

Pertenece a UME
Unidad de Microcomputación Electrónica
Universidad de Costa Rica

Toxicidad y neutralización de venenos ofídicos peruanos de los géneros *Bothrops* y *Lachesis* (Serpentes: Viperidae)

Rosa Incio Ruiz¹, Luis Incio Ruiz¹, Alfonso Zavaleta Martínez-Vargas^{2,3}, María Salas Arruz^{2,4} y José María Gutiérrez⁵

¹ Facultad de Biología, Universidad Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

² Laboratorio de Farmacología, Depto. Académico de Ciencias Fisiológicas, Universidad Peruana Cayetano Heredia, A.P. 5045, Lima Perú.

³ Centro de Control de Calidad, Instituto Nacional de Salud, Perú.

⁴ Laboratorio Afiliado, Centro de Investigación en Salud "Hugo Lumbreras Cruz", Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú.

⁵ Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

(Rec. 22-II-1993. Acep. 29-III-1993)

Abstract: The lethal potencies (Median Lethal Dose) of the venoms of Peruvian snakes (*Bothrops atrox*, *Bothrops barnetti*, *Bothrops pictus* and *Lachesis muta muta*) were determined in mice by using intravenous and intraperitoneal routes of injection. In addition, the neutralizing ability of three antivenoms (bothropic polyvalent, bothropic bivalent and lachetic) was studied by preincubation-type experiments. *B. pictus* venom had the highest lethality by the intraperitoneal route whereas *B. atrox* venom had the highest lethality when tested by the intravenous route. The three antivenoms were effective in neutralizing lethality of the homologous venoms. Bivalent antivenom was more effective than polyvalent antivenom in the neutralization of *B. pictus* venom. On the basis of these findings, the use of bivalent bothropic antivenom is recommended in the Pacific coastal regions of Perú, whereas polyvalent bothropic antivenom is recommended in the oriental jungle regions of the country.

Key words: Snake, venoms, lethality, antivenoms, neutralization.

El envenenamiento por mordedura de serpiente es un accidente frecuente en las vertientes occidental, o Pacífica, y oriental, o Atlántica, de la cadena de los Andes. Se conocen cerca de 60 especies de serpientes venenosas pertenecientes a los géneros *Bothrops*, *Lachesis*, *Crotalus* y *Micrurus* (Meneses 1974a, b, c, Hoge y Romano 1979, Carrillo 1983). Cuatro especies se han descrito como agentes causales principales del ofidismo en el Perú: *Bothrops atrox* (jergón) y *Lachesis muta muta* (sushupe) en la selva amazónica de la vertiente oriental y *Bothrops pictus* (jergón de la costa) y *Bothrops barnetti* (macanche) en las zonas desérticas de la vertiente occidental. La especie *B. atrox* es responsable de cerca del 90% de los accidentes ofídicos registrados anualmente en el Perú (Chang & Zavaleta 1987, De La Vega *et al.* 1989).

Los venenos de las cuatro especies mencionadas producen marcados efectos locales en el

sitio de la inyección, los cuales incluyen hemorragia, edema y necrosis. Además, se observan efectos sistémicos, entre los que destacan alteración de la coagulación sanguínea, hipotensión arterial, disfunción renal y muerte (Lee 1979, Russell 1980, Olascoaga 1987, Olascoaga, Zavaleta y Marsh 1988, Pancorbo 1989, Zavaleta *et al.* 1989, Villegas 1990). Los aspectos bioquímicos de los venenos de *B. atrox* y *L. muta muta* han sido estudiados, describiéndose la presencia de enzimas con actividad coagulante similar a trombina, esterasas, fosfolipasa A₂, fosfatasa, exonucleasa y 5'nucleotidasa (Campos y Yarleque 1974, Heredia, Campos y Yarleque 1982, Herrera *et al.* 1986, Yarleque, Escobar y Campos 1983, Campos *et al.* 1985, 1988, Zavaleta *et al.* 1989). Los estudios sobre aspectos bioquímicos y farmacológicos de los venenos de *B. barnetti* y *B. pictus* son aún escasos (Olascoaga 1987, Olascoaga, Zavaleta y Marsh 1988).

