



Resistencia natural a los venenos de serpientes

Vitelbina Núñez Rangel¹
Rafael Otero Patiño²

Resumen

La resistencia natural de algunos animales a los venenos de serpientes se ha logrado demostrar en el suero sanguíneo de mamíferos (Zarigüeyas, erizos, mangostas) y de serpientes. En este artículo se presenta el estado actual del conocimiento acerca de estas proteínas que no son anticuerpos, los métodos de caracterización y los mecanismos de acción de las mismas.

Palabras Clave

Venenos de serpientes, Hemorraginas, Neurotoxinas, Miotoxinas, Resistencia Natural.

INTRODUCCIÓN

Cien años después de que Calmette introdujera la terapia con antivenenos, ésta continúa siendo el único tratamiento específico para las mordeduras de serpientes, problema importante de salud pública en América Latina¹⁻³. Algunas de las dificultades asociadas con este problema son la insuficiente producción y disponibilidad de antivenenos en los lugares apartados donde ocurren los accidentes, y la falta de programas de vigilancia epidemiológica⁴. Adicionalmente, los antivenenos pueden desencadenar reacciones de hipersensibilidad en los pacientes y no han logrado solucionar todos los problemas relacionados con el accidente ofídico, en especial el daño tisular local inducido por los venenos de los vipéridos⁵. En consecuencia, la búsqueda de alternativas coadyuvantes del tratamiento con antivenenos tiene plena justificación.

¹ Bacterióloga Magister en Ciencias, Investigador programa de Ofidismo en Antioquia y Chocó, Universidad de Antioquia.

² Profesor titular Departamento de Pediatría y Coordinador Programa de Ofidismo en Antioquia y Chocó, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

Correspondencia:

Vitelbina Núñez, Programa de Ofidismo, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, A.A. 1226, Medellín, Colombia. Fax: 263 19 14.

E-mail: serpent@catios.udea.edu.co

Por otra parte, las serpientes son parte indispensable de la cadena alimenticia, factor determinante en el mantenimiento del equilibrio ecológico. Ellas son predadoras de insectos, aves, pequeños mamíferos, peces, batracios y reptiles incluyendo serpientes; y estas a su vez son presa de otros animales tales como aves rapaces, gallináceas, arañas (*Mygalomorphae*) y de algunos mamíferos como felinos, puercos, marsupiales y otros. Es apenas lógico pensar que en los animales predadores de serpientes existe algún mecanismo de resistencia natural al veneno inyectado por el reptil como defensa cuando se siente amenazado o capturado. A su vez, resulta también lógico pensar que las serpientes venenosas pueden sufrir laceraciones en su cavidad oral durante la captura y deglución de su presa y que, por lo tanto, deben poseer resistencia a su propio veneno.

La resistencia de algunos animales a los venenos de serpientes se conoce desde 1781 por el reporte de Fontana sobre la elevada resistencia de las serpientes venenosas a su propio veneno, quien postuló además que esa resistencia era independiente de la dosis. Ya en el siglo XIX se aclara este concepto y se determina que la resistencia no es absoluta y es dependiente de la dosis e interespecífica en las serpientes⁶.

Surge el interrogante de si esta resistencia es el resultado de la tolerancia de sus tejidos (V.gr. tejido adiposo) o se debe a la presencia de anticuerpos heredados (antitoxinas) o adquiridos por inmunización natural en el campo⁶. Por los estudios realizados hasta ahora se sabe que los factores neutralizantes no tienen semejanza con las inmunoglobulinas; parecen estar relacionados con las proteínas de fase aguda (μ -globulinas) encontradas en los mamíferos⁷.

Muchas serpientes venenosas son resistentes a su propio veneno, pero no al de otras serpientes, excepto si son especies estrechamente relacionadas⁸; el suero sanguíneo de los vipéridos muestra una alta protección cruzada contra los venenos de especies de su propia familia; sin embargo, algunas especies de colúbridos y elápidos presentan resistencia al veneno de los vipéridos, lo cual sugiere que los vipéridos pertenecen a un grupo primitivo más antiguo y que los factores neutralizantes de la sangre, filogenéticamente se desarrollaron más temprano en los vipéridos, concomitantemente con el desarrollo de la producción de veneno. Los elápidos quizás evolucionaron recientemente junto con los mecanismos especiales de resistencia para su veneno y al de los vipéridos. Algunos mamíferos como la mangosta (*Herpestes sp.*), el erizo (*Erinaceus sp.*), las zarigüeyas (*Didelphis sp.*) son resistentes a altas dosis de veneno de vipéridos y elápidos^{9,10}.

