

Obtención de una fracción crotálica con actividad hemoaglutinante y evaluación *in vivo* e *in vitro* del probable daño a tejidos

Purification of a hemagglutinant fraction from crotalid venom: *in vitro* and *in vivo* evaluation of cell damage

Arcelia Alvarado Islas^a, Octavio de Paz Villafán^a, Yolanda León Campos^b,
Álvaro Aguilar Setién^b

RESUMEN

Algunos venenos crotálicos poseen una fracción aglutinante con afinidad por receptores celulares, que podría ser empleada como agente antiviral para bloquear los sitios de entrada. La finalidad fue aislar una de estas fracciones y establecer su inocuidad al comparar su efecto con el causado por los venenos completos. Entre los venenos *A. piscivorus*, *A. contortix* y *C. scutulatus*, el primero mostró mayor actividad (64, 32 y 2 unidades hemoaglutinantes [UH], respectivamente). La dosis máxima no letal en ratón fue de 1.75 mg/30 g de peso para *C. scutulatus*; mientras que para los restantes fue \geq a 4.0 mg/30 g de peso. Macroscópicamente, *A. piscivorus* y *A. contortix* causaron edema masivo e infiltración sanguínea; microscópicamente, los tres produjeron miositis aguda con diversos grados de severidad. La inoculación de cultivos Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) con los venenos en dosis \geq 6, 12 y 195 μ g/ml respectivamente, causaron desprendimiento de la monocapa o aglutinación. Por su mayor actividad, la fracción hemoaglutinante de *A. piscivorus* se aisló mediante cromatografía líquida de alta presión-fase reversa (HPLC-RP). La inoculación de ratones con esta fracción en dosis de 4.25 μ g/0.2 ml no causó daño macroscópico ni microscópico, no alteró el metabolismo de células MDBK a concentraciones \leq 1.062 μ g/ml y la reducción a \leq 16 UH en glóbulos rojos tratados con neuraminidasa, indicó una probable preferencia de unión de la fracción con receptores ácido siálico. Los resultados muestran que la purificación de la fracción hemoaglutinante del veneno, elimina los daños causados por otros componentes proteicos, posibilitando su empleo como antiviral.

PALABRAS CLAVE: Venenos crotálicos, Lectinas, Fracción hemoaglutinante.

ABSTRACT

Some crotalid venoms have a hemagglutinant fraction with affinity to cell receptors. This can be used as an antiviral agent that blocks adsorption of the virus in the cell membrane. One of these fractions was isolated and its innocuity compared to the effect of complete venoms. *A. piscivorus*, *A. contortix* and *C. scutulatus* venoms were tested, with the first exhibiting the highest activity (64, 32 and 2 hemagglutinant units [HU], respectively). Maximum non-lethal dosage in mice was 1.75 mg/30 g body weight for *C. scutulatus* and \geq 4.0 mg/30 g body weight for the other venoms. Macroscopically, *A. piscivorus* and *A. contortix* caused massive edema and blood infiltration. Microscopically all three venoms caused acute myositis of varying severity. Inoculation of Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) cultures with venoms lead to monolayer detachment or agglutination at 6 μ g/ml for *A. piscivorus*, 12 μ g/ml for *A. contortix* and 195 μ g/ml for *C. scutulatus*. Because of its relatively high activity, the hemagglutinant fraction of the *A. piscivorus* venom was isolated by reverse phase high pressure liquid chromatography (HPLC-RP). Inoculation of mice with this fraction at 4.25 μ g/0.2 ml did not cause macroscopic or microscopic damage, and it did not alter MDBK cells at \leq 1.062 μ g/ml. Hemagglutination reduction, from 64 to 16 HU, caused by the fraction in neuraminidase-treated red cells indicated a probable preference for binding to sialic acid receptors. Results demonstrate that purification of the venom hemagglutinant fraction eliminates other damage-causing components, allowing its use as an antiviral.

KEY WORDS: Crotalid venom, Lectins, Hemagglutinant fraction.

Recibido el 12 de marzo de 2003 y aceptado para su publicación el 28 de noviembre de 2003.

a Departamento de Epizootiología del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología (CENID-Microbiología), INIFAP-SAGARPA, Km 15.5 Carretera México-Toluca, 05110 Palo Alto, DF. arce_ai@yahoo.es. Correspondencia al primer autor.

b Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Proyecto Z0006 B de CONACYT

INTRODUCCIÓN

Para el control quimioprolifático del virus de Influenza A existen fármacos como la amantadina, rimantadina y zanamivir que actúan interfiriendo el ciclo de replicación viral, mediante cambios en el pH a nivel endosomal, o por bloqueo de los mecanismos de excreción de los viriones⁽¹⁾. La fracción hemoaglutinante de los venenos crotálicos también podría inhibir la replicación viral, al bloquear a los receptores celulares que intervienen en el mecanismo de entrada de aquellos virus que posean una membrana lipídica cubierta con peplómeros de hemoaglutinina. Lo anterior deriva de la observación de que las hemoaglutininas o lectinas animales tipo C (calcio-dependientes), son proteínas no enzimáticas que se unen selectivamente a estructuras de carbohidratos que se localizan a nivel extracelular, y se relacionan con receptores de la clase de las sialoglicoproteínas. Mientras que las lectinas tipo S (tiol-dependientes), se localizan a nivel extra e intra celular, y se unen más fuertemente a carbohidratos de receptores de la clase de las glicoproteínas, glicolípidos y proteoglicanos⁽²⁾.

El veneno de serpiente consiste en una mezcla compleja de polipéptidos y proteínas farmacológicamente activos⁽³⁾. Los pertenecientes a la subfamilia Crotalinae actúan como inductores de la aglutinación de células y glóbulos rojos, a través de la glicoproteína denominada hemoaglutinina o lectina, caracterizada por poseer sitios de unión a receptores de azúcar de la membrana celular, y mediante mecanismos de transporte traspasan dicha membrana⁽⁴⁾. Estas lectinas han sido aisladas del veneno de serpiente de los géneros *Bothrops*, *Lachesis*, *Dendroaspis*, *Agkistrodon* y *Crotalus*^(5,6).

Varios componentes de los venenos de serpiente interfieren en funciones del organismo con actividades cardiotoxícas, hemotóxicas, miotóxicas, neurotóxicas y vasoactivas⁽³⁾. En los del género *Agkistrodon* predomina su efecto hemorrágico y mionecrótico, mientras que en el género *Crotalus* predomina el neurotóxico⁽⁷⁾. Por lo tanto, antes de pensar en el empleo de la fracción crotálica como un probable agente antiviral, es necesario evaluar los beneficios o daños que podría implicar su uso, estableciendo al mismo tiempo un cuadro

INTRODUCTION

Quimoprophylactic control of the Influenza A virus is possible with amantadine, rimantadine and zanamivir. These pharmaceuticals act by interfering with the viral replication scheme via endosomal-level pH changes or by blocking the virion excretion mechanisms⁽¹⁾. Crotalid venom hemagglutinating fractions may also inhibit viral replication by blocking the cellular receptors that intervene in the entrance mechanisms of those viruses with a lipid membrane covering hemagglutinin peplomers. This is based on observation of C-type (calcium-dependent) animal hemagglutinins and lectins, which are non-enzymatic proteins that selectively bind to extra cellular-level carbohydrate structures and relate to sialoglycoprotein-class receptors. In contrast, S-type (thiol-dependent) lectins are located at the extra- and intra-cellular levels and bind strongly to carbohydrates of glycoprotein-, glycolipid- and proteoglycan-class receptors⁽²⁾.

