

CAMBIOS SÉRICOS EN LAS ENZIMAS ALT, AST, FA, CK-TOTAL Y LDH INDUCIDOS POR VENENO DE *Crotalus durissus cumanensis* EN RATONES Balb/C

Serum Changes in ALT,AST,FA CK-TOTAL and LDH Enzymes Induced by the Venom of *Crotalus durissus cumanensis* Snake in Mouse Balb/C

José Noriega-Alvarado, David Colmenarez, Alexander Mogollón, Nelson Márquez, Virgilio Hernández y Mirleny Pérez

Laboratorio de Toxicología del Decanato de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado".
Barquisimeto, Venezuela. E-mail: jnoriega@ucla.edu.ve

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue medir los cambios séricos en las enzimas ALT, AST, FA, CK-TOTAL Y LDH inducidos por veneno de *Crotalus durissus cumanensis* en ratones balb/c que fueron inoculados con veneno crudo a una dosis de 0,75 mg proteínas/kg vía intraperitoneal, y los controles con solución fisiológica. Las muestras fueron obtenidas a diferentes intervalos de tiempo post inyección (1; 3; 6; 12 y 24 h) y se determinó la actividad de las enzimas: Alanina Aminotransferasa (ALT), Aspartato Aminotransferasa (AST), Fosfatasa Alcalina (FA), Creatina cinasa-total (CK-total) y Lactato Deshidrogenasa (LDH). Se observó diferencia significativa ($P<0,05$) en las ALT a partir de 1h post inyección hasta la 6h y ($P<0,01$) desde la 12h a las 24h con un valor máximo de 181 U/L a las 24h. La AST presentó un aumento significativo entre las 1h y las 24h, y entre las 3h y 12h alcanzando un máximo de 1066,8 U/L a las 6h, mientras que en la FA esta diferencia se observó desde la 12h a las 24h con un máximo de 201,6 U/L a las 12h. La CK- Total comienza a incrementarse a partir de la 1h post inyección, pero este incremento es significativo ($P<0,01$) desde las 6h hasta las 24h. La enzima LDH no presenta diferencias significativas en la 1h post inyección, sin embargo, experimenta un aumento significativo ($P<0,01$) desde la 3h y se mantiene a las 24h con un valor máximo 1390,2 U/L. El incremento de ALT, AST, y FA sugiere daño hepático. Los resultados obtenidos en la determinación de la CK-total y LDH pudieran indicar un daño de la musculatura del tejido cardíaco y/o esquelético en las primeras 24h de exposición al veneno de *Crotalus durissus cumanensis*.

Palabras clave: Cambios bioquímicos, enzima, veneno, *Crotalus*.

ABSTRACT

The objective of the present work was to measure the serum changes in the enzymes ALT, AST, AF, TOTAL-CK and LDH induced by the venom of *Crotalus durissus cumanensis* in Balb/C mice which been inoculated with crude venom in a doses of 0.75 mg/kg by intraperitoneal way, and the control with physiological solution. The samples were obtained at different intervals post-injection (1, 3, 6, 12 and 24 h) and was determinated the activity of the enzymes: Alanine Aminotransferase (ALT), Aspatate Aminotransferase (AST) and Alkaline Phosphatase (AF); Total Creatin Kinase (TCK) and Lactate Deshidrogenase (LDH). There was significant difference ($P<0.05$) in the ALT since the 1h post-injection to the 6h and high significant ($P<0.01$) since the 12h to the 24h with a maximum value of 181 U/L at the 24h, the AST show a significant rise between the 1h and the 24h, higher significant between 3h and 12h reaching a maximum of 1066,8 U/L at the 6h, while the AF this difference was observed since the 12h to the 24h; with a maximum of 201,6 U/L. The Total-CK begin to rise since the 1h post-injection, but this increase is higher significant ($P<0.01$) since the 6h to the 24h. The enzyme LDH didn't show significant difference at the 1h post-injection, however it show a rise higher significant ($P<0.01$) since the 3h a keep at the 24h with a maximum value 1390.2 U/L. The rise of ALT, AST and AF in this study suggests hepatic injury. The results obtained in the determination of the TOTAL-CK and LDH may indicated an injury at the cardiac and/or skeletal muscle at the first 24 hours after the exposure to the *Crotalus durissus cumanensis* venom.

