

EVALUACIÓN DEL EFECTO TRIPANOCIDA DEL VENENO DE CASCABEL (CROTALUS DURISSUS CUMANENSIS Y C. VEGANDRIS) SOBRE EL TRYPANOSOMA CRUZI EN CULTIVOS IN VITRO (MEDIO LIT)

* Elidiosmar Giraldo-Urbina; * Arantxa Montilva; * Julio Sánchez; * Víctor Sirit; * Spiridione Puzzar;
** Alexander Mogollón-Saldivia.

PALABRAS CLAVE: Trypanosoma cruzi, medio LIT, veneno de cascabel, cepas (YBM, G79).

RESUMEN

El interés de realizar dicha investigación parte de lograr un método efectivo para disminuir la reproducción del *T. cruzi*, el cual fue descubierto por el Dr. Carlos Chagas en el año 1909. La importancia del trabajo realizado radica en que los tratamientos utilizados anteriormente no han logrado una cura aceptable para la enfermedad. La muestra estuvo estructurada en 36 tubos de ensayo en el laboratorio de Toxicología del Decanato de Veterinaria de la UCLA, divididos en dosis de veneno (1,5mg y 3mg) de la cascabel CDC y CD y específicos: 8 con cepa YBM (veneno CDC), 8 con cepa YBM (veneno CV), 8 con cepas G-79 (veneno CDC), 8 con cepas G-79 (veneno CD) y 4 sin veneno cepa control. Se observó por microscopía antes de aplicar el veneno la cantidad de parásitos por mililitro que se encontraban en el cultivo, posteriormente se contabilizó nuevamente para determinar la efectividad del veneno sobre ellos, evidenciando efecto Tripanocida del veneno CDC sobre el crecimiento en ambas cepas; al igual que el efecto Tripanocida del veneno CV, correspondiente. Los resultados sin embargo, indican que al aplicar mayores dosis con el veneno de CDC, el parásito se inmuniza y logra multiplicarse. Se recomienda evaluar el efecto del veneno sobre perros o ratones infectados, además de tomar en cuenta el agregado de bajas dosis del veneno de CDC.

EVALUATION OF THE TRYPANOCIDAL ACTION OF THE VENOM OF RATTLESNAKES (CROTALUS DURISSUS CUMANENSIS AND C. VEGANDRIS) ON TRYPANOSOMA CRUZI IN VITRO (HALF LIT)

KEY WORDS: Trypanosoma cruzi, LIT culture medium, Rattlesnake venom, Strains (YBM, G79).

ABSTRACT

The purpose of this investigation was to evaluate the Tripanocida effect in the rattlesnake venom on Trypanosoma cruzi by LIT culture medium, which was discovered by Dr. Carlos Chagas in 1909. The importance of this investigation work lies on the fact that it hasn't achieved an acceptable cure to the elimination of the disease. The sample of this research was structured in 36 test tubes in the laboratory of toxicology veterinary deanery of the UCLA, divided into doses of venom (1,5mg y 3mg) of the rattlesnake Crotalus durissus cumanensis and Crotalus vegrandis, specifically: and 8 with strain YBM (poison CDC), 8 with YBM (poison CV), 8 strains G-79 (poison CDC), 8 with strains G-79 (poison CD) and 4 without poison that represent the control strain. By using the microscope was observed before applying poison the amount of parasites per milliliter in the culture, subsequently was recorded again to determine the effectiveness of the poison on them. It was evident from the venom CDC tripanocida effect on growth in both strains, as well the tripanocida effect of the venom CV accordingly. However, the results indicate that by applying higher doses venom CDC, the parasite is immunized and multiply. It is recommended to evaluate the effect of the venom on dogs or mice infected, as well as notice the addition of low doses of venom CDC.

* Decanato de Ciencias Veterinarias UCLA.

** Decanato de Ciencias Veterinarias UCLA.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, desde su descubrimiento ha generado interés por su estudio en el área investigativa experimental. Desde 1909, cuando el Doctor Carlos Das Chagas describió esta enfermedad, su agente causal *Trypanosoma cruzi* y el vector (Reduvidos) en el estado de Minas Gerais en Brasil hasta la actualidad (1), se han realizado investigaciones y experimentos con la finalidad de encontrar un agente externo que combata al *T. cruzi*, mediante un efecto tripanocida donde se elimine la reproducción del parásito, y que pudiera servir de tratamiento efectivo o de cura (2).