MECANISMOS DE ACCION Y CARACTERISTICAS DE LOS FACTORES AISLADOS

Se han propuesto dos mecanismos de acción para explicar la resistencia natural a los venenos de serpientes:

1. El blanco biológico de la toxina (V.gr. receptor) se ha vuelto insensible a ésta, debido a modificaciones genéticas que causan cambios en su estructura primaria. Por ejemplo, los receptores de la acetilcolina en el músculo de las serpientes pertenecientes a la familia de los elápidos y en la mangosta (*Herpestes ichneuman*), son insensibles a la bungarotoxina del veneno de la Krait *Bungarus multicinctus* y a la cobrotoxina de la cobra *Naja naja*, neurotoxinas que actúan a nivel postsináptico por unión a los receptores de acetilcolina⁸.
2. Existen factores neutralizantes en el suero sanguíneo de los animales resistentes, los cuales se unen a las toxinas en circulación y evitan la llegada a su blanco para desencadenar el daño^{8,9}. Este fue el primer mecanismo propuesto y el más estudiado hasta la fecha.

Estos factores son proteínas ácidas con un peso molecular de 50-100 kDa y, con pocas excepciones, alcanzan pesos superiores a los 500 kDa. Es el caso de los factores aislados del erizo europeo (*E. europaeus*) y de la serpiente colúbrido acuática *Natrix tessellata*, que tienen un peso de 780 y 880 kDa, respectivamente. Estas proteínas son estables a temperaturas de 0-80 °C y a un pH de 2-11. No tienen actividad proteolítica y no forman precipitados con el veneno de serpiente en pruebas de inmunodifusión; no son inmunoglobulinas ni enzimas; se clasifican como proteínas similares a la albúmina y las macroglobulinas, o más específicamente se definen como glicoproteínas, con excepción del factor aislado del suero del erizo europeo que no es glicosilado^{6,8,10}.

Los métodos de aislamiento y caracterización de estos factores inhibidores incluyen técnicas cromatográficas, electroforesis (SDS-PAGE), determinación de la secuencia de aminoácidos, inmunodifusión, inmunoelectroforesis y pruebas de neutralización de efectos biológicos producidos por el veneno tales como la hemorragia y la letalidad^{6,8}.

FACTORES INHIBIDORES DE LAS HEMORRAGINAS

Las hemorraginas, toxinas clasificadas en una nueva subfamilia de metaloproteinasas, son las responsables del daño endotelial en los capilares y, por consiguiente, del fenómeno hemorrágico local y sistémico que ocurre en el envenenamiento por vipéridos y algunos elápidos, siendo también coadyuvantes del efecto letal del veneno¹¹.

Los factores antihemorrágicos parecen actuar como inhibidores de las metaloproteínas y forman complejos no covalentes con las hemorraginas del veneno, inhibiendo tanto la actividad hemorrágica como la proteolítica de las mismas. Estos son los factores más estudiados y hasta la fecha, más de ocho han sido purificados y caracterizados del suero de varios animales, in-

cluyendo mamíferos, serpientes no venenosas y venenosas^{12,13,14}.

Algunos de los factores encontrados en mamíferos corresponden a fracciones aisladas del suero de marsupiales como las zarigüeyas (Tabla 1). Así, del suero de *Didelphis virginiana* se aisló un factor denominado Oprin (Opossum proteinase inhibitor). La neutralización de estas metaloproteinasas del veneno ocurre por la formación de un complejo (enzima metaloproteína/inhibidor). La secuencia de aminoácidos del Oprin no es similar a la de los otros inhibidores aislados, pero presenta una homología del 46.2% con la glicoproteína humana $\alpha 1B$, encontrada en el plasma, a la cual no se le conoce función hasta ahora. En la zarigüeya, la función de dicha glicoproteína es quizás la de controlar el ingreso rápido de metaloproteínas a los capilares sanguíneos que acompaña a un envenenamiento por víbora¹⁵.

