaglandinas y adenosina, que pueden ser liberadas por enzimas proteolíticas, fosfolipasa A y enzimas hidrolíticas de ácidos nucleicos presentes en el veneno, las cuales pudieran jugar un rol importante en el colapso circulatorio observado durante el envenenamiento [52]. La adenosina es considerada como un factor cardiotoxico e hipotensor [48].

Benavides confirmó en 1986, mediante el empleo de estudios de digestión enzimática con tripsina, la naturaleza proteica del factor hipotensor del

veneno de *Lachesis muta muta* y separó dos componentes con actividad hipotensora a partir del veneno crudo, utilizando cromatografía en Sephadex G-100 y cromatografía de intercambio iónico en columnas de DEAE-Celulosa. El primer componente hipotensor, denominado fracción 12, fue homogéneo en la electroforesis en gel de poliacrilamida y tuvo un peso molecular de 34.5 Kd; sin embargo, la inmunolectroforesis mostró 2 bandas de precipitación, quedando por discriminarse la posibilidad de que se trate de dos isoenzimas hipotensoras, o de un componente hipotensor y una proteína contaminante de peso molecular similar. La segunda fracción hipotensora (I6), presentó 6 bandas en gel de poliacrilamida e inmunolectroforesis, con pesos moleculares que fluctuaron entre 20 y 40 Kd [6]. Resultados similares, aunque empleando un paso de purificación adicional de cromatografía de afinidad en Sepharosa 4-B acoplada a aprotinina (figura 2), fueron obtenidos recientemente por nosotros. En nuestro estudio, caracterizamos farmacológicamente a dos fracciones hipotensoras ($R_{2,3}B+$ y $R_{2,3}C+$). La primera fracción hipotensora ($R_{2,3}B+$) presenta, además, actividad coagulante similar a trombina y actividad hemorrágica. La segunda fracción hipotensora ($R_{2,3}C_1+$) está libre de actividad coagulante, pero mantiene actividad hemorrágica. Las otras 4 fracciones constituyentes del pico C obtenido en el intercambio iónico, y que además mostraron afinidad con la aprotinina ($R_{2,3}C_2+$ a $R_{2,3}C_5+$), fueron recuperadas en muy pequeñas cantidades, por lo que no se ha podido discriminar sus efectos sobre la presión arterial [53]. Nuestros resultados muestran la existencia de por lo menos dos fracciones con actividad hipotensora, ambas con afinidad por la aprotinina, las que aún no han sido separadas hasta homogeneidad.

