

Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*

por

José María Gutiérrez, * Fernando Chaves **, y Róger Bolaños *

(Recibido para su publicación el 7 de mayo de 1980)

Abstract: This paper is a comparative study of venoms of newborn and adult specimens of *Bothrops asper* from two Costa Rican populations: San Carlos, in the Atlantic versant and Puriscal in the Pacific. Comparison was on a basis of determination of the following effects: hemorrhage, myonecrosis, edema, proteolysis, hemolysis, and lethality, as well as neutralization of the lethal effect by polyvalent antivenom. Biochemical and immunochemical comparisons were done by means of electrophoresis, immunoelectrophoresis, and immunodiffusion. There are marked differences between newborn and adult venoms from both regions in electrophoretic and immunoelectrophoretic patterns, although the immunodiffusion plates showed an almost identical pattern. Venoms from newborn specimens are more proteolytic, hemorrhagic, edema-forming and lethal, whereas those of adult specimens are more hemolytic and induce a stronger myonecrotic action, characterized by a myolytic type of necrosis. Antivenom neutralizes the lethality of all venoms with similar ED₅₀.

Venoms of adult specimens from both regions showed a slight variation in the immunoelectrophoretic pattern, but a complete identity in immunodiffusion plates. Adult venoms from San Carlos are more hemorrhagic, and myonecrotic, whereas those of Puriscal are more proteolytic, having similar lethality, edema-forming activity, and hemolytic effect. The same differences were observed when venoms from newborn specimens from both populations were compared.

Las variaciones ontogenéticas en el veneno de serpientes han sido poco estudiadas. Algunas investigaciones han demostrado que existen diferencias en características bioquímicas y físicas del veneno de las juveniles en relación con el de las adultas. Minton (1967), al estudiar las variaciones ontogenéticas de los venenos de *Crotalus horridus atricaudatus*, *Agkistrodon contortrix mokeson* y *Naja naja*, observó diferencias bioquímicas e inmunológicas significativas. Reid y Theakston (1978) reportaron variaciones en el efecto coagulante del veneno de *Crotalus atrox* de acuerdo con la edad de los especímenes. En el caso del veneno de *Crotalus viridis viridis*, Fiero *et al.* (1972) demostraron diferencias en el color, concentración de proteínas, solubilidad y letalidad. En venenos botrópicos, Rosenfeld (1971) observó que los de ejemplares juveniles de *Bothrops jararaca* presentaban una actividad

* Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
** Dirección actual: Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud.

proteolítica menor y un efecto coagulante mayor que los de especímenes adultos. Por otra parte, Jiménez-Porras (1964b) al estudiar las variaciones intraespecíficas en el veneno de *Bothrops nummifer* de Costa Rica, concluyó que las diferencias en el patrón electroforético no dependen de la edad del ejemplar, sino que derivan de un polimorfismo genético.

Bothrops asper, comúnmente denominada en Centroamérica terciopelo o barba amarilla, es la especie de serpiente más importante en esta región desde el punto de vista médico (Jiménez y García, 1969). Algunos trabajos clínicos señalan que muchas de las mordeduras son producidas por ejemplares juveniles y recién nacidos de esta especie (Sass, 1979). Además, con mucha frecuencia los campesinos costarricenses aseguran que las mordeduras por serpientes juveniles inducen un cuadro muy severo.

En el presente trabajo se pretende comparar inmunológica y toxicológicamente venenos de ejemplares adultos y recién nacidos de *Bothrops asper* de dos poblaciones costarricenses: San Carlos, de la vertiente atlántica y Puriscal en la del Pacífico, cuyos venenos presentan diferencias bioquímicas de acuerdo con las investigaciones de Jiménez-Porras (1964a) y Aragón y Gubensek (1979). Hemos estudiado la letalidad para el ratón blanco, las actividades proteolítica, hemolítica, hemorrágica, mionecrótica y edematizante, el patrón electroforético y su comportamiento en inmunolectroforesis e inmunodifusión en dos dimensiones. También se estudió su neutralización por el suero polivalente del Instituto Clodomiro Picado (ICP), preparado con venenos de *B. asper*, del Atlántico y del Pacífico, *Crotalus durissus* y *Lachesis muta* (Atlántico).

