

# Venenos de serpientes de la familia Viperidae en América: bioquímica y fisiopatología

José María Gutiérrez, Bruno Lomonte, Alexandra  
Rucavado y Fernando Chaves

Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología,  
Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

Autor de correspondencia:

José María Gutiérrez

Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología,  
Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

Teléfonos: 506-22293135, 506-22290344, fax 2292-0485

Dirección electrónica: jose.gutierrez@ucr.ac.cr

Los envenenamientos por mordeduras de serpiente constituyen un importante problema de salud pública en América (1-4). La gran mayoría son causados por especies de la familia Viperidae. Destacan, por su frecuencia, los accidentes por *Bothrops* sp. (en América Central y América del Sur) y por *Crotalus* sp. (en América del Norte). Éstos se caracterizan por provocar cuadros fisiopatológicos complejos y variados, los cuales se basan en la acción de múltiples componentes de naturaleza proteica presentes en dichos venenos. Los estudios bioquímicos de estas secreciones

## **Introducción**

tóxicas han mostrado fantástica complejidad, la cual se revela, una vez inyectado el veneno en las víctimas, en una amplia gama de efectos fisiopatológicos. Comprender dicha complejidad bioquímica, y especialmente el esclarecimiento de los mecanismos de acción de las diversas toxinas, es fundamental para interpretar de manera adecuada las características fisiopatológicas de estos envenenamientos, así como para diseñar normas de manejo y tratamientos eficaces.

En este capítulo se muestra una perspectiva general de las características bioquímicas de los principales tipos de toxinas presentes en los venenos de vipéridos americanos y la fisiopatología de estos envenenamientos. En la preparación de este texto no se pretendió ser exhaustivos en las referencias, sino tratar de citar artículos de revisión y trabajos selectos de investigación original, con la finalidad de que el lector encuentre en dichas publicaciones otras referencias más específicas, en caso de que desee profundizar en estos temas.

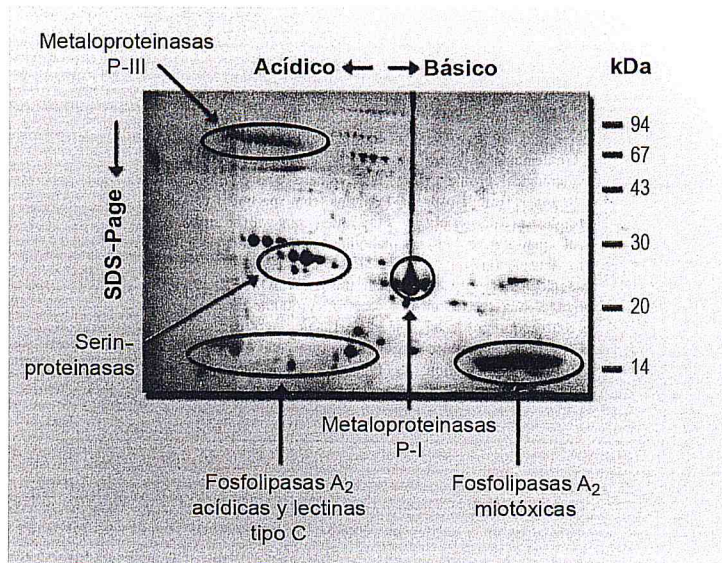
#### Envenenamientos por vipéridos en América

Pese a la enorme variación bioquímica y toxicológica de los venenos de vipéridos, las observaciones clínicas y experimentales permiten reconocer dos patrones fisiopatológicos principales en estos envenenamientos: a) el más común, observado en los casos de mordeduras por especies de los géneros *Agkistrodon*, *Atropoides*, *Bothrops*, *Bothriechis*, *Bothrocophias*, *Lachesis* y *Porthidium*, así como por muchas especies de *Crotalus*, se caracteriza por un cuadro de efectos locales, en los tejidos donde se inyecta el veneno, el cual se asocia con dolor, edema, sangrado, flictenas y necrosis de tejidos blandos. A nivel sistémico, estos envenenamientos se caracterizan por sangrado, coagulopatía y alteraciones hemodinámicas y renales. No todos los envenenamientos presentan la totalidad de estos efectos, ya que la severidad de los mismos varía enormemente, debido a múltiples factores, y a que existen variaciones entre especies, aunque se puede hablar de un patrón general de envenenamiento. b) Algunas especies del género *Crotalus*, como la cascabel sudamericana *Crotalus durissus*, la cual incluye varias subespecies, y algunas cascabeles norteamericanas, como *Crotalus scutulatus*, inducen un cuadro fisiopatológico asociado con neurotoxicidad severa, rabdomiólisis, insuficiencia renal aguda y defibrinación, pero sin presentar signos locales de envenenamiento relevantes. Para mayores detalles de los cuadros

clínicos que se presentan en envenenamientos por vipéridos en América se recomiendan el libro editado por Cardoso *et al.* (5), así como las revisiones de Warrell (3) y Norris (4).

Desde hace muchos años los estudiosos de los venenos de serpientes han reconocido su complejidad bioquímica. Sin embargo, los verdaderos alcances de dicha complejidad se han hecho más evidentes mediante el uso de técnicas modernas de separación de proteínas y los aportes de la proteómica, los cuales han revelado la presencia de cientos de proteínas en el veneno de una sola especie (ver, por ejemplo, el trabajo de Serrano *et al.* [6]). En la Figura 1 se muestra el patrón de electroforesis bidimensional del veneno de *Bothrops asper* de Guatemala, el cual presenta más de 140 proteínas diferentes (7). Estos venenos son ricos en enzimas proteolíticas o proteinasas, y en especial de serina proteinasas y metaloproteinasas. Además presentan otros tipos de hidrolasas, entre las que destacan las fosfolipasas A<sub>2</sub>, las nucleasas y la hialuronidasa.

## Venenos de vipéridos



**Figura 1**

Separación de las proteínas del veneno de *Bothrops asper* (terciopelo o barba amarilla) de Guatemala mediante electroforesis bidimensional.

Cada mancha corresponde a una proteína. Las masas moleculares de proteínas patrón (en kilodaltons, kDa) se muestran a la derecha. Se señalan las regiones donde se ubican proteínas que han sido identificadas en este veneno. Adaptado de Saravia *et al.* (7), con autorización de Elsevier Science.

Por otra parte, se encuentran otras familias de proteínas sin actividad enzimática, tales como las proteínas tipo lectinas tipo C,

**Tabla 1**  
Principales componentes  
tóxicos de venenos de  
serpientes americanas de la  
familia Viperidae

las desintegrinas, las proteínas con dominios tipo desintegrina y rico en cisteína, y las proteínas similares A 'crotamina'. Finalmente, también contienen abundantes péptidos con actividad diversa, tales como los péptidos potenciadores de bradiquinina (BPP), que ejercen una acción hipotensora. En la Tabla 1 se presentan los principales componentes presentes en venenos de vipéridos en América y las acciones fisiopatológicas asociadas con ellos.

Componente	Familia de toxina	Principales efectos fisiopatológicos
Hemorraginas	Metaloproteinasa	Hemorragia Formación de flictenas Edema
Enzimas tipo trombina	Serina proteinasa	Coagulación de fibrinógeno Desfibrinación Hipoagregación plaquetaria
Activadores de protrombina y de factor X	Metaloproteinasa	Activación de factor X o de protrombina Desfibrinación Hipoagregación plaquetaria
Miotoxinas	Fosfolipasa A <sub>2</sub> (Lys-49 o Asp-49)	Mionecrosis Edema Dolor
Quininogenasas	Serina proteinasa	Efecto hipotensor
Crotamina, miotoxina a	Polipéptido catiónico	Contractura muscular Miotoxicidad
Botrocetina, aspercetina	Lectinas tipo C	Aglutinación/agregación plaquetaria Trombocitopenia
Inhibidoras de agregación plaquetaria	Lectinas tipo C	Inhibición de agregación plaquetaria
Factores anticoagulantes	Lectinas tipo C	Inhibición de factores IX y X Efecto anticoagulante
Desintegrina	Desintegrina	Inhibición de agregación plaquetaria
Crotoxina, toxina mojave	Fosfolipasa A <sub>2</sub>	Neurotoxicidad Mionecrosis sistémica
Péptidos potenciadores de bradiquinina	Péptidos	Efecto hipotensor
Hialuronidasa	Hialuronidasa	Favorece la difusión y distribución de toxinas

La variación de los venenos se observa tanto a nivel interespecífico como intraespecífico. Además, se han descrito importantes variaciones ontogenéticas, en las que venenos de ejemplares de diferentes edades muestran características bioquímicas y toxicológicas muy distintas. Ejemplo de esta situación es *Lachesis stenophrys*: los venenos de ejemplares recién nacidos carecen de toxicidad relevante, al menos en modelos experimentales, en tanto que los venenos de adultos son de alta toxicidad (8). En contraste, el veneno de la cascabel centroamericana *Crotalus durissus durissus*, actualmente clasificada como *C. simus*, presenta alta toxicidad en venenos de ejemplares recién nacidos, los cuales son fuertemente neurotóxicos pero carecen de efecto hemorrágico, en tanto que los venenos de ejemplares adultos son similares a los venenos botrópicos, con acciones patológicas a nivel local y alteraciones sistémicas relacionadas con sangrado y choque cardiovascular, sin presentar neurotoxicidad (9,10).