El Instituto Nacional de Salud del Perú produce antivenenos ofídicos y arácnidos desde 1968 empleando técnicas de hiperinmunización en equinos (Chippaux y Goyffon 1983). Actualmente elabora en forma comercial cuatro antivenenos: Antilaquéstico monovalente (ALM; se utiliza como antígeno el veneno de *Lachesis muta muta*), anticrotálico monovalente (ACM; se utiliza como antígeno el veneno de *Crotalus durissus terrificus*), antibotrópico polivalente (ABP; se utiliza como antígeno los venenos de *Bothrops atrox* y *Bothrops pictus*) y antibotrópico bivalente (ABB; se utiliza como antígenos los venenos de *Bothrops barnetti* y *Bothrops pictus*).

Sin embargo, la potencia específica de estos sueros no ha sido previamente analizada en detalle, por lo que en este estudio se evaluó la potencia de cada antiveneno mediante pruebas en las que veneno y antiveneno se incuban antes de su administración en ratones (OPS 1977). Gutiérrez *et al.* (1990) han planteado que si bien en este tipo de experimentos no se reproducen las características naturales del envenenamiento ofídico, esta modalidad es la más adecuada para estudiar la concentración y afinidad de los anticuerpos neutralizantes en los antivenenos, ya que los resultados son independientes de la farmacocinética de veneno y antiveneno.

En el presente trabajo se estudió la toxicidad aguda de los venenos de las serpientes peruanas *B. atrox*, *B. pictus*, *B. barnetti* y *L. muta muta*, así como la actividad neutralizante antiletal de los antivenenos antibotrópico bivalente, antibotrópico polivalente y antilaquéstico monovalente producidos en el Perú.

MATERIAL Y METODOS

Venenos, antivenenos y animales de laboratorio: Para los estudios de toxicidad aguda utilizamos venenos cristalizados de las especies de serpientes peruanas *B. atrox* (localidades de Iquitos y Pucallpa), *B. pictus* (Lima), *B. barnetti* (Lambayeque) y *L. muta muta* (Alto Marañón, Amazonas). Los venenos fueron recolectados mediante presión manual de las glándulas venenosas en el Serpentario del Departamento de Animales Venenosos, Instituto Nacional de Salud, Perú. Para las pruebas de neutralización utilizamos los sueros

antilaquéstico monovalente (ALM, lote 12), antibotrópico bivalente (ABB, lote 1) y antibotrópico polivalente (ABP, lote 76), producidos por el Instituto Nacional de Salud del Perú. En estos experimentos se utilizó ratones albinos machos de la cepa Balb/C de 18 a 22 g de peso.

Toxicidad: Se estudió la toxicidad de los cuatro venenos por las vías intraperitoneal (ip) y endovenosa (ev), inyectando un volumen de 200 μ l (ev) o 500 μ l (ip) a cada ratón. Para los ensayos se prepararon diluciones de cada veneno en NaCl 0.85%, utilizando intervalos logarítmicos entre las dosis. Seis ratones por grupo fueron inyectados con alícuotas de cada dilución de veneno, registrándose la mortalidad a las 48 horas. Los ratones de los grupos control recibieron volúmenes idénticos de NaCl 0.85%.

La Dosis Letal Media (DL₅₀) de cada veneno se estimó por el método de transformación de probits (Geigy 1950, Finney 1971). Para la estimación de la potencia relativa de los venenos, así como la influencia de la vía de inyección sobre la toxicidad aguda, empleamos el veneno de *B. atrox* como referencia. La potencia relativa de cada veneno con respecto al de *B. atrox* fue obtenida mediante la técnica de Finney (1971), la cual emplea las curvas de regresión de log dosis vs. probit teórico para cada veneno y las compara con los parámetros obtenidos con el veneno de referencia. Los valores de los parámetros probit teórico y su correspondiente log dosis se obtuvieron previamente al calcular la DL₅₀ por el método de transformación en probits.