Key words: Chemical changes, enzyme, venom, *crotalus*.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela existen varios géneros de serpientes venenosas entre ellas el *Crotalus*, que contempla 3 especies: *Crotalus vegrandis*, *Crotalus pifamorum* [14] y *Crotalus durissus* la cual presenta dos subespecies *Crotalus durissus cumanensis* y *Crotalus durissus ruruima* [10]. La *Crotalus durissus cumanensis* (cascabel común) es la serpiente del género *Crotalus* más abundante en Venezuela, en especial en zonas bajas y secas pero en ocasiones suele encontrarse en bosques y zonas de 2500 m. de altura [15]. Los venenos de las serpientes cascabel contienen un gran número de proteínas farmacológica y bioquímicamente activas, comparado con el veneno de otras familias de serpientes, son las más complejas y contienen proteínas de mayor peso molecular, entre los componentes que lo conforman se encuentran los polipéptidos, que han sido clasificados en base a su actividad proteolítica, hemolítica, y neurotóxica [22], causantes de los daños tisulares [27]. En varias investigaciones ha sido bien estudiado las alteraciones sistemáticas y locales inducidas por el veneno de *Crotalus* en animales de experimentación [6, 8, 21, 23]. Sin embargo, la variabilidad de los venenos de serpientes no es sólo entre especies de la misma familia, sino también puede deberse a la situación geográfica [5], la dieta, las condiciones de cautiverio, la técnica para la extracción, así como, las vías de inoculación del veneno, lo que justifica realizar estudios continuos de los efectos que produce el veneno de serpientes, en los animales de experimentación.

En los tejidos de los seres vivos se encuentran enzimas características que sólo se detectan en la sangre cuando se lesionan o destruyen las células que las contienen, la presencia de tales enzimas específicas en el torrente sanguíneo, en cantidades significativas, sugiere daño tisular, entre las pruebas de función hepática comúnmente disponibles se incluyen la determinación de las transaminasas: la alanina amino transferasa (ALT) y aspartato aminotransferasas (AST) (hace más de 25 años denominadas transaminasa glutámico pirúvica (TGP) y transaminasa glutámico oxaloacética (TGO), respectivamente y la Fosfatasa Alcalina (FA) [17]. La enzima creatinina (CK) es un regulador significativo en la producción de fosfato de alta energía, utilizado por el tejido contráctil, que puede encontrarse en la musculatura lisa, estriada y en el tejido cerebral. Su concentración sérica ha sido empleada como indicador del daño tisular, específicamente en el tejido esquelético y cardíaco [25], esta enzima tiene tres isoformas citoplasmáticas (CK-MM, CK-MB y CK-BB), la determinación de CK proporciona información sustancial del daño celular de estos tejidos y además es útil en el diagnóstico de neoplasias malignas localizadas en el tracto gastrointestinal [25]. Otros marcadores con actividad enzimática que pueden ser empleados para determinar daño cardíaco son: la deshidrogenasa láctica (LDH) y sus isoformas [28] y AST [19], las cuales son de bajo costo. La LDH es una enzima que se encuentra en muchos tejidos del cuerpo, tales como el corazón, hígado, riñones, mús-

culos, eritrocitos, cerebro y los pulmones, su elevación en el suero es un *signo* de daño tisular, es valiosa para el diagnóstico y seguimiento del infarto agudo de miocardio. Esta enzima posee 5 isoenzimas. En caso de daño tisular a nivel cardíaco se presentan mayormente aumentos de las isoformas 1 y 2 de la LDH [16]. El objetivo del presente trabajo fue medir los cambios séricos en las enzimas ALT, AST, FA, CK-TOTAL Y LDH inducidos por veneno de *Crotalus durissus cumanensis* en ratones balb/c.