Snake venom is a complex mixture of pharmacologically-active polypeptides and proteins⁽³⁾. Venoms from Crotalinae subfamily snake species act as cellular and red cells agglutination inductors via the glycoprotein called hemagglutinin or lectin, characterized as having binding sites for cell membrane sugar receptors, and via transport mechanisms that pass through the membrane⁽⁴⁾. These lectins have been isolated from the venom of *Bothrops*, *Lachesis*, *Dendroaspis*, *Agkistrodon* and *Crotalus* genera snakes^(5,6).

A number of snake venom components interfere in organism function using cardiotoxic, hematotoxic, myotoxic, neurotoxic and vasoactive action mechanisms⁽³⁾. In venom from *Agkistrodon* species the hemorrhagic and myonecrotic effects predominate, whereas the neurotoxic effect is primary in venoms from *Crotalus* species⁽⁷⁾. Given this, evaluation of the benefits and damages of using particular venom is required before employing its crotalid fraction as a possible antiviral agent. A comparative table is also needed of the effects caused by whole venoms, that is, those containing all their protein and polypeptide components. This study was aimed at isolation and purification of the snake venom fraction with the highest hemagglu-

comparativo con los efectos causados por los venenos completos; es decir, por todos los componentes proteínicos o polipeptídicos contenidos en ellos. Para lograrlo, el objetivo del presente trabajo fue aislar o purificar a la fracción del veneno de serpiente con mayor actividad hemoaglutinante, determinar si ésta es o no inocua mediante evaluaciones *in vivo* e *in vitro*, y si se relaciona con receptores de la clase de las sialoglicoproteínas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron los venenos producidos por *Crotalus scutulatus*, *Agkistrodon piscivorus* y *Agkistrodon contortrix* que de acuerdo a referencias poseen una mayor actividad hemoaglutinante⁽⁵⁾. Como testigo, se empleó el veneno de un saurio del género *Heloderma* (monstruo de Gila), de escasa o nula actividad hemoaglutinante (venenos liofilizados adquiridos en el Herpetario de la Universidad Nacional Autónoma de México).

Se estableció la técnica de hemoaglutinación de acuerdo a metodología ya descrita^(5,8). Los venenos se reconstituyeron en la proporción de 6.25 mg/1 ml, con solución reguladora de Tyrodes, pH de 7.4 (1 g glucosa, 8 g NaCl, 0.5 g NaH₂PO₄.H₂O, 1 g NaHCO₃, 0.2 g CaCl₂, 0.1 g MgCl₂, 0.1 g KCl, en 1 L H₂O). Se emplearon glóbulos rojos de conejo al 2.5%, colectados en tubos «vacutainer» con EDTA o heparina como anticoagulante y lavados por tres ocasiones por centrifugación a 6,000 xg, con solución salina, pH 7.2 (0.85 g NaCl en 100 ml H₂O). La incubación fue por 20 min a temperatura ambiental y la lectura fue por apreciación de la aglutinación. Las unidades de hemoaglutinación (UH) en la prueba, se definieron como el recíproco a la dilución final en que se manifestó la hemoaglutinación⁽⁵⁾.

La dosis máxima no letal de los venenos se determinó por inoculación de grupos de dos conejos o diez ratones, a las concentraciones de 0.5, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 3.0 y 4.0 mg por cada 30 g de peso corporal; éstas se diluyeron en solución salina estéril. Los animales fueron observados a intervalos de 24 h a fin de constatar las muertes ocasionadas⁽⁹⁾.

tinant activity, consequent determination of its innocuity through *in vivo* and *in vitro* tests, and if it interacts with sialoglycoprotein-class receptors.

MATERIALS AND METHODS

Based on references indicating their high hemagglutinant activity, venoms were used from the *Crotalus scutulatus*, *Agkistrodon piscivorus* and *Agkistrodon contortrix* snake species⁽⁵⁾. Venom from a *Heloderma* genus (Gila monster) lizard (lyophilized venom from the Universidad Nacional Autónoma de México Herpetarium), known to have little or no hemagglutinant activity, was used as a control treatment.

The hemagglutination technique was established based on a previously-described methodology^(5,8). Briefly, the venoms were reconstituted at 6.25 mg/1 ml with Tyrodes regulatory solution at pH 7.4 (1 g glucose, 8 g NaCl, 0.5 g NaH₂PO₄.H₂O, 1 g NaHCO₃, 0.2 g CaCl₂, 0.1 g MgCl₂, 0.1 g KCl, in 1 L H₂O). These were applied to rabbit red cells used at 2.5%, collected in «vacutainer» tubes, with EDTA or heparin as anticoagulant, and washed three times via centrifuging at 6000 xg with a pH 7.2 saline solution (0.85 g NaCl in 100 ml H₂O). The mixture was incubated for 20 min at room temperature and its hemoagglutination properties titles measured. Hemagglutination units (HU) were defined as the reciprocal at the final dilution in which hemagglutination occurred.

Maximum non-lethal dosage for each venom was determined by inoculating groups of two rabbits or ten mice with concentrations (diluted in sterile saline solution) of 0.5, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 3.0 and 4.0 mg of venom per 30 g body weight. After injection the animals were observed for 24 h to record any deaths⁽⁹⁾. To evaluate *in vivo* cellular damage from the crotalid venoms, mice were inoculated with the maximum non-lethal dosage of 1.75 mg/30 g body weight determined for *C. scutulatus* venom. *C. scutulatus*, *A. piscivorus* and *A. contortrix* venoms were administered by injection in the tibial muscle, at 1.75 mg/30 g body weight, to groups of five animals. Two mice were given sterile saline solution as a control treatment.

Para valorar el daño celular *in vivo* de los venenos crotálicos, se inocularon ratones con la dosis máxima no letal de 1.75 mg/30 g de peso corporal dada para el veneno *C. scutulatus*, en grupos de cinco individuos con *C. scutulatus*, *A. piscivorus* y *A. contortix* en el músculo tibial; como testigo se emplearon dos ratones a los que se administró solución salina estéril. Los animales se sacrificaron a los tiempos de 30 min, 1, 3, 6 y 24 h posteriores a la inoculación⁽¹⁰⁾. Se observó si existía daño macroscópico y se extrajo el músculo para estudio histopatológico; para ello, se realizaron cortes de 3 mm de tejido, se fijaron con formalina amortiguada con fosfatos al 10% (4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 6.5 g Na_2PO_4 , 10 ml formalina, 1 L H_2O) y se tiñeron por la técnica de hematoxilina-eosina, de acuerdo a la metodología de inclusión en parafina de 20 h, descrita por Valero y Morales⁽¹¹⁾. Las inclusiones se observaron con la ayuda de un microscopio óptico, con ocular 10x y objetivo 20x.

El daño celular *in vitro* de los venenos crotálicos se determinó con la metodología de reducción de placas, empleada para la titulación viral⁽¹²⁾. Se desarrollaron cultivos celulares de la línea MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) 100% confluentes en microplacas de fondo plano de 96 pozos. De los venenos, a una concentración inicial de 6.25 mg/ml de solución salina, se realizaron diluciones para lograr concentraciones de 3125, 1562, 781, 390, 195, 97, 48, 24, 12, 6, 3 y 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, empleando como diluyente medio de cultivo MEM estéril (1 L medio MEM, 10% suero fetal bovino, 5% caldo de tripticaseína y fosfato, 0.8 g NaHCO_3 estéril, 1 ml mezcla penicilina/estreptomocina de 10,000 UI/ $\mu\text{g}/\text{ml}$). La inoculación fue de 50 μl /pozo. La incubación fue por 24 h a 37 °C y la lectura se realizó en un microscopio invertido por apreciación de la dilución a la cual los monoestratos celulares permanecieran 100% confluentes.