Neutralización de la actividad letal: La capacidad neutralizante específica de los antivenenos fue estudiada mediante experimentos con preincubación de veneno y antiveneno, empleando las vías intraperitoneal (1.0 ml de inóculo) y endovenosa (0.5 ml de inóculo) y una dosis fija de 2 DL₅₀ de veneno como dosis de reto a neutralizar. Se incubaron volúmenes de cada veneno en presencia de diluciones crecientes del antiveneno, a 37°C durante 30 min, procediéndose luego a inocular alícuotas de las mezclas con una dosis de veneno equivalente a 2 DL₅₀ por ratón. Como controles se inyectó volúmenes similares del antiveneno sin diluir, NaCl 0.85% o 2 DL₅₀ de veneno diluido en NaCl 0.85%. La mortalidad se registró a las 48 horas y la Dosis Efectiva 50% (DE₅₀) se calcu-

CUADRO 1

Toxicidad aguda (DL₅₀) de los venenos de cuatro serpientes crotalidas peruanas en ratones albinos*

Veneno	Vía de inoculación	DL ₅₀ ** (mg/kg)	Límites de confianza 95%	Potencia relativa
<i>Bothrops atrox</i>	intraperitoneal	5.47	4.5-6.6	1.0
<i>B. barnetti</i>	intraperitoneal	3.08	2.9-3.3	1.7
<i>B. pictus</i>	intraperitoneal	2.98	2.5-3.5	1.8
<i>Lachesis muta muta</i>	intraperitoneal	14.05	12.8-15.4	0.4
<i>Bothrops atrox</i>	endovenosa	1.58	1.3-1.8	1.0
<i>B. barnetti</i>	endovenosa	2.61	2.3-3.0	0.5
<i>B. pictus</i>	endovenosa	1.90	1.4-2.6	0.8
<i>Lachesis muta muta</i>	endovenosa	NC**		

* Ratones de 18-22 gramos de peso.

** DL₅₀: Dosis letal 50%, expresada en mg veneno/kg ratón.

** NC: No cuantificable (ver texto).

ló empleando el método de transformación en probits (Geigy 1950).

La potencia neutralizante específica (directa u homóloga) correspondió a aquella obtenida al enfrentar un antiveneno particular con el veneno utilizado como antígeno en su elaboración. Dicha potencia se expresó como la Dosis Efectiva 50% (DE₅₀), de tres formas diferentes: (a) µl de antiveneno/2 DL₅₀; (b) µl de antiveneno/mg de veneno y (c) mg de veneno/ml de antiveneno. En los tres casos, la DE₅₀ corresponde a la proporción antiveneno/veneno en la que sobrevive el 50% del total de ratones inoculados.

También se estimó la potencia relativa de cada uno de los antivenenos con respecto a un antiveneno de referencia (antiveneno antibotrópico polivalente, lote 76). Dicha potencia relativa se obtuvo utilizando el método de Finney, el cual emplea como parámetros el logaritmo de la dosis y el valor probit correspondiente, ambos determinados durante el cálculo de la DE₅₀.

RESULTADOS

La letalidad inducida por inyecciones ip y ev de los venenos fue dosis-dependiente, excepto en el caso del veneno de *L. muta muta* inoculado por vía endovenosa (1.5 a 3.5 mg veneno/kg peso). En ese caso observamos una elevada mortalidad en los primeros 10 min, la cual no fue dosis-dependiente, e impidió la estimación de la DL₅₀ por esta vía.

CUADRO 2

Efectos de la ruta de envenenamiento sobre la actividad tóxica del veneno de serpientes crotalidas peruanas

Veneno	DL ₅₀ *		Potencia relativa (vía ev/vía ip)
	EV	IP	
<i>Bothrops atrox</i>	1.58	5.47	3.9
<i>B. barnetti</i>	2.61	3.08	1.2
<i>B. pictus</i>	1.90	2.98	1.6

* Expresada en mg veneno/kg de ratón.

En los Cuadros 1 y 2 se compara la letalidad de los venenos estudiados con la del veneno de *B. atrox* para cada ruta de envenenamiento estudiada. La vía de inoculación afectó marcadamente la letalidad, siendo en todos los casos la vía ev la de mayor toxicidad. El perfil de potencia tóxica de los venenos botrópicos dependió de la vía de inoculación (Cuadro 2). El veneno de *B. pictus* fue el más tóxico por la vía ip, mientras que el de *B. atrox* fue el más tóxico por la vía ev.