MATERIALES Y MÉTODOS

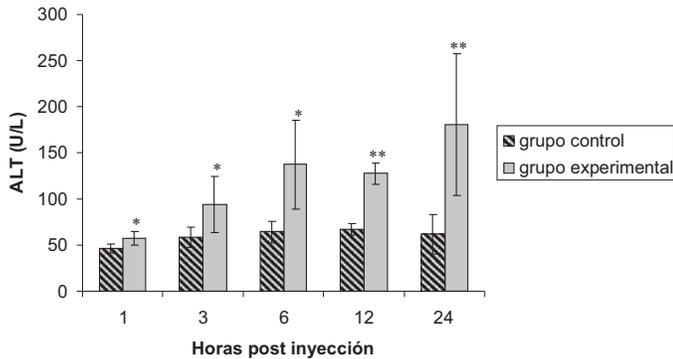
El estudio se realizó con el veneno de la serpiente *Crotalus durissus cumanensis* proveniente del laboratorio de Toxicología del Decanato de Ciencias Veterinarias (DCV) de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA) Barquisimeto-Venezuela, la obtención del mismo se realizó por ordeño manual. Los ratones utilizados pertenecían a la cepa Balb/C proveniente del bioterio de la UCLA. Se utilizaron 50 ratones divididos en 10 grupos, distribuidos en 5 grupos experimentales inoculados vía intraperitoneal con un pool de veneno de 10 serpientes *Crotalus durissus cumanensis* a dosis de 0,75mg de proteína/kg de peso ratón, y 5 grupos controles que fueron inoculados con solución fisiológica a una dosis única de 50µL. Las muestras de sangre se obtuvieron por extracción intracardiaca, a diferentes horas post inoculación (1h, 3h, 6h, 12h y 24h), respectivamente. Se centrifugaron a 800 g por 10 minutos, en el suero obtenido se determinaron las enzimas mediante el uso de kit comercial de ALT, AST, FA, (Invelab) CK-total y LDH (Invelab), en un fotocolorímetro (Ω Omega IV, EUA).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza y comparación de medias utilizando el paquete estadístico SPSS versión 10,0, se tomó como nivel de significancia un intervalo de confianza de 95% (P<0,05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la FIG. 1 se puede observar que el grupo experimental presentó un aumento significativo (P<0,05) de los niveles de ALT a partir de la 1h hasta las 6h y altamente significativa (P<0,01) a partir de las 12h, alcanzando un máximo de 181 U/L a las 24h. La ALT es una enzima que se considera específica para determinar daño del tejido hepático [24], resultados similares se reportan en otra especie del mismo género *Crotalus durissus terrificus*, donde se observa un pico máximo a las 24h [1]. Mientras que para otras especies como *Bothrops asper* y *Bothrops alternatus* donde se emplearon dosis superiores a la utilizada en este estudio, la ALT tiene un pico máximo a las 9h pero con valores de ALT menores que los encontrados en esta determinación [7, 26]. Esto pudiera indicar que el

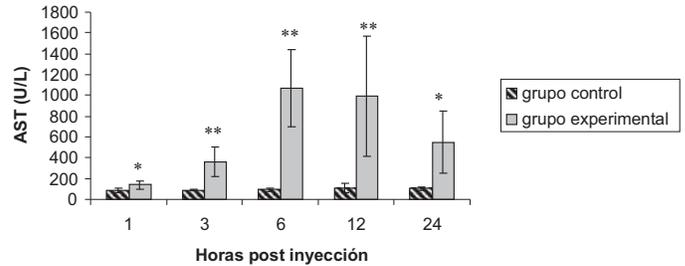


Las barras representan la media +/- la desviación estándar, n = 5
* P<0,05, ** P<0,01.

FIGURA 1. CONCENTRACIÓN SÉRICA DE LA ENZIMA ALT EN RATONES BALB/C INOCULADOS CON 0,75 mg/kg DE VENENO DE *Crotalus durissus cumanensis* A DIFERENTES INTERVALOS POST-INYECCIÓN/ ALT CONCENTRATION IN SERUM OF BALB/C MICE INOCULATED WITH 0.75 mg/kg OF VENOM OF *Crotalus durissus cumanensis* AT DIFFERENT INTERVALS POST-INJECTION.

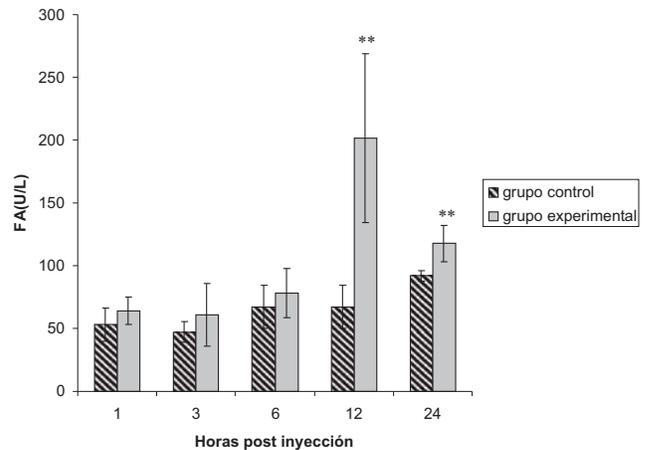
veneno de *Crotalus durissus cumanensis* es más tóxico en el tejido hepático que el de otras especies.

