

## NEUTRALIZACION CRUZADA DE VENENO DE *BOTHROPS JARARACUSSU* POR SUEROS ANTIOFIDICOS HETEROLOGOS

ADOLFO R. de ROODT<sup>1</sup>, JUAN C. VIDAL<sup>2</sup>, SILVANA LITWIN<sup>1</sup>, J. CHRISTIAN DOKMETJIAN<sup>1</sup>, JORGE A. DOLAB<sup>2</sup>, SILVIA E. HAJOS<sup>3</sup>, LILIANA SEGRE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Producción de Biológicos ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Ministerio de Salud; <sup>2</sup> Area Iología, Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia; <sup>3</sup> Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

**Resumen** En la Argentina se utilizan tres tipos de sueros antiofídicos frente a la mordedura de crotálidos, el Anticrotálico Monovalente, contra el veneno de *Crotalus durissus terrificus* ("víbora de cascabel"), el Botrópico Bivalente y el Botrópico Tetravalente ("Misiones") contra los venenos de las diferentes especies de *Bothrops* que se encuentran en la Argentina (las diferentes "yarára"). Además, existe un suero Botrópico-Crotálico (Trivalente) el cual cubriría el mismo espectro que el Bivalente más el Anticrotálico. En este trabajo estudiamos la reactividad inmunoquímica de los sueros antibotrópicos Bivalente y Tetravalente, del Botrópico Crotálico (Trivalente) y del Anticrotálico Monovalente con el veneno de *Bothrops jararacussu* ("yaráracuzú", "tapete dourado"). Además, se estudió la capacidad neutralizante de estos antivenenos sobre la potencia letal, y las actividades hemorrágica, necrotizante, procoagulante y hemolítica indirecta del veneno de *B. jararacussu*. La potencia neutralizante sobre las actividades biológicas y tóxicas de este veneno por todos los antivenenos utilizados es similar a la obtenida con el suero antibotrópico tetravalente (homólogo). Estos resultados sugieren la posibilidad de emplear sueros antibotrópicos heterólogos en el tratamiento de los accidentes por *B. jararacussu*.

**Abstract** *Cross neutralization of bothrops jararacussu venom by heterologous antivenoms.* We have studied the immunochemical cross-reactivity and cross-neutralization of the lethal potency, hemorrhagic, necrotizing, procoagulant and (indirect) hemolytic activities of *Bothrops jararacussu* venom by the standard antivenoms produced in Argentina. These antivenoms are horse immunoglobulin F (ab')<sub>2</sub> fragments from animals immunized with 1) *Crotalus durissus terrificus* venom (Monovalent Anticrotalic antivenom); 2) *Bothrops alternatus* and *B. neuwiedii* venoms (Bivalent Botropic antivenom); 3) *B. alternatus*, *B. neuwiedii*; *B. jararaca* and *B. jararacussu* venoms (Tetravalent Botropic, or "Misiones" antivenom) and 4) *B. alternatus*, *B. neuwiedii* and *C. d. terrificus* venoms (Trivalent Botropic-Crotalic antivenom). In preincubation experiments, all the heterologous antivenoms neutralized the toxic and biological activities of *B. jararacussu* venom with a potency at least as high as the Tetravalent Botropic (i.e. the only homologous) antivenom, in which *B. jararacussu* venom was included as immunogen. These results suggest the possibility of using heterologous antibotrophic antivenoms for the treatment of snake bites by *B. jararacussu*.

**Key words:** *Bothrops jararacussu*, antivenoms, snake bites

*Bothrops jararacussu* ("yaráracuzú", "tapete dourado"), el representante de mayor tamaño del Género *Bothrops* (*B.*) en la Argentina, tiene dos características de importancia desde el punto de vista médico. La primera es la elevada potencia letal de su veneno, una de las más altas dentro de las especies de este Género que habitan la Argentina<sup>1</sup>. La segunda es que la cantidad de veneno obtenida por extracción (~ 60 mg/100 g de peso

corporal) resulta 2-4 veces mayor que la que se obtiene con otras especies de *Bothrops*<sup>2</sup>.

Estas dos características, junto con el gran tamaño de los especímenes adultos (~ 2.0 m de longitud) justifican ampliamente los nombres aborígenes de esta especie: "suru-cucú- apeté" ("ssu" penetrar violentamente; "cucú", verter mucho, en el sentido de fluir y "apeté", caer cerca)<sup>3</sup>.

