

Neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas de cuatro venenos de serpientes de Guatemala y Honduras por el antiveneno polivalente producido en Costa Rica

Gustavo Rojas, José María Gutiérrez, José A. Gené, Maribel Gómez y Luis Cerdas
Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José Costa Rica.

(Recibido el 15 de abril de 1986)

Abstract: We studied the ability of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica to neutralize lethal, hemorrhagic, edema-forming, proteolytic, hemolytic, hyaluronidase and fibrinolytic activities of the venoms of *Bothrops asper* and *B. nummifer* from Honduras, and of *Agkistrodon bilineatus* and *Crotalus durissus durissus* from Guatemala. Neutralizing ability of antivenom was expressed as ED₅₀ (effective dose 50%), defined as the antivenom/venom ratio at which the activity of the venom is reduced 50%. Antivenom is highly effective in the neutralization of lethal, hemorrhagic, hemolytic, hyaluronidase, and caseinolytic activities of *B. asper*, *B. nummifer*, and *C. d. durissus* venoms. In the case of *B. nummifer* venom, neutralization of fibrinolytic effect was only partial, whereas this activity was adequately neutralized when studying the venoms of *B. asper* and *C. d. durissus*. The venom of *A. bilineatus* was adequately neutralized by the antivenom, with the only exception of hemolytic effect that was reduced only partially. However, in quantitative terms, a relatively large volume of antivenom was required to neutralize some effects induced by *A. bilineatus* venom. Regarding edema-forming activity, antivenom neutralized efficiently the venoms of *B. asper* and *A. bilineatus*, whereas that of *B. nummifer* was neutralized only partially; on the other hand, edema induced by the venom of *C. d. durissus* was not neutralized at all. Immunochemical results indicate a close immunological relationship between venoms of *B. asper*, *B. nummifer* and *C. d. durissus* collected in Honduras and Guatemala with those of the same species collected in Costa Rica. Interspecies comparison, however, showed variation between venoms obtained from different species. It is concluded that, with the exception of edema-forming activity of *C. d. durissus* and *B. nummifer* venoms, the polyvalent antivenom produced in Costa Rica is effective in neutralizing the venoms of these four species of crotaline snakes.

Desde 1967 se produce en Costa Rica un antiveneno polivalente efectivo en el tratamiento de mordeduras de serpientes de la familia Viperidae (Bolaños, 1971). Este antiveneno se prepara en caballos y ovejas inmunizados con una mezcla de los venenos de *Bothrops asper* (terciopelo), *Crotalus durissus durissus* (cascabel) y *Lachesis muta* (cascabela muda) (Bolaños y Cerdas, 1980). Se ha demostrado que este antiveneno es eficaz en la neutralización del efecto letal, así como de otras actividades tóxicas y enzimáticas, de los venenos de serpientes costarricenses de la familia Viperidae (Bolaños y Cerdas, 1980; Gutiérrez *et al.*, 1981; Gutiérrez *et al.*, 1985; Gené *et al.*, 1985). En la actualidad, y con una frecuencia cada vez mayor, este antiveneno se está distribuyendo a otros

países centroamericanos; sin embargo, el hecho de que existen variaciones importantes en las características bioquímicas y farmacológicas de venenos de ejemplares de una misma especie provenientes de regiones geográficas diferentes (Jiménez-Porras, 1964a, 1964b), plantea la necesidad de investigar si este antiveneno es realmente eficaz en la neutralización de actividades tóxicas de venenos de serpientes provenientes de otros países centroamericanos. En el presente trabajo se estudia la capacidad de este antiveneno polivalente para neutralizar efectos tóxicos y enzimáticos de los venenos de *Agkistrodon bilineatus* y *Crotalus durissus durissus* de Guatemala y de *Bothrops asper* y *Bothrops nummifer* de Honduras.

MATERIAL Y METODOS

Venenos: Los venenos de *Agkistrodon bilineatus* (Guatemala), *Bothrops asper* (Honduras) y *Bothrops nummifer* (Honduras) se obtuvieron de ejemplares mantenidos en el serpentario del Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica. Todas las serpientes eran adultas, efectuándose varias extracciones de veneno a cada una de ellas. Una vez obtenido, el veneno se congeló se liofilizó y se conservó a -40 C hasta su uso. El veneno de *Crotalus durissus durissus* provino de Guatemala.