Del suero del erizo europeo, predador de víboras, se identificaron tres macroglobulinas denominadas $\alpha 2$, $\alpha 2$ -b y b, de las cuales solo la b inhibe la actividad hemorrágica del veneno de *Vipera berus*, siendo este efecto 93 veces más alto que el del suero total del erizo^{16,17}. Otros investigadores aislaron un factor antihemorrágico del músculo del erizo llamándolo Erinacin; este factor neutralizó 10 venenos diferentes de la familia *Viperidae*. El Erinacin está conformado por dos subunidades y, la disociación de las mismas, inactiva el efecto antihemorrágico¹⁸. Hay zonas de Europa donde el erizo ocupa territorios habitados también por serpientes, pero los erizos sometidos al estudio del Erinacin provenían de zonas desprovistas de serpientes, lo cual podría indicar que la resistencia al veneno no es necesariamente adquirida por el contacto con serpientes venenosas^{18,19}.

Un complejo antibothrópico (ABC) purificado del suero de *Didelphis marsupialis*, fue seis veces más potente que el antiveneno comercial anti-*Bothrops jararaca*, para neutralizar el efecto hemorrágico del veneno; también es antiletal, antimionecrosante, y antiedematizante. Recientemente se está desarrollando una técnica para la producción a gran escala de este factor^{20,21}. El suero de *D. marsupialis* también ha mostrado capacidad neutralizante del efecto hemorrágico del veneno de *Bothrops lanceolatus*²².

En varios estudios se ha determinado la capacidad del suero de algunas serpientes para neutralizar su propio veneno o el de otras especies (Tabla 1). Tomihara y colaboradores demostraron que el suero de la serpiente japonesa Habu (*Trimeresurus flavoviridis*), inhibió la actividad hemorrágica de 28 venenos de serpientes con los cuales fue retado, reflejando también que las propiedades antigénicas y la composición de los factores hemorrágicos (metaloproteínas) son muy afines. A pesar de esto, sólo pudo inhibir el efecto letal de su propio veneno y no el de otras especies de los géneros *Agkistrodon*, *Bothrops*, *Crotalus* y *Vipera*; tampoco neutralizó el efecto letal del veneno de otras especies de su mismo género²³.

La mayoría de los factores antihemorrágicos han sido aislados de serpientes venenosas, pero en serpientes no venenosas también se han encontrado, principalmente en aquellas que son predatoras de serpientes venenosas. Así, el suero de la *Clelia clelia*, colúbrido distribuido ampliamente desde Méjico hasta Argentina, mostró un efecto antihemorrágico y antiletal contra venenos de los géneros *Bothrops*, *Lachesis*, *Crotalus* y *Micrurus*; además, contra los venenos de las cobras del sudeste asiático *Naja naja kaouthia* y *Naja melanoleuca*²⁴.

Tabla 1. Factores Aislados en Diferentes Animales con Resistencia Natural a los Venenos de Serpientes.

FACTOR AISLADO	ANIMAL	ACTIVIDAD DEL VENENO NEUTRALIZADA	VENENO NEUTRALIZADO
ABF,ABC ^{20,21,33,34}	<i>Didelphis marsupialis</i> <i>Philander opossum</i> <i>Lutreolina crassicaudata</i> (Zarigüeyas)	Letalidad y hemorragia	<i>Bothrops jararaca</i>
OPRIN ¹⁵	<i>Didelphis virginiana</i>	Letalidad y hemorragia	<i>Crotalus atrox</i>
LTNF ³⁵	<i>Didelphis virginiana</i>	Letalidad	Elápidos y vipéridos
AHF-1,AHF-2, AHF-3. ^{14,36,37}	<i>Herpestes edwardsii</i> (mangosta)	Hemorragia	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>
S.N.* ³⁸	<i>Neotoma micropus</i> (rata)	Letalidad y hemorragia	<i>Crotalus atrox</i>
Erinacin ^{16,17,18,19}	<i>Erinaceus europaeus</i>	Hemorragia	<i>Vipera berus</i> , <i>V. latastai</i> <i>Bitis nasicornis</i> , <i>B. gabonica</i> <i>B. arietans</i> , <i>Bothrops</i>
<i>jararaca</i>			
HSF ²³	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	Hemorragia y letalidad	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>
S.N.* ^{12,13}	<i>Crotalus atrox</i>	Hemorragia	<i>Crotalus atrox</i>
CNF, CICS ^{8,27}	<i>Crotalus d. terrificus</i>	Neurotoxicidad	<i>Crotalus durissus terrificus</i>

* S.N: Factores aislados, sin nombre específico.

