

Bruno Lomonte V.

33

Patogénesis y neutralización de los efectos locales inducidos por veneno de la serpiente "terciopelo" (*Bothrops Asper*)

J. M. Gutiérrez*
L. Cerdas*
O. Arroyo*
E. Rojas*
B. Lomonte*
J. A. Gené*

SUMARIO

Se presenta la revisión de una serie de investigaciones sobre la patogénesis y neutralización de los efectos locales inducidos por el veneno de la serpiente "terciopelo". El cuadro local está constituido por mionecrosis, hemorragia y un proceso inflamatorio caracterizado por abundante infiltrado leucocitario y pronunciado edema. Además, hay otras alteraciones vasculares como angionecrosis y trombosis.

La necrosis de fibras musculares se desarrolla rápidamente después de inocular el veneno. En ratón, los análisis histológico y ultraestructural muestran una alta proporción de fibras necróticas tres horas después del envenenamiento, momento en el cual los niveles séricos de CPK alcanzan su máximo valor. El efecto hemorrágico también es de aparición inmediata, aunque alcanza su máxima intensidad entre seis y nueve horas posteriores a la inoculación. El desarrollo del cuadro inflamatorio local es rápido y drástico, lo mismo que el de las otras alteraciones vasculares mencionadas.

Los sueros antiofídicos polivalentes producidos en Costa Rica contienen anticuerpos capaces de neutralizar los efectos locales, siempre y cuando el suero y el veneno se incuben previo a la inoculación. Sin embargo, cuando el veneno se administra antes que el suero, los efectos locales sólo son neutralizados parcialmente. Esto sugiere que el

rápido desencadenamiento de dichos efectos al entrar el veneno a los tejidos dificulta su neutralización por los sueros antiofídicos.

El suero sanguíneo de la serpiente "zopilota" es capaz de neutralizar los efectos locales de la serpiente "terciopelo", cuando se incubaba con el veneno antes de la inoculación. No obstante, este suero es tóxico para el ratón, por lo que su potencial uso en el tratamiento de las mordeduras de serpiente no es posible en este momento.

INTRODUCCION

En Costa Rica, así como en el resto de los países centroamericanos, las especies de serpiente más importantes desde el punto de vista médico, se ubican taxonómicamente en el género *Bothrops* (27,31,17). Entre ellas, la que produce una mayor cantidad de accidentes es *Bothrops asper*, anteriormente denominada *Bothrops atrox*, la cual recibe diversos nombres comunes, tales como "terciopelo", "barba amarilla" y "rabo amarillo". En nuestro país, algunas investigaciones señalan que esta especie es responsable de alrededor del 85% de las mordeduras en las que se ha identificado la serpiente agresora (31,17).

El cuadro clínico que provoca el envene-

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

namiento a consecuencia de la mordedura de "terciopelo" es muy complejo y su patogenia se conoce sólo parcialmente. No obstante, se puede afirmar que se caracteriza por un marcado y casi inmediato efecto local y por una serie de fenómenos sistémicos entre los que se destacan las hemorragias, el choque cardiovascular, la insuficiencia renal, la hemólisis intravascular y las alteraciones en los mecanismos de la coagulación sanguínea (27,20,27,16).

Lo que se ha denominado efecto local es una compleja gama de fenómenos íntimamente relacionados, los cuales se desencadenan en los tejidos ubicados en la vecindad de la zona de la mordedura. Dicho efecto se caracteriza por la necrosis de los tejidos musculares, la hemorragia y un proceso inflamatorio intenso que incluye un pronunciado edema y un abundante infiltrado leucocitario (14,10). La consecuencia más seria de estos efectos locales es la necrosis tisular, con subsecuente pérdida de tejido, la cual puede alcanzar proporciones importantes en casos de mordeduras severas (17, 28). Dada la rápida aparición de estos efectos, y dado que el suero antiofídico usualmente se administra varias horas después de la mordedura, esta destrucción tisular es una secuela bastante común de los accidentes por "terciopelo".