Los cuatro venenos fueron neutralizados por los antivenenos homólogos, con valores de DE₅₀ diferentes (Cuadro 3). Por otra parte, el estudio de la potencia relativa de los antivenenos titulados por la vía ip, comparados con antiveneno de referencia (ABP vs veneno de *B. atrox*), mostró que el suero ABB posee mayor eficacia relativa para neutralizar sus venenos homólogos que los sueros ABP y ALM

CUADRO 3

Neutralización específica de venenos de crocódidos peruanos por sueros antiveneno comerciales (INS-PERU)

Vía de inoculación	Veneno	Dosis de* reto (μg)	Antiveneno**	Neutralización (DE ₅₀)*** $\mu\text{l}/2\text{DL}_{50}$	$\mu\text{l}/\text{mg}$	mg/ml	Potencia relativa****
Intraperitoneal	<i>Bothrops atrox</i>	109.4	ABP	34.6(22.1-54.0)	316.3	3.2	1.00
Intraperitoneal	<i>Lachesis muta</i>	281.0	ALM	58.2(39.2-86.5)	207.1	4.8	0.59
Intraperitoneal	<i>Bothrops barnetti</i>	61.6	ABB	31.3(20.4-47.9)	508.1	2.0	1.11
Intraperitoneal	<i>Bothrops pictus</i>	59.6	ABB	22.4(15.1-33.3)	375.8	2.7	1.54
Intraperitoneal	<i>Bothrops pictus</i>	59.6	ABP	73 (46.6-114.3)	1224.8	0.8	0.47
Endovenosa	<i>Bothrops atrox</i>	31.6	ABP	52.5(32.9-86.3)	1661.4	0.6	1.00
Endovenosa	<i>Bothrops barnetti</i>	52.2	ABB	46.6(30.0-72.5)	892.7	1.1	1.13
Endovenosa	<i>Bothrops pictus</i>	38.0	ABB	55.4(36.0-85.3)	1457.9	0.7	0.95
Endovenosa	<i>Bothrops pictus</i>	38.0	ABP	67.2(40.5-111.8)	1768.4	0.6	0.78

* La dosis de reto corresponde a 2DL_{50} .

** Ver nomenclatura en Material y métodos.

*** DE_{50} : Dosis eficaz 50% definida como la razón antiveneno/veneno en la que se protege la mitad de los ratones inoculados. La DE_{50} se expresa de tres formas distintas: μl antiveneno/ 2DL_{50} de veneno; μl antiveneno/mg veneno; y mg veneno/ml antiveneno.

**** Con respecto al antiveneno de referencia (ABP) titulado contra el veneno de *B. atrox*.

(Cuadro 3). En forma similar, aunque en menor proporción que lo observado por la vía ip, el antiveneno ABP neutralizó los venenos homólogos (*B. atrox* y *B. pictus*) por vía ev. El estudio de potencia relativa reveló que el antiveneno ABB neutralizó el veneno de *B. pictus* con mayor eficacia que el antiveneno ABP, cuando los experimentos se efectuaron mediante inoculaciones ip (Cuadro 3).

DISCUSION

La toxicidad de los venenos ha sido clásicamente evaluada mediante el estudio de la Dosis Letal 50%, para lo cual se han sugerido varios métodos de cuantificación. Los métodos gráficos iniciales (e.g. Reed & Muench 1938) han sido superados por métodos más precisos, como los de Spearman-Kärber (WHO 1981, Gené y Robles 1987) y el de transformación en probits (Geigy 1950, Finney 1971). Para ambos métodos existen programas que permiten efectuar los cálculos en microcomputadora (Trevors 1986, Gené y Robles 1987).

Los resultados obtenidos muestran que la letalidad guardó una relación dosis-respuesta adecuada para los venenos estudiados por am-

bas vías, a excepción del veneno de *L. muta* cuando se utilizó la vía endovenosa. Este resultado es similar al observado por Siles-Villaruel *et al.* (1981). Estudios sobre la toxicidad de venenos de serpientes brasileñas por la vía ev indican que los de especies de la familia Viperidae producen coagulación intravascular, lo cual origina resultados imprecisos y difíciles de interpretar, lo que impide la estimación de la Dosis Letal 50% (Furlanetto 1965, Siles Villaruel *et al.* 1981). Esta situación, sin embargo, no la observamos al estudiar los venenos de *B. atrox*, *B. pictus* y *B. barnetti*. Nuestros resultados muestran, por otro lado, que los tres venenos botrópicos son 1.2 a 3.6 veces más tóxicos cuando se inoculan por la vía ev que por la vía ip.