FACTORES INHIBIDORES DE LAS NEUROTOXINAS

Las neurotoxinas se encuentran en los venenos de serpientes de las familias *Elapidae* e *Hydrophiidae* y en algunas especies de la familia *Viperidae*. Estas toxinas se clasifican como b-neurotoxinas, cuando actúan a nivel presináptico por inhibición de la liberación del neurotransmisor (Acetilcolina) de las vesículas sinápticas de las terminaciones nerviosas; y como a-neurotoxinas, cuando actúan a nivel postsináptico por inhibición competitiva de los receptores de la acetilcolina en la membrana muscular, es decir, tienen un efecto tipo curare. La expresión clínica del efecto de estas neurotoxinas es la parálisis flácida^{25,26}.

El estudio reciente de los inhibidores de las neurotoxinas ha permitido su identificación en el suero de serpientes cuyos venenos presentan efectos neurotóxicos. Una de ellas es la cascabel suramericana (*Crotalus durissus terrificus*), la cual presenta un factor protector contra su propio veneno y contra otros de la familia de los vipéridos, más no contra el veneno de los elápidos²⁷.

La crotoxina es la principal toxina del veneno de la cascabel suramericana. Es una potente b-neurotoxina, compuesta de dos subunidades; la primera llamada CB, que es una fosfolipasa A₂ básica y la segunda es la subunidad CA que es ácida y no tóxica (Molécula chaperona), aumentando la potencia letal de la subunidad CB. El factor que se aisló del suero de la cascabel suramericana y que neutraliza la crotoxina se ha denominado CICS (Crotoxin inhibitor from *Crotalus* serum), el cual neutraliza el efecto de la crotoxina y de la subunidad CB. El factor CICS es una glicoproteína ácida con peso molecular de 130 Kda, que forma un complejo con la subunidad CB, disociando a su vez las dos subunidades CA-CB de la crotoxina. De esta manera retiene a la crotoxina en el sistema vascular previniendo su acción tóxica en el sistema neuromuscular⁸.

Además del factor antihemorrágico (HSF) aislado del suero de la serpiente *Trimeresurus flavoviridis*, también se aisló un inhibidor de fosfolipasas A₂ (PLA₂) similar al CICS de la cascabel. Aunque las dos especies corresponden a la misma familia, sus inhibidores de PLA₂ no comparten secuencia alguna de aminoácidos en forma significativa²⁸.

En los sueros sanguíneos de algunos elápidos australianos (*Pseudechis australis* y *Pseudechis porphyriacus*) se han encontrado inhibidores de su propio veneno y del veneno de elápidos del género *Notechis*. Así mismo, en el suero de la pitón reticulada (*Python reticulatus*) se encontró un factor antitóxico, inhibidor de la PLA₂ (Daboia toxina) del veneno de la víbora asiática *Daboia russelli*²⁸.

FACTORES INHIBIDORES DE LAS MIOTOXINAS

En el envenenamiento por víboras, la necrosis del músculo esquelético puede ser el resultado de la acción de las hemorraginas y se desencadena pocos minutos después de inoculado el veneno. Pero, hay otro tipo de toxinas responsables del efecto mionecrosante, que se denominan «miotoxinas», las cuales tienen estructura de PLA₂ enzimáticamente activas o inactivas y su sitio de acción es la membrana plasmática de las fibras musculares²⁹. Los venenos de algunas especies de elápidos y de los géneros *Bothrops* y *Crotalus*, contienen este tipo de toxinas³⁰. Hasta ahora son pocas las publicaciones sobre el hallazgo de inhibidores de miotoxinas. El suero de los elápidos australianos *P. australis*, *P. porphyriacus* y *Notechis scutatus*, redujo significativamente la mionecrosis inducida por sus propios venenos, así como también la del veneno de la víbora *Daboia russelli* (*Vipera russelli*)³¹. Recientemente, del suero de *Bothrops asper* se aisló un inhibidor de la actividad catalítica *in vitro* y de la miotoxicidad *in vivo* provocadas por la PLA₂ de su veneno³².

PERSPECTIVAS

El aislamiento y la caracterización de moléculas con capacidad neutralizante de los venenos de serpientes se convierte en una alternativa terapéutica para el accidente ofídico, con una eficacia similar o mayor que la de los antivenenos, demostrada ya contra efectos locales tales como la hemorragia y la mionecrosis; y contra efectos sistémicos tales como la neurotoxicidad y la letalidad.

