



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

“ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO TÓXICO DE LAS
SECRECIONES ORALES DE COLÚBRIDOS Y VENENOS
VIPÉRIDOS SIMULANDO CANTIDADES EQUIVALENTES DE
INYECCIÓN EN RATONES CON IGUAL MASA.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

PRESENTA

Carlos Iván Arce Navarajo



DIRECTOR DE TESIS: DR. VÍCTOR HUGO REYNOSO ROSALES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA 14
MEXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Carlos Iván Arce Navarajo

FECHA: 24-Feb-04

FIRMA:

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Estudio comparativo del efecto tóxico de las secreciones orales de colúbridos y venenos vipéridos simulando cantidades equivalentes de inyección en ratones con igual masa"

realizado por Carlos Iván Arce Navarajo.

con número de cuenta 09432961-0 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dr. Víctor Hugo Reynoso Rosales

Propietario M. en C. Martha Asunción Sánchez Rodríguez

Propietario M. en C. Carlos Jesús Balderas Valdivia

Suplente Dr. Manuel Miranda Anaya

Suplente Biól. Experimental Gonzalo Acero Galindo

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez.

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGIA

Índice

Agradecimientos	I
Resumen	IV
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
HIPÓTESIS	6
JUSTIFICACIÓN	6
ANTECEDENTES	7
Forma y función del aparato venenoso	7
Glándula de Duvernoy.....	7
Glándula de veneno.....	9
Dientes maxilares posteriores en colúbridos.....	10
Colmillos en vipéridos.....	10
Inyección de veneno en colúbridos.....	12
Inyección de veneno en vipéridos.....	13
Efectos y propiedades de las secreciones de Duvernoy.....	14
Efectos y propiedades de los venenos vipéridos.....	15
Determinación de toxicidad	17
MATERIAL Y MÉTODOS	19
Especies de estudio	19
Mantenimiento de las especies colúbridas.....	20
Extracción de secreciones orales de colúbridos	21
Extracción de veneno en vipéridos	24
Liofilización	25
Determinación del efecto toxico de las secreciones orales y venenos	26
Análisis de mortalidad	28
Examen de patología	29
Determinación de rendimiento líquido, peso seco liofilizado y concentración de proteína de las secreciones orales y venenos	29
Análisis Estadísticos	31

RESULTADOS.....	37
Tiempo de envenenamiento para el primer ratón: Comparación entre las dosis de secreción oral y de veneno inyectadas.....	37
Familia Colubridae.....	37
Familia Viperidae.....	39
Tiempo de muerte del primer ratón: Comparación entre las dosis de secreción oral y de veneno inyectadas.....	41
Familia Colubridae.....	41
Familia Viperidae.....	43
Proporción de ratones muertos: Comparación entre las dosis de secreción oral y de veneno inyectadas.....	45
Familia Colubridae	45
Familia Viperidae	47
Estudio del efecto de las dosis y de las especies en el tiempo de envenenamiento para el primer ratón.....	49
Colúbridos.....	49
Vipéridos.....	50
Estudio del efecto de las dosis y de las especies en el tiempo de muerte para el primer ratón.....	51
Colúbridos.....	51
Vipéridos.....	51
Estudio del efecto de las dosis y de las especies en la proporción de ratones muertos.....	52
Colúbridos.....	52
Vipéridos.....	52
Análisis de mortalidad	53
Comparación de la mortalidad causada por secreciones orales y venenos por Familias y dosis.....	54
Cambios anatomo-patológicos en ratones inyectados con secreciones orales	58

Cambios anatomo-patológicos en ratones inyectados con venenos.....	58
Examen microscópico.....	59
Estudio del rendimiento de secreciones orales y de venenos y su relación con el peso corporal de los organismos de ambas Familias.....	66
Concentración de proteína de las secreciones orales y venenos.....	69
DISCUSIÓN.....	71
Tiempo de envenenamiento para el primer ratón.....	71
Tiempo de muerte del primer ratón.....	72
Proporción de ratones muertos.....	73
Daño macroscópico y microscópico en los ratones inyectados.....	74
Rendimiento y concentración de proteína de secreciones orales y venenos...	75
Aproximación de los resultados a la biología de colúbridos y vipéridos	76
CONCLUSIONES.....	78
LITERATURA CITADA.....	80

A mis padres

Carlos Arce

Lidia Navarajo

A mis hermanos

Carla, Lidia y Anuar

A mi amigo Leonardo

A mi Universidad

Agradecimientos:

Agradezco sinceramente al Dr. en C. Víctor Hugo Reynoso Rosales por la dirección en esta tesis.

A los miembros del jurado Marta Sánchez Rodríguez, Carlos Balderas Valdivia, Gonzalo Acero Galindo y Manual Miranda por sus valiosas observaciones en el presente trabajo en la parte estadística, evolutiva, técnicas de laboratorio y fisiológica.