Los estudios sobre actividad tóxica de venenos de víperidos peruanos son escasos. Lengua (1971) estimó que la Dosis Letal 50% del veneno de *B. atrox* por la vía subcutánea es de 367 μg por ratón. Sin embargo, un análisis detallado de sus datos mostró que, en su caso, esta vía no es adecuada, debido a la ocurrencia de muertes no relacionadas con la progresión de las dosis (Lengua 1971). En nuestro caso, la DL_{50} para el veneno de *B. atrox* por la vía ip fue mucho menor que la obtenida previamente

por Herrera *et al.* (1986) empleando la vía subcutánea. Asimismo, la DL₅₀ para el veneno de *B. pictus* empleando la vía ip (2.98 mg/Kg) es semejante a la obtenida previamente por la misma vía (2.3 mg/Kg) (Olascoaga 1987) y menor que la obtenida por ese investigador al emplear la vía subcutánea (26.1 mg/Kg). Los datos anteriores sugieren que la vía subcutánea no es recomendable para la evaluación rutinaria de la potencia tóxica de estos venenos, al requerir el consumo de cantidades mucho mayores de veneno.

Con respecto al veneno de *L. muta*, la DL₅₀ obtenida en este trabajo por la vía ip es similar a la descrita previamente por Zavaleta *et al.* (1989). Por otro lado, las DL₅₀ ip de las subespecies costarricenses *L. muta stenophrys* y *L. muta melanocephala*, 6.1 mg/Kg y 6.0 mg/Kg, respectivamente (Bolaños *et al.* 1978, Gutiérrez *et al.* 1987), sugieren que el veneno de *L. muta muta* tiene la menor toxicidad de las tres subespecies.

Nuestros resultados muestran que todos los antivenenos poseen actividad neutralizante antiletal para los venenos evaluados. Sin embargo, no existió uniformidad en las potencias específicas de los antivenenos.

En el Perú, hasta 1983 se planteó que el suero ABP podía ser utilizado eficazmente para la terapéutica del ofidismo en la región selvática oriental y en la zona de la costa Pacífica. Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que la potencia específica del suero ABP frente al veneno de *B. pictus* es baja (DE₅₀ ip= 1225 µl antiveneno/mg veneno; título de 0.8 mg veneno/ml antiveneno). En 1983 la costa del Pacífico sur del Perú se vio afectada por el fenómeno del Niño, evento climático que se acompañó de un incremento en la precipitación pluvial, elevación de la temperatura de aguas marinas e incremento del número de accidentes ofídicos en la costa peruana. Frente a esta situación, el Instituto Nacional de Salud del Perú preparó un antiveneno específico regional para la costa, el suero antibotrópico bivalente (ABB), el cual posee buena potencia neutralizante frente a los venenos de *B. pictus* y *B. barnetti*. La potencia de este antiveneno frente al veneno de *B. pictus* fue 3-4 veces mayor que la obtenida con el antibotrópico polivalente, por lo que se recomienda la distribución y uso del suero polivalente únicamente en la región selvática oriental.

La Organización Mundial de la Salud ha planteado la necesidad de profundizar en el estudio de la potencia neutralizante de los sueros antivenenos (WHO 1981), así como de establecer venenos y antivenenos de referencia nacionales y/o regionales. Sobre esta base hemos empleado el veneno de cristalizado de *B. atrox* y el antiveneno ABP lote 76 del Instituto Nacional de Salud del Perú como veneno y antiveneno referenciales, respectivamente. Asimismo, hemos incluido en la evaluación de la potencia la estimación de la potencia relativa. Lamentablemente, aún existe una multiplicidad de formas de expresión de los títulos neutralizantes de los sueros antivenenos, así como de condiciones experimentales de titulación (Gutiérrez *et al.* 1990), lo que dificulta la comparación de los resultados obtenidos por diversos grupos de investigadores. Es necesario continuar esfuerzos colaborativos a nivel latinoamericano con el fin de conocer la capacidad neutralizante de los antivenenos producidos en diferentes países.

AGRADECIMIENTOS

J.M. Gutiérrez es beneficiario del Programa de Apoyo a Investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica.