Tras la observación de los efectos tóxicos *in vivo* e *in vitro*, así como por la capacidad aglutinante de los venenos crotálicos, se seleccionó el producido por *A. piscivorus* para el aislamiento de la fracción proteínica, mediante el proceso de cromatografía líquida de alta presión, en fase reversa (HPLC-RP)^(13,14). Se empleó una columna de gel de sílice

Animals were killed at 30 min, 1, 3, 6 and 24 h after inoculation to determine damage caused by the venom⁽¹⁰⁾. The animals were examined for macroscopic damage and the muscle extracted for histopathological study. For this, 3mm sections were taken of the tissue, fixed in buffered formalin with 10% phosphates (4g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 6.5g NaPO_4 , 10 ml formalina, 1 L H_2O) and dyed using the hemotoxiline-eosine technique, according with the 20 h paraffin inclusion methodology⁽¹¹⁾. Inclusions were observed using an optical microscope with 10x ocular and 20x objective views.

The *in vitro* cellular damage was determined with the plate reduction methodology used for viral titration⁽¹²⁾. One hundred percent confluent, MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) cell cultures were grown in 96-well, flat-bottom plates. The venoms were prepared at an initial concentration of 6.25 mg/ml saline solution and then dilutions done with sterile MEM culture medium (1 L MEM medium, 10% bovine fetal serum, 5% tripticasein and phosphate broth, 0.8 g sterile NaHCO_3 , 1 ml penicillin/streptomycin mix at 10,000 UI/ $\mu\text{g}/\text{ml}$) to 3125, 1562, 781, 390, 195, 97, 48, 24, 12, 6, 3 and 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations. Each well was inoculated with 50 μl of solution and incubation was for 24 h at 37 °C. An inverted microscope was used to measure the dilution at which the cellular monolayers remained 100 % confluent.

Based on the agglutination capacity and *in vivo* and *in vitro* toxic effect results, venom from *A. piscivorus* was chosen for protein fraction isolation via reverse phase high pressure liquid chromatography (HPLC-RP)^(13,14). A C_{18} silica gel column with 50 μl injector (Vidac, USA) was used. The venom was diluted at 100 $\mu\text{g}/1$ ml HPLC-grade H_2O and filtered through a 0.22 μm pore nylon Millipore membrane. Polypeptide solubilization and separation were done with trifluoroacetic acid (TFA) at 0.1% in HPLC-grade H_2O (solvent A), and acetonitrile (ACN) at 0.1% in TFA (solvent B) was used as organic modifier. Both solvents were degasified by vacuum and agitation with a 0.22 μm GV-type Millipore filter. The elution slope was an initial ratio of 30% solvent B over solvent A, at 10 min time and a 1 ml/min

C₁₈ y un inyector de 50 µl, ambos de marca Vidac (USA). El veneno se diluyó a una proporción de 100 mg/1 ml en H₂O grado HPLC y se filtró con membrana Millipore de nylon de 0.22 mm de porosidad. La solubilización y separación de los polipéptidos fue con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% en H₂O grado HPLC (solvente A) y como modificador orgánico se empleó acetonitrilo (ACN) al 0.1% en TFA (solvente B); ambos fueron desgasificados por vacío y agitación, con filtro Millipore tipo GV de 0.22 mm. El gradiente de elusión fue a una proporción inicial de 30% del solvente B sobre el solvente A, a un tiempo de 10 min, con un rango de flujo de 1 ml/min. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 280 nm.

Se colectaron las proteínas y polipéptidos correspondientes a cada uno de los picos manifestados en el análisis cromatográfico. Se concentraron por liofilización⁽¹⁵⁾ y resuspendieron en un volumen de 50 ml de solución salina. La detección de la fracción hemoaglutinante fue por pruebas de hemoaglutinación^(5,8) en todas las fracciones colectadas.

Para evaluar el daño celular *in vivo* por la fracción crotálica aislada (lectina o hemoaglutinina), ésta se diluyó a una concentración de 4.25 µg por cada 0.2 ml de solución salina. Se inocularon dos ratones en dosis de 0.2 ml en el músculo tibial. Como testigo negativo, se inyectó a un ratón con solución salina en la misma dosis. Como testigo positivo, se inoculó un ratón con 1.75 mg por cada 30 g de peso corporal, con veneno completo de *A. piscivorus*⁽¹⁰⁾. Se sacrificaron 1 h después y se observó macroscópicamente; se extrajo el músculo y se fijó en formalina amortiguada con fosfatos al 10% para estudio histopatológico⁽¹¹⁾.

Para evaluar el daño celular *in vitro* por la fracción crotálica aislada, se determinó la sensibilidad celular (nivel de supervivencia o resistencia de una célula o tejido ante el efecto causado por una droga o fármaco) hacia la fracción hemoaglutinante (lectina) de *A. piscivorus* mediante pruebas de MTT (3-[4, 5-Dimethyl-thiazol-2-YI]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide), de acuerdo a metodología ya descrita^(16,17). Se realizaron diluciones de la fracción a concen-

flow range. Absorbance was measured at a 280 nm wavelength. Proteins and polypeptides corresponding to each of the peaks in the chromatography analysis were collected, concentrated by lyophilization⁽¹⁵⁾ and resuspended in 50 µl saline solution. Hemagglutination tests^(5,8) were used to detect the hemagglutinating fraction in each of the collected fractions.

Evaluation of *in vivo* cellular damage caused by the isolated crotalid fraction (lectin or hemagglutinin) was done by diluting the fraction at 4.25 µg/0.2 ml saline solution and inoculating it in the tibial muscle of two mice at a 0.2 ml dosage. As a negative control, an additional mouse was injected with 0.2 ml saline solution, and as a positive control another mouse was inoculated with whole *A. piscivorus* venom at 1.75 mg/30 g body weight⁽¹⁰⁾. One hour later the animals were killed and inspected macroscopically. Also, the muscle was extracted and fixed in buffered formalin with 10% phosphates for later histopathological study⁽¹¹⁾.

Evaluation of *in vitro* cellular damage caused by the isolated crotalid fraction and cellular sensitivity (a cell or tissue's survival or resistance to the effect of a drug or pharmaceutical) to the *A. piscivorus* hemagglutinating (lectin) fraction was determined using MTT (3-[4, 5-Dimethyl-thiazol-2-YI]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) tests^(16,17). The fraction was diluted to concentrations of 8.5, 4.25, 2.125, 1.062, 0.531, 0.265, 0.132 and 0.066 µg/ml in sterile saline solutions. Using 100 % confluent MDBK cell cultures in a 96-well microplate, 50 µl of each dilution was deposited in different wells and incubated for 24 h at 37 °C. After incubation, 20 µl MTT (5 mg MTT/ml of PBS at pH of 7.4 [8 g NaCl, 0.2 g KCl, 2.9 g NaHPO₄·2H₂O, 1 L H₂O]) was deposited in each well and incubated for an additional 4 h at 37 °C. They were then solubilized with 50 µl of 15% sodium dodecylsulphate (15% w/v SDS in 0.02M HCl) and left to incubate overnight at room temperature in the dark. Absorbance was measured at 492 nm wavelength with an ELISA reader. Results were statistically interpreted with a random design variance analysis between groups, using calculation of the arithmetical mean of the square

traciones de 8.5, 4.25, 2.125, 1.062, 0.531, 0.265, 0.132 y 0.066 µg/ml en solución salina estéril. Se emplearon cultivos celulares MDBK 100% confluentes, en microplaca de 96 pozos. Se depositaron 50 µl/pozo/c/dilución de la fracción e incubó a 37°C por 24 h. Se adicionó en toda la placa 20 µl/pozo de MTT (5 mg MTT/ml de PBS a pH de 7.4 [8 g NaCl, 0.2 g KCl, 2.9 g NaHPO₄.2H₂O, 1 L H₂O]), se incubó a 37 °C por 4 h y solubilizó con 50 µl/pozo de dodecil sulfato de sodio al 15% (15% w/v SDS en 0.02M HCl); se incubó por toda la noche a temperatura ambiental en la oscuridad. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 492 nm en un lector de ELISA y los resultados se interpretaron estadísticamente mediante análisis de varianza entre grupos, con el diseño completamente aleatorio, mediante la determinación de la media aritmética de los cuadrados de las desviaciones respecto de la media de los valores de absorbancia⁽¹⁸⁾.