Antivenenos: Se utilizó el antiveneno polivalente (lote # 145) producido en el Instituto Clodomiro Picado. Este antiveneno se prepara a partir de plasma sanguíneo de caballos inmunizados con una mezcla de partes iguales de los venenos de *Bothrops asper*, *Crotalus durissus durissus* y *Lachesis muta* obtenidos de ejemplares recolectados en Costa Rica. Los detalles del proceso de inmunización y del control de calidad del antiveneno han sido descritos previamente (Bolaños y Cerdas, 1980).

Diseño experimental: Para cada una de las actividades estudiadas se efectuó un estudio de la relación dosis-respuesta con cada veneno. Lo anterior permitió obtener la "dosis mínima" necesaria para inducir un efecto particular. Luego, se incubó un número determinado de dosis mínima de venenos con diferentes volúmenes de antiveneno uniformándose el volumen de la mezcla con solución salina amortiguada con fosfatos, pH 7.2. Se incubó las mezclas de antiveneno y veneno a 37 C durante 30 minutos, al cabo de los cuales se estudió su actividad empleando los mismos métodos utilizados en el estudio de la relación dosis-respuesta. Se expresó los resultados de los experimentos de neutralización en porcentaje, tomando como 100% la actividad de la solución en la que el veneno se incubó sin antiveneno. La capacidad neutralizante se expresó como la DE_{50} (Dosis efectiva 50%), definida como la razón antiveneno/veneno en la cual se reduce en un 50% el efecto inducido por el veneno. Esta metodología se empleó en el estudio de todos los efectos, con excepción del edema, en cuya determinación se evitó la incubación previa de veneno y antiveneno. Se efectuó todos los experimentos un mínimo de tres veces.

Letalidad: La determinación de la dosis letal 50% (DL_{50}) y la de la neutralización del efecto letal (DE_{50}), se efectuaron utilizando la vía intraperitoneal en ratones blancos de 16-18 gramos de peso. Se analizó los datos empleando el método de Spearman-Kärber (WHO, 1981). En el estudio de la neutralización del efecto letal se empleó una dosis de reto de cuatro DL_{50} . Se observó la letalidad durante un período de 48 horas posteriores a la inoculación.

Hemorragia: Se utilizó el método de Kondo *et al.* (1960) con las modificaciones de Gutiérrez *et al.* (1985). La dosis hemorrágica mínima se definió como la cantidad de veneno que induce un área hemorrágica de 10 mm de diámetro dos horas después de la inoculación. En los estudios de neutralización se utilizó una dosis de reto de veneno correspondiente a 10 dosis hemorrágicas mínimas.

Edema: Se utilizó el método de Yamakawa *et al.* (1976), modificado por Gutiérrez *et al.* (1986). La dosis edematizante mínima se definió como la cantidad de veneno que produce un edema del 30% seis horas después de la inoculación. Se omitió el desarrollo de experimentos que involucrarán incubación de veneno y antiveneno previo a la inoculación, debido a que se ha demostrado que el veneno libera sustancias farmacológicamente activas a partir de precursores presentes en el antiveneno; estas sustancias son edematígenas y, por ende, dificultan el estudio de la capacidad neutralizante del antiveneno (Gutiérrez *et al.*, 1986). Como método alternativo, a los ratones se les administró el antiveneno por la vía intravenosa y cinco minutos más tarde se inoculó una dosis de veneno correspondiente a seis dosis edematizantes mínimas en la almohadilla plantar (Gutiérrez *et al.*, 1986). El edema se evaluó seis horas después de la inyección del veneno.

Proteólisis: Se utilizó la caseína como sustrato (Lomonte y Gutiérrez, 1983; Gutiérrez *et al.*, 1985). La dosis proteolítica mínima se definió como la cantidad de veneno que induce un cambio de 0.5 en la absorbancia a 280 nm, después de 30 min de incubación a 37 C. En los experimentos de neutralización, se empleó una dosis de reto de veneno correspondiente a una dosis proteolítica mínima (Gutiérrez *et al.*, 1985).