La FIG. 2 muestra el incremento significativo (P<0,05) de la AST en la 1h y 24h, altamente significativo (P<0,01) entre las 3h y las 12h alcanzando un máximo de 1066,8 U/L a las 6 h. La enzima AST, está presente como isoenzimas citosólicas y mitocondriales en numerosos tejidos [19], en este estudio, la inyección del veneno produjo una variación de la actividad de la enzima AST que es indicativo junto con la ALT de un daño hepático; sin embargo, puede aumentar también en respuesta a un daño muscular severo [17]. En trabajos realizados sobre la misma especie *Crotalus durissus terrificus* presentan un pico máximo de esta enzima a las 24h [1], lo que pudiera reforzar la hipótesis de que el veneno de la especie en estudio es más tóxico y/o pudiera estar afectando otros tejidos donde se encuentra esta enzima, sin embargo, en otras especies de serpientes (*Bothrops asper* y *B. alternatus*) la AST aumenta entre 3 y 9 horas [7, 26]. La FIG. 3 muestra que durante las 6 primeras horas post-inoculación del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* la concentración sérica de la actividad de la enzima FA se mantiene estable, produciéndose entre las 12 y hasta las 24h un aumento altamente significativo (P<0,01), observándose un pico máximo a las 12h. La FA es una enzima presente principalmente en tejido hepático y óseo, su incremento puede ser fisiológico o patológico, aunque su mecanismo fisiológico no está aclarado, se piensa que la producción de FA aumenta en los tejidos bajo estimulación metabólica y su aumento patológico se debe mayormente a trastornos hepatobiliares [12]. En investigaciones anteriores se ha estudiado las alteraciones sistémicas inducidas por el veneno de *Crotalus* en animales de investigación [8], sin embargo, poco se conoce sobre



Las barras representan la media +/- la desviación estándar, n = 5
* P<0,05, ** P<0,01.

FIGURA 2. CONCENTRACIÓN SÉRICA DE LA ENZIMA AST EN RATONES BALB/C INOCULADOS CON 0,75 mg/kg DE VENENO DE *Crotalus durissus cumanensis* A DIFERENTES INTERVALOS POST-INYECCIÓN/ AST CONCENTRATION IN SERUM OF BALB/C MICE INOCULATED WITH 0.75 mg/kg OF VENOM OF *Crotalus durissus cumanensis* AT DIFFERENT INTERVALS POST-INJECTION.

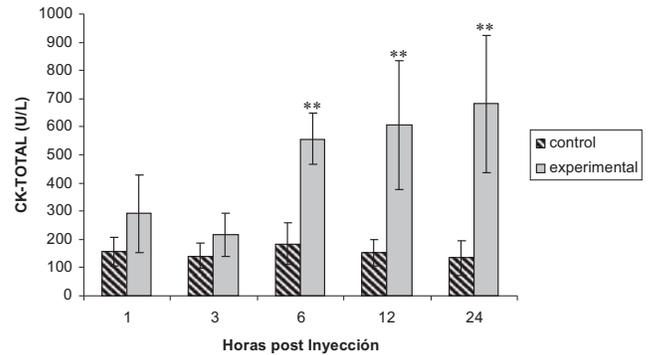


Las barras representan la media +/- la desviación estándar, n = 5
* P<0,05, ** P<0,01

FIGURA 3. CONCENTRACIÓN SÉRICA DE LA ENZIMA FA EN RATONES BALB/C INOCULADOS CON 0,75 mg/kg DE VENENO DE *Crotalus durissus cumanensis* A DIFERENTES INTERVALOS POST-INYECCIÓN/ AF CONCENTRATION IN SERUM OF BALB/C MICE INOCULATED WITH 0.75 mg/kg OF VENOM OF *Crotalus durissus cumanensis* AT DIFFERENT INTERVALS POST-INJECTION.