El objetivo del presente trabajo es exponer y discutir los resultados de una serie de investigaciones desarrolladas para estudiar la patogenia y la neutralización de los efectos locales (mionecrosis, hemorragia y edema) inducidos por el veneno de *Bothrops asper*.

El efecto mionecrótico:

Uno de los componentes más conspicuos del efecto local es el desencadenamiento de necrosis de las fibras musculares. Este fenómeno mionecrótico se inicia menos de una hora después del envenenamiento experimental en ratón e histológicamente se caracteriza por la presencia de fibras musculares necróticas de aspecto principalmente miolítico, es decir, con una clara lisis del material intracelular. Asimismo, son evidentes fibras necróticas de aspecto coagulativo, que contienen un material intracelular hialino y homogéneo, con pérdida de la estriación normal (8).

Pese a que la mionecrosis es evidente una

hora después de inoculado el veneno en ratones, la necrosis más intensa, a nivel histológico, se observa a partir de las tres horas (7,8). Las muestras histológicas tomadas una semana después de la inoculación muestran un cuadro regenerativo claro, con presencia de fibras en regeneración y células inflamatorias mononucleares (8).

Para conocer en mayor detalle la patogenia de este efecto mionecrótico, se ha efectuado un estudio ultraestructural con el microscopio electrónico de transmisión (2). Se tomaron muestras de tejido muscular de ratón 1 y 3 horas después de la inoculación de 50 μ g de veneno de "terciopelo" y se observaron tres tipos de fibras musculares: (a) células con una morfología ultraestructural normal, (b) fibras que mostraron una alteración no muy severa a nivel de retículo sarcoplásmico, el cual presentó dilatación y vacuolización moderadas, y (c) fibras con una alteración severa en las diferentes organelas; las miofibrillas perdieron su arreglo normal y los miofilamentos precipitaron en una masa amorfa de proteínas; el retículo sarcoplásmico sufrió vacuolización y fragmentación evidentes; la membrana plasmática se apreció destruida y discontinua en algunos puntos y algunas mitocondrias se observaron hinchadas, en tanto que otras perdieron su integridad estructural. Este estudio corroboró el hecho de que la mionecrosis inducida por el veneno de "terciopelo" es un fenómeno rápido y drástico, que en término de tres horas alcanza una gran intensidad.

Uno de los problemas que ha dificultado el estudio de la mionecrosis inducida por venenos es la ausencia de un método que permita cuantificar la magnitud de la necrosis (23). En nuestro laboratorio se efectuó un proyecto tendiente a estudiar la posibilidad de utilizar la determinación de los niveles séricos de la enzima creatina fosfoquinasa (CPK) como índice cuantitativo de dicha mionecrosis (8). En este estudio se observó que, en las condiciones experimentales empleadas, las muestras de corazón y cerebro no presentaron alteraciones severas a nivel histológico, en tanto que las fibras del músculo esquelético alrededor del sitio de la inoculación se apreciaron notablemente afectadas, tal y como se describió anteriormente. Con base en lo anterior, se concluyó que la rápida y pronunciada elevación de la

CPK en suero es un reflejo de la necrosis de músculo esquelético y, por lo tanto, puede utilizarse como índice cuantitativo de dicho proceso patológico. El uso potencial de la determinación de CPK en el campo de los venenos tiene dos implicaciones importantes: (a) a nivel de patología experimental, es un instrumento cuantitativo en la evaluación de la magnitud de la necrosis y en el estudio de la capacidad neutralizante de los sueros antiofídicos; y, (b) podría eventualmente utilizarse en la práctica hospitalaria como técnica de laboratorio para evaluar la intensidad de la necrosis e, indirectamente, para estimar la severidad del envenenamiento en general, colaborando de esta forma en el diseño de un adecuado tratamiento. Resulta interesante destacar que un grupo de investigadores japoneses ha propuesto recientemente el uso de la determinación de la CPK como índice cuantitativo del volumen de veneno inoculado a las víctimas de accidentes ofídicos (22).