Esta enfermedad afecta a nivel mundial alrededor de 100 millones de personas, en América Latina se ha expandido desde el sur de EE.UU hasta Argentina, haciendo que alrededor de 50.000 personas mueran anualmente. La misma es endémica en ciertas áreas rurales de los países en donde existe, principalmente Brasil, Venezuela, Chile, Argentina, Uruguay, Bolivia, Perú (2, 3).

A este respecto, se tiene evidencia que en Venezuela aproximadamente 6 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad de Chagas, dado a las malas condiciones de vida en las zonas de bajos recursos, aún y cuando, en diversos trabajos se ha demostrado que el insecto vector, conocido como el chipo (Triatominae), se ha propagado a partes de zonas urbanas, es decir, su población afectada ha ido expandiéndose, lo que convierte a la situación en un caso grave (4).

Por otra parte, la prevalencia de la enfermedad de Chagas en Venezuela ha estado asociada a altos índices de infestación y colonización de la vivienda por *Rhodnius Prolixus*, que es el principal vector en el país (5, 6). En los últimos 43 años, en la misma se ha visto un descenso gradual de los índices de prevalencia, de un 44,5% en la década de los años 50 (7), a un 8,3% en el año 2000 (8). Estos resultados son debidos a las acciones emprendidas para su control como son: sustitución de viviendas, control de vectores, control serológico para las transfusiones de sangre y programas de prevención en áreas de riesgos (9, 10).

La enfermedad de Chagas es también conocida como Trypanosomosis Americana, Mal de Chagas-Mazza o Esquizotripanosomosis, es una zoonosis

endémica, generalmente crónica (11). La misma se ha clasificado en tres fases: aguda, indeterminada y crónica dependiendo de la evolución clínica en el tiempo. La fase aguda se caracteriza por una alta parasitemia y los principales síntomas pueden incluir: hipertermia, mialgia, cefalea, astenia, hepato y esplenomegalia, linfadenopatías, deterioro progresivo, alteraciones cardiacas y nerviosas, algunas veces presenta miocarditis y meningoencefalitis con pronóstico grave (12). La fase indeterminada, es generalmente asintomática y puede durar de 5 a 40 años, evolucionando luego a la miocardiopatía Chagásica; la fase crónica caracterizada por insuficiencia cardíaca, megalovisceras (megaesófago, megacolon), cardiomiopatía difusa grave y alteraciones del sistema nervioso (9, 13).

Como terapéutica para esta enfermedad existen dos drogas mundialmente aprobadas como son el Nifurtimox y el Benznidazol, los cuales son compuestos nitroheterocíclicos con una adecuada actividad en la fase aguda de la enfermedad, y cuya eficacia puede variar de acuerdo a la región geográfica donde habita el paciente. Como aspecto adverso de esta terapéutica ambos medicamentos llevan más de 40 años generando efectos secundarios como hipertermia, vómito, dermatitis, cefaleas entre otros, que hacen que los pacientes con frecuencia deban abandonar la terapia antes de que el parásito pueda ser eliminado (14, 15).

Alrededor del año 2005, el químico venezolano Julio Urbina presentó estudios de cómo tratar la enfermedad durante su etapa crónica a través de un compuesto llamado Posaconazol (antimicótico). Sus estudios en animales han demostrado que el mismo es 30 veces más potente que el Benznidazol. Faltando aún fases del estudio para comprobar totalmente su efectividad terapéutica (16).

Por otra parte, en el 2008 se evaluaron los efectos tóxicos de los venenos de cinco serpientes costarricenses, en cuanto a su capacidad tripanocida contra dos cepas de *Trypanosoma cruzi*. Los venenos de *Bothrops asper*, *Bothriechis schlegelii*, *Crotalus durissus durissus*, *Atropoides nummifer* y *A. picadoi*, demostrándose actividad tripanocida contra las formas de epimastigoto, amastigoto y tripomastigoto. Los de *B. asper* y *B. schlegelii* presentaron la más alta actividad en los epimastigotos de la cepa CL, mientras que los venenos de *B. asper* y el de *A.*

nummifer fueron más eficientes contra los epimastigotos de la cepa Jennifer (17).

Debido a los efectos adversos y baja efectividad que presentan el Benznidazol y Nifurtimox y la carencia de un tratamiento efectivo para la enfermedad de Chagas, se considera necesario plantear nuevas alternativas terapéuticas, como lo es investigar el efecto tripanocida del veneno de cascabel (común y enana) sobre el *T. cruzi* en medio de cultivo LIT (18).