En la enorme mayoría de los casos de mordeduras por vipéridos, en los que se inyecta veneno, se desarrollan edema y dolor rápidamente, aun en casos de envenenamiento leve. El edema es un efecto complejo de origen multifactorial, originado por: a) la acción directa de componentes del veneno sobre la microvasculatura, lo cual causa un incremento en la permeabilidad vascular y extravasación; este efecto se debe a metaloproteinasas, aunque también participan otros componentes. Se ha demostrado que las fosfolipasas A<sub>2</sub> con actividad miotóxica son parcialmente responsables del efecto edematígeno inducido por varios venenos de *Bothrops* sp. (11). b) La liberación de una serie de mediadores endógenos, como resultado de la respuesta inflamatoria al daño tisular. Estudios farmacológicos han demostrado que el edema se asocia con la liberación de histamina, bradiquinina, eicosanoides, óxido nítrico y PAF, entre otros mediadores (12,13). Además, en los tejidos envenenados se incrementa la producción de varias citoquinas y de metaloproteinasas de matriz (MMP) (14,15), las cuales también contribuyen con las alteraciones vasculares descritas. El hecho de que el edema se deba en buena medida a la acción de estos mediadores endógenos explica la dificultad de neutralizar este efecto con antivenenos, ya que una vez liberados

### **Los efectos locales en el envenenamiento por vipéridos**

Edema y dolor

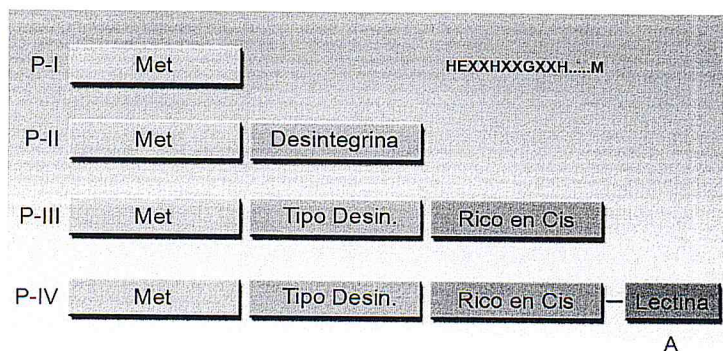
éstos la administración del antiveneno no detiene la cascada de eventos inflamatorios iniciada (16).

El edema inducido por estos venenos tiene dos consecuencias fisiopatológicas importantes: a) representa un desplazamiento de fluido del compartimiento vascular al compartimiento tisular intersticial, y de esa forma contribuye con el cuadro de hipovolemia que caracteriza estos envenenamientos y que puede llevar, en casos severos, a alteraciones hemodinámicas conducentes a un choque cardiovascular. b) El incremento en el volumen intersticial en determinados compartimientos musculares, como el compartimiento tibial anterior, induce un aumento en la presión intracompartimental que, si llega a superar los 30 mm Hg, deviene en síndrome compartimental, que puede contribuir significativamente a la necrosis tisular. Por otra parte, la reacción inflamatoria característica de estos envenenamientos se asocia con un abundante infiltrado de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y de macrófagos (17).

El efecto hiperalгésico (dolor) característico de estos envenenamientos ha sido poco investigado. Estudios efectuados con los venenos de *Bothrops jararaca* y *B. asper*, así como con fosfolipasas A<sub>2</sub> miotóxicas del veneno de *B. asper*, han demostrado que este efecto se debe a la acción de una serie de mediadores inflamatorios endógenos que actúan sobre neuronas aferentes y que afectan la sensibilidad de receptores nociceptivos (11,18). Además, se ha demostrado la mediación de mecanismos que operan a nivel central, en el caso de hiperalgesia y alodinia inducidas por estas fosfolipasas A<sub>2</sub> miotóxicas (19). Este efecto también es de difícil neutralización para los antivenenos, debido a la rápida liberación de estos mediadores, lo que hace necesario el uso de analгésicos en la terapia para estos envenenamientos.

**Hemorragia** El sangrado local es una de las manifestaciones más comunes en envenenamientos por vipéridos y se manifiesta por hematomas, equimosis y sangrado a través de los orificios dejados por los colmillos de la serpiente. Este fenómeno se debe, principalmente, a la acción de una familia de metaloproteinasas dependientes de zinc (20,21), que se han denominado "hemorraginas". Estas metaloproteinasas se dividen en varias clases, dependiendo de la estructura de dominios de las mismas. La clase P-I comprende proteinasas que presentan únicamente el dominio metaloprotei-

nasa, en tanto las clases P-II y P-III presentan, además del dominio metaloproteinasa, dominios desintegrina (clase P-II) y dominios tipo desintegrina y rico en cisteína (clase P-III). Finalmente, las de la clase P-IV tienen, además de los dominios metaloproteinasas, tipo desintegrina y rico en cisteína, una cadena polipeptídica adicional que es homóloga con lectinas tipo C (20,21) (Figura 2). En términos generales, las metaloproteinasas con actividad hemorrágica más potente son las de la clase P-III, y se propone que los dominios adicionales al dominio metaloproteinasas son responsables de esa fuerte acción, porque dirigen la hemorragina a sitios relevantes en la microvasculatura, porque inhiben la agregación plaquetaria o porque bloquean la inhibición de la hemorragina por inhibidores séricos, como la  $\alpha_2$ -macroglobulina (22).



**Figura 2**

Clasificación de las metaloproteinasas de venenos de serpiente, de acuerdo con su constitución de dominios.

Con frecuencia las enzimas de la clase P-II son procesadas luego de su síntesis, de manera que se liberan una proteínasa constituida sólo por el dominio metaloproteinasas y una desintegrina. En la parte superior se detalla la típica secuencia de ligación a zinc presente en el sitio activo de estas enzimas.

Se han aislado y caracterizado varias metaloproteinasas hemorrágicas de venenos de vipéridos americanos, pero su mecanismo de acción no ha sido plenamente dilucidado. Sin embargo, se ha demostrado que estas hemorraginas actúan principalmente a nivel de la microvasculatura, sobre todo en vasos capilares, y que son capaces de degradar los principales componentes de la membrana basal de los capilares, tales como laminina, nidogen y colágeno tipo IV (20,22). Con base en estas observaciones y en la caracterización de las alteraciones ultraestructurales que sufren los capilares, producto de la acción de estas enzimas (23,24), recientemente se ha propuesto un modelo para explicar la patogénesis de la hemorragia inducida por venenos, en dos pasos: a) en inicio, las hemorraginas degradan enzimáticamente

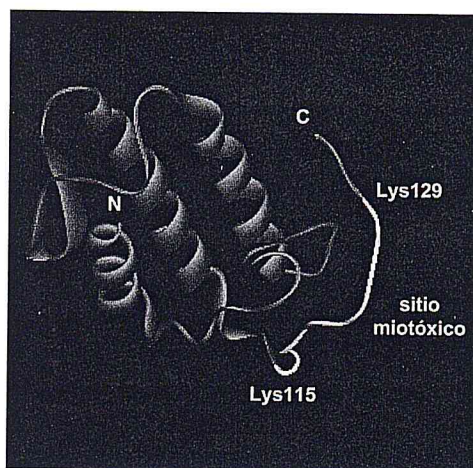
algunos componentes de la membrana basal de los vasos capilares; ello genera un debilitamiento mecánico en la estructura del capilar, ya que la membrana basal juega un papel de andamiaje estructural que inhibe la tendencia de la pared capilar a distenderse, producto de la presión hidrostática que opera en la microvasculatura. b) Una vez debilitado mecánicamente el capilar, las fuerzas biofísicas hemodinámicas que por lo normal operan en la microvasculatura (la tensión en la pared del vaso generada por la presión hidrostática y las fuerzas de cizalla o *shear stress*) provocan una distensión en el vaso, hasta que llega un punto en el cual la continuidad de la pared se rompe y se genera extravasación por 'rexis'; o sea, a través de las rupturas en las células endoteliales (22). Otro efecto local inducido por metaloproteinasas es la formación de flictenas o bulas, las cuales se deben a la degradación proteolítica de componentes de la unión dermis-epidermis, con la consecuente separación entre estas dos capas de la piel (25).