Al Dr. Oscar Dorado, Director del Centro de Investigación y Educación Ambiental de la Sierra de Huautla, Morelos por las facilidades otorgadas para la colecta de ejemplares en la Reserva de Huautla.

A los Biólogos Rafael Aguilar Cortés, Daniel Barreto Oble, Gonzalo Acero Galindo, al M. en C. Carlos Balderas Valdivia y al P. de B. Henry Carmona, por los conocimientos y experiencias compartidas durante la captura y manejo de serpientes.

A la Bióloga Mónica Salmerón por facilitarme ejemplares colúbridos así como el espacio físico para realizar extracciones orales en el Herpetario de la Facultad de Ciencias.

Al M.V.Z. Mario Soriano Bautista y la Bióloga Dora María Salazar Castelo por proporcionarme ratones para la alimentación de las serpientes y las cajas de policarbonato durante el experimento.

A los M.V.Z. Carla Arce Navarajo y Rene Salazar Luna por mostrarme técnicas de inyección intramuscular e intraperitoneal.

Al M. en C. Rafael Madrid Ríos uno de mis mejores maestros y amigos por su apoyo y confianza durante la realización de los análisis estadísticos.

A la Dra. Gabriela Arenas y el Dr. Johnstone Baldomero Hernández por su gran ayuda en la sección histológica y de fotografía, a la M. en C. Esthela Sandoval Zapotitla por su asistencia para digitalizar las imágenes de los cortes histológicos, en el Laboratorio de Apoyo a la Investigación, Jardín Botánico, IBIOLOGIA, UNAM.

A toda mi familia y amigos por el interés y apoyo durante la realización del trabajo permitiéndome llegar hasta donde estoy.

RESUMEN

Las secreciones orales de las serpientes colúbridas son menos tóxicas que el veneno de los vipéridos para matar rápidamente a sus presas, sin haberse hecho un estudio comparativo del efecto tóxico con cantidades equivalentes de secreciones orales y venenos inyectados. Es indispensable determinar si la baja toxicidad en la acción de las secreciones orales colúbridas es un problema de función del aparato venenoso o de la letalidad del veneno. Para determinar el efecto tóxico de las secreciones orales y venenos, se realizó un experimento basado en inyección intraperitoneal de cantidades equivalentes de secreciones orales y venenos a 128 grupos de 10 ratones. Con la finalidad de contar con un gradiente muy fino, a cada grupo se le suministraron diferentes dosis proporcionales al peso por ratón, partiendo de una dosis de secreción oral que no causa envenenamiento ni muerte. Las dosis aplicadas fueron 0.1, 0.3, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5 y 9 mg/lote de 10 ratones. Se utilizaron secreciones orales de los colúbridos *Trimorphodon tau*, *T. biscutatus*, *Oxybelis fulgidus* y *Salvadora bairdi*, todos con evidencia previa de toxicidad; y venenos de los vipéridos *Crotalus basiliscus*, *C. triseriatus*, *Agkistrodon bilineatus* y *Sistrurus ravus*, mezclando las muestras liofilizadas de dos organismos por especie obtenidas durante tres meses.

Para determinar el efecto tóxico se midió el tiempo de envenenamiento del primer ratón, tiempo de muerte del primer ratón y la proporción de ratones muertos. La tendencia de la repuesta al cambio se analizó con el método de polinomios ortogonales, y se contrastaron las diferencias entre las medias de las respuestas con ANOVA. La comparación de las curvas de mortalidad se realizó mediante un análisis de supervivencia. La asociación entre el peso corporal de las serpientes y rendimiento de secreciones orales y venenos se analizó con regresión lineal simple utilizándose regresión lineal múltiple para saber si existen otros factores asociados al rendimiento. Una prueba *t*-student se usó para comparar el promedio de la concentración de proteínas de las muestras.

Los resultados indican que las secreciones de colúbridos son siempre menos tóxicas que los venenos vipéridos en las diferentes dosis inyectadas. El tiempo de envenenamiento para el primer ratón, tiempo de muerte para el primer ratón ocurrieron con los venenos vipéridos desde la dosis 0.1 mg, sin embargo, las secreciones orales colúbridas causaron síntomas de envenenamiento a partir de la dosis 1.5 mg, y solo las secreciones orales de *Trimorphodon tau* y *T. biscutatus* causaron la muerte de los ratones a partir de esta dosis. La proporción de ratones muertos inyectados con secreciones orales es del 30% en dosis de 1.5 mg y solamente se llega al 60% en dosis de 9 mg; en cambio en los vipéridos alcanza el 40% en dosis de 0.1 mg y a partir de la dosis 1.5 mg sobrepasa el 90% de muertes. El análisis de mortalidad indica que el 90% de los casos de muerte ocurren después de los 200 minutos cuando las secreciones orales requieren poco más de 1000 minutos para causar tan solo el 40%. Se observó interacción dosis-especie significativas en el tiempo de envenenamiento del primer ratón sólo para colúbridos, y en la proporción de ratones muertos, sólo para vipéridos.