El secuenciamiento de estas proteínas y su síntesis posterior, permitirá la producción en gran escala para su uso en humanos como coadyuvantes o sustitutos de la seroterapia.

SUMMARY

The natural resistance to snake venoms have been demonstrated in some mammalian (opossum, mongoose, hedgehog) and snakes blood serum. In this paper, the actual knowledge on these proteins that are not antibodies, is reviewed.

Key words: Snake venoms, hemorrhagins, neurotoxins, myotoxins, natural resistance.

BIBLIOGRAFIA

1. Bon C. Serum therapy was discovered 100 years ago. In: Bon C. and Goyffon M. Envenomings and their treatments. Lyon, Fondation Marcel Mérieux, 1995:4-9.
2. Fan H W, Cardoso J L C. Clinical toxicology of snake bites in South America. In: Meier J., White J. Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. Boca Raton, CRS Press, 1995: 667-8.
3. Gutiérrez J.M., Clinical toxicology of snakebite in Central America. In: Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons. Boca Raton, CRC Press, 1995: 645-5.

4. Otero R, Cardoso J L, Higashi H G et al. A randomized, blinded, comparative trial of one pepsin-digested and two whole IgG antivenoms for *Bothrops* snake bites in Urabá, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58:183-9.
5. Gowda T V. Interaction of snake venom phospholipases A₂ with plant isolates. In: Kini R M. *Venom Phospholipase A₂ Enzymes. Structure, Function and Mechanism*. Chichester. Jhon Wiley & Sons Ltd, 1997:205-21.
6. Damont GB, Perales J, Moissatche H. Natural anti-snake venom proteins. *Toxicon* 1991;29:1183-94.
7. Omori-Satoh T, Nakaoka Y, Yamakawa Y Mebs D. Inhibition of hemorrhagic activities of various snake venoms by purified antihemorrhagic factor obtained from Japanese habu snake. *Toxicon* 1994;32:365-8.
8. Perales J, Villela CH, Damont G et al. Molecular structure and mechanism of the crotoxin inhibitor from the *Crotalus durissus terrificus* serum. *Eur J Biochem* 1995;227:19-26.
9. Ovadia M, Kochva E. Neutralization of Viperidae and Elapidae snake venoms by sera from different animals. *Toxicon* 1977;15:541-7.
10. Ovadia M. Purification and characterization of an antihemorrhagic factor from serum of the snake *Vipera palestinae*. *Toxicon* 1978;16:661-2.
11. Bjamason J B Fox J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac. Ther.* 1994;62:325-372.
12. Weissenberg S, Ovadia M., Fleming G. and Mandelbaum F.R. Antihemorrhagic factors from the blood of the Western diamondback rattlesnake *Crotalus atrox*. *Toxicon* 1991; 29:807- 818.
13. Weissenberg S, Ovadia M Kochva E. Inhibition of the proteolytic activity of hemorrhagin from *Crotalus atrox* venom by antihemorrhagins from homologous serum. *Toxicon* 1992;30:591-8.
14. Qi ZQ, Yonaha K, Tomihara Y, Toyama S. Isolation of peptides homologous to domains of human a1B- glycoprotein from a mongoose antihemorrhagic factor. *Toxicon* 1995;33:241-5.
15. Catanese J, Kress L. Isolation from opossum serum of metalloproteinase inhibitor homologous to human a1B- glycoprotein. *Biochemistry* 1992;31:410-8.
16. De Wit CA, Westrom BR. Venom resistance in the hedgehog, *Erinaceus europaeus*: Purification and identification of macroglobulin inhibitors as plasma antihemorrhagic factors. *Toxicon* 1987;25:315-4.
17. De Wit C A, Westrom B R. Purification and characterization of a₁, a₂- b, and b, macroglobulin inhibitors in the hedgehog, *Erinaceus europaeus*: a macroglobulin identified as the plasma antihemorrhagic factor. *Toxicon* 1987;25:1209-19.
18. Omori-Satoh T, Nagaoka Y, Mebs D. Muscle extract of hedgehog *Erinaceus europaeus*, inhibits hemorrhagic activity of snake venoms. *Toxicon* 1994;32:1279-81.
19. Mebs D, Omori-Satoh T, Yamakawa Y, Nagaoka Y. Erinacin, an antihemorrhagic factor from the European hedgehog *Erinaceus europaeus*. In: Abstracts 5th Pan American Symposium on animal, and microbial toxins. Frederick, Maryland 30 July-4 August 1995:71.