MATERIAL Y METODOS

Venenos: Se utilizaron 4 venenos distintos: a) una mezcla obtenida de 20 ejemplares adultos de la zona atlántica (San Carlos); b) una mezcla de 43 ejemplares adultos de la zona del Pacífico centro (Puriscal); c) una mezcla de veneno de 108 ejemplares menores de un mes de edad de la zona de San Carlos y d) una mezcla de venenos de 59 ejemplares menores de un mes de edad de la región de Puriscal. En el caso de las recién nacidas los venenos son mezclas de ejemplares nacidas en el serpentario del Instituto Clodomiro Picado. Los venenos se congelaron de inmediato, se liofilizaron y se conservaron a -70°C hasta su uso.

Dosis letal 50 (DL₅₀): Se utilizaron ratones blancos de 16-18 g de peso, inoculados por la vía intraperitoneal de acuerdo con Bolaños (1972). Se emplearon 8 ratones por cada dosis de veneno y los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el método de Spearman-Kärber.

Neutralización del efecto letal (DE₅₀): Dosis fijas de veneno se mezclaron con cantidades variables del antiveneno, se incubaron por 30 minutos a 37°C y se inocularon por la vía intraperitoneal a grupos de 8 ratones cuyo peso osciló entre 16 y 18 g. Los resultados se analizaron mediante el método de Spearman-Kärber. El antisuero utilizado fue el polivalente (Botrópico-Crotálico-Lachésico) del Instituto Clodomiro Picado, lote N° 107.

Actividad proteolítica: Se utilizó como sustrato la caseína de la BDH Chemicals Co., de acuerdo con el método de Friedrich y Tu (1971); se efectuaron 5 determinaciones para cada muestra y la actividad se expresó en unidades por mg así:

$$\frac{\text{D.O. a 280 nm en 30 min.}}{\text{mg de veneno}} \quad \times 100$$

Actividad hemorrágica: Se utilizó la técnica de Kondo *et al.* (1960), pero usando ratones de 18-20 g de peso, inoculados i.d. con cantidades variables de veneno en 0,1 ml de solución salina. Dos horas después se sacrificaron con cloroformo y se midió el área hemorrágica. La Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) es la cantidad de veneno que provoca un área hemorrágica de 10 mm de diámetro en dos horas.

Actividad hemolítica: A 0,1 ml de una suspensión de yema de huevo al 1% se adicionó 2,9 ml de solución salina (pH 7,2), 1 ml de eritrocitos humanos lavados en concentración de 2,5 % y 1 ml de la solución conteniendo 1 mg de veneno (Gómez-Leiva, 1975); esta mezcla se incubó por 30 minutos a 37 C, efectuándose luego la lectura de la hemoglobina liberada en el sobrenadante, con un espectrofotómetro Varian Techtron a una longitud de onda de 550 nm. El efecto hemolítico se expresó como el porcentaje de hemólisis, tomando como 100% la lectura del sobrenadante resultante de la incubación de los eritrocitos con agua destilada.

Actividad edematizante: Se utilizó la técnica de Yamakawa *et al.* (1976) consistente en la inoculación de 60 μg de veneno en 30 μl de solución salina, en el pie trasero derecho de ratones blancos de 18 a 20 g, en tanto que el pie izquierdo se inoculó con 30 μl de solución salina. A las 24 horas los ratones se sacrificaron con cloroformo y ambos pies fueron cortados a la altura de la articulación y pesados en balanza analítica. El edema se expresó como el aumento en porcentaje de peso de la pata inyectada con veneno en relación con la otra.

