

Neutralización heteróloga e interacción de amanitinas con venenos de *Bothrops* y *Crotalus* y de abeja

Heterologous neutralization and interaction of toxic amanitins with Bothrops and Crotalus venoms, and honey bee venom

Neutralização heteróloga e interação das amanitinas tóxicas com veneno de Bothrops e Crotalus e veneno de abelha

- Alicia Beatriz Pomilio¹, Miguel Edgardo Battista¹, Arturo Alberto Vitale¹, Stella Maris Battista¹, Armando Ítalo Amadeo Ricciardi², Ana María Torres², Francisco José Camargo²

¹ Instituto de Biología y Medicina Molecular (IBIMOL, ex PRALIB) (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, C1113AAD Buenos Aires, Argentina.

E-mail: pomilio@ffyb.uba.ar.

² Cátedra de Toxicología y Química Legal, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste, 9 de Julio 1449, 3400 Corrientes, Argentina.

E-mail: aricciardi@exa.unne.edu.ar

Resumen

En el presente trabajo se examinó la interacción de las amanitinas de *Amanita phalloides* (Basidiomycetes) con los venenos de las serpientes *Bothrops neuwiedi diporus* ("yarárá pequeña"), *B. alternatus* ("yarárá grande"), *Crotalus durissus terrificus* ("serpiente de cascabel") y de la abeja mielera *Apis mellifera*. Se aplicaron las técnicas de Ouchterlony, inmunotransferencia, electroforesis *rocket* y electroforesis en gel de poli(acrilamida a los anti-venenos y anti-toxinas obtenidos por inmunización en caballos y/o en conejos. Los anti-sueros de serpientes y las amanitinas reaccionaron en forma cruzada, así como el veneno de abeja y las amanitinas. Cuando los venenos de *Bothrops neuwiedi diporus* y *Crotalus durissus terrificus* se preincubaron con las amanitinas y se analizaron por electroforesis en gel de poli(acrilamida-dodecilsulfato de sodio (*dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*: SDS-PAGE), algunas bandas de proteínas desaparecieron y otras se redujeron notablemente. Estos resultados revelan por primera vez la interacción y la degradación de las proteínas de los venenos de serpientes por las amanitinas. Por otra parte, la modificación del tiempo de coagulación de la sangre humana, debida a los venenos, se corrigió con los ciclopéptidos de *Amanita*. Estos resultados también se informan por primera vez en este trabajo. La presencia de polipéptidos tóxicos en los venenos de serpientes y abejas, así como en *A. phalloides* y la reactividad cruzada demostradas en este trabajo, sugieren la existencia de epítomos comunes a todos ellos. Teniendo en cuenta estas reacciones, el uso de anti-venenos heterólogos parece ser de utilidad en el tratamiento del envenenamiento.

Palabras clave: *Amanita phalloides* * *Apis mellifera mellifera* * *Bothrops neuwiedi diporus* * *Bothrops alternatus* * *Crotalus durissus terrificus* * reactividad cruzada * interacción * electroforesis en gel de poli(acrilamida-dodecil sulfato de sodio* tiempo de coagulación humano

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Summary

In the present work, the interaction of the amanitins of Amanita phalloides (Basidiomycetes) with the venoms of Bothrops neuwiedi diporus ("small yarará snake"), B. alternatus ("big yarará"), Crotalus durissus terrificus ("rattlesnake"), and honey bee Apis mellifera was examined. Ouchterlony, immunotransfer, rocket-electrophoresis, and polyacrylamide gel electrophoresis techniques were applied to anti-venoms and anti-toxins obtained by immunization in horses and/or in rabbits. Snake antisera and amanitins cross-reacted as well as bee venom and amanitins. When venoms of Bothrops neuwiedii diporus and Crotalus durissus terrificus were preincubated with amanitins and analysed by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), some protein bands disappeared and others were significantly reduced. These results reveal for the first time the interaction and degradation of proteins in snake venoms by amanitins. Moreover, the modification of the human blood clotting time due to snake venoms was corrected by the Amanita cyclopeptides. These results are also reported for the first time in this work. The occurrence of toxic polypeptides in the snake and bee venoms as well as in A. phalloides, and the cross-reactivity demonstrated herein, suggest the occurrence of epitopes common to all of them. Taking into account these reactions, the use of heterologous anti-venoms seems to be of value in envenomation treatment.

Keywords: Amanita phalloides * Apis mellifera mellifera * Bothrops neuwiedi diporus * Bothrops alternatus * Crotalus durissus terrificus * cross-reactivity * interaction * sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis * human clotting time

Resumo

No presente trabalho foi examinada a interação das amanitinas de Amanita phalloides (Basidiomycetes) com os venenos das serpentes Bothrops neuwiedi diporus ("jararaca-cruzeira"), B. alternatus ("urutu"), Crotalus durissus terrificus ("serpente cascavel") e da abelha-europeia Apis mellifera. Foram aplicadas as técnicas de Ouchterlony, imunotransferência, eletroforese rocket e eletroforese em gel de poliácridamida aos anti-venenos e anti-toxinas obtidos por imunização em cavalos e/ou em coelhos. Os anti-soros de serpentes e as amanitinas reagiram em forma cruzada, bem como o veneno de abelha e as amanitinas. Quando os venenos de Bothrops neuwiedii diporus e Crotalus durissus terrificus foram incubados previamente com as amanitinas e foram analisados por eletroforese em gel de poliácridamida-dodecilsulfato de sódio (dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE), algumas faixas de proteínas desapareceram e outras se reduziram notavelmente. Estes resultados revelam por primeira vez a interação e a degradação das proteínas dos venenos de serpentes pelas amanitinas. Por outra parte, a modificação do tempo de coagulação do sangue humano, devido aos venenos, se corrigiu com os ciclopeptídeos de Amanita. Estes resultados também se informam por primeira vez neste trabalho. A presença de polipeptídeos tóxicos nos venenos de serpentes e abelhas, bem como em A. phalloides e a reatividade cruzada demonstradas neste trabalho, sugerem a existência de epítomos comuns a todos eles. Levando em consideração estas reações, o uso de anti-venenos heterólogos parece ser de utilidade no tratamento do envenenamento.

Palavras chave: Amanita phalloides * Apis mellifera mellifera * Bothrops neuwiedi diporus * Bothrops alternatus * Crotalus durissus terrificus * reatividade cruzada * interação * eletroforese em gel de poliácridamida-dodecilsulfato de sódio * tempo de coagulação humano

Introducción

Se conocen tres grupos de ciclopéptidos tóxicos de bajo peso molecular de Basidiomycetes: amatoxinas, falotoxinas y virotoxinas (sólo presentes en *Amanita virosa*) (1) (2). Las falotoxinas presentan una acción más específica sobre la membrana celular y el metabolismo, mientras que las amatoxinas sobre el núcleo celular y la síntesis de proteínas. Las amatoxinas inhiben la ARN polimerasa II dependiente del ADN (3).

Las especies de los géneros *Amanita*, *Lepiota* y *Galerina* que contienen amatoxinas son responsables de los casos más severos de intoxicación por ingestión de hongos, con alta tasa de mortalidad. Más del 90% de los casos mortales por esta intoxicación en el hombre fueron causados por la ingestión de amatoxinas (en particular α - y β -amanitina) de *Amanita phalloides*; los síntomas generalmente se desarrollan después de un cierto tiempo (>6h). Estas amanitinas muestran gran estabilidad química y térmica. Las amatoxinas y las fa-

lotoxinas se han estudiado durante casi un siglo (2-5). Recientemente, se ha informado sobre las estructuras químicas y la actividad biológica de los ciclopéptidos de plantas y hongos superiores (6), así como sobre las estructuras químicas de las toxinas de hongos (7). En los laboratorios de los autores se llevaron a cabo cálculos moleculares semiempíricos AM1 y *ab initio* de amatoxinas y falotoxinas, así como de α -amanitina, y de su 6'-O-metil éter (un *R*-sulfóxido), el *S*-sulfóxido, la sulfona y el *S*-deoxo derivado (8) (9). α -Amanitina es un potente inhibidor de la ARN polimerasa II dependiente del ADN (forma nucleoplásmica) del erizo de mar, del hígado de rata y del timo de ternera, y no ejerce ningún efecto sobre la actividad de la polimerasa I (forma nucleolar) o de la polimerasa III (también nucleoplásmica).