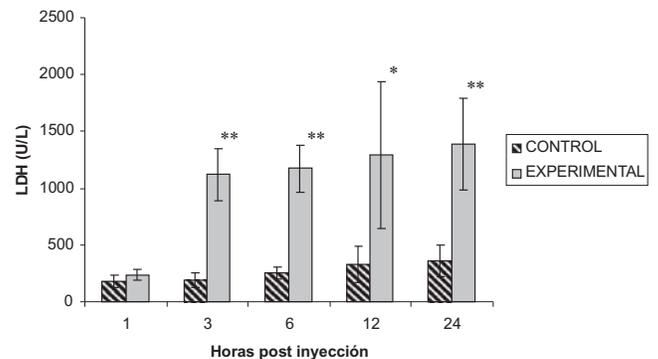
el efecto del veneno de *Crotalus* sobre la actividad de la FA. Resultados similares se han descrito en estudios sobre alteraciones en las pruebas de bioquímica clínica que induce el veneno de *Crotalus durissus terrificus* en caninos (*Canis familiaris*), indicando un aumento de FA entre las 24 y 48h después de la inyección intramuscular del veneno [4]. Estudios

realizados en otras especies como *Bothrops asper* indican que la concentración sérica de FA disminuye por inducción del veneno de este género de serpiente [2], mientras que estudios realizados en veneno crudo y fraccionado de *Bungarus caeruleus* aumenta la concentración sérica de FA en los animales de experimentación [13, 18]. La FIG. 4 muestra que la concentración sérica de creatina cinasa-total comienza a incrementarse a partir de 1h post inyección, pero este incremento se hace altamente significativo ($P < 0,01$) desde las 6h hasta las 24h post inyección. La enzima CK-total puede encontrarse en la musculatura estriada, lisa y en el tejido cerebral, y sus concentraciones séricas han sido empleadas como indicadores del daño tisular específicamente en el tejido esquelético y cardíaco [25]. En este orden de ideas, investigaciones realizadas con la misma especie describieron alteraciones ultraestructurales del tejido cardíaco en ratones a partir de las 6h post inyección [9], lo que coincide con el aumento de la actividad de la CK-total encontradas en este estudio reforzando la hipótesis del daño al tejido cardíaco. Por otra parte, en estudios empleando el veneno de la especie *Crotalus durissus terrificus* se determinó que la actividad máxima de esta enzima se alcanza a las 9h post inoculación del veneno [1]. Se han obtenido resultados similares en especies de otras serpientes venenosas donde la CK-total aumenta por inyección de la fracción miotóxica de *Bothrops* provocando rápidamente, la liberación de creatina cinasa, alcanzando un valor de 4090 U/L luego de 4h, y disminuyendo a valores casi normales después de 24h [11]. Estudios en humanos indican que el incremento de CK-total conjuntamente con AST y LDH en pacientes víctimas de mordeduras por *Crotalus durissus terrificus* muestran un patrón similar al observado en el infarto agudo al miocardio [3], todos estos hallazgos sugieren que al igual que el de otras especies el veneno de la *Crotalus* lesiona el tejido cardíaco. La FIG. 5 muestra que durante la primera hora post-inoculación del veneno de *Crotalus durissus cumanensis*, la actividad de la enzima LDH no presenta diferencias significativas, sin embargo, experimenta un aumento altamente significativo ($P < 0,01$) desde la 3h y se mantiene en constante incremento aún a las 24h post inyección con un valor máximo 1390,2 U/L. La LDH y sus isoformas son utilizadas como herramienta diagnóstica de daño en tejido cardíaco [28]. Poco se conoce sobre el efecto del veneno de *Crotalus* sobre la actividad de la LDH, sin embargo, en otras especies como *Bothrops brazili* se muestra una elevación de LDH a sus niveles máximos desde la media hora hasta la primera hora, provocando un incremento de su concentración de casi 14 veces su valor inicial en los ratones inoculados con este veneno [20], a diferencia de lo encontrado en el presente estudio donde su aumento fue de 3,8 veces su valor inicial. Esto puede sugerir que el tejido es más susceptible al veneno de *Bothrops*. El *Bungarus caeruleus* induce un aumento del 6% de la actividad de LDH en ratones de experimentación [18]. Los resultados obtenidos en este estudio en la determinación de la CK y LDH pudieran indicar un daño de la musculatura del tejido cardíaco y/o esquelético en las primeras 24h de exposición al veneno de *Crotalus durissus cumanensis*.