Actividad mionecrótica: Se evaluó mediante el análisis histológico y la determinación de la actividad de enzima Creatinafosfoquinasa (CFQ) en suero de ratones inoculados. Para el análisis histológico se efectuaron inoculaciones de 50 μg de veneno, según Gutiérrez y Chaves (1980); seis horas después se tomó una muestra de músculo, se fijó en formalina al 10% a temperatura ambiente y fue lavada, deshidratada e incluida en parafina para su posterior corte y coloración con hematoxilina y eosina. Para la determinación de CFQ se inoculó 50 μg de veneno intramuscularmente en ratones de 18 a 20 g; tres horas después se obtuvo sangre de la cola y se determinó la concentración de la enzima mediante la técnica colorimétrica basada en la medición de la creatina formada en la reacción ADP/fosfocreatina (Sigma Technical Bulletin N° 520). La CFQ se determinó tres horas después de la inoculación debido a que es el momento en que la curva de elevación de esta enzima alcanza su máximo nivel (Gutiérrez *et al.*, 1980).

Electroforesis, Inmunolectroforesis e Inmunodifusión: La corrida electroforética se efectuó en gel de agarosa al 0,75% con amortiguador de barbituratos pH 8,2 y 0,1 de ionicidad. Se utilizó una solución de veneno de 50 mg/ml, corriéndose la electroforesis por 150 minutos con una corriente de 2,4 mA por centímetro

de sección. Para las inmunoelectroforesis las condiciones fueron idénticas, utilizándose una hendidura longitudinal en el centro de la lámina para el suero hiperinmune (I.C.P. 107); las bandas se dejaron desarrollar por 48 horas y luego se colorean con azul de almidón (Crowle, 1961). Se efectuaron Inmunodifusiones de Ouchterlony en agarosa al 0,5%, utilizando el veneno a una concentración de 10-12 mg/ml y dejándose difundir por 24 horas previo a su tinción con azul de almidón.

RESULTADOS

Se observó una variación significativa entre los venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de las dos poblaciones estudiadas; por otra parte, pese a que los venenos de adultas entre sí, así como los de recién nacidas entre sí, presentaron ciertas diferencias en algunas actividades, hubo más similitud entre ellas que entre los venenos de recién nacidas y adultas de una misma zona geográfica.