Hemólisis indirecta: Se utilizó el método empleado por Gené *et al.* (1985). La dosis hemolítica mínima se definió como la cantidad de veneno que induce una hemólisis del 70%. En los experimentos de neutralización se empleó una dosis de reto de veneno correspondiente a dos dosis hemolíticas mínimas.

Hialuronidasa: Se utilizó la técnica de Xu *et al.* (1982), modificada por Gené *et al.* (1985), empleando ácido hialurónico (Sigma) como sustrato. La dosis hialuronidasa mínima se definió como la cantidad de veneno que hidroliza el 70% del ácido hialurónico. En los experimentos de neutralización se usó una dosis de reto de veneno correspondiente a una dosis hialuronidasa mínima.

Fibrinólisis: La actividad fibrinolítica se estudió utilizando una técnica de placa modificada, en la cual se trabaja con un coágulo de fibrina obtenido a partir de una mezcla de plasma de cinco carneros, empleando citrato de sodio al 4% como anticoagulante. El plasma citratado fue diluido con un amortiguador de Tris 0.05 M, sulfato de amonio, 0.07 M, Cloruro de sodio, 0.09 M, Cloruro de magnesio, 0.69 mM, pH 7.5. Se transfirió 22 ml de la solución de plasma diluido a placas de plástico (13 x 8 cm) de la casa Hyland; posteriormente se adicionó 3 ml de CaCl₂ 0.25 M, mezclándose y dejándose la placa en reposo durante una hora a 37 C con el fin de obtener un coágulo consistente. Se abrieron orificios de 2mm de diámetro, manteniendo una distancia de 1.5 cm entre uno y otro y se adicionó 30 ul de la muestra. Por último, se incubó la placa durante 18 horas a 37 C. La dosis fibrinolítica mínima se definió como la cantidad de veneno que induce un área de fibrinólisis de 12 mm de diámetro. En los estudios de neutralización se empleó una dosis de reto correspondiente a una dosis fibrinolítica mínima.

Inmunodifusión e inmunoelectroforesis: Se efectuó una comparación inmunoquímica de estos cuatro venenos entre sí, así como entre ellos y los de ejemplares de las mismas especies recolectados en Costa Rica. Se utilizó la técnica de doble difusión en geles de agarosa al 1% (Ouchterlony y Nilsson, 1978), enfrentándose los venenos con antiveneno polivalente. Se disolvió las muestras de veneno en solución salina amortiguada, pH 7.2, a una concentración de

10 mg/ml. Se llenó los orificios con 20 ul de muestra. Luego de 24 horas de difusión en cámara húmeda, se lavó los geles con solución salina y agua destilada y se les tiñó con negro de almidón o colorante Ponceau-S. Además, se efectuó inmunoelectroforesis de los venenos contra antiveneno polivalente en geles de agarosa al 1% en amortiguador de barbituratos, pH 8.2 (Ouchterlony y Nilsson, 1978). Una vez concluida la corrida electroforética, se abrió un canal en el centro del gel, llenándose con antiveneno polivalente y se dejó difundir durante 24 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Se lavó los geles con solución salina y agua destilada y fueron teñidos con colorante Ponceau-S.

RESULTADOS

En los cuadros 1, 2, 3, 4, 5, y 6, así como en la figura 1, se resume los resultados relativos a las actividades tóxicas y enzimáticas de cada veneno, así como a su neutralización por el antiveneno. El veneno de *Agkistrodon bilineatus* presentó una actividad proteolítica muy débil sobre la caseína, de manera que en este caso no se estudió la neutralización por el antiveneno. Por otra parte, este veneno resultó ser altamente hemorrágico, edematizante y letal; en términos cuantitativos, el veneno de *A. bilineatus* es casi diez veces más hemorrágico y edematizante que el veneno de *Bothrops asper* (cuadro 2).