A la gran cantidad de veneno que puede inocular y la elevada potencia letal del mismo debe agregarse un factor de riesgo dependiente del hábitat de esta especie, que en la Argentina se encuentra limitado a la Provincia de Misiones<sup>3, 4</sup>. Los accidentes humanos por *B. jararacussu* ocurren en individuos que habitan o incursionan en zonas selváticas, habitualmente alejadas de centros

Recibido: 30-X-1998

Aceptado: 3-III-1999

**Dirección postal:** Dr. Adolfo R. de Roodt, Instituto Nacional de Producción de Biológicos ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Av Vélez Sarsfield 563, 1281 Buenos Aires, Argentina  
Fax: (54-11)4303-2492; E-mail: aderooot@ba.net

asistenciales. Esto hace que el tratamiento precoz del accidente ofídico sea muchas veces imposible.

Tanto las características específicas de *B. jararacussu*, como las condicionadas por su hábitat, determinan que los accidentes ofídicos producidos por esta especie sean siempre graves.

El único tratamiento específico del accidente ofídico consiste en la administración parenteral de suero antitóxico (antiofídico) y el Instituto Nacional de Producción de Biológicos-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán (INPB) prepara un suero Antibotrópico Tetravalente ("Misiones") que, entre sus inmunógenos contiene veneno entero de *B. jararacussu*. Este suero antitóxico se considera la terapia específica apropiada para los accidentes por *B. jararacussu*.

Teniendo en cuenta el importante grado de reactividad inmunológica cruzada que se observa entre los diferentes venenos botrópicos y sueros antitóxicos heterólogos contra venenos de varios crotálicos<sup>5, 10</sup>, en el presente trabajo se evaluó la reactividad inmunoquímica y la capacidad neutralizante de los distintos antivenenos producidos por el INPB frente a la potencial letal, las actividades hemorrágica, procoagulante, hemolítica indirecta y necrotizante del veneno de *B. jararacussu*.

## Materiales y métodos

### Veneno

El veneno de *Bothrops jararacussu* se obtuvo por extracción manual a partir de 18 especímenes adultos sanos, provenientes de la provincia de Misiones. El veneno, colectado en placas de Petri estériles fue inmediatamente desecado al vacío; fraccionado en frascos con cierre hermético y conservado a 4° C en la oscuridad. Las soluciones de veneno se prepararon inmediatamente antes de ser usadas en CINA 0.15 M y se esterilizaron por filtración.

### Antivenenos

Todos los antivenenos utilizados contenían el fragmento F(ab)<sub>2</sub> de inmunoglobulinas equinas y fueron producidos por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán. La potencia antitóxica homóloga de cada suero se determinó por la técnica convencional (suero fijo-veneno variable) utilizada para controlar los sueros antiofídicos en Argentina<sup>6</sup>.

**Suero antibotrópico Bivalente (En adelante, 2B):** Producido por la inmunización con los venenos de *Bothrops alternatus* ("yará", "víbora de la cruz" o "urutú") y *Bothrops neuwiedii* ("yará chica", "cabeza candado" o "yaráraca pintada"). Serie 246/93. Un mililitro de este antiveneno neutraliza 5 mg de veneno de *B. alternatus* y 4.8 mg de veneno de *B. neuwiedii*. Vencimiento 3/97.

**Suero antibotrópico Tetravalente (En adelante, 4B):** Producido por la inmunización con los venenos de las dos especies mencionadas más los venenos de *Bothrops jararacussu* ("yaráracussu", "tapete dourado") y *Bothrops jararaca* ("yará-raca", "queimadora"). Serie 420/94. Un mililitro de este antiveneno neutraliza 3.8 mg de veneno de *B. alternatus*, 3.4 mg de veneno de *B. neuwiedii*, 3.1 mg de

veneno de *B. jararaca* y 2.6 mg de *B. jararacussu*. Vencimiento 7/97.

**Suero antibotrópico crotálico Trivalente (En adelante 3BC):** Producido por la inmunización con los venenos de *B. alternatus*, *B. neuwiedii* y *Crotalus durissus terrificus* ("víbora de cascabel"). Serie 301/96. Un mililitro de este antiveneno neutraliza 4.0 mg de veneno de *B. alternatus*, 3.8 mg de *B. neuwiedii* y 0.6 mg de *C. d. terrificus*. Vencimiento 10/2001).