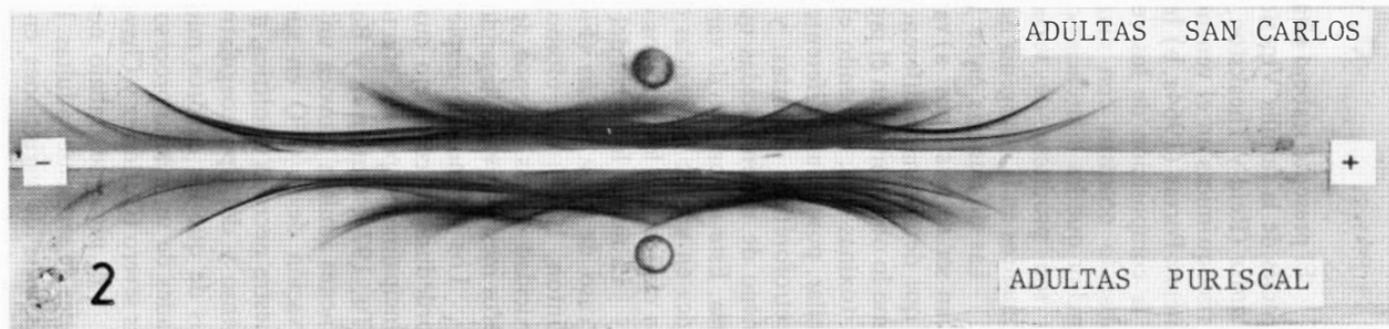
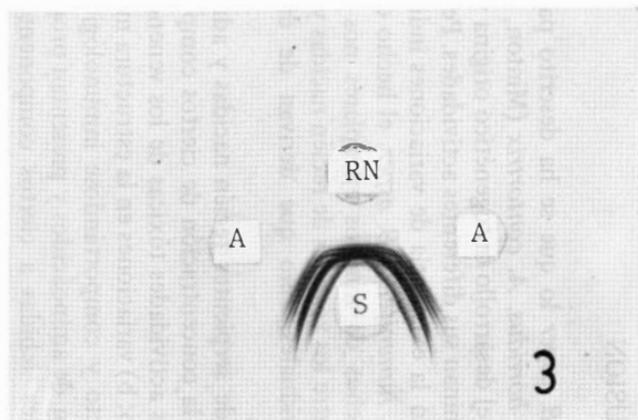
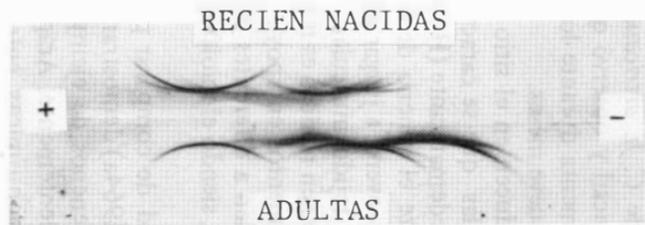
El patrón electroforético fue muy diferente ya que los venenos de especímenes recién nacidos solamente muestran una fracción catódica, en tanto que dos fracciones muy evidentes del veneno de adultas migraron hacia el cátodo. El patrón inmunoelectroforético fue también muy divergente, destacándose especialmente dos bandas catódicas muy nítidas en el veneno de las adultas, que están ausentes en el de recién nacidas (Fig. 1). La comparación de los venenos de especímenes adultos de ambas zonas mostró un patrón electroforético relativamente similar, aunque la inmunoelectroforesis mostró pequeñas diferencias en el número y posición de las bandas (Fig. 2). La inmunodifusión de Ouchterlony mostró una total identidad cuando se compararon venenos de ejemplares adultos entre sí, así como de ejemplares recién nacidos entre sí. Sin embargo, los venenos de adultas y recién nacidas presentaron una identidad parcial ya que comparten todas sus bandas, excepto una, aquella de adultas que difunde más. En la Fig. 3 se presenta una placa típica comparativa de venenos de recién nacidas y de adultas del Atlántico. El patrón de los venenos del Pacífico es similar al de los del Atlántico. El antiveneno polivalente neutralizó el efecto letal de todos los venenos con título similar.

En cuanto a los efectos de los venenos, el de serpientes menores de un mes de edad resultó ser más tóxico en términos generales ya que fue más letal, más proteolítico, más hemorrágico y más edematizante; sin embargo, produce elevaciones menores de CFQ y un cuadro histológico en tejido muscular donde predominan fibras necróticas de aspecto coagulativo (Fig. 4). Por su parte, el veneno de ejemplares adultos presentó un mayor efecto hemolítico indirecto y una mayor actividad mionecrótica, originando un típico cuadro de necrosis miolítica (Fig. 5), con una gran elevación de los niveles de CFQ. En lo que respecta a los parámetros toxicológicos estudiados, los venenos de ejemplares adultos de la zona de San Carlos fueron más mionecróticos y más hemorrágicos en tanto que los de ejemplares

Fig. 1. Patrones de electroforesis e inmunoelectroforesis de los venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *B. asper* de la región de San Carlos.

Fig. 2. Patrón de la inmunodifusión en dos dimensiones de los venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *B. asper* de San Carlos. A representa el veneno de adultas, RN el de recién nacidas y S el suero hiperinmune.

Fig. 3. Patrón inmunoelectroforético de los venenos de ejemplares adultos de *B. asper* de las zonas de San Carlos y Puriscal.



adultos de Puriscal fueron más proteolíticos. Las mismas diferencias se observaron cuando se compararon los venenos de serpientes recién nacidas de ambas poblaciones entre sí (Cuadro 1).