Una estructura de rayos X de α -amanitina integrada en cristales de ARN polimerasa II de levadura indicó muchos contactos atómicos que son clave en la inactivación de la ARN polimerasa II (10) (11). Dado que α -amanitina bloquea la translocación mediante esta polimerasa, al usar α -amanitina como una sonda dinámica del mecanismo de la ARN polimerasa II, Gong *et al.* (11) demostraron que la conformación más preparada del complejo de elongación resultó selectivamente resistente a la inhibición con α -amanitina.

Se desarrollaron estudios recientes sobre la transcripción y los cofactores generales, así como sobre la inhibición de la transcripción debida a ARN polimerasa II (12-15). Además, Letschert *et al.* (16) realizaron la caracterización molecular y la inhibición de la captación de amanitina en hepatocitos humanos.

En los laboratorios de los autores se llevaron a cabo estudios previos con sueros antiofídicos, así como con sueros humanos de sujetos insensibilizados y/o intoxicados, veneno de abeja, venenos de serpientes como: *Bothrops alternatus*, *B. neuwiedii diporus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *Crotalus durissus terrificus* y *Micrurus frontalis altirostris*, y las toxinas del hongo *A. phalloides* (17).

Estos resultados nos llevaron a analizar más a fondo la reactividad cruzada, la neutralización y/o la interacción de estos venenos con las toxinas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la interacción de las amanitinas de *Amanita phalloides* (Basidiomycetes) con los venenos de *Apis mellifera*, *Bothrops alternatus* ("yará grande"), *Bothrops neuwiedii diporus* Cope ("yará pequeña"; "jararaca pintada"; ca. 0,9 m de longitud), y *Crotalus durissus terrificus* Laurenti ("serpiente de cascabel"; "cascabel sudamericana"; ca. 1,2 m de longitud) de Argentina. Estas interacciones fueron estudiadas mediante la formación de precipitina y por electroforesis, como: SDS-PAGE y la corrección por amanitina del tiempo de coagulación de la sangre humana modificada por la acción de cada veneno.

Materiales y Métodos

Reactivos. Todos los productos químicos y solventes se usaron de la mayor pureza disponible y se obtuvieron de Merck AG (Darmstadt, Alemania) o de Sigma Co. (St. Louis, MO, EE.UU.).

Venenos de serpiente. Los venenos de *Bothrops alternatus* ("yará grande"), *Bothrops neuwiedii diporus* ("yará pequeña") y *Crotalus durissus terrificus* ("serpiente de cascabel") se obtuvieron del Centro de Producción de Sueros Antiofídicos (CEPSAN; Corrientes, Provincia de Corrientes, Argentina). Los valores de dosis letal₅₀ (DL₅₀) fueron ($\chi \pm DE$): 1,25 \pm 0,30 μ g/g para *Bothrops neuwiedii diporus*, 1,14 \pm 0,30 μ g/g para *Bothrops alternatus* y 0,17 \pm 0,02 μ g/g para *Crotalus durissus terrificus* (18) (19).

Las muestras se secaron por separado al vacío a temperatura ambiente y se mantuvieron en frascos cerrados herméticamente a 4 °C hasta su uso. Se prepararon las soluciones de los venenos en NaCl 0,15 M justo antes de ser usadas y se esterilizaron por filtración.

Veneno de abejas. El veneno de *Apis mellifera* fue suministrado gentilmente por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos (INPB; ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires, Argentina).

Antivenenos. Todos los sueros terapéuticos fueron preparados a partir de plasma de caballos hiperinmunizados (INPB), por ejemplo: monovalente antibotrópico (1-Bh planteado contra el veneno de *Bothrops alternatus*); trivalente botrópico crotálico (3-BC formulado contra los venenos de *Bothrops alternatus*, *B. neuwiedii* y *Crotalus durissus terrificus*) y monovalente anticrotálico (1-Ch planteado contra el veneno de *Crotalus durissus terrificus*) (18). La aparición de anticuerpos antiveneno se analizó mediante el método de Ouchterlony. Se separaron alícuotas de los antivenenos y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

Cada antisuero consistió en una solución purificada de la fracción F(ab')₂ de inmunoglobulinas obtenidas a partir del plasma de caballos hiperinmunizados con veneno de las serpientes del género *Bothrops* y de *Crotalus durissus terrificus*. El antiveneno fue purificado mediante digestión peptídica y fraccionamiento salino. Cada mililitro neutralizó el veneno de serpiente de referencia en ratones.

Amanita phalloides. Carpóforos de *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Secr. se recolectaron en el Parque Pereyra Iraola, Provincia de Buenos Aires, Argentina, y fueron identificados en PROPLAME-PRHIDEB (CONICET y UBA; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires). Se depositaron muestras de ejemplares bajo el número BAFC 34.547. Leg: Miguel

Battista, Parque Pereyra Iraola, Provincia de Buenos Aires. *A. phalloides* es común en Europa, pero en Argentina crece en ectomicorrizas de robles y pinos, que originalmente fueron traídos al país por los primeros europeos.

Amanitinas provenientes de Amanita phalloides. Los basidiocarpos frescos de *Amanita phalloides* se cortaron en trozos pequeños y se cubrieron con metanol, manteniéndolos a temperatura ambiente durante varios días, o bien, se los calentó en un baño de agua a 60-70 °C durante 30 min. Después de la filtración, se repitió este paso de extracción. Se evaporaron los filtrados combinados al vacío y se desgrasó el residuo con *n*-hexano. Una vez evaporado el solvente, se disolvió el residuo en agua y se desaló con una columna de Amberlite XAD-4. Todas las toxinas se unieron a la resina, mientras que las moléculas iónicas se eluyeron con agua. Luego, las toxinas se eluyeron con etanol-agua (1:1 v/v). Se llevó a cabo un paso cromatográfico a pH 3 en Sephadex LH-20, de manera que la separación dependió del peso molecular (PM). Se efectuó un segundo paso de desalado con XAD-4, antes de una cromatografía neutra en Sephadex LH-20 con el fin de lograr un fraccionamiento de las toxinas principales. Se recogieron fracciones, eluyendo las falotoxinas ácidas, las falotoxinas neutras y las amanitinas (α -, β -, γ - y ϵ -amanitina). El fraccionamiento fue supervisado por cromatografía líquida de alta resolución en capa delgada (*high performance thin-layer chromatography*: HPTLC). Las fracciones que contenían amanitinas, fueron combinadas y liofilizadas. Estas operaciones en su conjunto no han sido registradas con anterioridad.

Cromatografía líquida de alta resolución en capa delgada (HPTLC). Se utilizaron cromatoplasmas de HPTLC de silicagel 60 F₂₅₄ (Merck) con 2-butanol-acetato de etilo-agua (14:12:5 v/v/v) y cloroformo-metanol-agua (65:25:4 v/v/v). Las manchas se detectaron mediante asperjado con una solución de cinamaldehído en ácido clorhídrico (metanol-ácido clorhídrico concentrado-aldehído cinámico, 15:5:0,3 v/v/v), observando la aparición de color después de 5-10 min a 100 °C. Las manchas de amatoxinas tomaron color violeta y las de falotoxinas color gris-azulado. Estos son colores rápidos, pero muy selectivos y se deben a la reacción del grupo aldehído con el grupo 6-hidroxiindol.