#### Necrosis de tejido muscular

La necrosis de tejidos blandos, principalmente de músculo esquelético, es una de las manifestaciones características de envenenamiento local por vipéridos. En el caso de los venenos de *Bothrops* sp., la miotoxicidad se relaciona principalmente con un grupo de proteínas muy básicas que presentan estructura de fosfolipasas A<sub>2</sub> (26,27). Estas miotoxinas se subdividen, a su vez, en un subgrupo denominado 'Asp-49', que se caracteriza por presentar un residuo de aspartato en la posición 49, como es típico de la mayoría de las fosfolipasas A<sub>2</sub> de venenos e inflamatorias en mamíferos. Estas variantes Asp-49 son activas enzimáticamente; esto es, son capaces de hidrolizar fosfolípidos presentes en las membranas. El otro subgrupo de miotoxinas con estructura de fosfolipasa A<sub>2</sub> es el de las 'Lys-49', en las que el aspartato de la posición 49 es sustituido por un residuo de lisina (28). Las Lys-49 son proteínas que carecen de actividad enzimática, ya que la modificación en la posición 49, junto con otras modificaciones en el "asa de unión a calcio", impiden que éstas coordinen la unión con el calcio, el cual es un cofactor para la catálisis (28). No obstante su falta de actividad enzimática, estas proteínas son capaces de afectar la integridad estructural de las membranas y de inducir mionecrosis. Se ha propuesto que las miotoxinas Lys-49 llevan a cabo esta acción permeabilizante al emplear una región rica en



aminoácidos hidrofóbicos y catiónicos ubicada cerca de su extremo C-terminal (28) (Figura 3A).



**Figura 3A**

Estructura cristalográfica de la miotoxina AppK49, aislada del veneno de *Agkistrodon piscivorus piscivorus* de Norteamérica.

Se indica la posición de los extremos amino (N) y carboxilo (C) terminales, así como la ubicación de la región responsable de la miotoxicidad, comprendida entre la Lys115 y la Lys129 (gris claro). La inyección de un péptido sintético que corresponde a este segmento reproduce la mionecrosis en ratones (85). Figura generada con LabViewer 4.0 (Molecular Simulations Inc.), con base en las coordenadas 1PPA del Protein Data Bank.

El mecanismo de acción de las fosfolipasas  $A_2$  miotóxicas, tanto las Asp-49 como las Lys-49, se basa en la unión y desorganización de la membrana plasmática de las células musculares. El "aceptor" de estas proteínas en la membrana no se conoce con certeza, aunque es probable que se trate de regiones enriquecidas en ciertos fosfolípidos. Una vez unidas con la membrana, estas miotoxinas penetran y desorganizan la estructura de la bicapa lipídica mediante procesos tanto independientes de la hidrólisis enzimática (Lys-49 y Asp-49) como por la acción hidrolítica de las mismas (Asp-49). La principal consecuencia de esta desorganización en la integridad en la membrana es la pérdida del control de la permeabilidad hacia iones y macromoléculas. Se produce un influjo de calcio, siguiendo el gradiente electroquímico que existe en dicha membrana, así como la salida de marcadores citoplasmáticos, como las enzimas deshidrogenasa láctica (DHL) y creatinquinasa (CK). Este incremento en el calcio citosólico pone en marcha una serie de procesos degenerativos, tales como hipercontracción de miofilamentos, alteraciones mitocondriales, activación de calpainas (proteinasas intracelulares dependientes de calcio) y de fosfolipasas  $A_2$  intracelulares, así como desregulación de diversas vías metabólicas. Como conse-

cuencia de estos procesos, las células se lesionan de forma irreversible en un proceso de muerte celular necrótica (29,30). En la Figura 3B se ilustra la secuencia de eventos que se ha propuesto ocurren en una célula muscular como consecuencia de la acción de estas fosfolipasas miotóxicas.

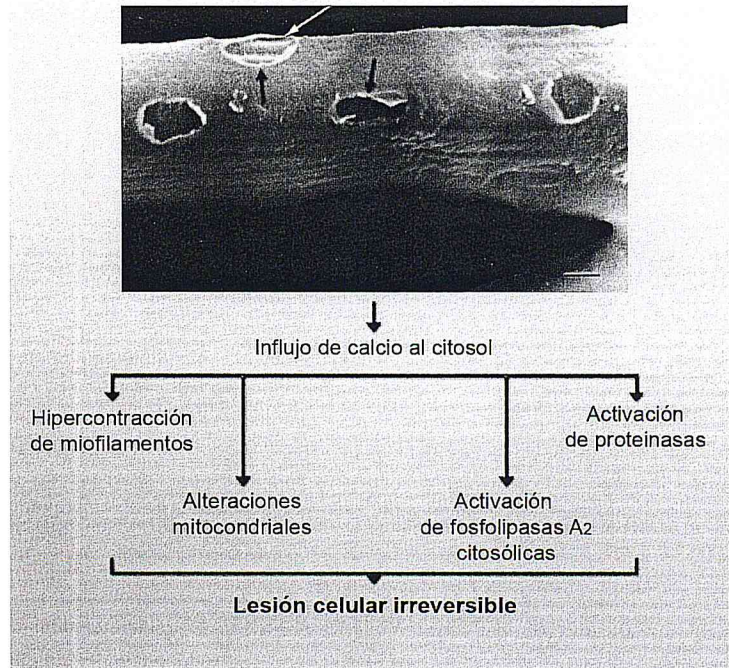
**Figura 3B**

Secuencia de eventos degenerativos que ocurren en las células musculares como consecuencia de la acción de fosfolipasas  $A_2$  miotóxicas, presentes en venenos de vipéridos.

El evento inicial es la unión y disrupción en la integridad de la membrana plasmática, lo cual origina un influjo del ion calcio. La micrografía tomada con el microscopio electrónico de rastreo ilustra lesiones en la membrana plasmática, producto de la acción de una fosfolipasa  $A_2$  Lys-49.

El incremento en la concentración citosólica del ion calcio pone en marcha una serie de procesos degenerativos que culminan con la lesión celular irreversible, la cual conduce a mionecrosis.

Adaptado de Gutiérrez y Ownby (30), y presentada con la autorización de Elsevier Science.



La gran mayoría de las fosfolipasas  $A_2$  miotóxicas de venenos de vipéridos americanos ejercen su acción predominantemente a nivel local; esto es, en el músculo donde es inyectado el veneno. Por el contrario, la "crotoxina" es una fosfolipasa  $A_2$  del veneno de varias subespecies de la cascabel sudamericana *Crotalus durissus*, que ejerce efectos neurotóxico y miotóxico sistémicos. La acción miotóxica de la crotoxina es similar, en su mecanismo, a la ejercida por las miotoxinas de *Bothrops* sp., en el sentido de que se basa en una ruptura de la integridad de la membrana plasmática (31). Sin embargo, la crotoxina induce degeneración no sólo en el músculo cercano al sitio de la inyección, sino que también es capaz de provocar miotoxicidad sistémica al liberar

grandes cantidades de CK y mioglobina a la circulación y provocar mioglobinuria y alteraciones renales secundarias, que pueden terminar en insuficiencia renal aguda (32).

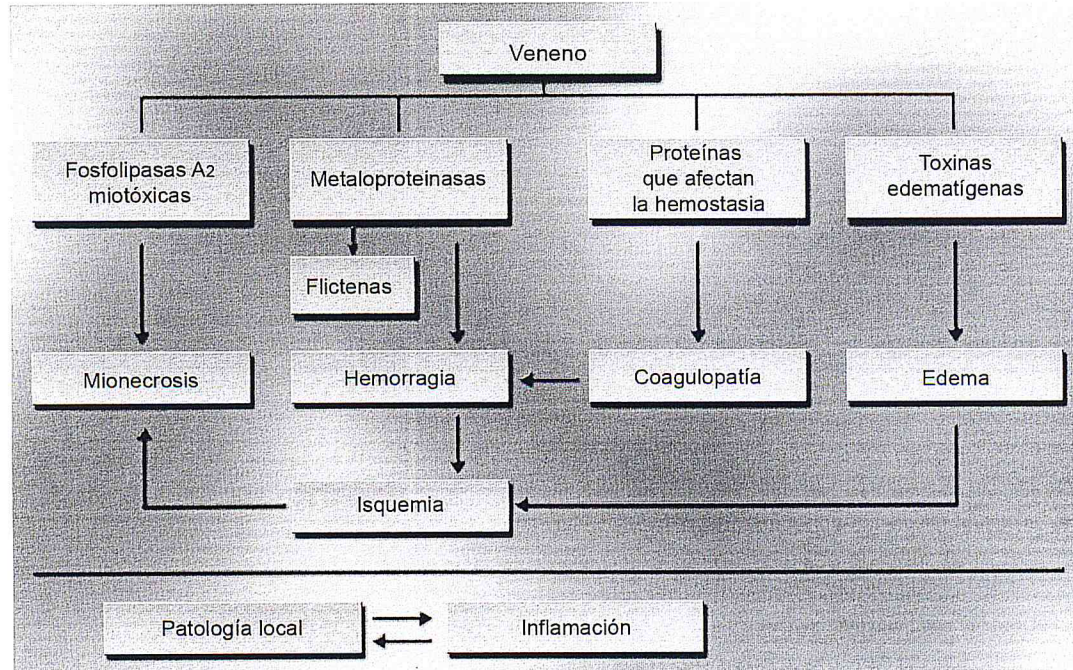
Se ha planteado que la diferencia entre las miotoxinas de acción local y las de acción sistémica se relaciona con la especificidad de estas fosfolipasas, por la membrana de la célula muscular. En el caso de las miotoxinas de *Bothrops* sp., éstas interactúan con aceptores, no sólo en las células musculares sino en muchos otros tipos celulares, por lo que son "secuestradas" en el tejido donde son inyectadas. En cambio, la crotoxina tiene una mayor especificidad por aceptores en la membrana muscular, por lo que no se une con sitios "inespecíficos" en otras membranas y, al distribuirse de manera sistémica, es capaz de reconocer aceptores específicos en células musculares de diferentes regiones (30). Esta especificidad de la crotoxina se relaciona con su estructura cuaternaria, ya que está formada por una fosfolipasa A<sub>2</sub> básica, catalíticamente activa (denominada subunidad B) y por una subunidad enzimáticamente inactiva, denominada "crotapotina" o subunidad A. La subunidad A previene la unión de la subunidad B con sitios inespecíficos, lo cual contribuye a que la toxina se una con aceptores específicos, farmacológicamente relevantes; cuando está en las membranas celulares que constituyen su blanco, la subunidad A se separa y la subunidad B actúa en la membrana. Existen toxinas homólogas a crotoxina en venenos de otras especies de cascabel, tales como *C. vegrandis*, en Sudamérica, y *C. scutulatus*, en Norteamérica. Además de la crotoxina, los venenos de varias especies de *Crotalus* de Norte y Sudamérica presentan un tipo de polipéptido catiónico, como la "crotamina" o la "miotoxina a", que inducen un influjo de sodio a través de la membrana plasmática, causando vacuolización del retículo sarcoplásmico y, en algunas células, necrosis (33). No obstante, las fosfolipasas A<sub>2</sub> miotóxicas son los principales agentes causantes de mionecrosis en los envenenamientos por vipéridos americanos.