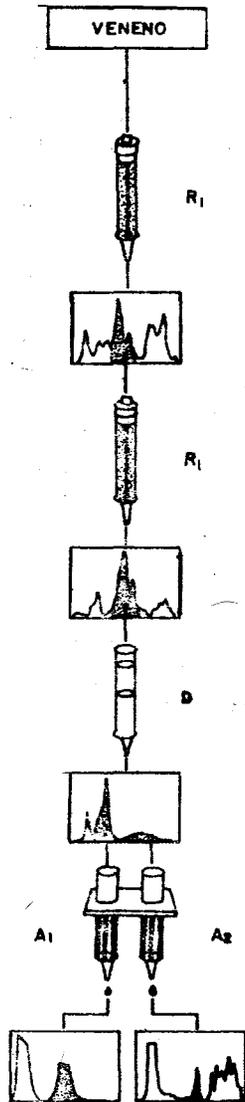


Fig. 2: Diagrama de Flujo de la separación cromatográfica de los factores hipotensores del veneno de *L. muta muta*. (Fuente: Zavaleta, 1989. Referencia 53)
 (R1) Filtración en columna de Sephadex G-100 S.F.
 (D) Intercambio iónico en DEAE-Sephadex A50
 (A) Cromatografía de Afinidad en columna de Aprotinina-Sapharosa 4B.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abalos, J. Walter (1977) **¿Qué sabe Ud. de Víboras?**. Editorial Losada S. A. Buenos Aires, 175 p.
2. Adams Z. S., Gattulo D. Et. Al (1981) *Toxicon* 19 (2): 263-270.
3. Aguirre Santa Cruz, C. Eduardo (1989) Actividad mionecrótica del veneno de la serpiente Peruana **Bothrops barnetti** (Parker 1938). Tesis Bachiller Biología, Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, 85 p.
4. Avello Canisto, A., Colarrossi Salinas, A. C., Franco, J., Zavaleta Martínez Vargas, A. (1985) Determinación de la actividad de colinesterasa y anticolinesterasa en venenos de serpientes y arácnidos. Libro de resúmenes. III Jornadas Científicas Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, p. 283.
5. Bailey G. and Shipolini, R. (1976) *Biochem J.* 153: 409-414.
6. Benavides Ranilla, Jorge L. (1986) Purificación parcial de un componente hipotensor del veneno de **Lachesis muta muta** (Shushupe). Tesis Bachiller Biología, Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima. 23 p.
7. Bernard Henry, John, (1985) Todd-Sanford-Davidsohn Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 7ma. Ed. Vol. 1. Salvat Editores, Barcelona. p. 872-873.
8. Bolanos, Roger (1984) **Serpientes, veneno y ofidismo en Centro América**. Editorial Universidad de Costa Rica, San José, 136 p.
9. Cevese, A., Gattulo, D. (1983) *Toxicon*. 21 (1): 67-74.
10. De La Vega, E., Zavaleta, A., Carrillo, N. y Trelles, L. (1989) Accidentes producidos por animales ponzoñosos: serpientes venenosas del Perú. EN: **Anales del Seminario Nacional de Zoonosis y Enfermedades de Transmisión Alimentaria**. pp. 169-188. Lima, Ministerio de Salud. Programa Nacional de Control de Zoonosis.

11. Dolly O. J., Ed. (1988) **Neurotoxins in Neurochemistry**. New York, Ellis Horwood Limited. 251 p.
12. Fernández Lancho, Manuel (1969) *Tribuna Médica*, **5**: 1-2.
13. Ferreira, S. H. (1965) *Brit. J. Pharmacol.* **24**: 163-169.
14. Gutiérrez, J., Bolaños, R. (1980). *Bol. Ofic. Sanitaria Panamericana*, **89** (2): 149-156.
15. Gutiérrez, J.M., Arroyo, O., Bolaños, R. (1980) *Toxicon*. **18**: 603-610.
16. Gutiérrez, J. M. y Cháves, F. (1980) *Toxicon* **18**: 315-321.
17. Gutiérrez, J. M. y Cerdas, L. (1984) *Rev. Biol. Trop.*, **32** (2): 213-222.
18. Gutiérrez, J. M. (1986) Myonecrosis induced by Bothrops asper venom: pathogenesis and treatment. Proceedings of the **Second American Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins**, Stillwater, Oklahoma, (Ownby, Ch. Ed): 27-39
19. Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Lomonte, B., Gene, J. and Cerdas, L. (1986) *Comp. Biochem. Physiol.* **85 C**(1): 171-176.
20. Instituto Butantan. (1986) Normas gerais para o tratamento dos acidentes humanos por animais peçonhentos. Sao Paulo, BANESPA. 20 pags.
21. Kaiser, E. and Michl, H. (1971) Chemistry and pharmacology of the venoms of Bothrops and Lachesis, En: **Venomous Animals and their Venoms**. Vol 2. Venomous vertebrates. (Bucherl, W. and Buckley, E. Eds). New York, Plenum Press.: 307.
22. Kato, W. and Susuki, T. (1971) *Biochemistry*, **10** (6): 972-980.
23. Lee, Chen-Yuan., Chang, C.C., Chiu, T.H., Tseng, T. C. and Lee, S.Y. (1968) *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmak u Exp Path.*, **259**: 360-374.
24. Lee, Chen-Yuan. (Ed). (1979) **Snake venom**. New York. Springer Verlag. Handbook of Exper. Pharmacology, **49**: 1150 p.