Comportamiento químico. Estos péptidos son compuestos incoloros. Las amatoxinas son muy solubles en metanol, menos solubles en etanol, ligeramente solubles en alcoholes superiores, fácilmente solubles en piridina, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, insolubles en éter etílico, tolueno, ligroína (fracción de éter de petróleo 80-120 °C), cloroformo y acetato de etilo. Las falotoxinas son menos solubles en agua. Como péptidos,

las amatoxinas y las falotoxinas no tienen puntos de fusión netos, pero se descomponen a más de 250-280 °C. α -Amanitina: C₃₉H₅₄N₁₀O₁₄·S₄H₂O, PM 990 (918+72); β -amanitina: C₃₉H₅₃N₉O₁₅·S₃H₂O, PM 973 (919+54); γ -amanitina: C₃₉H₅₄N₁₀O₁₃·4H₂O, PM 974 (902+72).

Preparación del suero contra la toxina de Amanita phalloides. El suero anti-amanitina de conejos se logró mediante la inyección en conejos, durante un año, de un extracto de amanitinas en 1,6-hexanodiamina y glutaraldehído. La presencia de anticuerpos antiveneno se analizó mediante el método de Ouchterlony. La antitoxina fue separada en alícuotas y se mantuvo a -20 °C hasta su uso.

Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE) y Western blot. Se llevó a cabo SDS-PAGE de las muestras en condiciones no reductoras en un gel de poliacrilamida al 10%, con una unidad vertical Miniprotean II (Bio Rad), seguida por la adición de *buffer* de Laemmli (Tris 25 mM pH 6,8, glicerol 10% v/v, SDS 2%, azul de bromofenol 10 μ g/mL). Después de la separación electroforética, las bandas de proteína fueron teñidas con Azul Brillante de Coomassie R-250 (*Coomassie Brilliant Blue R-250*, BioRad) o bien, bloteados durante 1 h en membranas de nitrocelulosa (BioRad), según Towbin *et al.* (20) para la caracterización inmunológica. Se usó un equipo diagnóstico de marcadores de peso molecular (94-14 kDa).

Las membranas fueron bloqueadas durante la noche con leche reducida en grasas al 3% en una solución salina con *buffer* Tris y se incubaron con los diferentes antivenenos hiperinmunes a una dilución de 1:100 durante 1 h a 37 °C. Se utilizaron los sueros normales de caballo y de conejo como controles negativos. Se usó conjugado IgG peroxidasa anti-caballo o anti-conejo (Sigma) como segundo anticuerpo y las bandas de proteína se tiñeron mediante la adición de 4-cloro-1-naftol (Sigma) y peróxido de hidrógeno.

Ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (Enzyme Linked Immunosorbant Assay: ELISA). Placas de 96 pocillos fueron sensibilizadas con una solución al 1,0 mg/mL de cada veneno en *buffer* bicarbonato 50 mM de pH 9,0. Los pocillos se lavaron y se incubaron con diluciones de los antivenenos. Se determinaron los complejos inmunes utilizando conjugado con peroxidasa anticaballo de conejo (Sigma) y la reacción de peroxidasa, como se describió previamente (21).

Los pocillos sensibilizados con suero normal de caballo o con veneno, pero sin antiveneno, se utilizaron como controles negativos.

Ensayos de amanitinas y venenos de serpiente. SDS-PAGE. Se realizó SDS-PAGE en gel de poliacrilamida

al 12% (gel de *stacking* al 4%) en un equipo Mini Protean III. Tiempo de corrida: 3 h 30 min, 200 V, 10 mA para la placa y azul de bromofenol como indicador. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie a temperatura ambiente durante una noche y se trataron con una solución de lavado para visualizar las bandas.

Patrones de Bothrops neuwiedii diporus. Se prepararon los patrones de los venenos de serpientes yarará y de cascabel de la siguiente manera: Se prepararon muestras de 100 µg de cada veneno en 30 µL de *buffer* (pH 6,8 glicerol-urea; indicador: azul de bromofenol) y 1,5 µL de mercaptoetanol (mantenido durante 5 min en un baño de agua). Las muestras de 5 µL de una dilución equivalente a 16 µg de veneno en peso seco se aplicaron a cada placa de electroforesis.

Patrones de veneno y de amanitinas. Se prepararon patrones de veneno y de amanitinas a partir de muestras de 100 µg de cada veneno de serpiente en 4 µL de solución salina normal, a los que se agregaron 700 µg de amanitinas en 6 µL de agua destilada. Después de mezclar e incubar durante 30 min a 37 °C, se agregaron 10 µL de *buffer* y 1 µL de mercaptoetanol (mantenido durante 5 min en un baño de agua). Las muestras de 3,5 µL equivalentes a 16 µg de veneno se aplicaron a cada placa de electroforesis *vs* 116 µg de amanitinas en una proporción aproximada de (1:10) en peso seco.

Patrones de amanitinas. Se prepararon los patrones de amanitinas a partir de muestras de 120 µg de amanitinas en 5 µL de *buffer* y 0,25 µL de mercaptoetanol (mantenido durante 5 min en un baño de agua). Las muestras de 5 µL equivalentes a 114 µg en peso seco se aplicaron a cada placa de electroforesis.

Actividad procoagulante en plasma humano. Ensayos de coagulación. El tiempo normal de coagulación (TC) se determinó en plasma humano fresco, del que se obtuvo la dosis mínima de coagulación (DMC) (DMC: cantidad de veneno que disminuye el TC en 1 min) incubando 0,2 mL de plasma humano fresco con 10 µL de diluciones variables de veneno (30 s a 37 °C), tomando el tiempo de formación de coágulo a partir de la adición de 0,2 mL de una solución acuosa de CaCl₂ 0,025 M. A continuación, 1 mL de la solución correspondiente a DMC se incubó durante 30 seg a 37 °C con 40 µL de cada relación de veneno:amanitinas en peso seco (1:10 y 1:20) y se determinó la inhibición por el veneno de la capacidad de coagulación (ICC) para cada dilución de amanitinas con 10 µL del sobrenadante.

Actividad proteolítica. La actividad proteolítica sobre la gelatina se midió en 5,0 mL (volumen final) de una solución al 2% de gelatina (tipo A de piel porcina, *ca.* 300 Bloom, Sigma) en una solución acuosa de NaCl 0,15 M ajustada a 25 °C a pH 8,0.

Electroforesis rocket (técnica de Laurell). Similar a la difusión simple en agar en la que se incorporó el antisero en el agar que se vertió luego en una placa grande para que se enfriara. Los pocillos fueron cortados a lo largo de un extremo y llenados con soluciones estándar del antígeno o con la solución desconocida. Se estableció entonces una corriente eléctrica a través del agar, que condujo al antígeno en la dirección de la corriente. Luego, el antígeno precipitó cuando la concentración fue igual a aquella en el agar. La altura de los *rockets* fue proporcional a la concentración del antígeno en el pocillo.

Análisis estadístico. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se expresaron como valor medio ± desviación estándar (DE). Cuando resultara conveniente, se presentaron entre paréntesis los intervalos de confianza al 95%. Se usó el ensayo *t* de Student para determinar la significancia estadística de las diferencias entre los grupos.

Resultados

La electroforesis (SDS-PAGE) de los venenos de crocótidos, como *Bothrops neuwiedii diporus*, *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *Crotalus durissus terrificus* y *B. moojeni* se muestra en la Figura 1.