A nivel experimental se ha observado que la inyección de metaloproteinasas hemorrágicas en tejido muscular induce mionecrosis. Este efecto no aparece tan temprano como el inducido por la acción directa de las fosfolipasas A<sub>2</sub> miotóxicas, por lo que se ha sugerido que este efecto miotóxico de las hemorraginas es secundario a la isquemia resultante en el músculo, como consecuencia de la interrupción del flujo sanguíneo provocado por la

**Figura 4**  
Resumen de los principales procesos fisiopatológicos involucrados en las alteraciones locales inducidas por venenos de vipéridos.

Las toxinas provocan una compleja patología local que genera una reacción inflamatoria, la cual a su vez puede coadyuvar en la patología.

hemorragia (34). También se ha visto que las alteraciones en la microvasculatura, originadas por la acción de las metaloproteinasas hemorrágicas, afectan de manera drástica el proceso de regeneración muscular, debido a que una adecuada perfusión constituye un requisito para el éxito del proceso regenerativo (34). Además, los venenos de vipéridos inducen otros tipos de alteraciones vasculares, tales como trombosis y angionecrosis (35, 36), los cuales contribuyen a la isquemia en tejido muscular y a la mionecrosis. En la Figura 4 se presenta un resumen de la patogénesis de los efectos locales inducidos por venenos de vipéridos.



¿Contribuye la inflamación a la patología local en los envenenamientos por vipéridos?

La inflamación constituye una respuesta estereotipada de los tejidos a la acción de agentes lesivos diversos, entre los que se incluyen los venenos. Esta respuesta contribuye a aislar a dichos agentes y a coordinar una serie de eventos celulares y vasculares que llevan a la reparación y regeneración de los tejidos. No obstante, cuando el proceso inflamatorio adquiere ciertas proporció-

nes y no es debidamente regulado, puede convertirse en un arma de doble filo y causar daño tisular adicional. En el caso de los envenenamientos por vipéridos, se ha planteado repetidamente la posibilidad de que algunos componentes de la respuesta inflamatoria, como los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos o los macrófagos, así como mediadores como las citoquinas, el óxido nítrico o las MMP, causen lesión tisular adicional a la causada por las toxinas del veneno. Existen evidencias de que la liberación de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) contribuye a la dermonecrosis en tejido inyectado con jararagina, una metaloproteinasa hemorrágica del veneno de *B. jararaca* (37, 38). Sin embargo, otros estudios sugieren que las citoquinas, así como los neutrófilos y las MMP, no contribuyen al daño tisular local en envenenamientos experimentales por *Bothrops* sp. (15,39,40). Es necesario efectuar estudios adicionales para evaluar cuál es el papel de los procesos inflamatorios en la patogénesis del daño tisular local en envenenamientos por vipéridos, lo cual podría abrir una ruta terapéutica complementaria, basada en la modulación de la respuesta inflamatoria.

Observaciones clínicas y experimentales han demostrado con claridad que la administración de antivenenos no es completamente exitosa en la detención del desarrollo de los efectos patológicos locales (16,41). Esto se ha observado, a nivel experimental, aun cuando los antivenenos se administran con rapidez después del veneno (16). La causa de esta deficiente neutralización se basa, fundamentalmente, en el rápido efecto de las toxinas de acción local una vez inyectado el veneno (42). La hemorragia, la mionecrosis y el edema se desarrollan rápidamente, por lo que la llegada del antiveneno a los tejidos afectados ocurre una vez que se han puesto en marcha los procesos patológicos locales (43). Ello se ha observado con antivenenos constituidos por moléculas completas de IgG, así como por fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y Fab (16,44). Esta dificultad terapéutica ha promovido la búsqueda de alternativas que complementen la acción neutralizante de los antivenenos. Uno de los caminos más promisorios lo constituye el uso de inhibidores sintéticos o naturales de metaloproteinasas y fosfolipasas A<sub>2</sub>, los cuales puedan ser inyectados con rapidez, de manera local y en el campo, después de ocurrida la mordedura. Los ejemplos del inhibidor de metaloproteinasas "batimastat" y del inhibidor de

El problema de la neutralización de los efectos locales

miotoxinas "suramina" ilustran el potencial de esta estrategia (45, 46), la cual merece ser investigada en ensayos clínicos.

### **Los efectos sistémicos en envenenamiento por vipéridos**

El sangrado y las alteraciones en la coagulación

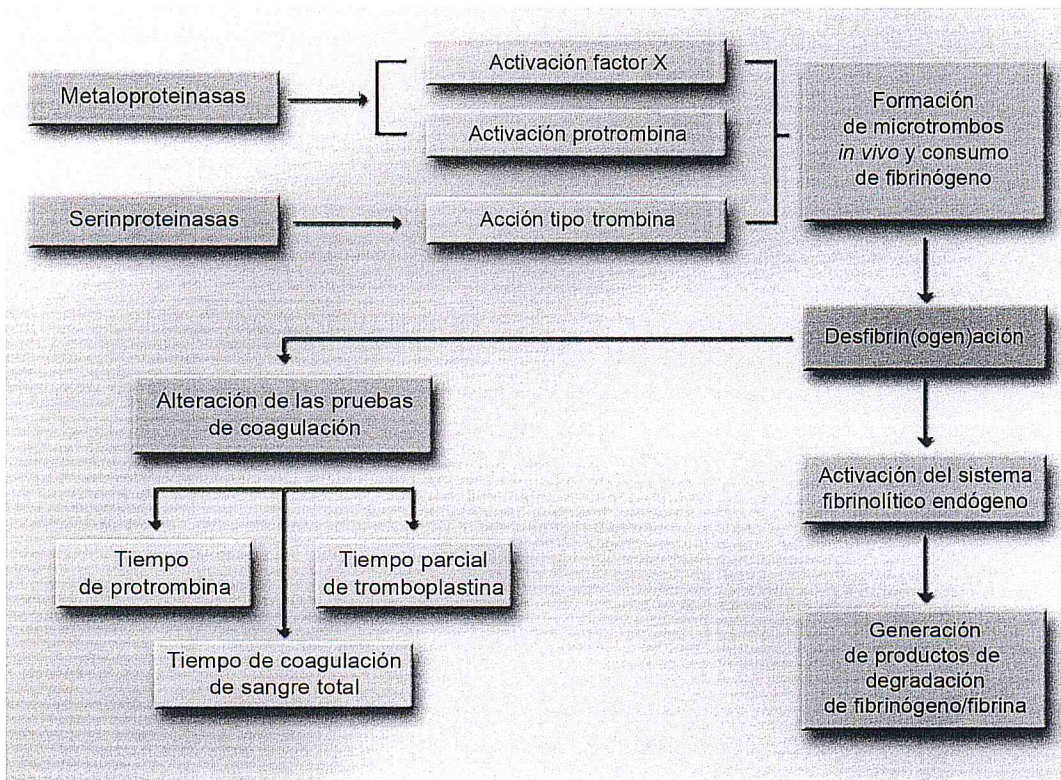
El sangrado sistémico es una de las manifestaciones más comunes en casos moderados y severos de envenenamientos por vipéridos; se manifiesta como gingivorragia, equimosis, hemoptisis, hematemesis, melena, hematuria y accidente vascular cerebral (3,47,48). Las metaloproteinasas hemorrágicas son los principales agentes responsables de este efecto, mediante su acción en la microvasculatura en diferentes tejidos, de manera similar a lo descrito para la hemorragia local. Las metaloproteinasas de la clase P-III, las cuales presentan en su estructura dominios metaloproteínasa, tipo desintegrina y rico en cisteína, tienen una fuerte acción hemorrágica sistémica (49). Por el contrario, las metaloproteinasas hemorrágicas de la clase P-I inducen hemorragia local, pero no hemorragia sistémica (50). Se ha planteado que la presencia de los dominios adicionales (tipo desintegrina y rico en cisteína) en las metaloproteinasas P-III contribuye a su acción hemorrágica sistémica por tres posibles mecanismos: *a)* por el efecto inhibitorio de la agregación plaquetaria ejercido por los dos dominios adicionales, *b)* por la capacidad de dichos dominios para dirigir la proteínasa a blancos relevantes en la microvasculatura (como las integrinas del endotelio o proteínas de la membrana basal), y *c)* por la resistencia de estas proteinasas a la inhibición por la  $\alpha_2$ -macroglobulina plasmática (22).