MATERIAL Y MÉTODO SERPIENTE DE CASCABEL

El género *Crotalus*, se extiende desde el Sureste de Canadá al norte de Argentina. En Venezuela, se han encontrado 3 especies: *Crotalus pfanorum*, *Crotalus vegrandis* y *Crotalus durissus*, esta última con 2 subespecies *cumanensis* y *uruima*. Siendo de interés para este estudio *C. vegrandis* y *C. durissus cumanensis*, esta última se encuentra distribuida a lo largo de toda la geografía nacional. El veneno de serpientes contiene proteínas con poderoso efecto farmacológico, clasificadas por su actividad proteolítica, hemolítica, citotóxica, miotóxica y neurotóxica (19), las cuales constituyen del 90 al 95% del peso seco del veneno y son responsables de sus efectos (20). Su dosis letal es de 3 mg por kilogramo. Las serpientes *Crotalus durissus cumanensis* y *Crotalus durissus uruima* son dos subespecies de *Crotalus* en Venezuela (21), su veneno contiene una mezcla compleja de enzimas, toxinas y péptidos, conocidos como: crotamina y crotoxina de acción miotóxica, principalmente sobre las fibras esqueléticas tipo I (22, 23, 24). La crotoxina (crotapotina y fosfolipasa A₂) tiene acción neurotóxica (24, 25, 26), giroxina y convulsina producen convulsiones, alteraciones circulatorias y respiratorias (27, 28) y una enzima parecida a la trombina que su actividad permanente hace incoagulable la sangre al agotar al fibrinógeno, con disminución del conteo plaquetario (29, 30).

Cultivo de *Trypanosoma cruzi* en medio LIT (Liver Infusion Tryptose)

Los tripanosomas se cultivaron en medio LIT, que es una solución que cuenta con nutrientes de hígado de cerdo (31). Siendo el más indicado porque se trata de prescindir de la utilización de sueros o de componentes de la sangre, ya que estos dificultan estudios de tipo inmunológico o bioquímico, pero en

nuestro caso perseguimos la producción de gran número de parásitos disponiendo de un cierto control sobre su crecimiento, es decir, disponiendo de unas curvas de crecimiento estables que nos permitan prever el desarrollo del cultivo, fase de crecimiento exponencial, picos, fase estacionaria, etc. (32) con lo que, se puede evaluar de una forma más precisa la acción del veneno sobre los parásitos.

Se cultivaron dos cepas de *T. cruzi* denominadas YBM y G-79 (silvestre) con el objeto de comparar el efecto tripanocida de los venenos de cascabel (*Crotalus durissus cumanensis* y *Crotalus vegrandis*) en estas. Para evaluar esta acción, se realizó la determinación del número de parásitos por mililitro en cámara de Neubauer, así como la estimación de la viabilidad del parásito mediante el uso del test de exclusión celular o la coloración de trypan blue® (33, 34)

Las muestras estudiadas se distribuyeron en 36 tubos de ensayo:

- 8 tubos de ensayo con cepa YBM con veneno *Crotalus durissus cumanensis*:
 - 4 tubos de ensayo con 3 mg de dosis.
 - 4 tubos de ensayo con 1,5 mg de dosis.
- 8 tubos de ensayo con cepa YBM con veneno *Crotalus vegrandis*
 - 4 tubos de ensayos con 3 mg de dosis.
 - 4 tubos de ensayos con 1,5 mg de dosis.
- 8 tubos de ensayos con cepa G-79 con veneno *Crotalus durissus cumanensis*:
 - 4 tubos de ensayo con 3 mg de dosis.
 - 4 tubos de ensayo con 1,5 mg de dosis.
- 8 tubos de ensayo con cepa G-79 con veneno *Crotalus vegrandis*:
 - 4 tubos de ensayo con 3 mg de dosis.
 - 4 tubos de ensayo con 1,5 mg de dosis.
- 4 tubos de ensayo sin veneno, que representaron el control.