Con el objeto de determinar si uno de los receptores para la fracción crotálica era el ácido siálico, glóbulos rojos de conejo fueron tratados previamente con neuraminidasa⁽²⁾ y posteriormente sometidos a pruebas de hemoaglutinación con la fracción crotálica^(5,8). El título de UH fue comparado con el obtenido con glóbulos rojos no tratados.

RESULTADOS

Selección de venenos

De acuerdo a su capacidad hemoaglutinante, se obtuvo una débil respuesta para el veneno de *C. scutulatus* con 2 UH. *A. piscivorus*, marcó un claro efecto con 64 UH, y *A. contortix* rindió un claro y débil efecto a las 16 y 32 UH, respectivamente. El veneno del saurio *Heloderma* no mostró ningún efecto aglutinante.

Dosis máxima no letal

Se observó que los venenos de los crotálicos *A. piscivorus* y *A. contortix*, así como el del no crotálico *Heloderma*, no causaron la muerte de ratones ni conejos, aún a la dosis de 4.0 mg por cada 30 g de peso corporal. Sin embargo, hubo cojera y tumefacción en la área de aplicación del

roots of the deviations versus the mean absorbance values⁽¹⁸⁾.

To determine if one of the crotalid purified fraction receptors was sialic acid, rabbit red cells were previously treated with neuraminidase⁽²⁾ and then submitted to a hemagglutination test with the crotalid fraction^(5,8). The HU title was compared to that of the untreated red cells.

RESULTS

Venom selection

In terms of hemagglutinant capacity, *C. scutulatus* had a weak reaction at 2 HU, *A. piscivorus* had a clear effect at 64 HU and *A. contortix* had a clear effect at 16 HU and a weak effect at 32 HU. The *Heloderma* sp. venom exhibited no hemagglutinant effect.

Maximum non-lethal dosage

The *A. piscivorus* and *A. contortix* (crotalid) venoms, as well as the *Heloderma* sp. (non-crotalid) venom, did not cause death of the rabbits or mice, even at the 4.0 mg/30 g body weight dosage. However, lameness and swelling were evident in the area around the inoculation site. Maximum non-lethal dosage of *C. scutulatus* venom for both the rabbits and mice was 1.75 mg/30 g body weight. Higher dosages lead to death within a maximum of 24 h.

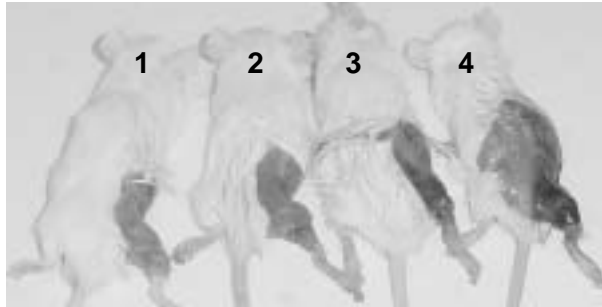
In vivo cellular damage from crotalid venoms

Macroscopic damage to the tibial muscle tissue was similar but of slightly increased severity with time after killing of the animal. The mice in the control treatment, and those inoculated with *C. scutulatus* venom at 1.75 mg/30 g body weight, showed no appreciable tissue damage. In contrast, the mice inoculated with the same dosage of *A. piscivorus* or *A. contortix* exhibited extensive, local damage with massive edema and blood infiltration into the tissues (Figure 1).

Microscopic damage in the mice inoculated with *A. contortix* venom was diagnosed as severe, multifocal acute myositis with abundant basophil

Figura 1. Daño *in vivo* causado por los venenos crotálicos en el músculo tibial de ratones

Figure 1. *In vivo* damage caused by crotalid venoms in tibial muscle of mice



1= negative control; 2= 1.75 mg *C. scutulatus*; no appreciable macroscopic damage; 3 and 4= inoculated with 1.75 mg *A. piscivorus* and *A. contortix*, respectively; massive edema and equimosis extending beyond inoculation zone.

inóculo. La dosis máxima no letal, para conejo y ratón con el veneno de *C. scutulatus* fue de 1.75 mg/30 g de peso corporal; a dosis superiores, causó la muerte en un máximo de 24 h.

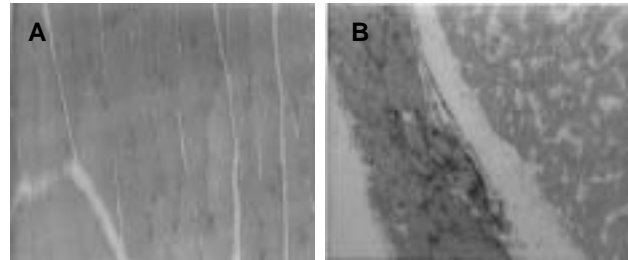
Daño celular in vivo

El daño macroscópico en los tejidos de músculo tibial, fue con lesiones similares, pero con incrementos paulatinos en el grado de severidad, de acuerdo a los tiempos posteriores al sacrificio. En los ratones testigo y en los inoculados con dosis de 1.75 mg/30 g de peso con el veneno de *C. scutulatus*, no se apreció daño en el tejido; mientras que la misma dosis con los venenos de *A. piscivorus* y *A. contortix*, causaron un daño local y extensivo, con edema masivo e infiltración sanguínea en los tejidos (Figura 1).

A nivel microscópico, los cortes musculares de los ratones controles negativos, inoculados con solución salina estéril, mostraron una estructura intacta. En los tejidos inoculados con *A. contortix*, se diagnosticó una miositis aguda multifocal severa, con abundante infiltrado basófilo, con eritrocitos fuera de los vasos sanguíneos, sobre las fibras musculares y entre los fascículos. En algunas zonas se apreció degeneración

Figura 2. Cortes histológicos de músculo tibial de ratones inoculados con el veneno de *A. piscivorus*

Figure 2. Histological section of tibial muscle of mice inoculated with *A. piscivorus* venom



A) Negative control (sterile saline solution) with intact structure. **B)** Inoculated with 1.75 mg/30 g body weight *A. piscivorus* venom with total necrosis, macrophage and neutrophil infiltration, congestion and hemorrhage.

infiltration and erythrocytes outside of blood vessels, on muscle fibers and between fascicles. Zenker degeneration was present in some zones with loss of striation, nucleus in pycnosis, karyoexis and karyolysis, as well as loss of cellular detail and plasmatic content. Mice inoculated with *A. piscivorus* venom had severe, diffuse acute myositis with abundant basophil infiltration and marked vascular changes, such as congestion and hemorrhage. Multifocal zones were observed with total cellular detail loss in muscle fascicles and lack of nucleus, as well as abundant sarcoplasm protein precipitation. The *C. scutulatus* inoculations caused slight acute multifocal myositis with discrete macrophage and neutrophil infiltration in the cut edge in addition to some congestion of blood vessels. The negative control mice, inoculated with sterile saline solution, had an intact tissue structure (Figure 2).