Los venenos de vipéridos afectan la hemostasia de múltiples maneras, relacionadas con la cascada de la coagulación o con las plaquetas (51, 52). Estos venenos presentan proteinasas procoagulantes, que actúan en varios puntos de la cascada de la coagulación. Las más importantes son metaloproteinasas que activan el factor II (protrombina) o el factor X. Estas metaloproteinasas son principalmente de la clase P-III, aunque no presentan acción hemorrágica (53-55). Además, muchos de estos venenos contienen serinoproteinasas que actúan directamente sobre el fibrinógeno, generando fibrina, por lo que se denominan "enzimas tipo trombina"; a diferencia de la trombina; sin embargo, estas enzimas generan trombos débiles, fácilmente degradables por el sistema

fibrinolítico (51). *In vitro*, estos componentes originan coagulación de la sangre o del plasma; *in vivo*, la acción coagulante de estos componentes varía de acuerdo con la ruta de inoculación. Cuando los venenos o las enzimas coagulantes purificadas se inyectan por la vía intravenosa, se produce una trombosis letal (55). Por otra parte, si las enzimas se inyectan por las vías subcutánea o intramuscular, la absorción lenta de las mismas a la circulación origina la formación de microtrombos, los cuales liberan pequeños émbolos que se depositan en la microvasculatura, sin que se generen trombos grandes. En estas circunstancias, el efecto neto es el de consumo de fibrinógeno, con alteraciones de los tiempos de coagulación, protrombina y tromboplastina parcial (Figura 5). Asimismo, se activa el sistema fibrinolítico endógeno y se generan productos de degradación de fibrinógeno/fibrina (56, 57). En algunos casos, se observa consumo de otros factores de la coagulación, además del fibrinógeno.

**Figura 5**  
Principales alteraciones en los procesos de coagulación sanguínea inducidas por los venenos de serpientes de la familia Viperidae.

El efecto predominante, consecuencia de la acción coagulante de diversas enzimas de estos venenos, es una desfibrinación, con la consecuente alteración en las pruebas de laboratorio.



Unos pocos venenos de algunas especies de *Bothrops*, principalmente *B. lanceolatus* (distribuida en la isla caribeña de Martinica) y *B. caribbaeus* (distribuida en la vecina isla de Santa Lucía), se caracterizan por inducir un perfil completamente distinto de alteraciones en la coagulación. Estos venenos no inducen desfibrinación, sino que provocan cuadros de trombosis severas, con tromboembolismos que traen serias consecuencias para las víctimas (52,58). Se desconoce el tipo de toxinas responsables de este efecto.

Los venenos de vipéridos afectan tanto el número de plaquetas circulantes como la funcionalidad de las mismas (Figura 6). La trombocitopenia es un hallazgo de laboratorio común en estos envenenamientos (47,59). Los estudios experimentales han identificado diversos mecanismos que originan la trombocitopenia: a) la acción de proteínas con estructura de lectina tipo C, tales como "botrocetina" y "aspercetina", las cuales interactúan con el factor de von Willebrand, induciendo su interacción con el receptor glicoproteína Ib de la membrana plaquetaria, lo cual origina aglutinación/agregación de plaquetas (60,61). Como consecuencia, se forman agregados plaquetarios en la circulación, los cuales son removidos a nivel microvascular, resultando en una reducción drástica en el número de plaquetas (62). b) La acción de metaloproteinasas hemorrágicas, que causan degradación de la membrana basal microvascular y ruptura en la integridad del endotelio; ello provoca la activación de las plaquetas y su agregación en los sitios de daño microvascular, con la consiguiente reducción en las plaquetas circulantes (57,63). c) La activación de protrombina por metaloproteinasas procoagulantes de los venenos; en tanto que la trombina es un importante agonista de la agregación plaquetaria; dicha activación genera agregación plaquetaria y, en consecuencia, reducción en el número de plaquetas circulantes (56).

Además, a niveles clínico y experimental se ha documentado que estos envenenamientos se asocian con disfuncionalidad plaquetaria, reflejada en su incapacidad para agregarse cuando se incuban *ex vivo* con agonistas como el ADP y el colágeno (56,57,64). Los mecanismos involucrados en este efecto hipoagregante plaquetario incluyen: a) la acción de las desintegrinas, que son proteínas de baja masa molecular que se unen con gran afinidad con la glicoproteína IIb/IIIa (integrina  $\alpha_{IIb}\beta_{III}$ ), inhibiendo la

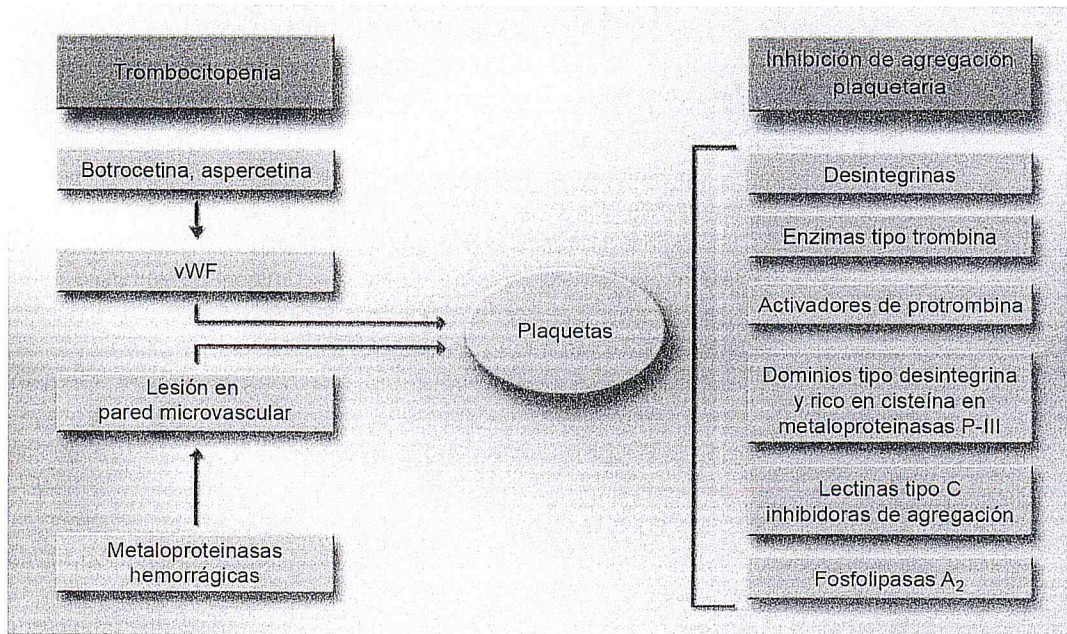


interacción del fibrinógeno y la fibronectina con dicho receptor (59,65). *b*) La acción de los dominios "tipo desintegrina" y "rico en cisteína" presentes en los venenos, ya sea solos o formando parte de metaloproteínas de la clase P-III. Estas proteínas se unen con la integrina  $\alpha_2\beta_1$  (receptor de colágeno), inhibiendo la agregación plaquetaria inducida por este agonista (66,67). *c*) La acción de las proteinasas coagulantes de tipo serinoproteinasas y metaloproteinasas, las cuales inducen consumo de fibrinógeno; como consecuencia, se afecta la agregación plaquetaria, ya sea por depleción del fibrinógeno necesario para agregar las plaquetas o por interacción de los productos de degradación de fibrinógeno con la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_{III}$  (57). *d*) La acción de diversas proteínas pertenecientes a la familia de las lectinas tipo C, que interactúan con receptores plaquetarios y son capaces de inhibir los procesos normales de agregación (68). *e*) La acción de fosfolipasas  $A_2$ , que inhiben la agregación plaquetaria (69). Por otra parte, hay proteínas con acción agregante de las plaquetas, como algunas fosfolipasas  $A_2$  (69) y la convulxina del veneno de *Crotalus durissus terrificus*, que es una proteína oligomérica de la familia de las lectinas tipo C (70).