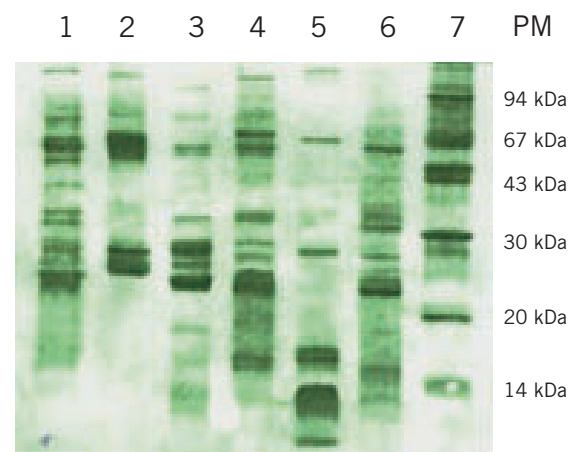


Figura 1. Electroforesis SDS-PAGE de los venenos de serpientes llevada a cabo bajo condiciones no reductoras en un gel al 10%. Las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie. *Carril 1:* veneno de *Bothrops neuwiedii diporus* ("yarará pequeña"). *Carril 2:* veneno de *Bothrops alternatus* ("yarará grande"). *Carril 3:* veneno de *Bothrops jararaca* ("serpiente jararaca"). *Carril 4:* veneno de *Bothrops jararacussu* ("serpiente jararacuzú"). *Carril 5:* veneno de *Crotalus durissus terrificus* ("serpiente de cascabel"). *Carril 6:* veneno de *B. moojeni* ("serpiente caisaca"). *PM:* marcadores de peso molecular.

El análisis por SDS-PAGE de los venenos de *Bothrops* ensayados en este estudio mostró múltiples bandas de proteínas de PM entre 90 y 14 kDa (Fig. 1) como se informara anteriormente (18). Las bandas de proteínas de ca. 15,0-17,0 kDa estaban presentes en el veneno de *B. neuwiedii diporus* y prácticamente ausentes en el veneno de *B. alternatus*, lo cual se correlaciona bien con diferentes contenidos de fosfolipasa A₂ (22-25).

El perfil electroforético (SDS-PAGE) del veneno de *B. neuwiedii diporus* mostró bandas fuertemente teñidas alrededor de 50-60 kDa y 24-30 kDa, de acuerdo a lo informado para otros venenos botrópicos (26).

El patrón electroforético del veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Fig. 1; carril 5) se caracterizó por un bajo número de componentes, con un gran contenido de proteínas de bajo PM (14-15 kDa y menores) y una banda fuerte de 15,0 kDa. Esto está de acuerdo con el alto contenido del complejo de crototoxina [compuesto letal principal; neurotoxina (27) (28)], crotamina [10-15 kDa; secuencia de aminoácidos similar a la de neurotoxinas, toxinas de membrana y fosfolipasas] y convulxina [complejo de lectina tipo C, glicoproteína ácida con dos subunidades: α (13,5 kDa) y β (12,5 kDa) e hidratos de carbono al 5% que indujeron agregación inducida a través de acetilgliceriléter de fosforilcolina] en este veneno. SDS-PAGE en condiciones reductoras mostró dos bandas con movilidades correspondientes a los PMs de 9,5 kDa [subunidad A: una fosfolipasa A₂ básica (PLA₂) o crototoxina B (CB), con actividad directa sobre las plaquetas] y 14,5 kDa [subunidad B: cadena miotóxica, asociada a una proteína ácido no tóxica, llamada crototoxina A (CA) o crotapotina]. Un anticuerpo que disociara el complejo CA-CB neutralizaría la acción *in vitro* e *in vivo* de la crototoxina. Otros componentes: aceptor-receptor GPVI (39) y giroxina (30) que es dos veces más letal que la crotamina.

Los Westernblot realizados con todos los antisueros del Instituto Malbrán utilizados, reconocieron, de manera eficiente, aunque en diferente medida, los componentes de alto (> 40 kDa), medio (40-20 kDa) y bajo (< 20 kDa) PM de todos los venenos de serpientes ensayados. Se observó un alto nivel de reactividad inmunológica cruzada entre los antivenenos homólogos o heterólogos consistentes en fragmentos F(ab')₂ de caballo y los diferentes venenos de *Bothrops* y *C. durissus terrificus* de acuerdo con informes anteriores (18) (31) (32).

Con el fin de estudiar la interacción de los venenos de serpientes y el veneno de abejas con las amanitinas de *Amanita phalloides*, se realizó primero SDS-PAGE del veneno de abejas (Fig. 2).

En el presente estudio se estudiaron las interacciones entre las amanitinas y el veneno de abejas.

Una electroforesis *rocket* del suero de un sujeto intoxicado por la ingestión de *Amanita phalloides* y del veneno de abejas permitió verificar que el suero humano obtenido tras la ingestión de *Amanita phalloides* (com-

puestos tóxicos: amanitinas) reconoció al veneno de abejas como un antígeno.

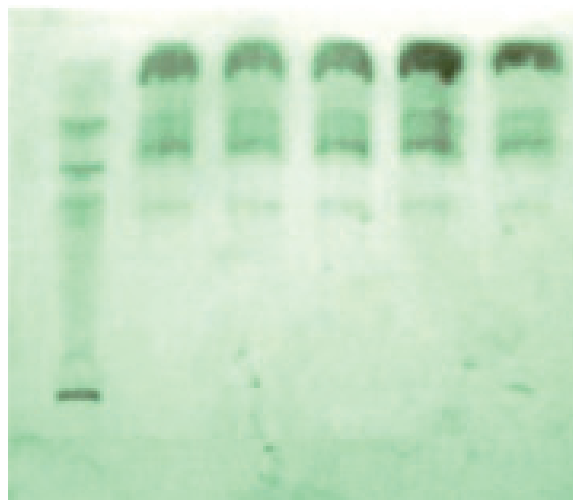


Figura 2. Electroforesis del veneno de abejas.

La electroforesis PAGE del suero de un sujeto intoxicado por ingestión de *Amanita phalloides* desarrollada en un gel embebido con amanitinas (Fig. 3) mostró las manchas de α -amanitina y de β -amanitina en proporción menor. Este suero anti-amanitina entonces se comporta como un suero homólogo.

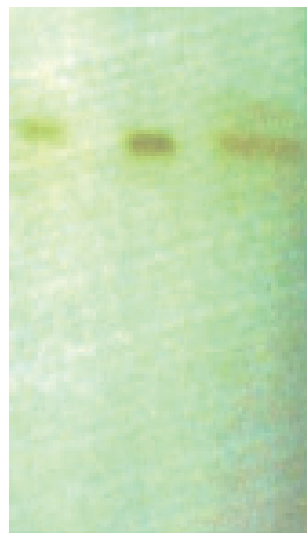


Figura 3. Suero de un sujeto intoxicado por ingestión de *Amanita phalloides* desarrollado en un gel embebido con amanitinas.

La electroforesis PAGE de un suero trivalente anti-botrópico y anticrotático (3-BC) en un gel embebido con amanitinas mostró una respuesta positiva, lo que

indica que las amanitinas son reconocidas como antígenos.

Las amanitinas se compararon con los sueros de conejos inmunizados con veneno de abejas y también con antivenenos de serpientes, como por ejemplo: 1-Bh, 3-BCh, 1-Mh y 1-Ch. Todos los antivenenos de serpientes reconocieron a las amanitinas, pero en diferente medida, como se muestra en el electroferograma PAGE embebido con amanitinas. Se incluyó *Micrurus* como control positivo (17). De acuerdo con las electroforesis *rocket* y PAGE: 1-Bh << 3-BC < 1-Mh < 1-Ch.

Esta reactividad cruzada mostró la eficiencia de 1-Bh, 1-Mh, 1-Ch y 3-BC como sueros heterólogos. Se observó reactividad cruzada y disminuyó desde el suero univalente de *Crotalus* al suero de *Bothrops*.

El antiveneno de amanitinas se ensayó también contra el veneno de *Crotalus* a fin de evaluar la reactividad cruzada. Por lo tanto, la electroforesis PAGE del suero de un sujeto intoxicado con *A. phalloides* se aplicó a un gel embebido con veneno de *Crotalus durissus terrificus* mostrando la presencia de una mancha principal.