**Suero anticrotálico: (En adelante, 1C):** Producido por la inmunización con veneno de *C. d. terrificus*. Serie 325/96. Un mililitro de este antiveneno neutraliza 2.0 mg de veneno de *C. d. terrificus*. Vencimiento 10/99.

### ELISA

Se emplearon policubetas de 96 pocillos (Corning) sensibilizadas con veneno (1.0 µg/ml en amortiguador de barbital sódico pH 9.0 a 4° C por 12 h) y lavadas con amortiguador de fosfato 10 mM pH 7.4 conteniendo 0.05% de Tween 20 y 10% de leche descremada como solución de bloqueo. Los volúmenes de muestras de incubación fueron en todos los casos 100 µl y luego de cada incubación se lavaron 4 veces con 300 µl de NaCl 0.15 M, amortiguador de fosfato 10.0 mM pH 7.4 conteniendo 0.05% de Tween 20. Los pocillos se incubaron (30 minutos, a 37° C) sucesivamente con diluciones (1/200 a 1/128 000) de los diferentes antivenenos y una dilución 1:10 000 de conjugado IgG anti-equino de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma). El revelado se efectuó con o-fenilendiamina y peróxido de hidrógeno a pH 5.7 durante 25 min en la oscuridad y la reacción se detuvo con ácido sulfúrico 3.0 N. Se determinó la absorbencia a 490 nm con un lector de ELISA. Se emplearon como controles negativos pocillos sensibilizados con veneno, omitiendo la incubación con antiveneno o incubados con suero equino normal.

### Dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) del veneno de *B. jararacussu*

Ratones cepa CF-1, de 18-22 g de peso (n = 10) se inyectaron con cantidades crecientes de veneno de *B. jararacussu* por vía intraperitoneal y se determinó el tiempo de muerte. El cálculo de la DL<sub>50</sub> se realizó a partir de la representación gráfica de Dosis en función de [Dosis/Tiempo de muerte]<sup>11</sup>. El análisis por regresión lineal se efectuó usando el Software Prisma (Graph Pad Software, Inc. San Diego, California, U.S.A.).

### Seroneutralización de la actividad letal

Para cada dosis se utilizaron grupos de 10 ratones cepa CF-1, de 18-22 g de peso. Los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal con 200 µg (11.6 DL<sub>50</sub>) de veneno de *B. jararacussu* preincubado 30 min a 37°C con NaCl 0.15 M (control positivo) o con distintas cantidades de los diferentes antivenenos. El grado de protección se estimó como DE<sub>50</sub> (Dosis Efectiva 50), expresada como la cantidad de antiveneno que reduce el efecto letal de 11.6 DL<sub>50</sub> de veneno al 50%, y se calculó por regresión no lineal de la curva de sobrevivencia en función de los µl de antiveneno utilizado.

### Seroneutralización de la actividad hemorrágica

Se determinó en ratones cepa CF-1 de 25 g de peso. Cuatro grupos (6 animales cada uno) se inyectaron por vía intradérmica con 100 µg de veneno de *B. jararacussu* preincubado 30 min a 37° C con NaCl 0.15 M (control positivo, ≅ 7.0 DMH) y con distintas cantidades de los diferentes antivenenos. El área de hemorragia se calculó por el método de Kondo modificado<sup>12, 14</sup>. Se asignó un valor de 100 a la

media del área hemorrágica determinada en el grupo control positivo. Las  $DE_{50}$  de cada antiveneno se determinaron por regresión no lineal de la curva de área hemorrágica en función de la cantidad de antiveneno.

#### *Seroneutralización de la actividad necrotizante*

Se determinó en ratones CF-1 de 25 g de peso. Cuatro grupos (6 ratones cada uno) se inocularon por la vía intradérmica con 100 µg de veneno de *B. jaracussu* preincubado 30 min a 37°C con NaCl 0.15 M (control positivo,  $\cong$  3.0 DMN) o con 25, 50 o 100 µl de antiveneno en un volumen total de 150 µl. El área de necrosis se calculó según el método de Kondo<sup>14</sup>. Se asignó un valor de 100 a la media del área de necrosis del grupo control positivo. Las  $DE_{50}$  para cada antiveneno se determinaron por regresión no lineal de la curva de área necrótica en función de la cantidad de antiveneno.