RESUMEN

Se determinó la letalidad (Dosis Letal Media) en ratones de los venenos de las serpientes peruanas *Bothrops atrox*, *Bothrops pictus*, *Bothrops barnetti* y *Lachesis muta muta*, empleando las vías de inoculación endovenosa e intraperitoneal. Además, se estudió la capacidad neutralizante de esta actividad letal de tres antivenenos producidos por el Instituto Nacional de Salud del Perú: antibotrópico polivalente, antibotrópico bivalente y antilachésico monovalente. Los resultados mostraron que la toxicidad de los venenos varía de acuerdo a la vía de inoculación, siendo el veneno de *B. pictus* el más tóxico por la vía intraperitoneal y el de *B. atrox* el más tóxico por la endovenosa. Por otra parte, los estudios de neutralización demostraron que los antivenenos son eficaces en la neutralización de los venenos homólogos, en tanto que el antiveneno antibotrópico biva-

lente neutralizó el veneno de *B. pictus* con mayor eficacia que el antibotrópico polivalente. Se recomienda el uso del antiveneno antibotrópico bivalente en la región de la vertiente del Pacífico del Perú y el uso del antiveneno antibotrópico polivalente en la región selvática oriental de este país.

REFERENCIAS

- Bolaños, R., G. Muñoz & L. Cerdas. 1978. Toxicidad, neutralización e inmunolectroforesis de los venenos de *Lachesis muta* de Costa Rica y Colombia. *Toxicon* 16: 295-300.
- Campos, S. & A. Yarlequé. 1974. 5'nucleotidasa en el veneno de la serpiente *Lachesis muta*. *Bol. Soc. Química Perú* 40: 202-212.
- Campos, S., E. Escobar, F. Lazo, A. Yarlequé, N.A. Marsh, P.M. Peyser, B.C. Whaler, L.J. Creighton & P.J. Gaffney. 1985. Partial separation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the Peruvian bushmaster snake *Lachesis muta*. *Toxicon* 23: 558.
- Campos, S., E. Escobar, F. Lazo, A. Yarlequé, N. Marsh, P. Peyser & B. Whaler. 1988. Partial separation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the peruvian bushmaster snake, *Lachesis muta muta*, p. 107-115. In H. Pirkle & F.S. Markland (eds.). *Hemostasis and Animal Venoms*. Marcel Dekker, Nueva York.
- Carrillo, N. 1983. Contribución al conocimiento de las serpientes venenosas del Perú de las familias Viperidae, Elapidae e Hydrophiidae. *Publ. Mus. Hist. Nat. J. Prado (Lima)* 30: 1-55.
- Chang, J. & A. Zavaleta. 1987. Ofidismo en el Hospital General de la Merced: estudio retrospectivo de 116 casos. *Diagnóstico (Lima)* 20: 115-120.
- Chippaux, J.P. & M. Goyffon. 1983. Producers of antivenomous sera. *Toxicon* 21: 739-752.
- De la Vega, E., A. Zavaleta, N. Carrillo & L. Trelles. 1989. Accidentes producidos por animales ponzoñosos: serpientes venenosas del Perú, p. 169-188. In *Anales del Seminario Nacional de Zoonosis y Enfermedades Transmitidas por Alimentos*. Ministerio de Salud, Lima.
- Finney, D.J. 1971. *Probit Analysis*. Cambridge University, Londres. 333 p.
- Furlanetto, R.S. 1965. Empleo de camundongos tratado como dose preparatoria de venenos botrópicos para avaliação de DL50 desses venenos. Tesis, Facultad de Odontología, Universidad de Sao Paulo.
- Geigy, S.A. 1950. *Documenta Geigy. Tables Scientifiques. Probis Transformation*. (5a. ed.). Geigy, Basilea. 514 p.
- Gené, J.A. & A. Robles. 1987. Determinación de la dosis letal 50% por el método de Spearman Karber. *Rev. Méd. Hosp. Nal. Niños (Costa Rica)* 22: 35-40.
- Gutiérrez, J.M., G. Rojas & L. Cerdas. 1987. Ability of a polyvalent antivenom to neutralize the venom of *Lachesis muta melanocephala*, a new Costa Rican subspecies of the bushmaster. *Toxicon* 25: 713-720.
- Gutiérrez, J.M., G. Rojas, B. Lomonte, J.A. Gené & F. Chaves. 1990. La evaluación de la capacidad neutralizante de los antivenenos en América. *Publ. Inst. Clodomiro Picado, San José*. 21 p.
- Heredia, V., S. Campos & A. Yarlequé. 1982. Actividad de una 5'nucleotidasa en el veneno de la serpiente *Bothrops atrox* "Jergón". *Acta Cient. Venez.* 31: 148-153.
- Herrera, E., A. Yarlequé, S. Campos & A. Zavaleta. 1986. Efecto de la radiación gama sobre la actividad biológica y propiedades enzimáticas de los venenos de las serpientes *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Informe Nuclear (Perú)* 3: 1-14.
- Hoge, A.R. & S.A. Romano. 1979. Poisonous snakes of the world. Part I. Checklist of the pit vipers (Viperoidea, Viperidae, Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan* 42/43: 179-310.
- Lee, C.Y. 1979. *Snake Venoms*. Springer-Verlag, Berlín. 1150 p.
- Lengua, F. 1971. Determinación de la DL50 del veneno de *Bothrops atrox* por el método de Probits. Tesis, Facultad de Biología. Universidad Mayor de San Marcos, Lima.
- Meneses, O. 1974a. Los animales venenosos y sus peligros. Ministerio de Salud, Lima. 20 p.
- Meneses, O. 1974b. Ofidios y ofidismo en el Perú. I. Las serpientes venenosas del Perú. *Rev. Inst. Zoon. Invest. Pec.* 2: 69-77.
- Meneses, O. 1974c. Ofidios y ofidismo en el Perú. II. Aspectos ecológicos de la fauna ofídica ponzoñosa. *Rev. Inst. Zoon. Invest. Pec.* 2: 79-84.
- Olascoaga, M.E. 1987. Estudio del veneno de *Bothrops pictus*: bioquímica, toxicidad y neutralización y efectos biológicos. Tesis, Facultad de Biología. Universidad Nacional Agraria "La Molina", Lima. 68 p.
- Olascoaga, M.E., A. Zavaleta & N.A. Marsh. 1988. Preliminary studies of the effects of a Peruvian snake *Bothrops pictus* (jergón of the coast) venom upon fibrinogen. *Toxicon* 26: 501-504.
- Organización Panamericana de la Salud. 1977. *Manual de Procedimientos. Producción y Pruebas de Control en la Preparación de Antisueros Diftérico, Tetánico, Botulínico, Antivenenos y de la Gangrena Gaseosa*. Oficina Sanitaria Panamericana, Washington. 141 p.