A cada tubo se le adicionó 1,5 ml de medio LIT más 0,5 ml del cultivo del *T. Cruzii*, se esperó durante 4 días en agitación para que este cultivo creciera. Se tomaron 10 µl del cultivo para hacer el conteo de parásitos por ml en la cámara de Neubauer y al resto del cultivo se le centrifugó a 5000 rpm por 10 min., seguidamente se descartó el sobrenadante y se efectuaron 2 lavados con solución de Buffer salina. Posteriormente, se agregó la solución de Buffer, parásitos y el veneno de cascabel (calculado en base a la proteína del veneno) en cantidades de 6 µg (3 mg/Kg) y 3 µg (1,5 mg/Kg) hasta completar 2 ml, se

dejó incubando a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, se tomaron 10 µl de esta muestra para contar los parásitos viables e inviables en la cámara de Neubauer, se centrifugó el resto y se hizo nuevamente 2 lavados, descartando el

sobrenadante procediéndose a sembrar los parásitos en el medio LIT. Se dejó este cultivo en agitación por 4 días y se volvió a tomar 10 µl para hacer el conteo de la población del parásito por ml (18, 35, 36).

Cuadro. 1 Determinación del número de parásitos por mililitro. Pre tratamiento.

Grupos	Muestra	Cepa YBM	Cepa G-79 (silvestre)
Experimental 1	1	140.000	75.000
	2	150.000	70.000
	3	230.000	110.000
Experimental 2	4	510.000	135.000
	5	145.000	90.000
	6	155.000	235.000
Experimental 3	7	460.000	235.000
	8	605.000	195.000
	9	475.000	165.000
Experimental 4	10	295.000	315.000
	11	260.000	290.000
	12	445.000	0
Experimental 5	13	320.000	160.000
	14	630.000	140.000
	15	400.000	405.000
Experimental 6	16	300.000	75.000
	17	330.000	665.000
	18	245.000	345.000
Control	19	325.000	315.000
	20	255.000	410.000

Se puede apreciar que ambas cepas mostraron un buen crecimiento, y uniforme en el medio de cultivo

LIT, con números de parásitos variables para cada medio.

Cuadro. 2 Determinación del número de parásitos por mililitro. Post tratamiento.

Grupos	Muestra	Cepa YBM	Cepa G-79 (silvestre)
Experimental 1	1	110.000	15.000
	2	70.000	10.000
	3	90.000	10.000
Experimental 2	4	450.000	5.000
	5	15.000	0
	6	0	5.000
Experimental 3	7	210.000	0
	8	130.000	0
	9	1.015.000	5.000
Experimental 4	10	0	170.000
	11	10.000	125.000
	12	25.000	0
Experimental 5	13	5.000	145.000
	14	15.000	50.000
	15	615.000	115.000
Experimental 6	16	120.000	75.000
	17	200.000	5.000
	18	120.000	110.000

Se puede evidenciar una disminución sustancial en el número de parásitos por mililitro, llegando en algunos casos a ser de cero (0) el contaje. En ambos casos, la reducción en el número de parásitos superó

el 50%. Siendo en apariencia la cepa G-79, más afectada en su factor de crecimiento que la cepa YBM.

Cuadro. 3: Comparación del número de parásitos por mililitro Pre y post tratamiento.

Grupo	N°	Cepa									
		YBM				G-79					
		Tratamiento		Dif. (miles)	%	X̄	Tratamiento		Dif. (miles)	%	X̄
Pre (miles)	Post (miles)	Pre (miles)	Post (miles)								
Experimental 1	1	140	110	30	21.4		75	15	60	80	
	2	150	70	80	53.3	45.2	70	10	60	85.7	85.5
	3	230	90	140	60.9		110	10	100	90.9	
Experimental 2	4	510	450	60	11.8		135	5	130	96.3	
	5	145	15	130	89.7	67.1	90	0	90	100	98
	6	155	0	155	100		235	5	230	97.8	
Experimental 3	7	460	210	250	54.3		235	0	235	100	
	8	605	130	475	78.5	66.4	195	0	195	100	98.9
	9	475	1.015	540	113		165	5	160	96.7	
Experimental 4	10	295	0	295	100		315	170	145	85.2	
	11	260	10	250	96.2	98	290	125	165	57	71.1
	12	445	25	420	94.4		0	0	0	0	
Experimental 5	13	320	5	315	98.4		160	145	15	9.3	
	14	630	15	615	97.6	88.2	140	50	90	64.2	48.4
	15	400	615	215	53.7		405	115	290	71.6	
Experimental 6	16	300	120	180	60		75	75	0	0	
	17	330	200	130	39.4	50.1	665	5	660	99.2	55.8
	18	245	120	125	51		345	110	235	68.1	

Al evaluar los resultados, se aprecia que ambas cepas fueron afectadas por igual, siendo en la cepa YBM el valor más bajo de inhibición de los factores

de crecimiento 45.2% y el más alto de 98% ; con respecto a la cepa G-79 el valor más bajo reportado fue de 48.4% y el más alto de 98.9%.