DISCUSION

El presente trabajo establece para *B. asper* lo que se ha descrito para otras especies de la familia Viperidae como *C. horridus*, *A. contortrix* (Minton, 1967) y *C. atrox* (Reid y Theakston, 1978): que el desarrollo ontogenético origina variaciones bioquímicas en el veneno que determinan sus diferentes actividades. Pese a que Jiménez-Porras (1964a, b) há demostrado la existencia de variaciones individuales en la composición de los venenos de *B. nummifer* y *B. asper*, el hecho de haber trabajado nosotros con mezclas de venenos de muchos ejemplares nos permite concluir que las diferencias observadas entre los venenos de recién nacidas y adultas no son producto de variaciones individuales, sino que derivan de diferentes momentos en la ontogenia de la serpiente.

Las diferencias entre los venenos de serpientes recién nacidas y adultas podrían ser de tres tipos: a) variaciones en la concentración de ciertos componentes, lo que determinaría diferencias en ciertas actividades tóxicas de los venenos, tal y como lo observamos en el presente trabajo; b) variaciones en la estructura molecular de toxinas que, teniendo el mismo efecto y comportándose inmunológicamente similar, poseen una diferente composición de aminoácidos y presentan propiedades electroforéticas distintas; y c) variaciones debidas a ciertos componentes en el veneno de recién nacidas que no están presentes en el veneno de adultas, o viceversa. Este tercer tipo de variación es evidente por la ausencia de identidad inmunológica en una de las bandas en el patrón de Ouchterlony. Este fenómeno se aprecia con claridad en los venenos de *C. h. atricaudatus* y *A. c. mokeson* (Minton, 1967).

La mayor letalidad del veneno de *B. asper* menor de un mes de edad es similar al caso de *C. v. viridis* (Fiero *et al.*, 1972), así como al de *C. h. atricaudatus* (Minton, 1967); este último autor efectuó un análisis secuencial y observó que la toxicidad de los venenos de *C. horridus* y *A. contortrix* aumenta durante los primeros meses de vida, llegando a un máximo al cabo de seis a nueve meses.

Los venenos de serpientes de la familia Viperidae producen en el sitio de la mordedura un complejo cuadro local, responsable de secuelas que se caracteriza principalmente por los efectos hemorrágico, mionecrótico y edematizante (Homma y Tu, 1971; Gutiérrez y Bolaños, 1980). Experimentalmente el veneno de especímenes adultos provoca un cuadro de necrosis muscular más severo, a juzgar por la elevación de la CFQ en suero y el análisis histológico del tejido muscular, que muestra necrosis miolítica, mientras que el inducido por las recién nacidas es menos intenso y del tipo coagulativo. Estos resultados brindan elementos en apoyo a la tesis de que los cuadros miolítico y coagulativo corresponden a diferentes intensidades de un mismo proceso patológico de necrosis muscular, siendo el miolítico el más severo (Gutiérrez y Chaves, 1980).

El presente trabajo nos brinda también la oportunidad de comparar poblaciones de serpientes adultas. Los estudios de Jiménez-Porras (1964a) demostraron la existencia de variaciones en el patrón electroforético de venenos de ejemplares adultos de *B. asper* de diferentes zonas de Costa Rica. Recientemente, Aragón y Gubensek (1979) describieron una serie de variaciones bioquímicas entre los venenos de ejemplares adultos de esta misma especie procedentes de las regiones

CUADRO 1

Efectos provocados por venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de Bothrops asper de las regiones de San Carlos y Puriscal