**Figura 6**

Acciones de diversos componentes de venenos de vipéridos sobre las plaquetas.

Los efectos principales son la trombocitopenia y la inhibición de la agregación plaquetaria. Se presentan los principales tipos de proteínas responsables de inducir estos efectos. En el caso de las proteínas, como botrocetina, éstas inducen aglutinación/agregación plaquetaria mediada por el factor de von Willebrand (vWF).



Las alteraciones en la cascada de la coagulación, así como la trombocitopenia y la hipoagregación plaquetaria, coadyuvan en el proceso de sangrado iniciado por las metaloproteinasas hemorrágicas al impedir la acción hemostática en sitios lesionados de la microvasculatura. Por ello, en la valoración de la severidad de los envenenamientos por vipéridos, así como en el seguimiento del éxito terapéutico posterior a la administración de antivenenos, se observan con detenimiento las manifestaciones de sangrado y las coagulopatías, como parámetros medulares. La corrección de estos efectos fisiopatológicos, en plazos de tiempo establecidos en las normas de tratamiento de cada país, es el principal criterio de éxito terapéutico de la antivenenoterapia. Por el contrario, la falta de corrección de estas alteraciones es indicativa de que se requiere administrar una dosis adicional de antiveneno (71).

Las alteraciones hemodinámicas

El sangrado local y sistémico, así como el aumento en la permeabilidad vascular en diversos tejidos, particularmente en la región anatómica donde se inyecta el veneno, provocan un desplazamiento importante de fluido del compartimiento vascular al compartimiento tisular, con la consecuente hipovolemia. En ocasiones, ocurre paralelamente una hemoconcentración, debido a que se pierde más volumen de plasma que de elementos celulares; dicha hemoconcentración acarrea un incremento en la viscosidad de la sangre, con la subsiguiente disminución del flujo sanguíneo. Varios componentes y mecanismos participan en la patogénesis de estas alteraciones vasculares. Las metaloproteinasas hemorrágicas inducen la ruptura de vasos capilares y vénulas, provocando extravasación a nivel microvascular. Además, una variedad de componentes de los venenos, tales como metaloproteinasas, serinoproteinasas y fosfolipasas A<sub>2</sub>, liberan diversos mediadores inflamatorios y participan en la síntesis de otros, con lo cual contribuyen al incremento en la permeabilidad vascular (11,27). El edema pulmonar se observa con frecuencia en envenenamientos severos por vipéridos.

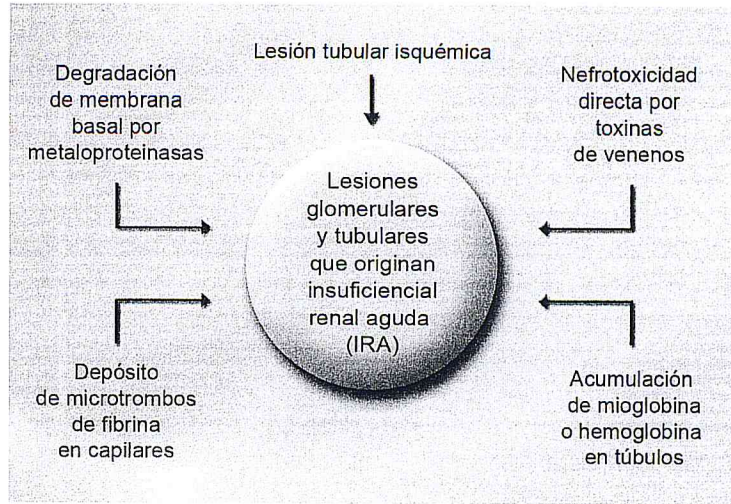
La hipotensión es una manifestación característica de los envenenamientos moderados y severos por serpientes de la familia Viperidae (3). Este efecto se debe, en buena medida, a la hipovolemia descrita. Además, venenos de especies de *Bothrops* sp. presentan en su composición los denominados "péptidos potenciadores de bradiquinina", que son inhibidores de la enzima

convertidora de angiotensina (72). Dichos péptidos, que sirvieron de base para la síntesis de potentes agentes antihipertensivos, como el captopril, pueden jugar un papel importante en la hipotensión en estos envenenamientos. El efecto hipotensor también puede deberse a la acción de mediadores endógenos liberados o sintetizados en el envenenamiento, como óxido nítrico, quini- nas, aminas vasoactivas y otros. Por otra parte, algunos venenos de vipéridos de otros continentes han mostrado tener un efecto cardiotoxico, como consecuencia de la liberación de TNF- $\alpha$  (73). Pese a que este efecto no se ha demostrado en venenos de vipéridos americanos, la posibilidad de que ocurra constituye una hipótesis interesante, sobre todo porque en envenenamientos severos inducidos por serpientes del género *Bothrops*, tanto a nivel experimental (74) como clínico (75), se ha demostrado un incremento en los niveles séricos de esta citoquina. Las alteraciones hemodinámicas en los envenenamientos por vipéridos causan una insuficiente perfusión tisular, lo cual se refleja en incrementos en la concentración de lactato y otras alteraciones metabólicas (76). La terapia de fluidos es uno de los elementos centrales en el manejo de estos envenenamientos.

Con frecuencia, en los envenenamientos por vipéridos se desarrolla insuficiencia renal aguda. Las acciones de dichos venenos sobre el funcionamiento y la estructura renales son diversas: *a)* Los problemas de perfusión, derivados de las alteraciones hemodinámicas descritas, originan isquemia renal que culmina con necrosis tubular aguda. *b)* Las metaloproteinasas del veneno degradan la membrana basal glomerular, generando hematuria y proteinuria. *c)* Se da una acción tóxica directa de componentes de venenos de vipéridos sobre células renales, demostrada *in vivo* e *in vitro*. Aunque estos componentes no han sido identifi- cados sistemáticamente hay descripciones de toxinas con acción nefrotóxica directa. *d)* Cuando ocurre hemólisis intravascular o miotoxicidad importante, se acumulan hemoglobina y mioglobi- na en los túbulos renales, con el consecuente efecto tóxico sobre las células tubulares. Todas estas alteraciones son responsables de lesión celular a diversos niveles, la cual se manifiesta como necrosis cortical bilateral, lesión glomerular y necrosis tubular aguda (77,78). En la Figura 7 se resumen los posibles mecanismos de daño renal en envenenamientos por vipéridos.

#### Las alteraciones renales

**Figura 7**  
Principales mecanismos mediante los cuales se postula que se origina la insuficiencia renal aguda en envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae en América.



El caso de los envenenamientos por la cascabel sudamericana *Crotalus durissus terrificus* y por otras subespecies de *C. durissus* merece ser destacado. Estos envenenamientos se caracterizan por un efecto nefrotóxico muy importante, asociado con mioglobinuria. La acumulación de mioglobina en los túbulos renales es resultado de una severa rabdomiólisis por la acción de la crotoxina a nivel sistémico. La insuficiencia renal aguda es una de las principales causas de muerte en los envenenamientos severos por cascabel en Sudamérica (79).

Neurotoxicidad en envenenamientos por ciertas especies de cascabel

La gran mayoría de las especies de vipéridos en América inducen un cuadro fisiopatológico asociado con prominentes alteraciones locales y con sangrado sistémico, coagulopatía y alteraciones renales y hemodinámicas. Los venenos de ciertas especies de cascabel, tales como varias subespecies de *Crotalus durissus* en Sudamérica y algunas poblaciones de *C. scutulatus* en Norteamérica, inducen un cuadro clínico en el que no se desarrolla un cuadro patológico local importante. Por el contrario, en su composición estos venenos tienen altas concentraciones de un complejo dimérico constituido por una fosfolipasa A<sub>2</sub> y una molécula "chaperona", como ocurre con la crotoxina (80), la cual tiene un potente efecto neurotóxico y miotóxico. Estos envenenamientos se caracterizan por un efecto neurotóxico que puede ser severo, asociado con parálisis flácida de diversos músculos, incluyendo

parálisis respiratoria. La crotoxina y las neurotoxinas similares tienen una acción en el sistema nervioso periférico, a nivel presináptico, afectando la liberación de acetilcolina de la terminal presináptica y alterando la ultraestructura de la terminal (81). Este efecto presináptico de la crotoxina se asocia con destrucción de la terminal axonal. Ya fue discutido el efecto miotóxico de la crotoxina, que se relaciona con lesiones en la integridad de la membrana plasmática. Además de los efectos neurotóxico y miotóxico, con las consecuentes alteraciones renales ya descritas, producto de la acumulación de mioglobina, estos venenos poseen una serinproteínasa con actividad tipo trombina, la cual induce desfibrinación y altera los parámetros hemostáticos de laboratorio (82).