El modo exacto de acción de las toxinas mionecróticas del veneno de "terciopelo" se desconoce. Estudios preliminares no publicados indican que en este veneno existen al menos tres diferentes componentes que provocan mionecrosis. Pese a la ausencia de investigaciones con toxinas purificadas, parece razonable proponer que algunas toxinas mionecróticas podrían actuar directamente en la membrana plasmática de las células musculares, alterando severamente el control que dicha membrana posee sobre la permeabilidad de diferentes sustancias. Lo anterior traería como consecuencia un desequilibrio en el ambiente intracelular que culminaría con la muerte de la fibra muscular. Una de las implicaciones más importantes de esta alteración en la permeabilidad de la membrana celular sería el aumento de la concentración del ion Calcio en el interior de las células. Varias hipótesis han sido propuestas en las cuales se le confiere al ion Calcio un rol fundamental en los procesos de muerte celular en músculo esquelético y cardíaco (6,32,5). Aparentemente, el aumento en la concentración intracelular de Calcio activa una serie de proteasas y fosfolipasas que pueden desencadenar la muerte celular. La temprana liberación de CPK al torrente circulatorio, observada en nuestros estudios experimen-

tales en ratones, es una evidencia de esta posible alteración en la permeabilidad de la membrana plasmática. Sin embargo, las ideas anteriores permanecen en el plano hipotético hasta que no se tengan datos experimentales más concluyentes al respecto.

En algunas oportunidades se ha propuesto que la necrosis muscular local es consecuencia de la intensa compresión tisular originada a partir de los procesos inflamatorio y edematizante que provoca el veneno de "terciopelo". Sin embargo, el hecho de que es posible aislar de los venenos toxinas puras capaces de inducir mionecrosis por sí mismas, sin provocar edema, es una clara demostración de que la compresión tisular puede constituir un factor que contribuye al cuadro mionecrótico local, pero no es su causa principal.

El efecto hemorrágico:

La hemorragia local y sistémica es uno de los efectos más consistentes y evidentes en el envenenamiento por "terciopelo". Dicho cuadro ha sido ampliamente descrito en trabajos de tipo clínico, así como de patología experimental (27,20,17,30,8).

En estudios efectuados en ratones, el fenómeno hemorrágico local aparece pocos minutos después de la inoculación de veneno de "terciopelo"; no obstante, el mismo adquiere su mayor intensidad 6 horas después (8).

Aunque la patogenia del efecto hemorrágico inducido por el veneno de "terciopelo" no ha sido investigada a profundidad, algunos estudios efectuados con otros venenos pueden sugerir posibles modos de acción de las toxinas hemorrágicas. Merecen la atención principalmente los estudios desarrollados con los venenos de las especies *Trimeresurus flavoviridis* (29) y *Crotalus atrox* (25,24), ya que estas serpientes tienen una posición filogenética cercana con la "terciopelo". En el caso del veneno de *T. flavoviridis*, las toxinas hemorrágicas afectan directamente la sustancia intercelular que separa las células endoteliales en el lecho capilar; este mecanismo se ha denominado hemorragia por diapedesis, ya que los eritrocitos abandonan el torrente circulatorio atravesando los orificios que quedan entre las células endoteliales. En cambio, los componentes hemorrágicos del veneno de *C. atrox* atacan y lesionan directamente las

células endoteliales de los vasos capilares, sin que se haya descrito una acción sobre la sustancia intercelular. Este segundo veneno origina una hemorragia por rexis, en la cual los eritrocitos se extravasan atravesando los orificios que quedan al ser destruidas las células del endotelio. Es posible que ambos mecanismos jueguen un rol en la patogenia del efecto hemorrágico y que la importancia relativa de uno u otro varíe de acuerdo al veneno.