Los cuadros muestran que el antiveneno fue altamente efectivo en la neutralización de las actividades letal, hemorrágica, hemolítica indirecta, hialuronidasa y caseinolítica de los venenos de *Bothrops asper*, *B. nummifer*, y *C. durissus durissus*; en el caso del veneno de *B. nummifer*, la neutralización del efecto fibrinolítico fue sólo parcial, en tanto que el antiveneno neutralizó adecuadamente esta actividad en los venenos de *B. asper* y *C. d. durissus*. Por su parte, el veneno de *Agkistrodon bilineatus* fue neutralizado totalmente por el antiveneno, con la excepción del efecto hemolítico indirecto cuya neutralización fue sólo parcial. En el estudio de ciertos efectos se necesitó, en términos cuantitativos, un mayor volumen de antiveneno para neutralizar el veneno de *A. bilineatus*; sin embargo, eventualmente se llegó a una dosis de antiveneno que neutralizó las actividades de este veneno. En lo que respecta al efecto edematizante, el antiveneno polivalente fue eficaz en la neutralización de los venenos de *B. asper* y *A.*

CUADRO 1

Efecto letal de los venenos y su neutralización por el antiveneno polivalente

Veneno	Dosis letal 50 % ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)*	Neutralización (DE_{50}) (μl antiveneno/mg veneno)**
<i>Crotalus durissus durissus</i> (Guatemala)	16	917
<i>Agkistrodon bilineatus</i> (Guatemala)	22	1075
<i>Bothrops asper</i> (Honduras)	64	333
<i>Bothrops nummifer</i> (Honduras)	128	769

* El veneno se inoculó por la vía intraperitoneal y se observó las muertes durante 48 horas.

** Razón antiveneno/veneno en la que se protege al 50% de la población de ratones inoculados.

CUADRO 2

Efecto hemorrágico de los venenos y su neutralización por el antiveneno polivalente

Veneno	Dosis hemorrágica mínima (μg)*	Neutralización (DE_{40}) (μl antiveneno/mg veneno)**
<i>Crotalus durissus durissus</i> (Guatemala)	7.5	350
<i>Agkistrodon bilineatus</i> (Guatemala)	0.25	2650
<i>Bothrops asper</i> (Honduras)	6	57
<i>Bothrops nummifer</i> (Honduras)	18	157

* Cantidad de veneno que induce un área hemorrágica de 10 mm de diámetro 2 horas después de la inoculación.

** Razón antiveneno/veneno en la que el efecto hemorrágico es reducido en un 50%.

bilineatus. (Fig. 1). Por otra parte, la neutralización del edema inducido por el veneno de *B. nummifer* fue sólo parcial, en tanto que el veneno de *C. d. durissus* no fue neutralizado del todo en lo que respecta a edema (Fig. 1).

Los resultados de las inmunodifusiones demostraron una identidad inmunológica en todas las bandas de precipitación cuando los venenos de *B. asper* (Honduras), *B. nummifer* (Honduras) y *C. d. durissus* (Guatemala) fueron comparados con los de las mismas especies pro-

cedentes de Costa Rica. Sin embargo, cuando se efectuó una comparación interespecífica utilizando la misma técnica, se observó que algunas bandas de precipitación mostraban identidad total, en tanto que otras no presentaron identidad. El análisis inmunoelectroforético reveló una gran similitud entre estos venenos y los de las mismas especies recolectados en Costa Rica. No obstante, cuando se comparó las diferentes especies entre sí, hubo claras divergencias. El veneno de *A. bilineatus* formó una cantidad

CUADRO 3

Efecto hemolítico indirecto de los venenos y su neutralización por el antiveneno polivalente

Veneno	Dosis hemolítica mínima (μg)*	Neutralización (DE_{50}) (μl antiveneno/mg veneno)**
<i>Crotalus durissus durissus</i> (Guatemala)	> 1000	— **
<i>Agkistrodon bilineatus</i> (Guatemala)	73	> 2000
<i>Bothrops asper</i> (Honduras)	34	225
<i>Bothrops nummifer</i> (Honduras)	70	120

* Cantidad de veneno que induce 70% de hemólisis.