Por otra parte, algunos envenenamientos por *Lachesis muta* en Sudamérica se han caracterizado por un efecto de aparente estimulación del sistema nervioso autónomo parasimpático, que se caracteriza por bradicardia, hipotensión, diaforesis, cólicos, vómito y diarrea (83). Se desconoce cuáles toxinas son responsables de este efecto, el cual no se presenta en todos los casos de envenenamientos por *Lachesis* sp. (84). Este ejemplo ilustra lo complejo e interesante del fenómeno del envenenamiento ofídico, donde pueden darse diferencias inter e intraespecíficas en la composición de los venenos y en las manifestaciones fisiopatológicas de los envenenamientos. Aún estamos lejos de conocer los venenos de serpientes en toda su complejidad.

Los autores agradecen a sus colegas, alumnos y asistentes del Instituto Clodomiro Picado, así como a muchos colaboradores de diversos países latinoamericanos y de otras latitudes, por los esfuerzos compartidos en el estudio de los venenos de serpientes y en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para estos envenenamientos. Muchos de nuestros trabajos citados en este capítulo han sido financiados por la Vicerrectoría de Investigación (Universidad de Costa Rica), la International Foundation for Science (IFS), el Wellcome Trust y la red NeTropica.

## **Agradecimientos**

## Referencias

1. Fan, HW, Cardoso, JL. (1995) Clinical toxicology of snake bites in South America. In: Meier, J, White, J, (Eds.) Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. CRC Press, Florida, pp. 667-688.
2. Gutiérrez, JM. (1995) Clinical toxicology of snakebite in Central America. In: Meier, J, White, J, (Eds.), Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. CRC Press, Florida, pp. 645-665.
3. Warrell, DA. (2004) Snakebites in Central and South America: Epidemiology, clinical features, and clinical management. In: Campbell, JA, Lamar, WW, (Eds.) The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere, Comstock, Ithaca, pp. 709-761.
4. Norris, R. (2004) Venom poisoning by North American reptiles. In: Campbell, JA, Lamar, WW, (Eds.) The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere, Vol II, Comstock, Ithaca, pp. 683-708.
5. Cardoso, JLC, Franca, FOS, Wen, FH, Málaque, CMS, Haddad, V. (2003) Animais Peconhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapeutica dos Acidentes. Sarvier, Sao Paulo, 468 p.
6. Serrano, SM, Shannon, JD, Wang, D, Camargo, AC, Fox, J.W. (2005) A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. *Proteomics* 5; 501-510.
7. Saravia, P, Rojas, E, Escalante, T, Arce, V, Chaves, E, Velásquez, R, Lomonte, B, Rojas, G, Gutiérrez, JM. (2001) The venom of *Bothrops asper* from Guatemala: toxic activities and neutralization by antivenoms. *Toxicon* 39; 401-405.
8. Gutiérrez, JM, Avila, C, Camacho, Z, Lomonte, B. (1990) Ontogenetic changes in the venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (bushmaster) from Costa Rica. *Toxicon* 28; 419-426.
9. Lomonte, B, Gené, JA, Gutiérrez, JM, Cerdas, L. (1983) Estudio comparativo de los venenos de serpiente cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. *Toxicon* 21; 379-384.
10. Gutiérrez, JM, Dos Santos, MC, Furtado, MF, Rojas, G. (1991) Biochemical and pharmacological similarities between the venoms of newborn *Crotalus durissus durissus* and adult *Crotalus durissus terrificus* rattlesnakes. *Toxicon* 29; 1273-1277.
11. Teixeira, CFP, Landucci, ECT, Antunes, E, Chacur, M, Cury, Y. (2003a) Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon* 42; 947-962.
12. Trebien, H, Calixto, JB. (1989) Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. *Agents Actions* 26; 292-300.
13. Chaves, F, Barboza, M, Gutiérrez, JM. (1995) Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon* 33; 31-39.
14. Lomonte, B, Tarkowski, A, Hanson, LÅ. (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.
15. Rucavado, A, Escalante, T, Teixeira CFP, Fernandes, CM, Diaz, C, Gutiérrez, JM. (2002) Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Med. Inflamm.* 11; 121-128.
16. Gutiérrez, JM, León, G, Rojas, G, Lomonte, B, Rucavado, A, Chaves, F. (1998) Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 36; 1529-1538.
17. Farsky, SH, Walter, J, Costa-Cruz, M, Cury, Y, Teixeira, CF. (1997) Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: *in vivo* and *in vitro* studies. *Toxicon* 35; 185-193.
18. Chacur, M, Picolo, G, Gutiérrez, JM, Teixeira, CFP, Cury, Y. (2001) Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 39; 1173-1181.

19. Chacur, M, Milligan, ED, Sloan, EM, Wieseler-Frank, J, Barrientos, RM, Martin, D, Poole, S, Lomonte, B, Gutiérrez, JM, Maier, SF, Cury, Y. & Watkins, LR. (2004) Snake venom phospholipase A<sub>2</sub>s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. *Pain* 108; 180-191.
20. Bjarnason, JB, Fox, JW. (1994) Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol. Ther.* 62; 325-372.
21. Fox, JW, Serrano, SMT. (2005) Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 42; 915-931.
22. Gutiérrez, JM, Rucavado, A, Escalante, T, Díaz, C. (2005) Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45; 997-1011.
23. Ownby, CL, Bjarnason, JB, Tu, AT. (1978) Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. *Am J Pathol* 93, 201-218.
24. Moreira, L, Borkow, G, Ovadia, M, Gutiérrez, JM. (1994) Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. *Toxicon* 32; 977-987.
25. Rucavado, A, Núñez, J, Gutiérrez, JM. (1998) Blister formation and skin damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Int. J. Exp. Pathol.* 79; 245-254.
26. Gutiérrez, J, Lomonte, B. (1995) Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33; 1405-1424.
27. Gutiérrez, JM, Lomonte, B. (2003) Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. En: Cardoso, JLC, Franca, FOS, Wen, FH, Málaque, CMS, Daddad, V. (Eds.) *Animais Peconhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier, Sao Paulo, pp 310-323.
28. Lomonte, B, Angulo, Y, Calderón, L. (2003) An overview of Lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* 42; 885-901.
29. Gutiérrez, JM, Ownby, CL, Odell, GV. (1984) Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp. Mol. Pathol.* 40; 367-379.
30. Gutiérrez, JM, Ownby, CL. (2003) Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 42, 915-931.
31. Gopalakrishnakone, P, Dempster, DW, Hawgood, BJ, Elder, HY. (1984) Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> complex. *Toxicon* 22; 85-98.
32. Azevedo-Marques, MM, Cupo, P, Coimbra, TM, Hering, SE, Rossi, MA, Laure, CJ. (1985) Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon* 23; 631-636.
33. Ownby, CL, Cameron, D, Tu, AT. (1976) Isolation of myotoxin components from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. Electron microscopic analysis of muscle damage. *Am J Pathol* 85; 149-166.
34. Gutiérrez, JM, Romero, M, Núñez, J, Chaves, F, Borkow, G, Ovadia, M. (1995) Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Exp Mol Pathol* 62; 28-41.
35. Homma, M, Tu, AT. (1971) Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. *Br. J. Exp. Pathol.* 52; 538-542.

36. Queiroz, LS, Santo-Neto, H, Assakura, MT, Reichl, AP, Mandelbaum, FR. (1985) Pathological changes in muscle caused by haemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 23; 341-345.
37. Moura-da-Silva, AM, Laing, GD, Paine, MJI, Dennison, JMTJ, Politi, V, Crampton, JM, Theakston, RDG. (1996) Processing of pro-tumor necrosis factor- $\alpha$  by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. *Eur. J. Immunol.* 26; 2000-2005.
38. Laing, GD, Clissa, PB, Theakston, RDG, Moura-da-Silva, AM, Taylor, MJ. (2003) Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. *Eur. J. Immunol.* 33; 3458-3463.
39. Teixeira, CFP, Zamunér, SR, Zuliani, JP, Fernandes, CM, Cruz-Hofling, MA, Fernandes, I, Chaves, F, Gutiérrez, JM. (2003b) Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. *Muscle & Nerve* 28; 449-459.
40. Chaves, F, Teixeira, CFP, Gutiérrez, JM. (2005) Role of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. *Toxicon* 45; 171-178.
41. Warrell, DA. (1992) The global problem of snakebite: its prevention and treatment. In: Gopalakrishnakone, P, Tan, CK, (Eds.) Recent Advances in Toxinology research, Vol 1. National University of Singapore, Singapore, pp. 121-153.
42. Lomonte, B, Lundgren, J, Johansson, B, Bagge, U. (1994) The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. *Toxicon* 32; 41-55.
43. Battellino, C, Piazza, R, da Silva, AMM, Cury, Y, Farsky, SHP. (2003) Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 41; 583-593.
44. Gutiérrez, JM, León, G, Lomonte, B. (2003) Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. *Clin. Pharmacokin.* 42; 721-741.
45. Escalante, T, Franceschi, A, Rucavado, A, Gutiérrez, JM. (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.
46. Murakami, M, Arruda, EZ, Melo, PA, Martinez, AB, Lomonte, B, Gutiérrez, JM, Arni, RK. (2005) Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypansomal drug suramin. *J Mol Biol* 350; 416-426.
47. Cardoso, JLC, Fan, HW, Franca, FOS, Jorge, MT, Leite, RP, Nishioka, SA, Avila, A, Sano-Martins, IS, Tomy, SC, Santoro, ML, Chudzinski, AM, Castro, SCB, Kamiguti, AS, Kelen, EMA, Hirata, MH, Mirandola, RMS, Theakston, RDG, Warrell, DA. (1993) Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in Sao Paulo, Brazil. *Q J Med* 86; 315-325.
48. Otero, R, Gutiérrez, J, Mesa, MB, Duque, E, Rodríguez, O, Arango, JL, Gómez, F, Toro, A, Cano, F, Rodríguez, LM, Caro, E, Martínez, J, Cornejo, W, Gómez, LM, Uribe, FL, Cárdenas, S, Núñez, V, Díaz, A. (2002) Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon* 40; 1107-1114.
49. Escalante, T, Núñez, J, Moura-da-Silva, AM, Rucavado, A, Theakston, RDG, Gutiérrez, JM. (2003) Pulmonary hemorrhage induced by jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 193; 17-28.
50. Escalante, T, Rucavado, A, Kamiguti, AS, Theakston, RDG, Gutiérrez, JM. (2004) *Bothrops asper* metalloproteinase BaP1 is inhibited by  $\alpha_2$ -macroglobulin and mouse