In vitro cellular damage from crotalid venoms

Cellular damage in the MDBK cell monolayers inoculated with *A. piscivorus* venom exhibited total detachment and agglutination from the 3125 to the 97 µg/ml concentrations. This effect decreased up to the 6 µg/ml concentration in which only minor agglutination and cellular grouping was observed (Figure 3). Beginning at the 3 µg/ml concentration, the monolayers remained 100% confluent. The same

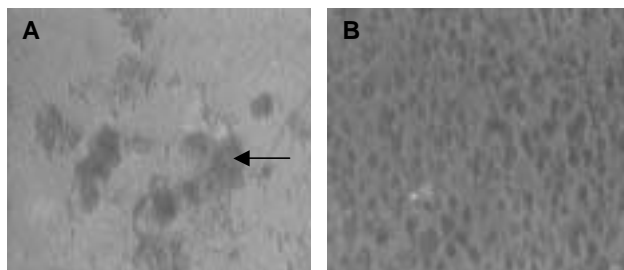
de Zenker, con pérdida de la estriación, núcleos en picnosis, cariorexis y cariólisis, así como pérdida del detalle celular y del contenido plasmático. En los inoculados con *A. piscivorus*, hubo miositis aguda difusa severa, con abundante infiltrado basófilo, así como marcados cambios vasculares, tales como congestión y hemorragia. Se observaron zonas multifocales con fascículos musculares que presentaron pérdida total del detalle celular y ausencia de núcleos, así como abundante precipitación proteínica del sarcoplasma. En los correspondientes a *C. scutulatus*, hubo miositis multifocal aguda leve, con discreto infiltrado de macrófagos y neutrófilos en la periferia del corte y algunos vasos sanguíneos con congestión (Figura 2).

Daño celular *in vitro*

La monocapa de las células MDBK inoculadas con veneno de *A. piscivorus*, desde la concentración de 3125 hasta 97 µg/ml, fue totalmente desprendida y aglutinada. El efecto decreció hasta la dosis de 6 µg/ml, en donde aún se observó una aglutinación menor y agrupamiento celular (Figura 3). A partir de los 3 mg/ml, los monoestratos fueron 100% confluentes. Con el veneno de *A. contortix*, se apreció el mismo efecto de aglutinación severa hasta la concentración de 195 µg/ml, ligera aglutinación y agrupamiento celular hasta los 12 µg/ml y 100% de confluencia celular a partir de la dosis de 6 µg/

Figura 3. Daño celular *in vitro* causado por los venenos crotálicos

Figure 3. *In vitro* cellular damage caused by crotalid venoms



A) MDBK cells inoculated with *A. piscivorus* venom at 6 µg/ml with clear grouping and monolayer detachment; **B)** MDBK negative control cells, 100% confluent.

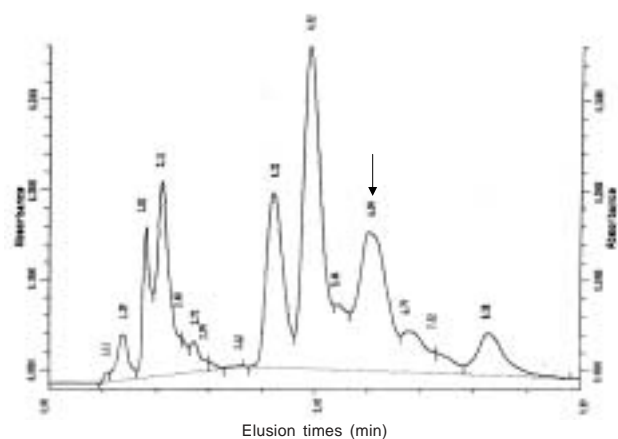
agglutination results were seen with the *A. contortix* venom up to the 195 µg/ml, after which agglutination and cellular grouping decreased up to the 12 µg/ml. Cellular confluences in the monolayers, was 100% beginning at the 6 µg/ml dosage. Agglutination and cellular grouping was detected with the *C. scutulatus* venom up to the 390 µg/ml concentration and cellular confluence occurred after the 195 µg/ml concentration. The cultures inoculated with 3125 µg/ml *Heloderma* sp. venom and the negative control cultures remained 100% confluent (Figure 3B).

Isolation of the hemagglutinant fraction of the crotalid venom

During the HPLC process the *A. piscivorus* venom was shown to have 15 different polypeptides, which migrated at 1.1, 1.39, 1.83, 2.11, 2.48, 2.72, 2.99, 3.62, 4.23, 4.92, 5.44, 6.04, 6.79, 7.32 and 8.28 min elution times (Figure 4). The only one with hemagglutinating activity was that at peak 12 (6.04 min elusion), which had activity up to the 1:64 dilution. This corresponds to 64 HU in the HA tests. Whole *A. piscivorus* venom, with all its protein and polypeptide components (the positive

Figura 4. Patrón cromatográfico del veneno de *A. piscivorus*

Figure 4. Chromatographic pattern of *A. piscivorus* venom



Of the 15 peaks that correspond to different polypeptide and protein components, only peak 12 (6.04 elusion time) had hemagglutinant activity

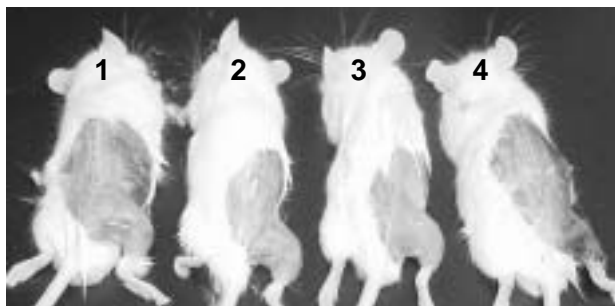
ml. Con el veneno de *C. scutulatus*, se detectó el efecto de aglutinación y agrupamiento celular hasta la concentración de 390 µg/ml, y confluencia celular a partir de la concentración de 195 mg/ml. Los cultivos inoculados aún con la más alta concentración de 3125 µg/ml de *Heloderma*, así como los cultivos testigo negativos, permanecieron 100% confluentes (Figura 3 B).

Aislamiento de la fracción con actividad hemoaglutinante

En el proceso cromatográfico, *A. piscivorus* manifestó poseer 15 diferentes polipéptidos, los cuales migraron a tiempos de elusión de 1.1, 1.39, 1.83, 2.11, 2.48, 2.72, 2.99, 3.62, 4.23, 4.92, 5.44, 6.04, 6.79, 7.32 y 8.28 min (Figura 4). El único con actividad hemoaglutinante fue el pico 12, con un tiempo de elusión de 6.04 min, el cual manifestó actividad hasta la dilución 1:64, correspondiente a 64 UH en las pruebas de HA. El testigo positivo, dado por veneno de *A. piscivorus* completo (con todos sus componentes proteínicos y polipeptídicos), en dosis de 6.25 µg/ml, mostró una marcada aglutinación. La fracción hemoaglutinante se obtuvo a razón de 17 µg/ml, por cada 100 µg de veneno completo sometido al proceso cromatográfico.