Cabe mencionar, además, el hecho de que el veneno de "terciopelo" provoca otras alteraciones vasculares en ratón, siendo las más evidentes la angioneurosis y la trombosis (14,7). Dado que dichos fenómenos se aprecian con claridad cerca del sitio anatómico de la mordedura, ellos son componentes de lo que hemos denominado efectos locales.

El edema y el fenómeno inflamatorio:

El desarrollo de un proceso inflamatorio agudo en el sitio de la mordedura es otra de las características típicas del envenenamiento por "terciopelo". Pese a que la patogenia del mismo no se conoce en sus detalles, en dicho cuadro se dan dos fenómenos principales: (a) Histológicamente, se observa un abundante infiltrado leucocitario compuesto en las primeras 24 horas por polimorfonucleares neutrófilos (7). La composición celular del infiltrado inflamatorio varía una semana después del envenenamiento en ratones, cuando está formado principalmente por macrófagos y otras células mononucleares. En los estudios experimentales efectuados, el infiltrado inflamatorio alcanza su máxima intensidad entre las 9 y las 24 horas posteriores a la inoculación de veneno de "terciopelo" (8). (b) Aparece, muy rápidamente, un intenso edema que en el ratón alcanza valores significativos desde la primera hora y se mantiene por varios días, llegando a su máximo valor a las 24 horas (8). En la patogénesis de dicho edema pueden participar directamente componentes del veneno que afecten la permeabilidad capilar y que induzcan una exudación de material plasmático. Además, el edema puede ser provocado de manera indirecta por el veneno, en el sentido de que es parte de la respuesta inflamatoria de los tejidos al envenenamiento. En este caso, podría estar mediado por meca-

nismos autofarmacológicos relacionados con la liberación de histamina y bradikina.

Variaciones geográficas y de acuerdo a la edad del ejemplar:

Jiménez-Porras (1964) demostró claramente que los venenos obtenidos de ejemplares individuales de "terciopelo", procedentes de diferentes regiones del territorio costarricense, varían en su composición bioquímica. Por otra parte, Aragón y Gubensek (1979) también demostraron una diferenciación de tipo bioquímico entre los venenos de ejemplares de "terciopelo" de la región Atlántica en relación con los del Pacífico. Más recientemente, Gutiérrez et al. (1980) observaron que los venenos de ejemplares adultos y recién nacidos de esta especie presentan propiedades inmunológicas y toxicológicas distintas. En lo relativo a los efectos locales en ratón, los venenos de ejemplares recién nacidos son más hemorrágicos y más edematizantes, en tanto que los venenos de ejemplares adultos producen una miocrosis de mayor intensidad, con una más pronunciada elevación de los niveles séricos de CPK. Es de destacar que, pese a las diferencias, el suero antiofídico polivalente neutraliza el efecto letal de ambos tipos de veneno con título similar.

De estos estudios se concluye que el cuadro local resultante de una mordedura de "terciopelo" varía de un caso a otro, siendo imposible predecir la magnitud del daño. Dicha variación se origina por la diferente cantidad de veneno inoculado (que no siempre guarda una relación directamente proporcional al tamaño del ofidio), por el sitio anatómico de la mordedura, por la procedencia geográfica del espécimen y por la edad de la serpiente.

La neutralización de los efectos locales del veneno de "terciopelo":

a) *Neutralización por los sueros hiperinmunes polivalentes:* Durante muchos años se ha desarrollado una polémica a nivel internacional con respecto a si los sueros antiofídicos o antivenenos neutralizan o no los efectos locales inducidos por mordedura de serpiente. En general, estudios efectuados en otros países han llegado a la conclusión de que los antivenenos no son capaces de neutralizar en su totalidad la hemorragia y

la mionecrosis (21,13,19,26).