Efecto	Recién nacidas Puriscal	Adultas Puriscal	Recién nacidas San Carlos	Adultas San Carlos
Proteólisis (unidad/mg)	108,4 ± 4,56*	66,0 ± 4,47	79,2 ± 5,22	54,0 ± 4,0
Hemólisis indirecta (%)	48,8 ± 1,30	96,8 ± 1,48	48,6 ± 6,11	99,0 ± 1,0
Hemorragia (DHM- μ g)	0,65	2,5	0,5	1,5
Mionecrosis (magnitud y tipo)	Moderado Predominantemente coagulativo	Intenso Predominantemente miolítico	Moderado Predominantemente coagulativo	Intenso Predominantemente miolítico
CFQ (U.I./l)	1311 ± 206,7	6756 ± 378,5	2025 ± 727,1	8260 ± 646,5
Edema (%)	80,0 ± 8,5	62,2 ± 7,1	87,6 ± 11,4	62,7 ± 3,9
DL ₅₀ (μ g por ratón)	35 (32,2 – 38,1)**	65 (62,1 – 68,1)	33,5 (30,9 – 36,3)	67(64,2 – 69,9)
DE ₅₀ (mg de veneno por ml de suero)	2,65 (2,12 – 3,31)**	2,65 (2,17 – 3,23)	2,35 (1,95 – 2,83)	2,00 (1,64 – 2,44)

* Los resultados se dan con \pm una desviación estándar.

** Entre paréntesis se expresan los límites de confianza del 95%.

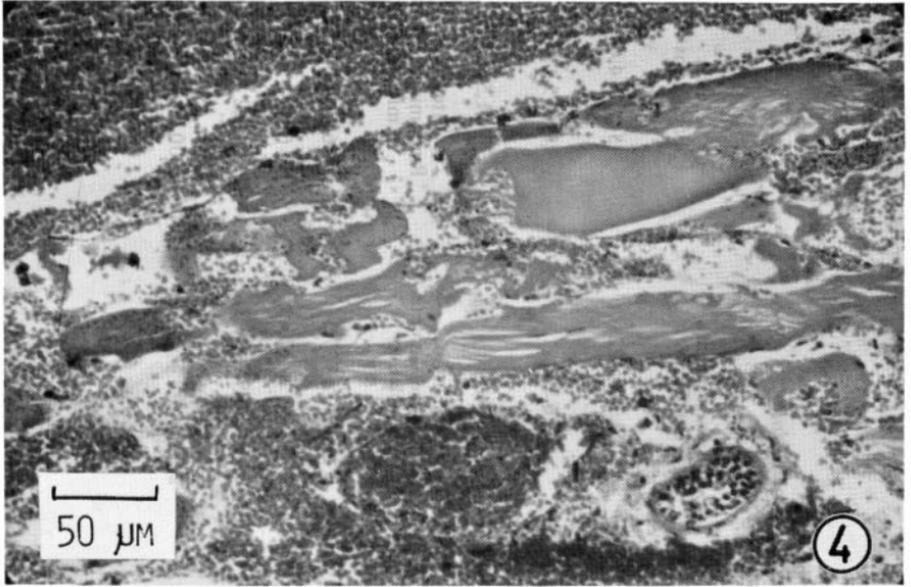


Fig. 4. Cuadro histológico en tejido muscular de ratón inducido por la inoculación intramuscular de 50 μg de veneno de ejemplares recién nacidos de *B. asper*. Se aprecia una intensa hemorragia y una mionecrosis con fibras de aspecto coagulativo.