Figura 5. Daño *in vivo* causado por la fracción hemoaglutinante aislada del veneno de *A. piscivorus*

Figure 5. *In vivo* damage caused by isolated hemagglutinating fraction of *A. piscivorus* venom



1= negative control (sterile saline solution); 2 and 3= inoculated with 4.25 µg crotalid fraction, with no apparent macroscopic damage; 4 = positive control (whole venom) inoculated with 1.75 mg/30 g body weight, with massive edema and blood extravasation.

control), showed marked agglutination at a 6.25 mg/ml dosage. The hemagglutinant fraction was recovered at a 17 µg/ml per 100 µg whole, HPLC-processed venom.

In vivo cellular damage from the isolated crotalid fraction

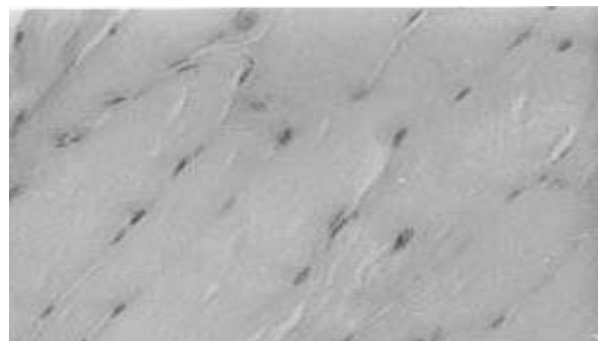
The negative control mouse, administered 0.2 ml sterile saline solution, and those inoculated with the *A. piscivorus* isolated fraction at 4.25 µg/30 g body weight showed no macroscopic tissue damage (Figure 5). This was confirmed microscopically in that the sections had no apparent pathological changes (Figure 6). In contrast, the positive control mouse, injected with *A. piscivorus* venom, had extensive, local macroscopic damage with edema, and microscopic histopathological observation again resulted in a diagnosis of severe, diffuse acute myositis.

In vitro damage from the isolated crotalid fraction

Based on the reduction or maintenance of cellular metabolism after infection with the *A. piscivorus* isolate, the MDBK cells exhibited 36.6 % viability at 8.5 µg/ml, 67.0 % at 4.25 µg/ml, 95.8 % at 2.125 µg/ml, 99.0 % at 1.062 µg/ml and 100 % at 0.531 µg/ml. Metabolism regularized beginning

Figura 6. Corte histopatológico de músculo tibial de ratón inoculado con la fracción hemoaglutinante

Figure 6. Histopathological section of tibial muscle of mice inoculated with hemagglutinating fraction



Inoculated with 4.25 µg *A. piscivorus* isolated fraction, with no apparent pathological changes. Hematoxylin-eosine stain technique; 20x objective view.

Daño celular in vivo por la fracción crotálica aislada

Los músculos tibiales de ratones testigo negativo, a los que se administraron 0.2 ml de solución salina estéril, así como los inoculados con la fracción aislada de *A. piscivorus*, en dosis de 4.25 µg/30 g de peso corporal, macroscópicamente se apreciaron sin daño en los tejidos (Figura 5), lo cual quedó confirmado al estudio microscópico, en donde los cortes no mostraron cambios patológicos aparentes (Figura 6). Contrastando con ellos, el músculo del ratón testigo positivo, inoculado con veneno de *A. piscivorus*, macroscópicamente manifestó daño local y extensivo, con edema y al corte histopatológico nuevamente se diagnosticó miositis aguda difusa severa.

Daño in vitro por la fracción crotálica aislada

De acuerdo a la reducción o mantenimiento del metabolismo celular, posterior a la infección con la fracción aislada de *A. piscivorus*, se encontraron porcentajes de viabilidad de 36.6, 67.0, 95.8, 99.0 y 100.0 % para las células MDBK inoculadas con la fracción a concentraciones de 8.5, 4.25, 2.125, 1.062 y 0.531 µg/ml, en adelante. A partir de la concentración de 1.062 µg/ml el metabolismo se regularizó. Estadísticamente, las concentraciones de 8.5 y 4.25 µg/ml de fracción crotálica que afectan la viabilidad, registran una varianza de 0.0389 y 0.0095 respectivamente, mientras que en las restantes no hubo varianza significativa (Figura 7).

Unión de la fracción crotálica con receptores del género de las sialoglicoproteínas

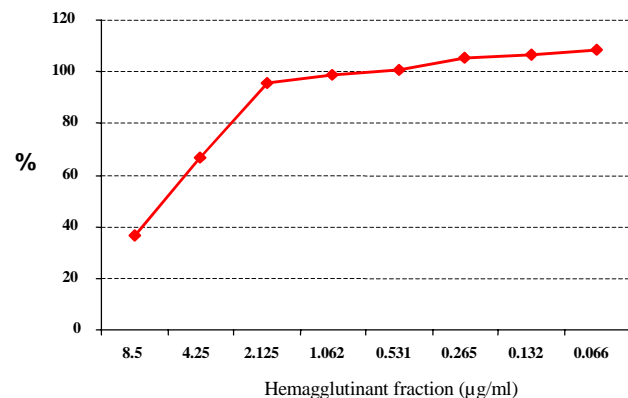
Se observó una reducción parcial (25%) del título hemoaglutinante de la fracción aislada de *A. piscivorus*, de 64 a 16 HA, al realizar las pruebas de hemoaglutinación con glóbulos rojos tratados previamente con neuraminidasa.

DISCUSIÓN

La capacidad hemoaglutinante de los venenos crotálicos seleccionados, no fue similar a lo reportado por otros autores. Mientras que Ogilvie y Gartner⁽⁵⁾, empleando glóbulos rojos de conejo, informan de capacidades hemoaglutinantes de 16,

Figura 7. Porcentajes de viabilidad de cultivos MDBK posterior a la inoculación con la fracción hemoaglutinante del veneno de *A. piscivorus*

Figure 7. Viability percentages of MDBK cultures after inoculation with *A. piscivorus* venom hemagglutinating fraction



at the 1.062 µg/ml concentration. Statistical variation was observed in the 8.5 µg/ml (0.0389) and 4.25 µg/ml (0.0095) concentrations, both of which affected viability, but not in the remaining concentrations (Figure 7).

Bonding of crotalid fraction with sialoglycoprotein class receptors

In the hemagglutination tests using neuraminidase-treated red cells, a partial reduction of 25 % (from 64 to 16 HU) in the hemagglutination titer of the *A. piscivorus* isolate fraction was noted.

DISCUSSION

The hemagglutinating capacity of the selected crotalid venoms in this study differed from those reported by other authors. Ogilvie and Gartner⁽⁵⁾ report hemagglutinating capacities of 16 HU for *A. piscivorus*, >1024 HU for *A. contortix* and +/- 2 HU for *C. scutulatus*, using rabbit red cells, whereas the capacities in the present study were 64, 32 and 2 HU, respectively. This disparity may result from the biological activity of the venoms, which can vary⁽¹⁹⁾ according to venom color⁽²⁰⁾, age⁽²¹⁾ and collection and preparation frequency⁽²²⁾, even for samples from the same individual.

> 1024 y +/- 2 UH para *A. piscivorus*, *A. contortix* y *C. scutulatus*, en el presente trabajo se obtuvieron 64, 32 y 2 UH para cada uno de los venenos, respectivamente. La disparidad pudo deberse a que la actividad biológica de los venenos, aún colectados de un mismo individuo, puede variar⁽¹⁹⁾ de acuerdo a factores como la coloración del veneno⁽²⁰⁾; la edad⁽²¹⁾ y la frecuencia de colección y preparación⁽²²⁾.