Los sueros de conejos inmunizados con veneno de abejas se ensayaron contra las amanitinas (gel embebido con amanitinas), dando una respuesta positiva, que junto con los resultados de la electroforesis *rocket* del suero del sujeto intoxicado con amanitinas y del veneno de abejas, muestra la reactividad cruzada del veneno de abejas y de las amanitinas.

En cuanto a la inhibición de la actividad proteolítica sobre la gelatina, las metaloproteasas de los venenos son capaces de hidrolizar la gelatina.

En las condiciones experimentales, el veneno de *C. durissus terrificus* no pudo licuar la gelatina aún a una concentración de 1,0 mg/mL. Por otra parte, de acuerdo con su alta actividad proteolítica (33) todos los venenos de *Bothrops* ensayados produjeron licuación completa de la gelatina. La preincubación de los venenos con todos los antivenenos ensayados (incluido 1-Ch) inhibió completamente la licuefacción de la gelatina inducida por los venenos.

El perfil electroforético del veneno de *Bothrops neuwiedii diporus* (Fig. 4; carril 2) se modificó después de la incubación con diluciones de amanitinas (Fig. 4; carril 3). Se observó la disminución de la intensidad de las siguientes bandas de veneno por la acción de las amanitinas:

- 52,3 kDa ++ representa a las enzimas activantes de la protrombina [algunas son metaloproteinasas (34)];
- 40,9 kDa +; 38,2 kDa +; 34,5 kDa +; 26,1 kDa ++ representan a la botroalternina (tipo lectina, inhibidora de la trombina) y botrocetina (coaglutinina de plaquetas);
- 18,9 kDa y 16,6 kDa + corresponden a fosfolipasas (estas enzimas desempeñan un papel importante en la cascada que conduce a la respuesta inflama-

toria y al dolor). La mayoría de las miotoxinas de crotálicos son fosfolipasas y algunas presentan actividad proteolítica.

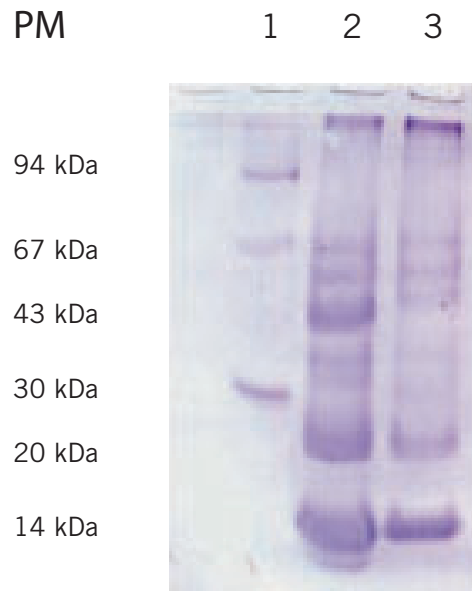


Figura 4. SDS-PAGE del veneno de *Bothrops neuwiedii diporus* "yarará pequeña". Carril 1: marcadores de PM. Carril 2: Patrón del veneno de *Bothrops neuwiedii diporus* Cope ("yarará pequeña"). Carril 3: Veneno de *B. neuwiedii diporus* preincubado con amanitinas.

La interacción entre las amanitinas y el veneno de *Bothrops neuwiedii diporus* se evidenció por la corrección del 26% y el 38% de los ensayos de coagulación debido a las relaciones 1:10 y 1:20 entre veneno: amanitinas respectivamente.

El perfil electroforético del veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Fig. 5; carril 1) se modificó después de la incubación con amanitinas (Fig. 5; carril 2). Por la acción de las amanitinas se observó que se modificaban las bandas del veneno de *Crotalus durissus terrificus* correspondientes a los siguientes PMs:

- desaparecieron las bandas correspondientes a 70 kDa y 38 kDa, y
- disminuyó la intensidad de las bandas correspondientes a las fosfolipasas de 18,9 y 16,6 kDa.

En cuanto al TC, como se esperaba el veneno de *Crotalus durissus terrificus* se caracterizó por una actividad procoagulante pobre.

En los ensayos de coagulación, el tiempo de coagulación (TC) del plasma humano normal fue de 133 segundos, mientras que el TC del plasma humano en presencia del veneno de *B. neuwiedii diporus* fue de 58 segundos (DMC 10 µg/mL).

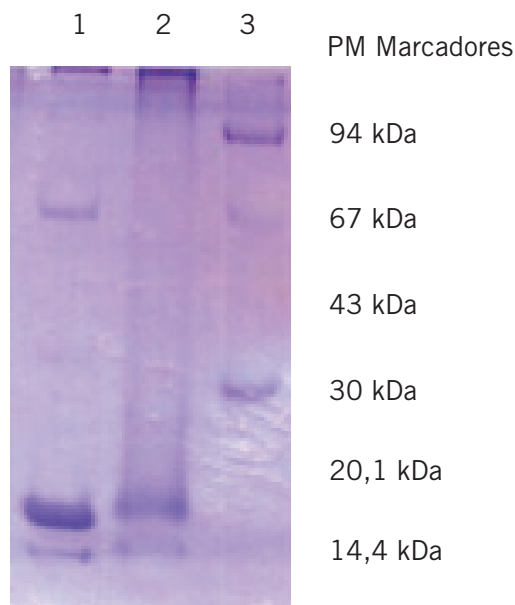


Figura 5. SDS-PAGE del veneno de *Crotalus durissus terrificus* ("serpiente de cascabel"). Carril 1: Patrón del veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Carril 2: Veneno de *C. d. terrificus* preincubado con amanitinas. Carril 3: Marcadores de PM.

El TC de plasma humano con veneno preincubado a 37 °C durante 30 minutos con una relación 1:10 de veneno:amanitinas resultó en 77,3 segundos (valor promedio de cuatro determinaciones; $p = 0,001$; corrección del 26%), mientras que con una relación 1:20 de veneno:amanitinas fue de 86,5 segundos (valor promedio de cuatro determinaciones; $p = 0,001$; corrección del 38%).

Aplicando el método estadístico t de Student para determinar si las diferencias observadas entre ambas relaciones eran estadísticamente significativas, se obtuvo $p = 0,002$, lo que implica que la corrección de TC fue dependiente de la concentración de las amanitinas.

De acuerdo con estos resultados, la acción coagulante del veneno de la yarará pequeña también fue corregida significativamente por las amanitinas.

Discusión

Las serpientes venenosas de la Argentina pertenecen a la familia Viperidae, subfamilia Crotalinae, género *Bothrops* (nombre común: "serpientes yarará") y *Crotalus* ("serpientes de cascabel"), y a la familia Elapidae, subfamilia Elapinae, género *Micrurus* ("serpientes coral"). La potencia letal de los venenos de las cuatro especies americanas de *Micrurus*, algunas características bioquímicas e inmunoquímicas, y la actividad neutralizante de los antivenenos se han registrado anteriormente (35).

Los crotálicos están muy extendidos, dando lugar a diferencias en la composición del veneno según el origen geográfico (36). El noreste de Argentina es parte de los hábitats de *Bothrops alternatus*, *B. neuwiedii diporus* y *Crotalus durissus terrificus* y es la única región en la que se puede encontrar *B. jararaca* y *B. jararacussu* (37).

Los venenos de los *Bothrops* de América del Sur mostraron una variedad de actividades coagulantes, defibrinantes, líticas y fibrinogenolíticas (38-40). *Bothrops neuwiedii diporus* Cope es una subespecie muy común en el noreste de Argentina, desde el norte de la Provincia de Entre Ríos hasta el sur de Paraguay y el sudeste de Brasil (Río Grande do Sul). Se encuentra en ambientes algo más secos o más pedregosos que los de *B. alternatus*. *B. n. diporus* es responsable de un cierto número de mordeduras de serpientes en Argentina y contiene un veneno más activo que el de *B. alternatus* (41).