** Razón antiveneno/veneno en que el efecto hemolítico es reducido en un 50%.

*** Dada la baja actividad de este veneno, no fue posible estudiar la neutralización por el antiveneno.

CUADRO 4

Efecto proteolítico de los venenos sobre caseína y su neutralización por el antiveneno polivalente

Veneno	Dosis proteolítica mínima (mg)*	Neutralización (DE_{50}) (μl antiveneno/mg veneno)**
<i>Crotalus durissus durissus</i> (Guatemala)	1.3	80
<i>Agkistrodon bilineatus</i> (Guatemala)	> 2.5	— **
<i>Bothrops asper</i> (Honduras)	2.1	10
<i>Bothrops nummifer</i> (Honduras)	1.2	11

* Cantidad de veneno que induce un cambio de 0.5 en la absorbancia (a 280 mm) de la solución de caseína.

** Razón antiveneno/veneno en que el efecto proteolítico es reducido en un 50%.

*** Dada la baja actividad de este veneno, no fue posible estudiar la neutralización por el antiveneno.

menor de bandas de precipitación que los venenos de las otras tres especies, tanto en las placas de inmunodifusión como en las inmunolectroforesis.

DISCUSION

Dada la tendencia actual de distribuir el antiveneno polivalente producido en el Instituto

Clodomiro Picado a otros países de Centroamérica, se hacen imprescindibles estudios sobre la capacidad neutralizante de este antiveneno contra venenos de ejemplares ubicados en otros países del área. De los venenos contemplados en este trabajo, el de *A. bilineatus* ha sido muy poco estudiado en el pasado. El género *Agkistrodon* es considerado primitivo dentro de la subfamilia Crotalinae (Brattstrom, 1964); es-

CUADRO 5

Actividad hialuronidasa de los venenos y su neutralización por el antiveneno polivalente

Veneno	Dosis hialuronidasa mínima (μg)*	Neutralización (DE_{50}) (μl antiveneno/mg veneno)**
<i>Crotalus durissus durissus</i> (Guatemala)	60	10
<i>Agkistrodon bilineatus</i> (Guatemala)	330	4
<i>Bothrops asper</i> (Honduras)	310	2
<i>Bothrops nummifer</i> (Honduras)	130	20

* Cantidad de veneno que hidroliza el 70% del ácido hialurónico.

** Razón antiveneno/veneno en que la actividad hialuronidasa es reducida en un 50%.

CUADRO 6

Actividad fibrinolítica de los venenos y su neutralización por el antiveneno polivalente

Veneno	Dosis fibrinolítica mínima (μg)*	Neutralización (DE_{50}) (μl antiveneno/mg veneno)**
<i>Crotalus durissus durissus</i> (Guatemala)	103	735
<i>Agkistrodon bilineatus</i> (Guatemala)	110	800
<i>Bothrops asper</i> (Honduras)	67	750
<i>Bothrops nummifer</i> (Honduras)	58	>1200

* Cantidad de veneno que induce un halo fibrinolítico de 12 mm de diámetro luego de 18 horas de incubación.

** Razón antiveneno/veneno en que el efecto fibrinolítico es reducido en un 50%.

te género incluye varias especies en Norteamérica, pero sólo una en Centroamérica (Bolaños, 1982). Nuestros resultados indican que es muy tóxico en lo que respecta a las actividades letal, edematizante y hemorrágica. Si se efectúa un análisis comparativo, se observa que de todos los venenos de serpientes centroamericanas que han sido estudiados, el de *A. bilineatus* es el más hemorrágico y el más edematizante (Gutiérrez et al., 1985, 1986), siendo su actividad letal por la vía intraperitoneal superada únicamente por la del veneno de *C. d. durissus* (Bolaños, 1972).

Estas observaciones sugieren que el veneno de *A. bilineatus* posee una alta vasculotoxicidad. Por otro lado, tiene una actividad proteolítica relativamente débil cuando se usan caseína y fibrina como sustratos.