Las barras representan la media +/- la desviación estándar, n = 5
* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

FIGURA 4. CONCENTRACIÓN SÉRICA DE LA ENZIMA CK-TOTAL EN RATONES BALB/C INOCULADOS CON 0,75 mg/kg DE VENENO DE *Crotalus durissus cumanensis* A DIFERENTES INTERVALOS POST-INYECCIÓN /CK CONCENTRATION IN SERUM OF BALB/C MICE INOCULATED WITH 0.75 mg/kg OF VENOM OF *Crotalus durissus cumanensis* AT DIFFERENT INTERVALS POST-INYECTION.



Las barras representan la media +/- la desviación estándar, n = 5
 $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

FIGURA 5. CONCENTRACIÓN SÉRICA DE LA ENZIMA LDH EN RATONES BALB/C INOCULADOS CON 0,75 mg/kg DE VENENO DE *Crotalus durissus cumanensis* A DIFERENTES INTERVALOS POST-INYECCIÓN /LDH CONCENTRATION IN SERUM OF BALB/C MICE INOCULATED WITH 0.75 mg/kg OF VENOM OF *Crotalus durissus cumanensis* AT DIFFERENT INTERVALS POST-INYECTION.

CONCLUSIONES

El veneno crudo de la serpiente *Crotalus durissus cumanensis* produce aumentos en la actividad de las enzimas ALT, AST y FA lo cual sugiere daño hepático.

El aumento producido por la inoculación del veneno sobre la actividad de las enzimas CK-total, AST y LDH sugiere daño al tejido muscular cardíaco y/o cerebral.

La presencia de cambios en la actividad de las enzimas ALT, AST, FA, CK-total y LDH sugiere que adicionalmente al mecanismo de acción neutotóxico del veneno de la serpiente cascabel *Crotalus durissus cumananensis*, este posee acción directa sobre el tejido muscular estriado y hepático.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ACOSTA DE P, O.; KOSCINCZUK, P.; TEIBLER, P.; RUIZ, R.; SANCHEZ, N.M.; MARUÑAK, S.; MUSSART DE C, N. Intoxicación por veneno de *Crotalus durissus terrificus* (cascabel) en ratas / *Crotalus durissus terrificus* (cascabel) venom poisoning in rats. **Acta Toxicol. Argent.** 5 (2):71-4. 1997.
- [2] CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, J.; LOMONTE, B.; CERDAS, L. Histopathological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (terciopelo) venom in mice. **Toxicon.** 27 (10):1085-93. 1989.
- [3] CUPO, P.; AZEVEDO, M.; HERING, E. Absence of myocardial involvement in children victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. **Toxicon.** 42: 741-74. 2003.
- [4] DE SOUSAESILVA, M.V.; TOMY, S.C.; TAVARES, F.L.; NAVAJAS, L.; LARSSON, M.H.; LUCAS, S.R.; KOGIKA, M.M.; SANO-MARTINS, I.S. Hematological, hemostatic and clinical chemistry disturbances induced by *Crotalus durissus terrificus* snake venom in dogs. **Hum. Exp. Toxicol.** 22(9):491-500. 2003.
- [5] FRANCISCHETTI, I.M.; GOMBAROBITS, M.E.; VALENZUELA, J.G.; CARLINIS, C.R.; GUIMARES, J.A. Intraspecific variation in the venom of the south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Com. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.** 127(1):23-36. 2000.
- [6] GRILLO, O.; SCANNONE, H.; PARRA, N. Enzymatic activities and other characteristics of *Crotalus durissus cumananensis* venom. **Toxicon.** 12: 297-302. 1974.
- [7] GUTIÉRREZ, J.M.; ARROYOS, O.; BOLAÑOS, R. Miocrosis, Hemorragia y Edema Inducidos por el Veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. **Toxicon.** 18: 603-610. 1980.
- [8] HAWGOOD, B.J. Crotoxin, the phospholipase A2 neurotoxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Mem. Inst. Butantan.** 52 (Supl.):21-22. 1990.
- [9] HERNÁNDEZ, M.; FINOL, H. J.; FERNÁNDEZ, I.; SCANNONE, H.; RODRÍGUEZ A, A. Alteraciones ultraestructurales de tejido cardíaco tratado con veneno crudo de serpiente de cascabel (*Crotalus durissus cumananensis*) **R.F.M. FM-UCV.** 28 (1):1-9. 2005.
- [10] HOGE, A. R. Preliminary account on neotropical *Crotalinae* (serpentes: viperidae). **Mem. Inst. Butantan.** 32:109-184.1966.
- [11] HUATUCO, S.; ESCOBAR, E.; YARLEQUÉ, A. Aislamiento y caracterización parcial de la miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (Ophidea viperidae). **Rev. Perú Biol.** 11 (1):79-86. 2004.
- [12] KACHMAR, J.; MOSS, D. In: Enzymes. **Fundamentals of Clinical Chemistry.** 2nd Ed. NW Tietz, (Ed) WB Saunders. 652 pp. 1976.
- [13] KIRAN, K.M.; MORE, S.S.; GADAG, J. R. Biochemical and clinicopathological changes induced by *Bungarus coeruleus* venom in a rat model. **J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.** 15 (3-4):277-87. 2004.
- [14] KLAUBER, L. M. Applications of statistical methods to herpetological problems. IV. The rattlesnakes listed by Linnaeus in 1758. **Bull. Zool. Soc.** San Diego 17:81-95. 1941.
- [15] KORNACKER, P. M. **Lista sistémica y clave para las serpientes de Venezuela** 1ra Ed. Rheinbach, Germany: Pako-Verlag. 270pp. 1990.
- [16] LAWRENCE, A; AMADEO, J. Isoenzymes Clinical Chemistry theory, analysis and correlation. 2nd Ed. by the C.V. Mosby Company. United State of America. 787 pp 1989.
- [17] LIMDI, J.K.; HYDE, G.M. Evaluación de las Pruebas de Función Hepática Anormales. **Postgrad. Med. J.** 79(932):307-312. 2003.
- [18] MIRAJKAR, K. K.; MORE,S.; GADAG, J.R. Isolation and purification of a neurotoxin from *Bungarus caeruleus* (common Indian krait) venom: biochemical changes induced by the toxin in rats. **J. Basic. Clin. Physiol Pharmacol.** 16(1):37-52. 2005.
- [19] NIOSHIMURA, H.; YASAKI, Y. Biochemical tests for diagnosis of acute myocardial infation and stimation of infarct size. **Nippon Rincho** 52: 755-759. 1994.
- [20] PANDIGOSO, C.; ESCOBAR, E.; YEARLEQUE, A. Acción de la miotoxina del veneno de *Bothrops brazili* Hoge, 1953 (Ophidia, viperidae). **Rev. Perú Biol.** 9 (2): 74-83. 2002.
- [21] PIRELA, R.; LOPÉZ-JONSTHON, J.C.; HERNÁNDEZ, J. Caracterización toxinológica del veneno total de la serpiente de cascabel *Crotalus durissus cumananensis* (Viperidae), presenten la localidad de Porshoure, Guajira Venezolana. **Rev. Cientif. FCV-LUZ** XVI (3):232-238. 2006.
- [22] ROSENFELD, T. Snake bites in South American venomous animals and their venoms. London Academia Press. Inc. 48pp. 1972.