Existen variaciones intraespecíficas dentro de la especie, por ejemplo: variación en la actividad miotóxica de los venenos de *B. neuwiedii* de diferentes regiones geográficas de Brasil y una alta actividad neurotóxica de algunos venenos asociados a la presencia de una banda en el electroferograma PAGE de proteínas básicas (42).

El veneno de *Crotalus durissus terrificus* es neurotóxico, miotóxico sistémico con actividad tipo trombina y nefrotóxico (43-45). La variación intraespecífica en los venenos de serpientes de cascabel de América del Sur también se ha registrado con anterioridad (46).

Como *Bothrops alternatus*, *B. neuwiedii diporus* y *Crotalus durissus terrificus* son especies de serpientes con una distribución geográfica más amplia en el centro y norte de Argentina, sus venenos fueron seleccionados para este estudio.

Como era de esperar, todos los antivenenos neutralizaron la potencia letal de los venenos ensayados, ya sea usados o no como inmunógenos. De acuerdo con la alta reactividad cruzada entre los antivenenos botrópicos y venenos de *Bothrops* (18), se encontró un alto grado de neutralización cruzada de sus actividades tóxicas. Todos los antivenenos ensayados (incluido el anticrotálico) fueron muy efectivos en la neutralización de las actividades hemorrágicas, necrotizantes, procoagulantes y proteolíticas (18).

Las abejas mieleras pertenecen al orden Hymenoptera, Familia: Apidae, Género: *Apis*. *Apis mellifera mellifera* (abeja de color negro o abeja alemana o abeja europea), *A. m. ligustica* (abeja italiana), *A. m. carnica* y *A. m. caucasica* son las abejas más frecuentes en América (47).

El veneno de *Apis mellifera* se compone de una mezcla compleja de sustancias, siendo la mayoría de las proteínas neutras o con un punto isoeléctrico básico (48). La mayoría de ellas son enzimas, péptidos y aminos biogénicas con propiedades farmacológicas y alergénicas, siendo venenosos para los mamíferos (49) (50). El veneno puede producir hemólisis debido a la acción sinérgica de la melitina y de la fosfolipasa A_2 (PLA₂) (51)

y miotoxicidad, por ejemplo: bloqueo neuromuscular, y puede conducir a parálisis respiratoria (50) (52). El veneno causa lesiones renales porque tanto la hemoglobina como la mioglobina pueden precipitar en los túbulos renales y conducir a insuficiencia renal aguda, una de las complicaciones más graves en este tipo de envenenamiento (53) (54).

Los componentes principales son: melitina (26 aminoácidos, PM ca. 3,0 kDa) que activa la fosfolipasa C y también puede activar PLA₂ tisular en forma similar a las cardiotoxinas de los elápidos y PLA₂ (del grupo III) que también son alérgenos junto con la hialuronidasa (55). Otros componentes del veneno de *Apis mellifera* son: lipasas y fosfatasas; apamina (neurotóxico a nivel central y periférico); péptido desgranulador de mastocitos (del inglés: *mastocyte degranulator peptide*, MDG-P) que produce la liberación de autacoides como derivados del ácido araquidónico, histamina y serotonina; sustancias biogénicas, como: histamina, serotonina, dopamina, noradrenalina, bradiquinina y la sustancia de reacción lenta en pequeñas cantidades. Otros péptidos son: secaparina y procamina, al parecer sin toxicidad para el hombre (52) (53) y tertiapina, que contiene 21 aminoácidos (56).

Se obtuvieron los antivenenos que experimentalmente neutralizaron las actividades biológicas del veneno de *A. mellifera* (53) (57).

Los sueros de conejos inmunizados con veneno de abejas se ensayaron contra las amanitinas dando una respuesta positiva, que junto con los resultados de la electroforesis *rocket* del suero del sujeto intoxicado con amanitinas y del veneno de abejas, muestra la reactividad cruzada del veneno de abejas y de las amanitinas.

La hidrólisis enzimática de la gelatina causa la licuefacción total e irreversible de la muestra, que resulta incapaz de solidificar aún a 4 °C y este efecto se ha utilizado para detectar la actividad proteolítica (19) (21) (58) (59).

Algunas plantas también se usaron para el tratamiento de mordeduras de serpientes y picaduras de alacrán (60) (61). Los compuestos de origen vegetal inhibieron la actividad proteolítica de los venenos y antagonizaron las actividades hemolíticas, miotóxicas y hemorrágicas inducidas por crotalina del veneno de crotálicos (62). Los compuestos como el citrato pueden inhibir la actividad de proteasa de algunos venenos formando un complejo con el cinc de las enzimas dependientes de zinc (63).

La neutralización de los péptidos, polipéptidos, proteínas y enzimas de los venenos, como se describe en este artículo, causa una reducción de la intensidad de los efectos del envenenamiento.

La interacción entre las amanitinas y el veneno de *Bothrops neuwiedii diporus* se evidenció por la corrección del 26% y el 38% de los ensayos de coagulación debido a las relaciones 1:10 y 1:20 entre veneno: amanitinas respectivamente.

Es evidente que existe una interacción de las amanitinas (ciclopéptidos de *Amanita*) con las enzimas y las toxinas de los venenos de las serpientes yarará pequeña y de cascabel. Las intensidades de las bandas afectadas de la electroforesis de la yarará pequeña correspondieron a las enzimas relacionadas con la acción procoagulante y a la acción hemolítica indirecta del veneno.

La inhibición de la actividad procoagulante en el plasma humano y la inhibición de la actividad hemolítica por los antivenenos ya han sido registradas previamente (18). Sin embargo, la inhibición por amanitinas se informa aquí por primera vez.

Cuando los venenos de *B. neuwiedii diporus* y de *C. d. terrificus* se incubaron con las amanitinas, algunas bandas se redujeron notablemente. La modificación del TC del plasma humano causado por *Bothrops neuwiedii diporus* fue neutralizado significativamente ($p < 0,001$) por las amanitinas, como se demuestra en este trabajo.

Las fosfolipasas A₂ pueden estar involucradas en esta reactividad cruzada y en la neutralización observadas. Por otra parte, los antivenenos de serpientes producen la inhibición de la actividad de PLA₂ en cierta medida, dependiendo la especificidad del contenido en PLA₂ del veneno (18). Sin embargo, el veneno botrópico con la menor actividad de fosfolipasa A₂ es el de *B. alternatus*, el cual fue fuertemente inhibido por todos los antivenenos ensayados, mientras que el producido por el veneno botrópico con la mayor actividad de fosfolipasa A₂ (*B. neuwiedii diporus*) fue fuertemente inhibido por los antivenenos botrópicos pero sólo poco inhibido por el suero antiofídico I-Ch.

Las fosfolipasas A₂ (PLA₂) muestran una alta homología en las secuencias de aminoácidos y en las estructuras terciarias (64) y, por tanto, puede estar ocurriendo una alta inhibición cruzada incluso con antivenenos heterólogos.

La mayoría de los componentes proteicos de los venenos de abejas, de serpientes Crotalinae y de *Amanita phalloides* mostraron aquí reacción cruzada con los antivenenos de serpientes, con las anti-amanitinas y con el antiveneno de abejas. Estos resultados están en parte de acuerdo con trabajos anteriores sobre la relación antigénica entre los venenos de *Bothrops* (26), así como sobre la reactividad cruzada y la neutralización heteróloga de los venenos botrópicos (18). Sin embargo, éste es el primer informe sobre la reactividad cruzada mostrada por las amanitinas y el veneno de abejas con los venenos de Crotalinae.

Los estudios de neutralización cruzada sugirieron que el uso de antivenenos heterólogos podría tener ventajas terapéuticas sobre el uso de los sueros homólogos. Las diferencias observadas en la capacidad neutralizante podrían explicarse suponiendo la presencia de diferentes determinantes antigénicos en los venenos ensayados.