En el Instituto Clodomiro Picado hemos efectuado varios estudios tendientes a analizar la capacidad neutralizante que posee el suero polivalente producido en nuestros laboratorios sobre los efectos locales inducidos por el veneno de "terciopelo" en ratón (11,12). Para ello se han llevado a cabo dos tipos de experimentos: (1) experimentos en los cuales se incubaba el veneno junto con el suero en un tubo de ensayo por un período de 30 minutos, inoculándose luego la mezcla en los animales de laboratorio y (2) experimentos en los cuales se ha tratado de reproducir la secuencia natural de una mordedura de serpiente, es decir, con inoculación inicial del veneno y administración posterior del suero antiofídico. Las conclusiones de estos estudios se pueden resumir de la siguiente manera: Primero, cuando el suero polivalente, ya sea éste producido en caballos o en ovejas, se incubaba previamente con el veneno de "terciopelo", los efectos locales (mionecrosis, hemorragia y edema) son neutralizados. No obstante, el volumen de suero necesario para neutralizar cada uno de los efectos es diferente, siendo más efectiva la neutralización de la actividad hemorrágica; en cambio, para neutralizar el edema y la mionecrosis se requiere una mayor proporción de suero. La conclusión principal es que, en este tipo de experimentos, nuestros sueros polivalentes son capaces de neutralizar los efectos locales que produce el veneno de "terciopelo". En segundo lugar, cuando el veneno de "terciopelo" se inocula en ratones y el suero polivalente se administra después, los resultados son diferentes. En estas circunstancias, los efectos edematizante y mionecrótico sólo son neutralizados parcialmente, aún en el caso de que el antiveneno se administre inmediatamente después del veneno. El fenómeno hemorrágico es mucho mejor neutralizado, siempre y cuando el suero sea inyectado inmediatamente después del envenenamiento. Sin embargo, si el suero se administra al ratón 30 minutos después del veneno, la neutralización de los tres efectos es mínima. Finalmente, se observó que, en ratón, el efecto neutralizante del suero varía de acuerdo a la vía de administración del mismo. Los mejores resultados se obtuvieron empleando la vía endovenosa; en lo referente a la vía intra-

muscular, se observó una mayor neutralización si el antiveneno se administra en la vecindad del sitio de la mordedura.

El suero antiofídico polivalente producido en el Instituto Clodomiro Picado neutraliza el efecto letal de los venenos de serpientes costarricenses ubicadas en la familia Viperidae (3,4). Sin embargo, los resultados anteriormente expuestos nos permiten concluir que dichos sueros neutralizan sólo parcialmente los efectos locales inducidos por el veneno de "terciopelo". La causa de ello no es la ausencia de antitoxinas en dichos sueros, sino que el origen de esa débil neutralización se encuentra principalmente en la forma rápida y drástica en que se desencadenan los citados efectos una vez que el veneno ha sido inoculado. Como fue mencionado, los fenómenos mionecrótico, edematizante y hemorrágico son muy pronunciados una hora después del envenenamiento experimental en ratones, lo que indica que los mismos se desencadenan pocos minutos después de la mordedura. Ello nos permite proponer que, cuando las antitoxinas presentes en el suero polivalente llegan a los tejidos afectados, ya se han iniciado los efectos locales y la neutralización de los mismos se dificulta considerablemente.

b) *Neutralización por el suero de la serpiente "zopilota" (Clelia clelia)*: La serpiente *Clelia clelia*, conocida como "zopilota", presenta hábitos ofiófagos, esto es, se alimenta de serpientes. Debido a ello, es frecuentemente mordida por las serpientes venenosas de las que se alimenta; sin embargo, presenta una resistencia natural contra dichos venenos. En nuestros laboratorios se han efectuado inoculaciones de veneno de las principales serpientes de Costa Rica en la "zopilota", y ésta ha sido resistente a todos ellos (Cerdas y Lomonte, resultados no publicados). Lo anterior sirvió de base para una investigación en la que se estudió la capacidad neutralizante que el suero de dicha serpiente tiene sobre los efectos locales del veneno de "terciopelo" (18). Los resultados de la misma señalan que efectivamente el suero sanguíneo de *Clelia clelia* es capaz de neutralizar los tres efectos locales mencionados, cuando se incubaba con el veneno antes de la inoculación en ratones. No obstante, también se observó que el