Cuadro 4. Evaluación del efecto tripanocida de los venenos de CDC y CV mediante la coloración de Trypan blue.

Grupos	Muestra	Cepa YBM				Cepa G-79 (silvestre)			
		viable	%	No viable	%	Viable	%	No viable	%
Experimental 1	1	40		60		30		70	
	2	30	43,3%	70	56,6%	20	33,3	80	66,6
	3	60		40		50		50	
Experimental 2	4	50		50		20		80	
	5	40	53,3%	60	46,6%	30	23,3	70	76,6
	6	70		30		20		80	
Experimental 3	7	50		50		40		60	
	8	70	53,3%	30	56,6%	10	30	90	70
	9	40		60		40		60	
Experimental 4	10	40		60		50		50	
	11	40	40%	60	60%	40	45	60	55
	12	40		60					
Experimental 5	13	20		80		50		50	
	14	40	20%	60	80%	40	43,3	60	56,6
	15	0		100		40		60	
Experimental 6	16	30		70		60		40	
	17	60	36,6%	40	63,3%	20	46,6	80	53,3
	18	20		80		60		40	
Control	19	100	100%	100	0%	100	100	0	0
	20	100		100		100		0	

En dicho cuadro se demuestra los resultados obtenidos sobre la evaluación de efecto tripanocida de los venenos usados, donde se aprecia que ambos venenos poseen efecto tripanocida, pero no existe diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$).

CONCLUSIÓN

Se evidenció efecto tripanocida del veneno de la *Crotalus durissus cumanensis* y *Crotalus vegrandis* sobre el crecimiento en ambas cepas (YBM y G-79), siendo estos resultados de gran ayuda en la lucha contra esta enfermedad. Se sugiere evaluar el efecto de bajas dosis de veneno de cascabel sobre el crecimiento de las cepas de *Trypanosoma cruzi* en medio LIT, así como también, evaluarlo en ratones o perros, con el objeto de determinar su efecto in vivo y sus posibles efectos adversos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KROPF S, 2004. Historia de la enfermedad de Chagas: ciencia, salud y sociedad Casa de Oswaldo Cruz, Fiocruz, Expanão, 0 – 361, Río de Janeiro, RJ, Brasil.
2. DIAS JC, PRATA A, CORREIA D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. Rev Soc Bras Med Trop 2008 41: 193 – 6.
3. KARCZ D, TALES H, MASRI M, 2007. Chagas Disease: Clinical Overview and implications for nursing. Medsurg Nurs.
4. ZAVALA J, 2002. Protozoosis transmitidas por artrópodos. Capítulo 10: Unidad IV. Tripanosomiasis, Parasitología médica. Séptima Edición. México.