- serum and does not induce systemic hemorrhage or coagulopathy. *Toxicon* 43; 213-217.
51. Markland, FS. (1998) Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36; 1749-1800.
  52. White, J. (2005) Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon* 45; 951-967.
  53. Hofmann, H, Bon, C. (1987) Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. I. Identification, purification, and properties of a prothrombin activator. *Biochemistry* 26; 772-780.
  54. Silva, MB, Schattner, M, Ramos, CR, Junqueira-de-Azevedo, IL, Guarnieri, MC, Lazzari, MA, Sampaio, CA, Pozner, RG, Ventura, JS, Ho, PL, Chudzinski-Tavassi, AM. (2003) A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* snake venom: characterization and molecular cloning. *Biochem. J.* 369; 129-139.
  55. Loria, GD, Rucavado, A, Kamiguti, AS, Theakston, RDG., Fox, JW, Alape, A, Gutiérrez, JM. (2003) Characterization of 'basparin A', a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 418; 13-24.
  56. Santoro, ML, Sano-Martins, IS. (2004) Platelet dysfunction during *Bothrops jararaca* snake envenomation in rabbits. *Thromb. Haemost.* 92; 369-383.
  57. Rucavado, A, Soto, M, Escalante, T, Loria, GD, Arni, R, Gutiérrez, JM. (2005) Thrombocytopenia and platelet hypoaggregation induced by *Bothrops asper* snake venom: toxins involved and their contribution to metalloproteinase-induced pulmonary hemorrhage. *Thromb. Haemost.* 94; 123-131.
  58. (58) Thomas, L, Tyburn, B, and the Research Group of Snake Bite in Martinique (1996) *Bothrops lanceolatus* bites in Martinique: Clinical aspects and treatment. In: Bon, C, Goyffon, M, (Eds.) *Envenomings and Their Treatments*. Fondation Marcel Mérieux, Lyon, pp. 255-265.
  59. Sano-Martins, IS, Santoro, ML. (2003) Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos no Brasil. In: Cardoso, JLC, Franca, FOS, Wen, FH, Málague, CMS, Haddad, V, (Eds.) *Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapeutica dos Acidentes*. Sarvier, Sao Paulo, pp. 289-309.
  60. Rucavado, A, Soto, M, Kammiguti, AS, Theakston, RDG, Fox, JW, Escalante, T, Gutiérrez, JM. (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.
  61. Lu, Q, Navdaev, A, Clemetson, JM, Clemetson, KJ. (2005) Snake venom C-type lectins interacting with platelet receptors. Structure-function relationships and effects on haemostasis. *Toxicon* 45; 1089-1098.
  62. Sanders, WE, Read, MS, Reddick, RL, Garris, JB, Brinkhous, KM. (1988) Thrombotic thrombocytopenia with von Willebrand factor deficiency induced by botrocetin. An animal model. *Lab. Invest.* 59; 443-452.
  63. Kamiguti, AS, Theakston, RDG, Desmond, H, Hutton, RA. (1991) Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 29; 1097-1105.
  64. Sano-Martins, IS, Santoro, ML, Castro, SCB, Fan, HW, Cardoso, JLC, Theakston, RDG. (1997) Platelet aggregation in patients bitten by the Brazilian snake *Bothrops jararaca*. *Thromb Res* 87; 183-195.
  65. Calvete, JJ, Marcinkiewicz, C, Monleón, D, Esteve, V, Celda, B, Juárez, P, Sanz, L. (2005) Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon* 45; 1063-1074.
  66. Kamiguti, AS, Hay, CRM, Zuzel, M. (1996) Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of  $\alpha_2\beta_1$ -integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Biochem. J.* 320; 635-641.

67. Moura-da-Silva, AM, Linica, A, Della-Casa, MS, Kamiguti, AS, Ho, PL, Crampton, JM, Theakston, RDG. (1999) Jararhagin ECD-containing disintegrin domain: expression in *Escherichia coli* and inhibition of the platelet-collagen interaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 369; 295-301.
68. Morita, T. (2005) Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. *Toxicon* 45; 1099-1114.
69. Kini, RM, Evans, HJ. (1997) Effects of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes on platelet aggregation. In: Kini, RM., Ed., *Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes. Structure, Function and Mechanism*. Wiley, Chichester, pp. 369-387.
70. Polgar, J, Clemetson, JM, Kehrel, BE, Wiedermann, EM, Wells, TN, Clemetson, KJ. (1997) Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. *J. Biol. Chem.* 272; 13576-13583.
71. Otero, R, Gutiérrez, JM, Núñez, V, Robles, A, Estrada, R, Segura, E, Toro, MF, García, ME, Díaz, A, Ramírez, EC, Gómez, G, Castañeda, J, Moreno, ME, the regional group on antivenom therapy research (1996) A randomized double-blind clinical trial of two antivenoms in patients bitten by *Bothrops atrox* in Colombia. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 90; 696-700.
72. Hayashi, MAF, Camargo, ACM. (2005) The bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. *Toxicon* 45; 1163-1170.
73. Szold, O, Ben-Abraham, R, Folkis, I, Sorkine, M, Sorkine, P. (2003) Tumor necrosis factor as a mediator of cardiac toxicity following snake envenomation. *Crit Care Med* 31; 1449-1453.
74. Petricevich, VL, Teixeira, CFP, Tambourgi, DV, Gutiérrez, JM. (2000) Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon* 38; 1253-1266.
75. Avila-Agüero, ML, Paris, MM, Hu, S, Peterson, PK, Gutiérrez, JM, Lomonte, B, Faingezicht, I, The snakebite study group (2001) Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. *Ped. Emerg. Care* 17; 425-429.
76. Carlson, RW, Schaeffer, RC, Whigham, H, Michaels, S, Russell, FE, Weil, MH. (1975) Rattlesnake venom shock in the rat: development of a method. *Am. J. Physiol.* 229; 1668-1674.
77. Amaral, CFS, Da-Silva, OA, Godoy, P, Miranda, D. (1985) Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. *Toxicon* 23; 877-885.
78. Boer-Lima, PA, Montijo, JAR, Cruz-Hofling, MA. (1999) Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moajeni* snake venom in rats. *A. J. Trop. Med. Hyg.* 61; 698-706.
79. Azevedo-Marques, MM, Hering, SE, Cupo, P. (2003) Acidente crotálico. In: Cardoso, JLC, Franca, FOS, Wen, FH, Mâlaque, CMS, Haddad, V, (Eds.) *Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier, Sao Paulo, pp. 91-98.
80. Bon, C. (1997) Multicomponent neurotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. In: Kini, R.M., Ed., *Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. Wiley, Chichester, pp. 269-285.
81. Gopalakrishnakone, P, Hawgood, BJ. (1984) Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. *Toxicon* 22; 791-804.
82. Sano-Martins, IS, Tomy, SC, Campolina, D, Dias, MB, Castro, SCB, Sousa-e-Silva, MCC, Amaral, CFS, Rezende, NA, Kamiguti, AS, Warrell, DA, Theakston, RDG. (2001) Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming in humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. *Q. J. Med.* 94; 551-559.

83. Málaque, CMS, Franca, FOS. (2003) Acidente laquético. In: Cardoso, JLC, Franca, FOS, Wen, FH, Málaque, CMS, Haddad, V, (Eds.) Animais Peconhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapeutica dos Acidentes. Sarvier, Sao Paulo, pp. 87-90
84. Bolaños, R, Rojas, O, Ulloa, CE. (1982) Aspectos biomédicos de cuatro casos de mordedura de serpiente por *Lachesis muta* (Ophidia: Viperidae) en Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 30; 53-58.
85. Núñez, CE, Angulo, Y, Lomonte, B. (2001) Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> 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.