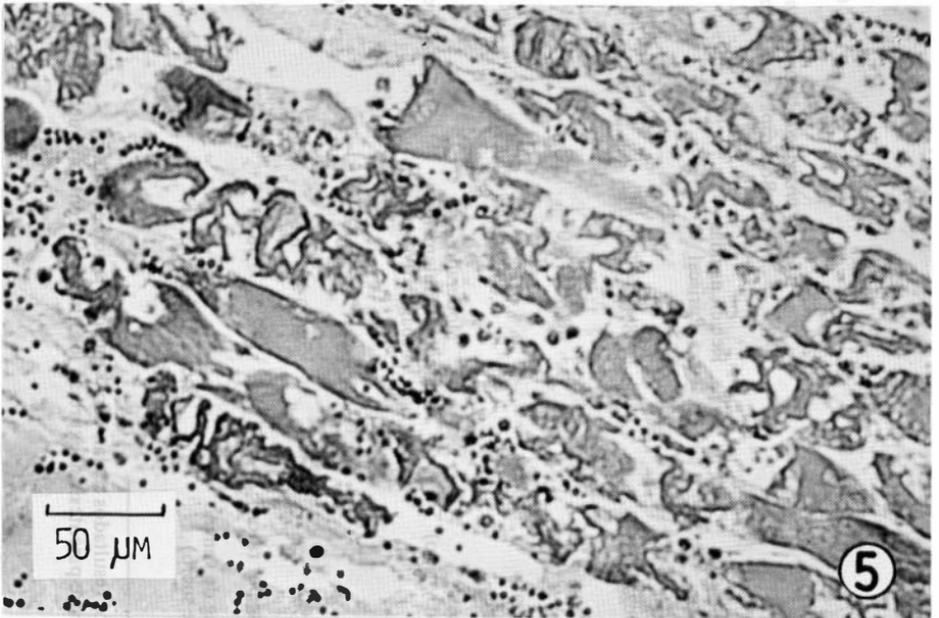


Fig. 5. Severa necrosis miofibrilar de las fibras musculares de ratón a consecuencia de la inoculación intramuscular de 50 μg de veneno de ejemplares adultos de *B. asper*. Se aprecia también grupos de eritrocitos, producto de la extravasación.

atlántica y pacífica de Costa Rica. Estos autores observaron diferencias en el patrón electroforético en geles de acrilamida, en la actividad proteolítica sobre caseína y fibrinógeno y en la actividad coagulante, siendo el veneno del Pacífico más proteolítico y menos coagulante que el de especímenes del sector Atlántico. La primera observación concuerda con los resultados de este estudio.

En la presente investigación, el patrón electroforético en geles de agarosa fue relativamente similar para ambas mezclas de venenos de adultos, no así el patrón inmunolectroforético que, pese a ofrecer cierta similitud, también mostró diferencias en el número y posición de las bandas. Sin embargo, la identidad inmunológica de ambas mezclas de venenos fue evidente por un patrón de inmunodifusión de Ouchterlony prácticamente idéntico. Es importante destacar el hecho de que el veneno de los ejemplares de San Carlos induce un efecto mionecrótico y hemorrágico un tanto más severo que el de los de Puriscal.

RESUMEN

Se estudiaron comparativamente los venenos de ejemplares recién nacidas (menos de un mes de edad) y adultas de *Bothrops asper* de dos regiones costarricenses: San Carlos en la vertiente atlántica y Puriscal en la pacífica. La comparación se basó en la determinación de los efectos hemorrágico, mionecrótico, edematizante, proteolítico, hemolítico y letal, así como la neutralización del efecto letal por suero antiofídico polivalente; además se efectuó una comparación bioquímica e inmunoquímica mediante electroforesis, inmunolectroforesis e inmunodifusión en dos dimensiones. Los venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de ambas regiones mostraron marcadas diferencias entre sí en lo que respecta a los patrones electroforético e inmunolectroforético, aunque la inmunodifusión mostró una identidad casi completa. Los venenos de recién nacidas de ambas poblaciones son más proteolíticos, más hemorrágicos, más edematizantes y letales, en tanto que los venenos de adultos son más hemolíticos y más mionecróticos, provocando un cuadro histológico de intensa necrosis miolítica. La letalidad de los 4 venenos fue neutralizada con título similar por el suero antiofídico polivalente.