- Pancorbo, M.Z. 1989. Evaluación del ofidismo experimental en ratones albinos mediante el método refractométrico. Tesis, Facultad de Biología. Universidad Particular Ricardo Palma, Lima. 46 p.
- Reed, L.H. & Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent end point. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.
- Russell, F.E. 1980. *Snake Venom Poisoning*. J.B. Lippincot, Filadelfia. 562 p.
- Siles-Villaruel, M., F. Zelante, R. Rolim-Rosa & J.L. De Lorenzo. 1981. Posibilidade de determinação da toxicidade do veneno de *Lachesis muta muta* e da titulação do antiveneno específico, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan* 44/45: 281-288.
- Trevors, J.T. 1986. A BASIC program for estimating LD₅₀ values using the IBM PC. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 37: 18-26.
- Villegas, L.F. 1990. Aspectos bioquímicos y farmacológicos de venenos de serpientes de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. Tesis, Facultad de Biología. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima. 41 p.
- World Health Organization. 1981. *Progress in the Characterization of Venoms and Standardization of Antivenoms*. WHO Offset Publication, Ginebra. 44 p.
- Yarlequé, A., E. Escobar & S. Campos. 1983. Exonucleasa y otras actividades nucleolíticas en los venenos de *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Acta Cient. Venez.* 34: 336-340.
- Zavaleta, A., M. Salas-Arruz, L.F. Villegas & J. Castillo. 1989. Estudio farmacológico del veneno de *Lachesis muta muta* shushupe, p. 17-94. In R. Castro de la Mata (ed.). *Premios 1988 Carlos Gutiérrez Noriega (Farmacología)*. Megaprint Ediciones, Lima.