Es importante estudiar la capacidad del antiveneno polivalente en la neutralización del veneno de *A. bilineatus*, tomando en cuenta que este veneno no se incluye en la mezcla antigénica utilizada en la inmunización de caballos. Las inmunodifusiones y las inmunoelectroforesis indican claramente que el antiveneno reacciona

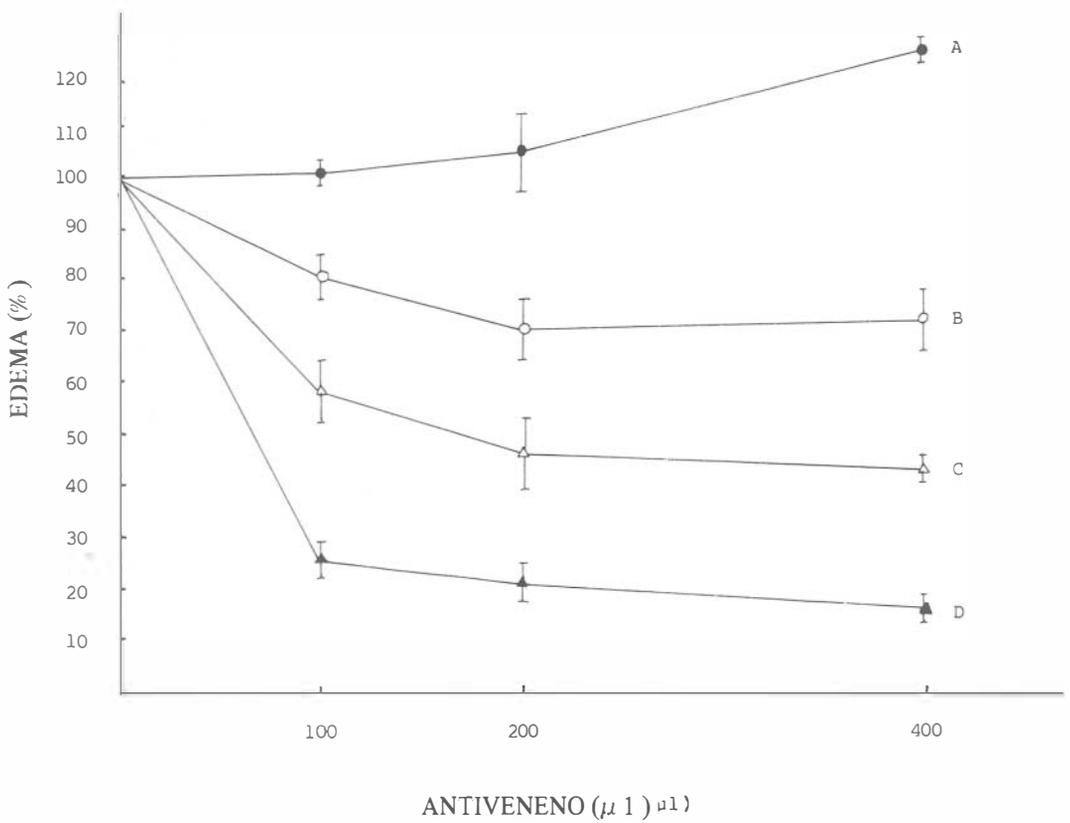


Fig. 1. Neutralización del efecto edematizante de los cuatro venenos por el antiveneno polivalente. El antiveneno se inoculó por la vía intravenosa 5 minutos antes de la inyección del veneno. A. *Crotalus durissus* (Guatemala); B. *Bothrops nummifer* (Honduras); C. *Bothrops asper* (Honduras); D. *Agkistrodon bilineatus* (Guatemala). En todos los casos se empleó una dosis de reto de veneno correspondiente a seis dosis edematizantes mínimas.

con componentes de este veneno. Además, nuestros resultados señalan que el antiveneno neutraliza las actividades tóxicas y enzimáticas de este veneno, pese a que se requieren volúmenes relativamente grandes de antiveneno para neutralizar los efectos hemorrágico y hemolítico indirecto. Es interesante observar que el antiveneno neutraliza más eficazmente el efecto edematizante inducido por el veneno de *A. bilineatus* que el inducido por los venenos de *B. asper*, *B. nummifer* y *C. d. durissus*. Se puede concluir, por lo tanto, que pese a que el veneno de *A. bilineatus* no fue utilizado en la mezcla de inmunización, el antiveneno polivalente es efectivo en su neutralización, probablemente como consecuencia de las reacciones cruzadas, de tipo inmunológico, entre venenos.