20. Neves-Ferreira A G C, Perales J, Ovadia M, et al. Inhibitory properties of the antithrombotic complex from the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. *Toxicon* 1997;35: 849-63.
21. Neves-Ferreira A G C, Sá P G, Cardinale N et al. New methodology for the production of the antithrombotic complex from *Didelphis marsupialis* (Opossum). In Abstract 12th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins, Mexico. 1997. *Toxicon* 1998;36:1284.
22. Rodríguez A, Aguilar I, Giron M E Antivenom activity of opossum (*Didelphis marsupialis*) serum fraction. *Toxicon* 1995;33:95-8.
23. Tomihara Y, Kawamura Y, Yonahak K. Neutralization of hemorrhagic snake venoms by sera of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu), *Herpestes edwardsii* (mongoose) and *Dinodon semicarinatus* (Akamata). *Toxicon* 1990;28:989-91.
24. Cerdas L, Lomonte B. Estudio de la capacidad ofiófaga y la resistencia de la zopilota (*Clelia clelia*, Colubridae) de Costa Rica, a los venenos de serpientes. *Toxicon* 1982;20:936-9.
25. Zouhair M. Postsynaptic-neurotoxin-acetylcholin receptor interaction and the binding sites on the two molecules. In: Tu AT. *Handbook of Natural Toxins Volume 5 (Reptile Venoms and Toxins)*, First edition. New York: Marcel Dekker, 1991:53-65.
26. Hawgood B, Bon C. Snake venom presynaptic toxins. In: Tu AT. *Handbook of Natural Toxins Volume 5 (Reptile Venoms and Toxins)*. First edition, New York: Marcel Dekker, 1991:3-15.
27. Fortes-Dias CL, Fonseca BC, Kochva E, Diniz CR. Purification and properties of an antivenom factor from the plasma of the South American rattle snake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon* 1991;29:997-1008.
28. Thwin MM, Gopalakrishnakone P. Snake envenomation and protective natural endogenous proteins: A mini review of the recent developments (1991-1997). *Toxicon* 1998;36: 1471-82.
29. Harris JB. Phospholipase in snake venoms and their effects on nerve and muscle. In: Harvey AL. *Snake Toxins*. New York, Pergamon Press, 1991:91-129.
30. Gutiérrez JM. Patogénesis de los efectos locales de los venenos. En: Otero R, Angel R, Garcia M. *Primer Simposio Colombiano de Toxicología*. Medellín 1998:57-60.
31. Ponraj D, Gopalakrishnakone P. Inhibitory effects of snake sera on several venom-induced myonecrosis, hemorrhage and oedema activities in mice. In: First Asia-Pacific Anatomical Conference: Symposium on neurotoxicology, Singapore. 1995. *Toxicon* 1996;34:621-5.
32. Lizano S, Lomonte B, Gutiérrez JM. *Bothrops asper* myotoxin inhibitor protein (BaMIP): a novel anti-toxic and anti-phospholipase A₂ factor from blood of *B. asper* In: 12th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins. Mexico 1997 *Toxicon*, 1998;36:1255.
33. Perales J, Muñoz R, Graterol S et al. New findings on the purification and characterization of anti-bothropic factor from *Didelphis marsupialis* (Opossum) serum. *Braz J Med Biol Res* 1989; 22:25-8.
34. Perales J, Moussatche H, Marangoni S et al. Isolation and partial characterization of anti-bothropic complex from the serum of South American Didelphidae. *Toxicon* 1994;32:1237-50.
35. Lipps BV. Lethal toxin neutralizing factor from opossum (*Didelphis virginiana*) serum as a treatment for snakebites. In: Abstracts. First International Congress on Envenomations and their Treatments. Institut Pasteur-Paris. 1995,225.
36. Tomiha Y, Yonaha K, Nozaki M, et al. Purification of three antihemorrhagic factors from the serum of a mongoose (*Herpestes edwardsii*). *Toxicon* 1987;25:685-689.
37. Qi ZQ, Yonaha K, Tomihara Y, Toyama S. Characterization of the antihemorrhagic factors of mongoose (*Herpestes edwardsii*). *Toxicon* 1994;32:1459-70.
38. Garcia V. and Perez J. The purification and characterization of an antihemorrhagic factor in woodrat (*Neotoma micropus*) serum. *Toxicon* 1984;22:129-38.