5. FELICIANGELI D, CARRASCO H, PATTERSON J, SUAREZ B, MARTÍNEZ C, MEDINA M, 2004. Mixed domestic infestation by *Rhodnius prolixus* stål, 1850 and *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811, vector incrimination, and seroprevalence for *Trypanosoma cruzi* among inhabitants in el guamito, Lara state, Venezuela. *Am J Trop Med Hyg*, 71: 501 – 505.
6. RODRÍGUEZ BONFANTE, OOVIOLE-VIELMA B, PASCUZZO C, MOGOLLÓN A, ALDANA E, CONCEPCIÓN JL, BONFANTE-CABARCAS R. Factores de riesgo epidemiológicos asociados a la seropositividad en habitantes de un área endémica para la enfermedad de Chagas en el Centrocidente de Venezuela.
7. ACHÉ A. Programa de Control de la enfermedad de Chagas en Venezuela. *Bol Dir Mal Amb*. 1993; 33: 11 – 12
8. ACHÉ A, MATOS AJ, 2001. Interrupting Chagas' disease transmisión in Venezuela. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 43: 37 – 43.
9. BONFANTE R, SANTELIZ S, 2010. Bases fisiopatológicas de la terapéutica en la enfermedad de Chagas. Venezuela.
10. FELICIANGELI D, CARRASCO H, PATTERSON J, SUAREZ B, MARTÍNEZ C, GONZÁLEZ D, CÓLEMAN P, DAVIES C, 2003. Chagas disease control in Venezuela: lessons for the ADean región and beyond. *Trends Parasitol* 19: 44 – 49.
11. SECRETARÍA DE SALUD DEL ESTADO, 2008. Enfermedad de Chagas o tripanosomosis americana. México.
12. CAMACHO-DAZA S, 2006. Características de las prácticas de Autocuidado de las gestantes en riesgo de adquirir enfermedad de Chagas. Caracas. Venezuela.
13. TOSTES J, ROCHA-RODRIGUEZ D, PEREIRA G, RODRIGUEZ J, 2005. Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas disease. *Int J Cardiol*. 99: 233 – 237.
14. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2009. Tratamientos aprobados para la fase inicial de la enfermedad de chagas. Venezuela.
15. WERNER APT B., INÉS ZULANTAY A, 2011: Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas; *Rev Med Chile* 2011; 139: 247 – 257.
16. RÍOS S, 2011: Investigación del posaconazol, antifúngico que frena la replicación del *Trypanosoma cruzi*. *Diario La Nación*. Disponible en: <http://www.lanacion.com.ar/>. Argentina.
17. CASTILLO A, RANDAL L, ZELEDÓN R, LOMONTE B, URBINA A, VALVERDE B, 2008. Susceptibilidad de *Trypanosoma cruzi* a diferentes venenos de serpientes de Costa Rica. *Bol Mal Salud Amb v.48 n.2 Maracay*.
18. MOGOLLÓN A, 2013. Aplicar dosis de veneno de cascabel sobre el cultivo in vitro LIT como tratamiento para disminuir el crecimiento del *Trypanosoma cruzi*. Barquisimeto. Venezuela.
19. BERGER B, BHATTI A.R. Snake venom components and their cross-reactivity: a review. *Biochem Cell Biol* 1971; 67: 597-601.
20. BON C, 1994: Snake venom & Pharmacopoeia. Bauchot R.(1st ed). Snake A natural history. New York: Sterling Publ. 194 – 2093.
21. HOGE AR, 1965: Preliminary account on neotropical Crotalinae (Serpentes: Viperidae). *Mem. Inst Butantan*; 32: 109 – 184.
22. ROSEFELD G, KELEN EMA, NUDEL F, 1960: Hemolytic activities of animal venoms, classification in different types and activities. *Mem Inst Butatan*; 30: 103 – 116.
23. CUPO P, AZEVEDO- MARQUEZ M M, HERING SE, 1990: Acute myocardial infarction-like enzyme profile in human victims of *C.durissus terrificus* envenoming. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 84: 447 – 451.
24. JORGE MT, RIBEIRO LA, 1990: Acidentes por serpents peçonhentas do Brasil. *Rev Assoc Med Bras*; 36: 66 – 77.

25. VITAL BO, 1966: Pharmacology of crystalline crotoxin II. Neuromuscular blocking action. Mem Inst Butantan; 33: 981 – 992.
26. FEITOSA RFG, MELO IMLA, MONTEIRO HSA, 1997: Epidemiologia dos acidentes por serpentes no Estado do Ceará. Rev Soc Bras Med Trop; 30: 295 – 30.
27. VITAL BO, FRANCESCHI JP, WAISHICH E, 1966: Pharmacology of crystalline crotoxin. Tox Mem Inst Butantan; 33: 973 – 80.
28. VITAL BO, 1980: Venenos ofídicos neurotóxicos. Rev Ass Med Brasil; 26: 212 – 218.
29. AMARAL CFS, RESENDE NA, PERODA TGM, 1988: Afibrinogenemia secundária a accidente ofídico crotálico. Ver Ins Méd Trop; 30: 288 – 92.
30. BARRAVIEIRA B, 1960: Acidentes por serpentes do gênero Crotalus. Arq Brás Méd; 64: 14 – 20.
31. LEPPARD B, ASHTON R, 2005. Descripción del medio de cultivo LIT. Venezuela
32. CAMARGO, EP, 1964: Grawth and differentiation in Trypanosoma cruzi, Origin ob metacyclic trypanosomes o liquid media. Revine. Mcd. Troo. Sao Paulo fi: 93 – 100.
33. MISHELL BB, SHIIGI SM, CHAN H, NORTH J, GALLILY R, SLOMICH M, MILLER K, MARBROOK J, PARKS D AH, 1980: Selected Methods in Cellular Immunology WH Freeman and Co., San Francisco, CA, pp 3 – 27.
34. ATLMAN A. S, RANDERS L, RAO GOVIND, 1993: Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations Biotechnol. Prog., 9 (6), pp 671 – 674.
35. ARKIN Y COLTON, 1995. Método Estadístico. México. Editorial Continental.
36. BRADFOR M, 1976. Bioquímica Analítica. Holanda. Editorial Elsevier.