Por otra parte, al comparar los venenos de especímenes adultos de ambas zonas entre sí, se apreció una ligera variación en el patrón inmunolectroforético y una identidad total en la inmunodifusión. Los de San Carlos fueron más hemorrágicos y más mionecróticos, en tanto que los de Puriscal fueron más proteolíticos, siendo similares las magnitudes de los efectos letal, edematizante y hemolítico. Las mismas diferencias fueron observadas cuando se compararon los venenos de serpientes recién nacidas de ambas poblaciones entre sí.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestro compañero señor Alvaro Flores Badilla por su valiosa ayuda en la obtención y mantenimiento de los venenos; a los señores Gerardo Serrano Sánchez y Guillermo Flores Badilla por su colaboración en el manejo de las serpientes; a la doctora Elsa Portilla por la preparación de los cortes histológicos; a los señores Alfredo Vargas y Abel Robles por su ayuda en el trabajo de laboratorio y a la señora Hilda Herrera de Solera por el trabajo mecanográfico. Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica y por la Universidad de Costa Rica.

REFERENCIAS

- Aragón, F., & F. Gubensek**
1979. *Bothrops asper* venom from the Atlantic and Pacific coasts of Costa Rica. *Toxicon*, 17 (Suppl. 1): 3 (Abstr.).
- Bolaños, R.**
1972. Toxicity of Costa Rican snake venoms for the white mouse. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 21: 360-363.
- Crowle, A.J.**
1961. Immunodiffusion. Academic Press, Londres 265 p.
- Fiero, M.K., M.W. Seifert, T.J. Weaver, & C.A. Bonilla**
1972. Comparative study of juvenile and adult prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venoms. *Toxicon*, 10: 81-82.
- Friedrich, C., & A.T. Tu**
1971. Role of metals in snake venoms for hemorrhagic, esterase, and proteolytic activities. *Bioch. Pharm.*, 20: 1549-1556.
- Gómez-Leiva, M.A.**
1975. Efecto del veneno de serpientes sobre diferentes tipos de glóbulos rojos. Tesis de grado. Universidad de Costa Rica.
- Gutiérrez, J.M., & R. Bolaños.**
1980 El problema de los efectos hemorrágico y mionecrótico por mordeduras de serpientes en el continente americano. *Bol. Of. San. Panamer.* (en prensa).
- Gutiérrez, J.M., & F. Chaves**
1980. Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. *Toxicon* (en prensa).
- Gutiérrez, J.M., O. Arroyo, & R. Bolaños**
1980. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon* (en prensa).
- Homma, M., & A.T. Tu**
1971. Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. *Br. J. Exp. Path.*, 52: 538-542.
- 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 variations in composition of venom of the jumping viper, *Bothrops nummifer*. *Toxicon*, 2: 187-195.
- Jiménez, E., & I. García**
1969. Análisis de 86 casos de ofidismo en niños. *Rev. Med. Hosp. Nal. Niños*, 4: 91-99.
- Kondo, H., S. Kondo, I. Ibezawa, R. Murata, & A. Ohsaka**
1960. Studies of the quantitative method for the determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. *Japan J. Med. Sci. Biol.*, 13: 43-51.
- Minton, S.A.**
1967. Observations on toxicity and antigenic make up of venoms from juvenile snakes, p. 531-562. *In* F.E. Russell & P.R. Sanders (eds.). *Animal Toxins*. Pergamon Press, Oxford.

Reid, H.A., & R.D. Theakston

1978. Changes in coagulation effects by venoms of *Crotalus atrox* as snakes age. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 27: 1053-1057.

Rosenfeld, G.

1971. Symptomatology, Pathology and Treatment of snake bites in South America, p. 345. *In* W. Bücherl & E. Buckley (eds.). *Venomous Animals and their Venoms*. Vol. II. *Venomous Vertebrates*. Academic Press. New York.

Sass, J.K.

1979. Snake bite in the Canal Zone: an update review of cases from September 1975 to August 1978. *Lab. Med.*, 10: 77-79.

Yamakawa, M., M. Nozaki, & Z. Hokama

1976. Fractionation of Sakishima-Habu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic, and edema forming activities of the fractions, p. 97-109. *In* A. Ohsaka, K. Hayashi y Y. Sawai (eds.). *Animal, plant and microbial toxins*, Vol. 1, *Biochemistry*. Plenum Press, New York.