#### *Seroneutralización de la actividad procoagulante*

Se determinó utilizando la técnica descrita por Theakston & Reid según la modificación descrita por Ferreira<sup>12, 14</sup>. Se preincubaron 50 µl de solución de veneno (1.0 mg/ml) con 50 µl de NaCl 0.15 M o con 50 µl del antiveneno durante 30 minutos a 37°C. Se adicionaron 500 µl de plasma humano normal (contenido de fibrinógeno 2.8 g/dl) y se determinaron los tiempos de coagulación de los controles positivos (veneno en NaCl) y de las muestras preincubadas con antiveneno. La inhibición de la actividad procoagulante por preincubación con el antiveneno se estimó a partir del incremento en el tiempo requerido para la formación del coágulo.

#### *Seroneutralización de la actividad hemolítica indirecta en medio líquido*

Se utilizó la técnica de Al-Abdula<sup>15</sup> con ciertas modificaciones. Brevemente, las muestras conteniendo 100 µg de veneno se preincubaron 30 min a 37°C con NaCl 0.15 M o con distintas cantidades de los diferentes antivenenos en un volumen final de 300 µl. Las muestras se adicionaron a 10.0 ml de una mezcla conteniendo 0.5 ml de glóbulos rojos humanos lavados; 0.5 ml de yema de huevo y 100 µl de  $CaCl_2$  0.1 M en NaCl 0.15 M, amortiguador de fosfato 10 mM pH 7.4 y se incubaron durante 180 minutos a 37°C. La reacción se detuvo con 1 ml de EDTA al 10%. Las mezclas se

centrifugaron a 1500 RPM durante 30 minutos y se determinó la absorbencia a 550 nm de los sobrenadantes. Se empleó como blanco la misma mezcla incubada con 300 µl de NaCl 0.15 M, y como controles positivos la misma mezcla de reacción incubada con 100 µg de veneno en 300 µl de NaCl 0.15 M. Con todos los venenos, se calculó la media de las lecturas de absorbencia a las que se asignó un valor de 100 y las  $DE_{50}$  de cada antiveneno se determinaron por regresión no lineal de la curva de absorbencia en función de la cantidad de antiveneno.

#### *Estadísticos utilizados*

Los resultados se expresan como la media y el desvío estándar (D.S.). Se utilizó como estadístico el *t* de Student por comparación de medias y varianzas. Para la comparación entre grupos se utilizó el estadístico *t* de Student y el método de Wilcoxon. Las curvas Dosis respuesta se estimaron utilizando el Software Prisma (Graph Pad Software, Inc. San Diego, California, U.S.A.).

## Resultados

La reactividad inmunológica de los diferentes sueros considerada por ELISA fue en el orden siguiente: 2B (1:100 000) > 4B (1:50 000) > 3BC (1:40 000) > 1C (1:10 000). Los números entre paréntesis representan la mayor dilución de cada suero que resulta positiva en el ELISA con un valor de  $p < 0.05$ .

Los valores de las  $DE_{50}$  para la neutralización de la potencia letal del veneno de *B. jaracussu* por los distintos antivenenos ( $x$  [límites 95% de confianza]) fueron de 8.62 µl [7.0-10.4 µl] para el 2B; 9.5 µl [9.3-9.9 µl] para el 4B (homólogo); 10.1 µl [9.2-11.0 µl] para el 3BC y de 12.2 µl [9.9-15.1 µl] para el 1C.

Los valores de  $DE_{50}$  para la neutralización de las actividades hemorrágica, necrotizante, procoagulante y hemolítica indirecta del veneno de *B. jaracussu* por los diferentes antivenenos se presentan en la Tabla 1.

TABLA 1

Suero	Letalidad (µl)	Letalidad (mg)	Hemorragia (µl)	Necrosis (µl)	Coagulación (incremento sobre el control)	Hemólisis indirecta (µl)
4B	9.5 (9.3-9.9)	1.25 (1.20-1.30)	4.9 ± 0.9	4.4 ± 1.5	> 16	70.2 ± 25.7
2 B	8.62 (7.0-10.4)	1.15 (0.94-1.34)	5.5 ± 0.9	7.3 ± 4.0	> 17	85.2 ± 20.5
3 BC	10.1 (9.2-11.0)	1.10 (1.00-1.20)	5.4 ± 4.3	4.4 ± 1.2	> 15	69.5 ± 28.2
1 C	12.23 (9.9-15.1)	1.13 (0.91-1.38)	5.7 ± 3.5	5.2 ± 3.2	> 14	84.1 ± 28.3