siero de la "zopilota" es tóxico para el ratón, produciendo a nivel local pronunciada necrosis tisular y edema. Lo anterior parece excluir la posibilidad del empleo de dicho suero sin detoxificar para tratamiento. A pesar de esto, el estudio del mecanismo de acción del suero sanguíneo de "zopilota" puede ser de mucha utilidad en el desarrollo de una más adecuada comprensión de la patogenia y neutralización de los efectos locales inducidos por el veneno de la serpiente "terciopelo".

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a todo el personal del Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica por su valiosa colaboración en los diferentes proyectos efectuados. Estas investigaciones han sido financiadas por la Universidad de Costa Rica y por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica.

BIBLIOGRAFIA

1. Aragón, F. y Gubensek, F. *Bothrops asper* Venom from the Atlantic and Pacific Coasts of Costa Rica. *Toxicon* 17 (Supl. 1): 3, 1979.
2. Arroyo, O. y Gutiérrez, J.M. Ultraestructura del efecto mionecrótico inducido por el veneno de *Bothrops asper* de Costa Rica en ratón blanco. *Toxicon*, 19: 733-782, 1981.
3. Bolaños, R. Nuevos Recursos Contra el Ofidismo en Centroamérica. 29 edición. Ministerio de Salubridad Pública y Universidad de Costa Rica, San José, 29 pp. 1971.
4. Bolaños, R. y Cerdas, L. The Production and Control of Anti-Venoms Sera. En: 15th. IABS Congress: Vaccinations in the Developing Countries. La Guadaloupe. Develop. Biol. Standard. vol 41: 109-114, 1978.
5. Chien, K.R., Pfau, R.G. y Farber, J.L. Ischemic Myocardial Cell Injury. Prevention by Chlorpromazine of an Accelerated Phospholipid Degradation and Associated Membrane Dysfunction. *Am. J. Pathol.* 97: 505-530, 1979.
6. Duncan, C.J. Role of Intracellular Calcium in Promoting Muscle Damage: A Strategy for Controlling the Dystrophic Condition. *Experientia*. 34: 1531-1535, 1978.
7. Gutiérrez, J.M. y Chaves, F. Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. *Toxicon* 18: 315-321, 1980.
8. Gutiérrez, J.M., Arroyo, O. y Bolaños, R. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon* 18: 603-610, 1980.
9. Gutiérrez, J.M., Chaves, F. y Bolaños, R. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Rev. Biol. Trop.* 28: 341-351, 1980.
10. Gutiérrez, J.M. y Bolaños, R. El problema de los efectos hemorrágico y mionecrótico por mordedura de serpiente en las Américas. *Bol. Of. San. Pan.* 89: 149-157, 1980.
11. Gutiérrez, J.M., Chaves, F., Bolaños, R., Cerdas, L., Rojas, E., Arroyo, O. y Portilla, E. Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. *Toxicon* 19: 493-500, 1981.
12. Gutiérrez, J.M., Cerdas, L., Arroyo, O. y Rojas, E. Neutralization of Hemorrhagic, Myonecrotic, and Edema-forming Effects of *Bothrops asper* Venom by Sheep Polyvalent Antivenin. Sometime a publicación en *Toxicon*, 1981.
13. Homma, M. y Tu, A.T. Antivenin for the Treatment of Local Tissue Damage Due to Envenomation by Southeast Asian Snakes. Ineffectiveness in the Prevention of Local Tissue Damage in Mice after Envenomation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19: 880-884, 1970.
14. Homma, M. y Tu, A.T. Morphology of Local Tissue Damage in Experimental Snake Envenomation. *Br. J. Exp. Pathol.* 52: 538-542, 1971.
15. Jiménez-Porras, J.M. Venom Proteins of the Fer-de-Lance, *Bothrops atrox*, from Costa Rica. *Toxicon* 2: 155-166, 1964.
16. Jiménez-Porras, J.M. Reptile Toxins. En: *Biology Data Book*, 2nd edition, Vol II, p.697. Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB), 1973.
17. Jiménez, E. y García, I. Análisis de 86 casos de ofidismo en niños. *Rev. Med. Hosp. Nal. Niños* 4: 91-99, 1969.
18. Lomonté, B., Cerdas, L., Gené, J.A. y Gutiérrez, J.M. Neutralization of Local Effects of the Terciopelo (*Bothrops asper*) Venom by the Serum of *Clelia clelia*. *Toxicon*, 20: 571, 1982.
Cambio de título.
19. McCollough, N.C. y Gennaro, J.F. Treatment of Venomous Snakebite in the United States. *Clin. Toxicol.* 3: 483-500, 1970.
20. Mekbel, S.T. y Céspedes, R. Las lesiones renales en el ofidismo. *Acta Méd. Cost.* 6: 111-118, 1963.
21. Minton, S. Polyvalent Antivenin in the Treatment of Experimental Snake Venom Poisoning. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 3: 1077-1082, 1954.
22. Nakada, F., Uezu, N., Ohshiro, M. y Miyagi,