25. Loayza Benzaquen, Simy Lis. (1983) Efecto del veneno de las serpientes *Lachesis muta* y *Bothrops atrox* sobre fibrinógeno bovino y substratos sintéticos. Tesis de Licenciado en Biología, Universidad Ricardo Palma (Lima), 30 p.
26. Lomonte, B. (1985) *Toxicon*. 23 (1): 173-176.
27. Low, B. and Corfield, P.W.R. (1988) The acetylcholine receptor: identification of prime —toxin binding site. In: *Neurotoxins in Neurochemistry*. (Dolly, O. J., Ed.) New York, Ellis Horwood Limited.: 3-12.
28. Magalhaes, A., María, L. and Diniz, C. R. (1973) *Ciencia e Cultura*, 25 (9): 873.
29. Magalhaes, A.; Sousa, A. J. Y, Diniz, C. R. (1973) *Ciencia e Cultura*, 25 (9): 872.
30. Margolis, J., Bruce, S. (1965) *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 43: 237-244.
31. Markaland E. S., Kettner, C., Schiffman S. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 1688-1692.
32. Mebs, D. Ehrenfels, Samejina, Y. (1983) *Toxicon*. 21 (3): 393-404.
33. Mebs, D. (1988) **Snake venom toxins: structural aspects**. In: *Neurotoxins in Neurochemistry*. (DOLLY, O. J., Ed.) New York, Ellis Horwood Limited.: 3-12.
34. Meier, J. (1984) Study on the *Bothrops atrox* and its modification after interventions in the coagulation, fibrinolytic and kallikrein like system of prey animals. Proceedings of the 6 th. European Symposium on Animal Plant and Microbial Toxins, International Society on Toxinology, European Section, Basilea. (Meier, J., Stocker, K. and Freyvogel, T.A. Eds): 112.
35. Meneses, Oswaldo. (1974a) *Rev. Instituto Zoonosis e Investigación Pecuaria*; 2 (3-4): 69-77.
36. Meneses, Oswaldo. (1974b) *Rev. Inst. Zoonosis e Investigación Pecuaria*, 2 (3-4): 79-84.

37. Olascoaga M. María Enriqueta (1987) Estudio del veneno de *Bothrops pictus*: Bioquímica, toxicidad, neutralización y efectos biológicos. Tesis de Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima. 68 pags.
38. Russell, F. and Puffer, H. (1970) *Clinical Toxicology*, 3 (3): 433-444.
39. Russell, Findlay E. (1980) **Snake venom poisoning**. New York, Scholium International. pags: 172-176.
40. Russell, Findlay E. (1961) *Jama*, 117 (13): 903-907.
41. Salas, M., Aguirre, E. y Zavaleta A. (1987) *Biota* (Lima), 94: 52-68.
42. Salas Arruz, María (1990) Estudio de los efectos del veneno de *L. muta muta* sobre músculo: aspectos farmacológicos, histológicos y bioquímicos. Tesis de Magister en Ciencias (Fisiología), Escuela de Postgrado Víctor Alzamora Castro, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima. 63 pags.
43. Sato, T., Iwanaga, S., Mizushima, Y. and Suzuki, T. (1965) *J. Biochem.* 57 (3): 380-391.
44. Schachter, M. (1966) *Physiol. Reviews*, 49 (3): 509-542.
45. Schultze, M. (1970) *Klinikarzt*, 8: 83-90.
46. Silva Haad, J. (1980) *Memorias do Instituto Butantan* (Sao Paulo), 46/48: 403-423.
47. Suzuki, T., Iwanaga, J., Sato, J. (1966) International symposium on vasoactive polypeptides Bradykinin and related kinins. Riberao Preto, Sao Paulo, Brasil, 27 p.
48. Tu, T. Anthony (1977) **Venoms: Chemistry and Molecular Biology**. New York, John Wiley & Sons Inc, 545 pags.
49. Vellard, Jean (1948) El veneno de *Lachesis muta* (Lenneo). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. *Publicaciones del Museo de Historia Natural "J. Prado"*, ser a (1), 52p

50. Viljoen, C., Meehan, C. and Botes, D. (1979) *Toxicon*. 17: 145-154.
51. Webster, M. and Prado, E. (1970) Glandular kallikreins from horse and human urine and from hog pancreas. *Methods and Enzimology* XIX, Proteolytic Enzymes. New York, Academic Press, : 681-699.
52. Zavaleta, Alfonso (1985) Estudio farmacológico del veneno de la serpiente *Lachesis muta muta* "Shushupe". Tesis de Magister en Ciencias (Farmacología), Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, 30 pags.
53. Zavaleta Martínez-Vargas, A. (1989) Caracterización farmacológica del veneno de la serpiente *Lachesis muta muta* "Shushupe". Tesis de Doctor en Ciencias (Farmacología), Escuela de Postgrado Víctor Alzamora Castro, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima. 94 pags.
54. Zavaleta M-V., A., Salas Arruz, M., Villegas, L. F., Castillo Yui, J. (1989) Estudio farmacológico del veneno de *Lachesis muta muta* "Shushupe". En: CONCYTEC. Premios 1988 Carlos Gutiérrez Noriega (Farmacología) (Castro de la Mata, R., Ed). Lima, Megaprint Ediciones: 17-94.