La Tabla expresa la Dosis efectiva 50% ( $DE_{50}$ ) indicada en µl de los antivenenos estudiados frente a diferentes actividades del veneno de *Bothrops jaracussu*. Las cantidades de veneno utilizadas fueron para la actividad letal ~ 11.0 DL<sub>50</sub> intraperitoneales, para la actividad hemorrágica ~ 7.0 DMH (dosis mínimas hemorrágicas), para la actividad necrotizante ~ 3.0 DMN, para la actividad coagulante en plasma ~ 11.0 DMP-P, y de 100 µg para la hemólisis indirecta. Los valores se expresan como la media indicando el intervalo de confianza (ente paréntesis) o como la media con el desvío estándar (media ± D.S.). En la neutralización de la actividad coagulante, los cuatro antivenenos retardaron la formación del coágulo en el plasma tratado más de 14 veces.

## Discusión

La reactividad inmunoquímica entre los venenos de los crotálicos americanos es bien conocida<sup>5, 6, 9</sup> así como la capacidad de los sueros antiofídicos de neutralizar las actividades enzimáticas y tóxicas de venenos no utilizados como inmunógenos en su preparación<sup>6, 7, 10, 13, 16</sup>. La reactividad cruzada se debería a la gran similitud en las secuencias de aminoácidos y las estructuras secundarias y terciarias que existe entre proteínas homólogas de venenos, y cuando estas proteínas tienen participación relevante en los mecanismos fisiopatológicos del envenenamiento, se observa neutralización cruzada<sup>17, 18</sup>.

Comparado con los venenos de otras especies de *Bothrops* de la Argentina, el veneno de *B. jararacussu* presenta diferencias en su composición y en la intensidad de sus actividades biológicas. En efecto, 25% de la proteína del veneno está constituido por miotoxinas, proteínas tóxicas de estructura similar a las fosfolipasas A<sub>2</sub> pero carentes de actividad enzimática<sup>19, 23</sup>. Estas diferencias se manifiestan en su elevada potencia letal, acompañada de actividades hemorrágica y proteolítica sobre gelatina 2-4 y 6-20 veces, respectivamente, más bajas que en otros venenos del mismo Género<sup>1</sup>.

Trabajos previos<sup>6, 24</sup> demostraron que los sueros antitóxicos producidos en el país producen reacción cruzada y poseen capacidad neutralizante heteróloga sobre la potencia letal de otros venenos de serpientes de la Argentina. Se estudió la capacidad neutralizante de estos antivenenos sobre las actividades biológicas del veneno de *B. jararacussu* (la especie potencialmente más peligrosa del país), ya que en la evaluación de los antivenenos deben considerarse no sólo la neutralización de la potencia letal, sino también la de otros efectos fisiopatológicos relevantes, como la lesión local<sup>23, 25</sup>.

Todos los antivenenos dan reacción cruzada con el veneno de *B. jararacussu* en el ELISA, cuya intensidad puede cuantificarse en base a la máxima dilución de antiveneno que resulta positiva con un valor de  $p < 0.05$ . Así, si la reactividad con el antiveneno 4B (homólogo) se toma como 1.0, ésta resulta 2.0 con el 2B, 0.8 con el 3BC y 0.2 con el 1C. Como se muestra en la Tabla 1, todos los antivenenos estudiados presentan una capacidad neutralizante similar sobre las actividades hemorrágica, necrotizante, procoagulante y hemolítica indirecta, así como sobre la potencia letal del veneno de *B. jararacussu*.

La capacidad neutralizante de los antivenenos 2B, 4B y 3BC sobre los venenos homólogos (*B. alternatus* y *B. neuwiedi*) es aproximadamente la misma, de modo que teniendo en cuenta el alto grado de reactividad inmunológica cruzada entre los venenos botrópicos<sup>6, 7, 9, 10, 13, 16, 24</sup> no resultaría sorprendente que esos antivenenos posean prácticamente la misma capacidad neutralizante sobre las actividades biológicas del veneno de *B.*

*jararacussu*. Por ejemplo, todos los antivenenos neutralizan la hemólisis indirecta con una potencia similar, ya que depende de la actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>, y si bien las miotoxinas de veneno de *B. jararacussu* no poseen actividad enzimática ni son hemolíticas *per se* son homólogos de fosfolipasa A<sub>2</sub><sup>26, 27</sup>. Igualmente, la neutralización de la actividad procoagulante por el antiveneno 1C podría explicarse por la similitud estructural de las proteasas procoagulantes presentes en los venenos de *C. d. terrificus* y *B. jararacussu*<sup>6</sup>.