- K. Relation Between Serum Creatine Phosphokinase Activity and the Amount of Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) Snake Venom Injected in Thigh Muscle in Rabbits. *Toxicon* 18: 351-355 (1980).
23. Ohsaka, A. Hemorrhagic, Necrotizing, and Edema-forming Effects of Snake Venoms. En: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol 52, Snake Venoms (Lee, C.Y., Ed.). Springer Verlag, Berlin, p. 480. 1979.
 24. Ownby, C.L., Bjarnason, J. y Tu, A.T. Hemorrhagic Toxins from Rattlesnake (*Crotalus atrox*) Venom. Pathogenesis of Hemorrhage Induced by Three Purified Toxins. *Am. J. Pathol.* 93: 201-218, 1978.
 25. Ownby, C.L., Kainer, R.A. y Tu, A.T. Pathogenesis of Hemorrhage Induced by Rattlesnake Venom: An Electron Microscopic Study. *Am. J. Pathol.* 76: 401-414, 1974.
 26. Ownby, C.L., Odell, G.V. y Colberg, T.R. Pre-injection Neutralization of Rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) Venom with Antivenin. Sometido a la publicación en *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1981.
 27. Picado, C. Serpientes venenosas de Costa Rica. *Sus venenos. Seroterapia antiofídica*. Imprenta Alsina, San José, 219 pp., 1931.
 28. Rosenfeld, G. Symptomatology, Pathology, and Treatment of Snake Bites in South America. En: *Venomous Animals and Their Venoms*. Vol II. *Venomous Vertebrates* (Bücherl, W. y Buckley, E., Eds.). New York. Academic Press, p. 345, 1971.
 29. Tsuchiya, M., Ohshio, C., Ohashi, M., Ohsaka, A., Suzuki, K. y Fujishiro, Y. Cinematographic and Electron Microscopic Analyses of the Hemorrhage Induced by the Main Hemorrhagic Principle, HR 1, Isolated from the Venom of *Trimeresurus flavoviridis*. En: *Platelets, Thrombosis, and Inhibitors* (Didisheim, P., Shimamoto, T. y Yamazaki, H., Eds.). Stuttgart: Verlag, pp. 439-446, 1974.
 30. Tu, A.T. y Homma, M. Toxicologic Study of Snake Venoms from Costa Rica. *Toxic. Appl. Pharmac.* 160: 73-78, 1970.
 31. Vallejo-Freire, A. Informe sobre las condiciones para la elaboración de sueros antiofídicos y programas correlativos en Costa Rica. *Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana*. 1967.
 32. Wrogemann, K. y Pena, S.D.J. Mitochondrial Calcium Overload: A General Mechanism for Cell-necrosis in Muscle Diseases. *Lancet* iii: 672-674. 1976.