Mientras que algunos autores, reportan dosis máximas letales para *A. piscivorus*, *A. contortix* y *C. scutulatus* de 25.8, 25.6 y 18.5 mg/kg⁽⁷⁾, en el presente trabajo se encontró que los dos primeros venenos, aún a la concentración de 4 mg/30 g de peso corporal (133 mg/kg), no eran mortales para conejos ni ratones, y para que *C. scutulatus* fuera mortal, se requirieron dosis superiores a los 1.75 mg/30 g (58.3 mg/kg), causando la muerte en un máximo de 24 h. La variabilidad entre lo reportado y los resultados obtenidos, también puede ser adjudicado a la variación de la actividad biológica de los venenos, así como a la vía de inoculación, ya que la vía intraperitoneal aparentemente es más efectiva que la intramuscular⁽²⁰⁾.

Grieg⁽⁷⁾ menciona que los componentes proteínicos con acciones coagulantes (Bilineobin), hemorrágicas (Bilitoxin y HT-1) y mionecróticas (fosfolipasa A₂) de algunos venenos crotálicos, causan daños dramáticos locales pero no fatales, como edema masivo y extravasación sanguínea. Dichos efectos fueron observados en el presente trabajo con *A. piscivorus* y *A. contortix* y confirmados en el estudio histopatológico, al observar la presencia de eritrocitos fuera de los vasos sanguíneos, congestión, infiltración de basófilos, fascículos musculares con pérdida del detalle celular y ausencia de núcleos, finalizando con necrosis; mientras que con *C. scutulatus*, sólo se encontró localmente, la presencia de un infiltrado de macrófagos y unos pocos neutrófilos. De igual forma, otros investigadores^(23,24), aseguran que en el envenenamiento por *C. durissus*, el efecto local es mínimo o ausente, siendo su principal peligro el ejecutado por sus proteínas neurotóxicas, las que causan ceguera, parálisis y muerte.

Previous studies report maximum lethal dosages of 25.8 mg/kg for *A. piscivorus*, 25.6 mg/kg for *A. contortix*, and 18.5 mg/kg for *C. scutulatus*⁽⁷⁾. Much higher dosages were required in the present study, with dosages of *A. piscivorus* and *A. contortix* at 4 mg/30 g body weight (133 mg/kg) not causing death in rabbits or mice, and *C. scutulatus* requiring dosages greater than 1.75 mg/30 g (58.3 mg/kg) to cause death within 24 h. Again, this variability between reported and current results can be attributed to biological variation in the venoms. It may also have resulted from differences in inoculation methods since intradermal administration is apparently more effective than intramuscular⁽²⁰⁾.

Grieg⁽⁷⁾ reports that in some crotalid venoms the protein components with coagulant (Bilineobin), hemorrhagic (Bilitoxin and HT-1), and myonecrotic (phospholipase A₂) actions cause dramatic local, but non-fatal, damage, such as edema and blood extravasation. All these effects were observed macroscopically in the present study with the *A. piscivorus* and *A. contortix* venoms. They were also confirmed in the histopathology analysis by the presence of erythrocytes outside of the blood vessels, congestion, basophil filtration, loss of cellular detail and lack of nucleus in the muscle, fascicles and necrosis. With *C. scutulatus* venom, only local infiltration of macrophages, and a very few neutrophils, was observed. Other researchers^(23,24) have reported only a minimum or null local effect with *C. durissus* poisoning, but that the main danger lays in the neurotoxic proteins, which lead to blindness, paralysis and death.

In a study⁽¹⁷⁾ of *in vitro* damage to MCF-7 (human breast adenocarcinoma) cells after inoculation with phospholipase A₂ from *Naja mosambique* venom a toxic effect was recorded even at 4.5 U/ml concentrations. Consistent morphological changes were observed, with rounding, detachment, cellular grouping and a decrease to 33 % viability. A similar effect was noted in the present study when inoculating MDBK cells with *A. piscivorus* venom at 6 µg/ml, *A. contortix* at 12 µg/ml and *C. scutulatus* at 390 µg/ml. Damage included total detachment of the monolayer, rounding, agglutination and cellular grouping. According to

En un estudio de evaluación del daño *in vitro*⁽¹⁷⁾, al inocular células MCF-7 (células de tumor mamario humano) con fosfolipasa A₂ de veneno de *Naja mosambique*, se encontró un efecto tóxico aún a concentraciones de 4.5 U/ml, y se apreciaron cambios morfológicos consistentes en redondeo, desprendimiento y agrupamiento celular y disminución de la viabilidad a un 33 %. Un efecto similar se encontró en el presente trabajo, al inocular células MDBK con veneno de *A. piscivorus*, *A. contortix* y *C. scutulatus* a las concentraciones de 6, 12 y 390 µg/ml respectivamente, en donde hubo desprendimiento total de la monocapa, redondeo, aglutinación y agrupamiento celular. De acuerdo con Cotter *et al.*⁽²⁵⁾, el efecto de redondeo celular, aparentemente debido a la fosfolipasa A₂, se podría adjudicar a que la mayoría de las células infectadas, desarrollan un citoplasma intacto antes de morir, lo cual es una característica típica del proceso de apoptosis.

El veneno de víbora contiene isoenzimas con homología en secuencia de aminoácidos, masa molecular o punto isoeléctrico, que llegan a co-eluir junto con los componentes de interés en los procesos de purificación⁽²⁶⁾; sin embargo, por HPLC-RP se logra separar polipéptidos de secuencias cercanamente idénticas⁽¹³⁾. En el presente trabajo, el efecto tóxico dado por los componentes del veneno de *A. piscivorus* con actividad hemorrágica y mionecrótica, fue eliminado con el aislamiento y purificación de la hemoaglutinina por HPLC-RP sin alterar sus propiedades biológicas, ya que la glicoproteína conservó su actividad en 64 UH.

Al evaluar el posible daño que podría llegar a causar *in vivo* la fracción hemoaglutinante de *A. piscivorus*, se pudo comprobar a nivel macro y microscópico que ésta, a concentraciones ≤4.25 µg/ml, no causa daño alguno al tejido, corroborando así que las toxinas hemolíticas y necróticas fueron eliminadas.

Martikainen *et al.*⁽¹⁷⁾, empleó la prueba de MTT para evaluar el efecto causado por la fosfolipasa A₂ de *Naja mosambique*, encontrando que el metabolismo se reducía al 50 % o menos de las células testigo. En el presente trabajo, al evaluar el

Cotter *et al.*⁽²⁵⁾, the cellular rounding effect, apparently due to phospholipase A₂, can be attributed to the fact that most infected cells develop intact cytoplasm before dying, which is characteristic of the apoptotic process.

Snake venom contains isoenzymes with amino acid sequence, molecular mass or isoelectric point homology, that co-elute with the target components in purification processes⁽²⁶⁾. However, polypeptides of nearly identical sequences can be separated through HPLC-RP⁽¹³⁾. In the present study the toxic effect of *A. piscivorus* venom components with hemorrhagic and myonecrotic activity were eliminated during HPLC-RP isolation and purification of the hemagglutinant, without altering its biological properties; the glycoprotein maintained its 64 HU activity.

Macro- and microscopic evaluation of the possible *in vivo* damage caused by the hemagglutinant fraction of the *A. piscivorus* venom showed that no tissue damage resulted at concentrations ≤4.25 µg/ml. This corroborates that the hemolytic and necrotic toxins were eliminated.