Por el contrario, la inyección intradérmica de veneno de *C. d. terrificus* en ratones no produce necrosis ni hemorragias. En consecuencia, no existirían en este veneno componentes homólogos que permitan explicar la elevada capacidad neutralizante del antiveneno 1C sobre las actividades hemorrágica y necrotizante del veneno de *B. jararacussu*.

En efecto, el veneno de *C. d. terrificus* difiere de los venenos botrópicos tanto en su composición como en su actividad biológica, y su elevada potencia letal (0.2 µg/g) se atribuye a presencia de una fosfolipasa A<sub>2</sub> neurotóxica (crotoxina) que constituye alrededor de 50% de la proteína del veneno.

Es difícil explicar la neutralización de la actividad hemorrágica del veneno de *B. jararacussu* por antiveneno 1C. En cambio, la neutralización de la actividad necrotizante por este antiveneno podría explicarse por la intensa reacción cruzada de las miotoxinas con F(ab')<sub>2</sub> anticrotoxina purificados por cromatografía de afinidad<sup>6</sup>. Esto indica que las miotoxinas comparten determinantes antigénicos con crotoxina<sup>26, 27</sup>. Por otra parte, el efecto de las miotoxinas sería más importante que el de la isquemia en la necrosis tisular producida por el veneno de *B. jararacussu*<sup>23, 28-30</sup>. De este modo, la neutralización de la actividad necrotizante por los antivenenos 1C y 3BC podría deberse a la presencia de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> anticrotoxina. De todos modos, la capacidad neutralizante del antiveneno 1C no es un artificio ni parece depender de la especie inmunizada o del tratamiento ulterior del suero. Resultados preliminares muestran que la preincubación de veneno de *B. jararacussu* con suero de conejos inmunizados con veneno de *C. d. terrificus* (IgG enteras) también es efectiva para neutralizar la actividad hemorrágica.

La actividad neutralizante del antiveneno 1C concuerda con observaciones clínicas<sup>26</sup> que sugieren que la adición de 1C al antiveneno homólogo, resulta en un mayor efecto terapéutico en el tratamiento de accidentes humanos producidos por *B. jararacussu*.

Los resultados presentados sugieren la necesidad de realizar nuevos estudios experimentales y de campo para evaluar la utilidad potencial de los sueros heterólogos en el tratamiento de los accidentes botrópicos. Estos estudios son particularmente importantes en regiones cohabitadas por varias especies del Género *Bothrops*.



Varios autores recomiendan el empleo de antivenenos específicos<sup>25, 31, 32</sup> debido a la variabilidad en la composición antigénica de los componentes del veneno entre especies y aun entre poblaciones de la misma especie. Sin embargo, en la práctica, el tratamiento del accidentado suele hacerse con antivenenos polivalentes, obtenidos a partir de animales inmunizados con mezclas de venenos. Por el contrario, resultaría viable el tratamiento con antivenenos heterólogos obtenidos a partir de inmunógenos seleccionados, que presenten una importante reactividad cruzada con los componentes relevantes del veneno en cuestión.