- [23] SARAVIA, P.; ROJAS, E.; ARCE, V. GUEVARA, C.; CHAVEZ, E.; ROJAS, G. GUTIÉRREZ, J.M. Geographic and ontogenic variability in the venoms of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. **Rev. Biol. Trop.** 50(1): 337-3346. 2002.
- [24] SHERLOCK, S. Drugs and Liver. In: Sherlock, E. **Diseases of the Liver and Biliary System**. 7. Ed. London, Blackwell. 304-333 pp. 1985.
- [25] TAKAGI, Y.; YASUHARA, T.; GOMI, K. Creatin Kinase and its isozymes. **Rinsho Byori** 116: 52-61. 2001.
- [26] TEIBLER, P.; ACOSTA DE P, O.; MARUÑAK, S.; RUIZ, R.; KOSCINCZUK, P.; SÁNCHEZ, N.; MUSSART DE C, N. Lesiones locales y sistémicas inducidas por veneno de *bothrops alternatus* (víbora de la cruz) de Argentina **Acta Toxicol. Argent.** 7(1):7-10. 1999.
- [27] TU, A., T. Venoms. In: **Chemistry and Molecular Biology**. Pp. 560-572. 1977.
- [28] ZHANG, J.G.; GHOSH, S.; OCKLEFORD, C.D.; GALIÑANES, M. Characterization of an *in vitro* model for the study short and prolonged effects of myocardial ischaemia and reperfusion in man. **Clin. Sci.** 99: 443-453. 2000.