Using the MTT test to evaluate the effect of *Naja mosambique* phospholipase A₂, Martikainen *et al.*⁽¹⁷⁾ report that metabolism was reduced to 50 %, or less, than the control cells. When evaluating the *in vitro* damage to MDBK cells that can result from the hemagglutinant fraction in the present study, it was observed that at concentrations of 8.5 and 4.25 µg/ml cellular viability also decreased to 50 % or less (36.6 and 67.0 %, respectively) than the control cells (100 % viability). At 2.125 µg/ml metabolism was near to regularization and beginning at 1.062 µg/ml viability remained at the same level as that of the control cells, though rounding was still present. This clearly demonstrates its feasibility as an antiviral agent. Cellular rounding in the present study could not result from phospholipase A₂ action⁽²⁵⁾ since this was eliminated during HPLC purification of the fraction. Apparently, the hemagglutinin binding sites are recognized by the cellular receptors and can penetrate the cell through them^(3,4). This makes its possible that the rounding effect in the present study was due to the penetration of the fraction into the cell.

daño *in vitro* que pudiera causar la fracción hemoaglutinante en células MDBK, se apreció que a las concentraciones de 8.5 y 4.25 µg/ml, la viabilidad celular también se redujo a niveles superiores e inferiores al 50 % (36.6 y 67.0 %, respectivamente) con relación a las células control (100 % de viabilidad). A la dosis de 2.125 µg/ml estuvo muy cercana a la regularización del metabolismo y a partir de los 1.062 µg/ml aunque el efecto de redondeo continuó manifestándose, la viabilidad fue mantenida al nivel de las células testigo, indicando así la factibilidad de su empleo como agente antiviral. El redondeo celular obtenido no pudo deberse a la acción de la fosfolipasa A₂⁽²⁵⁾, ya que esta última fue eliminada durante la purificación de la fracción por HPLC. Aparentemente, los sitios de unión de la hemoaglutinina son reconocidos por los receptores celulares, y a través de ellos logran penetrar a la célula^(3,4); por lo tanto, es factible que el efecto de redondeo celular observado sea debido a la penetración de la fracción al interior de la célula.

El hecho de que se haya observado una disminución en los títulos de hemoaglutinación con glóbulos rojos tratados con neuraminidasa, paralelamente significa que, al menos en parte, la fracción hemoaglutinante aislada se une a los receptores celulares del tipo ácido siálico, pudiendo utilizarse para bloquear la entrada o adsorción de virus como el de Influenza o Parainfluenza-3, los cuales utilizan a este receptor.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Los resultados obtenidos muestran que con una eficiente separación y purificación de los componentes proteínicos y polipeptídicos de los venenos de serpiente, se logra obtener una fracción hemoaglutinante inocua y libre de los efectos tóxicos no deseados, haciendo factible su empleo como agente antiviral *in vitro* e *in vivo* en animales de laboratorio.

LITERATURA CITADA

1. Graeme LW, Bischofberger N, Webster RG. Disarming flu viruses. *Scientific American*. 1999;(January):56-65.

The fact that the hemagglutination titers decreased in neuraminidase-treated red cells probably means that, at least in part, the isolated hemagglutinating fraction binds to the sialic acid-type cellular receptors. This makes their use possible for blocking the entrance or adsorption of viruses which use this receptor, such as influenza or Parainfluenza-3.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

The present results demonstrate that efficient separation and purification of the protein and polypeptide components of snake venom produces an innocuous hemagglutinating fraction free from undesirable toxic effects. This makes its use possible as an *in vitro* and *in vivo* antiviral agent in laboratory animals.

End of english version

-
2. Drickamer K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *Biol Chemistry* 1988;263(20):9557-9560.
 3. Manjunatha RK, Evans HJ. Effects of snake venom proteins on blood platelets. *Toxicon* 1990;28(12):1387-1422.
 4. Sharon N, Lis H. Lectins: cell-agglutinating and sugar specific proteins. *Science* 1972;(177):949-959.
 5. Ogilvie ML, Gartner TK. Identification of lectins in snake venoms. *J Herpetol* 1984;(18):285-290.
 6. Gartner TK, Ogilvie ML. Isolation and characterization of three Ca⁺⁺ dependent b-galactoside-specific lectins from snake venoms. *Biochem J* 1984;(224):301-307.
 7. Grieg FB, Australian venom & Toxin database. [on line] <http://www.kingsnake.com/toxinology/menu.htm>. Accessed Jun 8, 2003.
 8. Gartner TK, Stocker K, Williams DC. Thrombolectin: a lectin isolated from *Bothrops atrox* venom. *FEBS lett* 1980;(117):13-16.
 9. La Granje RG, Rusell FE. Platelet studies in rabbits following *Crotalus* poisoning. In: *Toxins of animal and plant origin*. A de Vries, Kochva E editors: Ed Gordon and Breach Science Publishers 3: 1973;1033-1038.
 10. Helater LD. Intramuscular and intradermal injection of DNA vaccines in mice and primates. In: *DNA vaccines, methods in molecular medicine*. Lowrie DB, Whalen RG editors. Totowa New Jersey: Human Press; 2000;71-77.
 11. Valero EG, Morales AJF. Técnicas de histopatología 1: Técnica usual. Centro de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. SARH;1988.
 12. Jenney EW, Wessman SJ, Spinka FL. Microtitration serology methods for bovine virology. USDA. Animal and Plant Health Inspection Service. Ames Iowa;1978.

13. VYDAC. The handbook of analysis and purification on peptides and proteins by reversed phase HPLC. 2^d ed. Hesperia CA, USA. VYDAC (the separations group); 1995.
14. Mancin AC, Soares AM, Andriao-Escarso SH *et al.* The analgesin activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. *Toxicon* 1998;36(12):1927-1937.
15. HETOSICC. Manual de congelación en seco HETOSICC CD2,5. [sin fecha de publicación].
16. Hayes PJ, Scoot R, Wheeler J. In vivo production of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in Balb/c mice inoculated intranasally with a high dose of respiratory syncytial virus. *Virology* 1994;(42):323-329.
17. Martikainen P, Nyman K, Nevalainen TJ. Toxic effects of human pancreatic and snake and bee venom phospholipases A₂ on MCF-7 cells in culture. *Toxicon* 1993;31(7):835-843.
18. Wayne WD. Bioestadística. 3^o edición, 2^o reimpresión. México DF; Ed. Limusa; 1989.
19. Johnson EK, Kardong KV, Ownby CL. Observation on white and yellow venoms from an individual southern pacific rattlesnake (*Crotalus viridis helleri*). *Toxicon* 1987;(25):1169-1180.
20. Dos Santos MC, Ferreira LCL, Dias DSW, Hurtado MFD. Caracterización de las actividades biológicas de los venenos amarillo y blanco de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. *Toxicon* 1993;(31)11:1459-1469.
21. Rhoades D. Spring rattles In: Rattlesnakes & their bites (Desert USA) [on line]. <http://www.desertusa.com/mag98/mar/stories/rattlesin.html>; Accessed Jul 7, 2001.
22. Clinical Toxinology Web Site. Delivery of venom and poisons. [on line] http://wch.sa.gov.au/paedm/clintox/venoms_toxicity.html. Accessed Jul 9, 2001.
23. Rosenfeld G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South América. In: Venomous animals and their venoms, Venomous vertebrates. Bucherl W, Buckley EE editors USA: New York Academic Press 2: 1971;345-384.
24. Amaral CFS, Dourado, HV *et al.* Manual de diagnóstico e trata-miento de accidentes ofídicos. Ministerio de Saúde do Brasil. 1991.
25. Cotter TG, Lennon SV, *et al.* Cell death via apoptosis and its relationship to grow, development and differentiation of four enzymes in blood. *Scan J Clin Lab Invest* 1974;(22):391-306.
26. Sim KL. Purification and preliminary characterization of praelongin phospholipases, antiplatelet agents from the snake venom of *Acanthophis praelongus*. *Bioch Biophys Acta* 1998;(1379):198-206.