Conclusiones

Los componentes de las proteínas de los venenos de serpientes y del veneno de abejas presentan cierta similitud estructural desde el punto de vista químico (en lo referente a la estereoquímica y la distribución de cargas) entre sí y por las amanitinas. Esta similitud, de acuerdo con el presente trabajo, también se mantiene desde el punto de vista inmunológico, lo cual puede ser utilizado en la terapia clínica. Los anticuerpos producidos con las amanitinas mostraron reactividad cruzada con el veneno de abejas y los venenos de serpientes.

La mayoría de los componentes proteicos de los venenos de abejas, de serpientes Crotalinae y de *Amanita phalloides* mostraron aquí reacción cruzada con los antivenenos de serpientes, con las anti-amanitinas y con el antiveneno de abejas. Estos resultados sobre la reactividad cruzada mostrada por las amanitinas y el veneno de abejas con los venenos de Crotalinae se informan por primera vez en este trabajo. La alta reactividad cruzada encontrada entre los venenos y los diferentes antivenenos, como: veneno de abejas y suero anti-amanitinas y viceversa; antivenenos de serpientes y amanitinas, incentiva el uso de inmunógenos con epítomos comunes con el fin de inducir anticuerpos con actividad neutralizante contra una variedad de proteínas tóxicas. Una mezcla de cualquiera de los compuestos tóxicos, por ejemplo: neurotoxinas, miotoxinas, factores procoagulantes, o venenos que contengan estos antígenos, puede ser adecuada para la obtención de antivenenos heterólogos que muestren mayor especificidad y eficiencia de neutralización para el tratamiento de la intoxicación por *Amanita phalloides*, mordeduras de crotálicos o picaduras de abejas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado financieramente en parte por la Universidad de Buenos Aires, la Universidad Nacional del Nordeste y CONICET (Argentina). ABP y AAV son Miembros de la Carrera de Investigador Científico del CONICET.

Los autores desean agradecer al Centro de Producción de Sueros Antiofídicos (CEPSAN; Corrientes, Provincia de Corrientes, Argentina) por la provisión de los venenos de serpientes; y al Dr. Adolfo R. de Roodt (Instituto Nacional de Producción de Biológicos, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires, Argentina) por los sueros antiofídicos.

CORRESPONDENCIA

DRA. ALICIA B. POMILIO
IBIMOL (ex PRALIB) (UBA-CONICET)
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires
Junín 956
C1113AAD BUENOS AIRES, Argentina.
E-mail: pomilio@ffybu.uba.ar
Tel/Fax: +(54 011) 4814-3952

Referencias bibliográficas

- Vetter J. Toxins of *Amanita phalloides*. *Toxicon* 1998; 36: 13-24.
- Battista ME. Tesis de Doctorado. Ph D Diss. Respuesta química, fraccionamiento y síntesis de macrocomponentes del hongo *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Secr. y su potencial aplicación tecnológica. Directora: Prof. Dr. A B Pomilio, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, 1999.
- Wieland T, Gotzendorfer C, Zanotti G, Vaisius AC. The effect of the chemical nature of the side chains of amatoxins in the inhibition of eukaryotic RNA polymerase B. *Eur J Biochem* 1981; 117: 161-4.
- Wieland T. Poisonous principles of mushrooms of the genus *Amanita*: Four-carbon amines acting on the central nervous system and cell-destroying cyclic peptides are produced. *Science* 1968; 159: 946-52.
- Wieland T, Faulstich H. Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: the biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. *CRC Crit Rev Biochem* 1978; 5: 185-260.
- Pomilio AB, Battista ME, Vitale AA. Naturally occurring cyclopeptides: Structures and bioactivity. *Curr Org Chem* 2006; 10: 2075-121.
- Pomilio AB, Battista ME, Vitale AA. Estructuras de las toxinas de hongos superiores. *Industria y Química* 2006; (352): 19-27.
- Battista M, Vitale A, Pomilio AB. Relationship between the conformation of the cyclopeptides isolated from the fungus *Amanita phalloides* (Vaill. Ex Fr.) Secr. and its toxicity. *Molecules* 2000; 5: 489-90.
- Pomilio AB, Battista ME, Vitale AA. Semiempirical AM1 and ab initio parameters of the lethal cyclopeptides α -amanitin and its related thioether, S-sulphoxide, sulphone, and O-methyl derivative. *J Mol Struct (Theorchem)* 2001; 536: 243-62.
- Bushnell DA, Cramer P, Kornberg RD. Structural basis of transcription: α -amanitin-RNA polymerase II cocrystal at 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 (3): 1218-22.
- Gong XQ, Nedialkov YA, Burton ZF. α -Amanitin blocks translocation by human RNA polymerase II. *J Biol Chem* 2004; 279: 27422-7.
- Kang X, Hu Y, Li Y, Guo X, Jiang X, Lai L, Xia B, Jin C. Structural, biochemical, and dynamic characterizations of the hRPB8 subunit of human RNA polymerases. *J Biol Chem* 2006; 281: 18216-26.
- Goede B, Naji S, von Kampen O, Ilg K, Thomm M. Protein-protein interactions in the archaeal transcriptional machinery: Binding studies of isolated RNA polymerase subunits and transcription factors. *J Biol Chem* 2006; 281: 30581-92.
- Phatnani HP, Greenleaf AL. Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev* 2006; 20: 2922-36.
- Thomas MC, Chiang C-M. The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2006; 41: 105-78.