Se ha acumulado una gran cantidad de observaciones que demuestran la presencia de fenómenos de variación en la composición bioquímica de venenos de serpientes de la misma espe-

cie, pero obtenidos de ejemplares recolectados en regiones geográficas separadas. En el caso de *B. asper* y *B. nummifer*, los resultados de Jiménez-Porras (1964a, 1964b), Gutiérrez *et al.* (1980) y Aragón y Gubensek (1981) han demostrado diferencias bioquímicas y toxológicas en los venenos de ejemplares de *B. asper* provenientes de las regiones Atlántica y Pacífica de Costa Rica. Nuestros resultados indican, sin embargo, que no hay variaciones inmunológicas drásticas cuando se compara los venenos de *B. asper* de Costa Rica y Honduras, *B. nummifer* de Costa Rica y Honduras y *C. d. durissus* de Costa Rica y Guatemala; en estos casos, los patrones inmunoelectroforéticos son muy semejantes y las inmunodifusiones de Ouchterlony señalan la existencia de una identidad inmunológica total. Más aún, el suero polivalente es eficaz en la neutralización de los venenos de ejemplares de Guatemala y Honduras.

En el caso del efecto edematizante, las obser-

vaciones efectuadas señalan que es mal neutralizado cuando se estudian los venenos de *B. nummifer* y *C. d. durissus*; la explicación de esta baja capacidad neutralizante no se debe a que los venenos hondureños y guatemaltecos presenten variaciones inmunoquímicas importantes con relación a los de Costa Rica, ya que el mismo fenómeno de escasa neutralización se observa cuando se estudia la neutralización del efecto edematizante inducido por los venenos de *B. nummifer* y *C. d. durissus* de Costa Rica (Lomonte, 1985; Gutiérrez *et al.*, 1986). Es realmente sorprendente que el veneno de *C. durissus*, utilizado en la mezcla de inmunización, no sea neutralizado en lo que respecta a su actividad edematizante. Una posible explicación es la presencia de sustancias que induzcan edema y que posean un peso molecular lo suficientemente bajo como para no inducir una respuesta inmune en los caballos. Estudios preliminares efectuados en nuestro laboratorio indican que efectivamente existen sustancias de peso molecular inferior a 6000 daltons en el veneno de *C. d. durissus*, que son capaces de inducir edema. Estos componentes no son neutralizados por el antiveneno. Sin embargo, también hay sustancias edematógenas de alto peso molecular que tampoco son neutralizadas.

En conclusión, con la excepción del efecto edematizante inducido por los venenos de *C. d. durissus* y *B. nummifer*, se puede afirmar que el antiveneno polivalente producido en Costa Rica es efectivo en la neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas de estos cuatro venenos de Guatemala y Honduras.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Abel Robles, Alfredo Vargas y Javier Núñez su colaboración y a Oscar Lara por haber donado el veneno de *C. d. durissus* (Guatemala). También agradecemos la ayuda de Rocío Monge. Esta investigación fue financiada por la International Foundation for Science, proyecto F-883/1.

RESUMEN

Se estudió la capacidad del antiveneno polivalente producido en Costa Rica para neutralizar las actividades letal, hemorrágica, edematizante, proteolítica, hemolítica, hialuronidasa y fibrinolítica de los venenos de *Bothrops asper* y *Bothrops nummifer* de Honduras y de

Agkistrodon bilineatus y de *Crotalus durissus durissus* de Guatemala. La capacidad neutralizante del suero se expresó como DE_{50} (Dosis efectiva 50%), definida como la razón antiveneno/veneno en la que la actividad del veneno es reducida en un 50%. El antiveneno fue altamente eficaz en la neutralización de las actividades letal, hemorrágica, hemolítica, hialuronidasa y caseinólítica de los venenos de *B. asper*, *B. nummifer* y *C. d. durissus*. En el caso del veneno de *B. nummifer*, el efecto fibrinolítico fue neutralizado sólo parcialmente, en tanto que esta actividad fue bien neutralizada cuando se estudiaron los venenos de *B. asper* y *C. d. durissus*. El antiveneno neutralizó adecuadamente el veneno de *A. bilineatus* con excepción del efecto hemolítico, cuya neutralización fue sólo parcial. Sin embargo, en términos cuantitativos, se requirió un volumen mayor de antiveneno para neutralizar algunas actividades del veneno de *A. bilineatus*. En relación al efecto edematizante, el antiveneno neutralizó eficazmente los venenos de *B. asper* y *A. bilineatus*, en tanto que el veneno de *B. nummifer* fue neutralizado sólo parcialmente, y el de *C. d. durissus* no fue neutralizado del todo. Experimentos inmunoquímicos mostraron una gran similitud entre los venenos de *B. asper*, *B. nummifer* y *C. d. durissus* colectados en Honduras y Guatemala cuando se compararon con los de las mismas especies colectadas en Costa Rica. No obstante, hay divergencias inmunoquímicas entre venenos de diferentes especies. Se concluye que, con la excepción del efecto edematizante inducido por los venenos de *B. nummifer* y *C. d. durissus*, el antiveneno polivalente producido en Costa Rica es efectivo en la neutralización de los venenos de estas cuatro especies de serpientes.