## Bibliografía

- de Roodt AR, Dolab JA, Segre L, et al. Comparative enzymatic and toxic activities of *Bothrops* venoms from Argentina. VI World Congress of Herpetology, Prague. 1997. Abstract Book.
- de Roodt AR, Dolab JA, Galarce PP, Litwin S, Gould E, Dokmetjian C, Segre L, Vidal JC. A study on the venom yield of venomous snake species from Argentina. *Toxicon* 1998; 36: 1947 (In press).
- Freiberg MA. Ofidios ponzoñosos de la Argentina. *Ciencia y Técnica* 1968; 24: 338.
- Martino O, Mathet H, Masini RD, Ibarra Grasso A, Thompson R, Gondell C, Bosch J. Emponzoñamiento humano provocado por venenos de origen animal. Secretaría de Salud, República Argentina. 1979.
- Anderson SG, Gutiérrez JM, Ownby CL. Comparison of the immunogenicity and antigenic composition of ten Central American snake venoms. *Toxicon* 1993; 31: 1051.
- de Roodt AR, Dolab JA, Fernandez T, Segre L, Hajos SE. Cross reactivity and heterologous neutralization of Crota-line antivenoms used in Argentina. *Toxicon* 1998; 36: 1025.
- Dias da Silva W, Guidolin R, Raw I, et al. Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. *Mem Inst Butantan* 1989; 51: 153.
- Mebs D. Cross reactivity testing of antivenoms: a way to improve snakebite treatment? First International Congress on Envenomation and their Treatments. Institut Pasteur, Paris. *Toxicon* 1996, 34: 166.
- Moura da Silva AM, D'Imperio Lima MR, et al. Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of Genus *Bothrops*. *Toxicon* 1990, 28: 181.
- Siles Villaroel M, Rolim Rosa R, Zelante F, Guidolin R. Evidenciação em Camundongos da soroneutralização paraespecífica entre venenos e antivenenos botrópicos. *Mem Inst Butantan* 1978, 42/43: 337.
- Meier J, Theakston RDG. Aproximate LD<sub>50</sub> determinations of snake venoms using eight to ten experimental animals. *Toxicon* 1986; 24: 395.
- Ferreira ML, Moura Da Silva AM, Franca FOS, Cardoso JL, Mota I. Toxic activities of venoms from nine species *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. *Toxicon* 1992; 30, 1063.
- Ferreira ML, Moura Da Silva AM, Mota I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. *Toxicon* 1992; 30, 1591.
- Theakston RDG, Reid HA. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull WHO* 1983; 61: 949.
- Al-Abdulla IH, Sidki AM, Candon J. An Indirect hemolytic assay for assessing antivenoms. *Toxicon* 1991, 29: 1043.
- Russell FEJ. Snake venoms immunology: historical and practical considerations. *J Toxicol-Toxin Reviews* 1988; 7: 1.
- Arni RK, Ward RJ. Phospholipase A<sub>2</sub> -A structural review. *Toxicon* 1996; 34: 827.
- Bjarnasson B, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac Ther* 1994; 62: 325.
- Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 1995; 33: 1405.
- Selistre De Araujo HS, White SP, Ownby CL. Sequence analysis of Lys 49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins: a highly conserved class of proteins. *Toxicon* 1996; 34: 1237.
- Mebs D, Ownby CL. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmac Ther* 1990; 48: 223.
- Ogawa T, Oda N, Nakashima K, et al. Unusually high conservation of untranslated sequences in cDNAs for *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A<sub>2</sub> isozymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 8557.
- Gutiérrez JM. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venoms. *Mem Inst Butantan* 1990, 52 (Supl): 37.
- de Roodt AR, Dolab JA, Hajos SE, Fernández T, Segre L. Capacidad neutralizante de los sueros antiofídicos frente al veneno de *Bothrops moojeni* (Caissaca, Lanzadera) *Medicina (Buenos Aires)* 1997; 57: 667-76.
- OMS, 23° Informe Técnico de Patrones Biológicos, OMS, Ginebra; 1971. p. 37.
- Dos Santos MC, Gonçalves LR, Fortes Dias CL, Cury Y, Gutiérrez JM, Furtado MF. A eficácia do antiveneno botrópico crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1992; 34: 77.
- Dos Santos MC, Gonçalves LR, Fortes Dias CL, Cury Y, Gutiérrez JM, Furtado MF. Estudo comparativo do efeito neutralizante dos soros antibotrópicos (SAB) e antibotrópico crotálico (SAB-C) sobre atividade miotóxica do veneno de *Bothrops jararacussu*. *Mem Inst Butantan* 1990, 52 (Supl.): 71.
- Queiroz LS, Petta CA. Histopatological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1984; 26: 247-53.
- Queiroz LS, Santo Neto H, Assakura MT, Reichl AA, Mandelbaum FR. Pathological changes in muscle caused by hemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 1985; 23: 341-5.
- Queiroz LS, Santo Neto H, Rodriguez-Simioni L, Prado-Franceschi J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 1984; 22: 339-46.
- Otero R, Nuñez V, Osorio RG, Gutiérrez JM, Giraldo CA, Posada CA. Ability of six Latin American antivenoms to neutralize the venom of Mapaná Equis (*Bothrops atrox*) from Antioquia and Chocó (Colombia). *Toxicon* 1995; 33: 809.
- Bogarín G, Segura E, Durán G, Lomonte B, Rojas G, Gutiérrez JM. Evaluación de la capacidad de cuatro antivenenos comerciales para neutralizar el veneno de la serpiente *Bothrops asper* (Terciopelo) de Costa Rica. *Toxicon* 1995; 33: 1242.