16. Letschert K, Faulstich H, Keller D, Keppler D. Molecular characterization and inhibition of amanitin uptake into human hepatocytes. *Toxicol Sci* 2006; 91: 140-9.
17. Battista M, Rodríguez R, Vitale A, Pomilio AB, Albonico A, Alonso A. Reactividad cruzada entre los venenos de serpiente, de abeja y las toxinas del hongo *Amanita phalloides*. *Medicina (Buenos Aires)* 2004; 64: 66-7.
18. de Roodt AR, Dolab JA, Fernández T, Segre L, Hajos SE. Cross-reactivity and heterologous neutralization of Crotaline antivenoms used in Argentina. *Toxicon* 1998; 36: 1025-38.
19. de Roodt AR, Dolab JA, Galarce PP, Litwin S, Gould E, Dokmetjian JC, et al. A study on the venom yield of venomous snake species from Argentina. *Toxicon* 1998; 36: 1949-58.
20. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4.
21. de Roodt AR, Dolab JA, Segre L, Simoncini C, Hajos SE, Fernández T, et al. Immunochemical reactivity and neutralizing capacity of a polyvalent antiviper (European) antivenom on enzymatic and toxic activities in the venoms of crotalids from Argentina. *J Anim Ven Toxins* 1999; 5: 67-83.
22. Vidal JC, Stoppani AOM. Isolation and purification of two phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedii* venom. *Arch Biochem Biophys* 1971; 145: 543-56.
23. Vidal JC, Stoppani AOM. Isolation and properties of an inhibitor of phospholipase A from *Bothrops neuwiedii* venom. *Arch Biochem Biophys* 1971; 147: 66-76.
24. Nisenbom HE, Seki C, Vidal JC. Phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. *Toxicon* 1986; 24: 259-72.
25. de Roodt AR. Tesis de Doctorado. Ph D Diss. Estudio Inmunobiológico del Veneno de Serpientes de Importancia Sanitaria de la Argentina. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, 2002.
26. Moura da Silva AM, D'Imperio Lima MR, Nishikawa AK, Brodskin CI, Dos Santos MC, Furtado MF, et al. Antigenic cross reactivity of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops*. *Toxicon* 1990; 28: 181-8.
27. Rangel-Santos A, Lima C., Lopes-Ferreira M, Cardoso DF. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon* 2004; 44: 609-16.
28. Santos KF, Murakami MT, Cintra ACO, Toyama MH, Marangoni S., Forrer VP, et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the heterodimeric crotoxin complex and the isolated subunits crotapotin and phospholipase A₂. *Acta Crystallogr Sect F* 2007; 63: 287-90.
29. Francischetti IM, Saliou B, Leduc M, Carlini CR, Hatmi M, Randon J, et al. Convulxin, a potent platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom, specifically binds to platelets. *Toxicon* 1997; 35: 1217-28.
30. Barrabin H, Martirena JL, Vidal JC, Barrio A. Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. En: Rosember P, editor. *Toxins: Animal, Plants and Microbial*. Oxford: Pergamon Press. p. 113, 1978.
31. Clement H, González C, de Roodt A, Litwin S, Olvera F, Alagón A. Cross reactions and heterologous neutralization of antivenoms used in Mexico and Argentina. *J Venom Anim Toxins* 2001; 7: 320.
32. Howes J-M, Theakston RDG, Laing GD. Neutralization of the haemorrhagic activities of viperine snake venoms and venom metalloproteinases using synthetic peptide inhibitors and chelators. *Toxicon* 2007; 49: 734-9.
33. Bjarnasson B, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac Ther* 1994; 62: 3285-72.
34. Govers-Riemslog JWP, Knapen MJH, Tans G, Zwaal RF, Rosing J. Structural and functional characterization of a prothrombin activator from the venom of *Bothrops neuwiedii*. *Biochim Biophys Acta* 1987; 916: 388-401.
35. de Roodt AR, Paniagua Solís JF, Dolab JF, Estévez-Ramírez J, Ramos-Cerrillo B, Litwin S, et al. Effectiveness of two common antivenoms for North, Central, and South American *Micrurus* envenomations. *J Toxicol Clin Toxicol* 2004; 42: 171-8.
36. Jorge MT, Ribeiro LA. Envenoming by the South American pit viper *Bothrops neuwiedii* Wagler. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94: 731-4.
37. Teixeira-Ferreira A, Walter Alves E. Characterization of a novel ADPase in *Bothrops jararaca* snake venom involved in nucleotide hydrolysis. *Protein Pept Lett* 2007; 14: 395-402.
38. França SC, Kashima S, Roberto PG, Marins M, Ticli FK, Pereira JO, et al. Molecular approaches for structural characterization of *Bothrops* L-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 355: 302-6.
39. Pérez AV, Saravia P, Rucavado A, Sant'Ana CD, Soares AM, Gutiérrez JM. Local and systemic pathophysiological alterations induced by a serine proteinase from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Toxicon* 2007; 49: 1063-9.
40. Pimenta DC, Prezoto BC, Konno K, Melo RL, Furtado MF, Camargo ACM, et al. Mass spectrometric analysis of the individual variability of *Bothrops jararaca* venom peptide fraction. Evidence for sex-based variation among the bradykinin-potentiating peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007; 21: 1034-42.
41. Koscinczuk P, Borda JT, Maruňák SL, Acosta de Pérez O, Mussart de Coppo N. Daño renal en ratas inducido por veneno de *Bothrops neuwiedii* diporus de Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 2004; 64: 320-4.
42. Borja-Oliveira CR, Soares AM, Zamunér SR, Hyslop S, Giglio JR, Prado Franceschi J, et al. Intraspecific variation in neurotoxic and myotoxic activities of *Bothrops neuwiedii* snake venoms. *J Venom Anim Toxins* 2002; 8: 88-101.

43. Hernández Cruz A, Mendonça RZ, Petricevich VL. *Crotalus durissus terrificus* venom interferes with morphological, functional, and biochemical changes in murine macrophage. *Mediat Inflamm* 2005; (2005): 349-59.
44. Bueno LGF, Leite GB, Cruz-Höfling MA, Rodrigues-Simioni L, Oshima-Franco Y. Effects of manganese (Mn²⁺) on neurotoxic and myotoxic activities induced by *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararacussu* venoms in chick biventer cervicis preparations. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2007; 13: 479-99.
45. Mendes Carneiro S, Fernandes W, Stefanini Sant'Anna S, Yamanouye N. Microvesicles in the venom of *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae). *Toxicon* 2007; 49: 106-10.
46. Francischetti IMB, Gombarovits MEC, Valenzuela JG, Carlini CR, Guimarães JA. Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*). *Comp Biochem Physiol* 2000; 127C: 23-36.
47. de Roodt AR, Salomón OD, Orduna TA, Robles Ortiz LE, Paniagua Solís JF, Alagón Cano A. Envenenamiento por picaduras de abeja. *Gac Méd Méx* 2005; 141: 215-22.
48. Leluk J, Schmidt J, Jones D. Comparative studies on the protein composition of hymenopteran venom reservoirs. *Toxicon* 1989; 27: 105-14.
49. Ebeling W. Pests Attacking Man and His Pets. En: *Urban entomology*. University of California, Div of Agricultural Sciences, Riverside, pp. 353-93, 2002.
50. De Medeiros CR, De Siqueira Franca FO. 2003. Acidentes por Abelhas e Vespas. En: Costa Cardoso JL, de Siqueira Franca FO, Wen FH, Sant'Ana Málaque CM, Haadad Jr V, editores. *Animais Peconhentos no Brasil*. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. Cap. 26, Sao Paulo: Ed. Sarvier, FAPESP. pp. 243-51, 2003.
51. Cottrell RC. 1981. Phospholipase A₂ from bee venom. *Meth Enzymol* 1981; 71: 698-702.
52. Haberman E. Chemistry, Pharmacology, and Toxicology of Bee, Wasp and Hornet Venoms. En: Bucherl W, Buckley EE, editores. *Venomous Animals and their Venoms*. Volumen II, Londres: Academic Press. pp. 61-89, 1971.
53. Azevedo-Marques MM, Fujii AA, Verceze AV, Arantes MR, Soares AEE, Higashi HG. Anti-bee venom serum: preliminary tests. *J Venom Anim Toxins* 1997; 3: 244.
54. Bresolin NL, Carvalho LC, Goes EC, Fernandes R, Barotto AM. Acute renal failure following massive attack by Africanized bee stings. *Pediatr Nephrol* 2002; 17: 625-7.
55. Markovic-Housley Z, Miglierini G, Soldatova L, Rizkallah PJ, Muller U, Schirmer T. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure Fold Des* 2000; 8: 1025-35.
56. Drici MD, Diocot S, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M. The bee venom peptide tertiapin underlines the role of I(KACh) in acetylcholine-induced atrioventricular blocks. *Br J Pharmacol* 2000; 131: 569-77.
57. Jones RGA, Corteling RL, To HP, Bhogal G, Landon J. A novel Fab-based antivenom for the treatment of mass bee attacks. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 361-6.
58. de Roodt AR, Dolab JA, Hajos SE, Gould E, Dinápoli H, Troiano JC, et al. Some toxic and enzymatic activities of *Bothrops ammodytoides* ("yará ñata") venom. *Toxicon* 2000; 38: 49-61.
59. Moreira V, Zamuner SR, Wallace JL, Pereira Teixeira C de F. *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms elicit distinct responses regarding to production of prostaglandins E₂ and D₂, and expression of cyclooxygenases. *Toxicon* 2007; 49: 615-24.
60. Lans C, Harper T, Georges K, Bridgewater E. Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad. *BMC Complement Altern Med* 2001; 1: 10-9.
61. Martins Melo M, Lúcia M, Habermehl GG. Plant extracts for topic therapy of *Bothrops alternatus* envenomation. *Rev Bras Farmacogn* 2007; 17: 29-34.
62. Melo PA, Ownby CL. Ability of wedelolactone, heparin, and para-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA₂ myotoxins. *Toxicon* 1999; 37: 199-215.
63. Odell GV, Ferry PC, Vick LM, Fenton AW, Decker LS, Cowell RL, et al. Citrate inhibition of snake venom proteases. *Toxicon* 1998; 36: 1801-6.
64. Arni RK, Ward RJ. Phospholipase A₂ - A structural review. *Toxicon* 1996; 34: 827-41.

Aceptado para su publicación el 30 de marzo de 2012