REFERENCIAS

- Aragón, F., & F. Gubensek. 1981. *Bothrops asper* venom from the Atlantic and Pacific zones of Costa Rica. *Toxicon* 19: 797-805.
- Bolaños, R. 1971. Nuevos recursos contra el ofidismo en Centroamérica. 2a. Ed. Ministerio de Salubridad Pública y Universidad de Costa Rica, 29 pp.
- Bolaños, R. 1972. Toxicity of Costa Rican snake venoms for the white mouse. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 21: 360-363.
- Bolaños, R., & L. Cerdas. 1980. Producción y control de sueros antiofídicos en Costa Rica. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 88: 189-196.

- Brattstrom, B. H. 1964. Evolution of pit vipers. *Trans. San Diego Soc. Nat. Hist.* 13: 185-268.
- Gené, J.A., M. Gómez, J. M. Gutiérrez, & L. Cerdas. 1985. Neutralization of hyaluronidase and indirect hemolytic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon* (en prensa).
- Gutiérrez, J. M., F. Chaves, & R. Bolaños. 1980. Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Rev. Biol. Trop.* 28: 341-351.
- Gutiérrez, J.M., J.A. Gené, G. Rojas, & L. Cerdas. 1985. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon* (en prensa).
- Gutiérrez, J.M., G. Rojas, B. Lomonte, J.A. Gené, & L. Cerdas. 1986. Comparative study on the edema-forming activity of Costa Rica snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Comp. Biochem. Physiol.* (en prensa).
- Gutiérrez, J.M., F. Chaves, R. Bolaños, L. Cerdas, E. Rojas, O. Arroyo, & E. Portilla. 1981. Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. *Toxicon* 19: 493-500.
- Jiménez-Porras, J.M. 1964a. Venom proteins of the fer-de-lance, *Bothrops atrox*, from Costa Rica. *Toxicon* 2: 155-166.
- Jiménez-Porras, J.M. 1964b. Intraspecific variation in the composition of the jumping viper, *Bothrops nummifer*. *Toxicon* 2: 187-195.
- Kondo, H., S. Kondo, I. Ikezawa, R. Murata, & A. Ohsaka. 1969. Studies of the quantitative method for the determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* 13: 43-51.
- Lomonte, B. 1985. Edema-forming activity of bushmaster (*Lachesis muta stenophrys*) and Central American rattlesnake (*Crotalus durissus durissus*) venoms and neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 23: 173-176.
- Lomonte, B., & J.M. Gutiérrez. 1983. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. *Rev. Biol. Trop.* 31: 37-40.
- Ouchterlony, O., & L.A. Nilsson. 1978. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis *In* D.M. Weir (ed.). *Handbook of Experimental Immunology*, vol 1. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 191 p.
- World Health Organization. 1981. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. World Health Organization, Geneva.
- Xu, X., X. Wang, X. Xi, J. Liu, J. Huang, & Z. Lu. 1982. Purification and partial characterization of hyaluronidase from five paca snake (*Agkistrodon acutus*) venom. *Toxicon* 20: 973-978.
- Yamakawa, M., M. Nozaki, & Z. Hokama. 1976. Fractionation of Sakishima-habu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic, and edema-forming activities of the fractions. *In* A. Ohsaka, K. Hayashi, & Y. Sawai (eds.). *Animal, Plant and Microbial Toxins*, vol. 1. Plenum Press, New York.