Necropsias realizadas en ratones inyectados mostraron que tanto secreciones orales como venenos afectan con inflamación y edema el corazón, pulmón, hígado, bazo, tubo gastrointestinal, riñón y piel, a partir de la dosis 1.5 de secreciones orales y desde la dosis 0.1 mg de venenos. Los análisis de concentración de proteínas indican que los venenos tienen de 0.6 a 3.49 veces mayor concentración de proteína que las secreciones orales, argumentando mayor letalidad del veneno. El rendimiento líquido de las secreciones orales es tres veces mayor que el rendimiento de los venenos y el rendimiento sólido es tres veces mayor en los venenos. Sin embargo el rendimiento por peso vivo del animal es igual para ambas serpientes.

Los colúbridos y vipéridos tienen diferente sistema de inyección de veneno con una función biológica primaria distinta. En el caso de los vipéridos, un sistema de inyección eficiente y la alta toxicidad produce una muerte casi instantánea de las presas, lo que no sucede con los colúbridos. Los colúbridos no solo tienen un sistema de inyección ineficiente, sino que las secreciones orales también son menos tóxicas. A pesar de esto facilitan la captura de sus presas garantizando su supervivencia.

INTRODUCCIÓN

Las serpientes cuentan esencialmente con dos métodos para inmovilizar a sus presas, el veneno y la constricción. Ambos métodos reducen el riesgo de escape de la presa y el daño provocado a la serpiente durante la ingestión de la misma (Gans, 1961, 1978). El veneno tiene varias funciones: inmovilización o muerte de la presa (Gans, 1978), acelerar la digestión (Thomas y Pough 1979; Rodríguez-Robles y Thomas, 1992), así como defensa contra los depredadores (Minton y Minton, 1980; Gans, 1978).

La toxicidad de los venenos se expresa a menudo como la "dosis letal mínima", que es la cantidad de tóxico que mata a un animal experimental en particular (Minton y Minton 1980). La caracterización de un veneno demanda que su toxicidad sea evaluada bajo condiciones controladas. El estudio de relación entre las dosis y el evento tóxico se comprueba de dos maneras. En la primera el evento se describe en términos del número de individuos muertos en la población e incrementándose dicha frecuencia conforme aumenta la dosis. En la segunda se describe como la acción de envenenamiento y de daños en órganos internos observada en los individuos, donde la severidad del efecto se incrementa conforme se incrementa la dosis (Klanssen y Watkins, 1999; Williams *et al.*, 2000; Loomis, 1982).

La Familia Colubridae contiene más del 77% de todas las especies vivientes de serpientes (Zug *et al.*, 2001). Son generalmente consideradas como inofensivas, sin embargo, cerca de la mitad de estas serpientes producen algún tipo de veneno, reflejándose la necesidad de estudiar las secreciones orales colúbridas (McKinstry, 1978; Weinstein y Smith, 1993; Hill y Mackessy, 1997; De Lisle, 1982).

Algunos géneros de serpientes colúbridas en América que muestran evidencia de secreciones tóxicas son *Coniophanes*, *Hypsiglena*, *Leptodeira*, *Oxybelis* y *Trimorphodon* (McKinstry, 1978). Los reportes de mordeduras de colúbridos tóxicos involucran humanos (Hayes y Hayes, 1985; Johnson, 1988; Pinto *et al.*, 1991; Kirchberg y Davidson, 1991; Fritts *et al.*, 1994; de Araújo y dos Santos, 1997; Senter, 1998) llegando incluso a causar decesos (Ferlan *et al.*, 1983; Douglas *et al.*, 1984; Kornalik *et al.*, 1978; Mittleman y Goris, 1978; Minton, 1990). Los primeros casos de envenenamientos reportados tienen aproximadamente cien años (Minton 1979; 1990; McKinstry, 1983). También hay reportes de los efectos en animales de laboratorio que muestran envenenamientos locales (Jansen, 1987; Rosenberg *et al.*, 1992; Rodríguez-Robles y Thomas; 1992) y sistémicos (Hiestand y Hiestand, 1979; Kornalik *et al.*, 1978).

La evidencia morfológica en colúbridos que poseen secreciones orales tóxicas muestra que la presencia de la glándula de Duvernoy es el indicador primario de toxicidad (McKinstry, 1983), siendo esta una característica única de las serpientes colúbridas (Taub, 1967). El segundo indicador morfológico de toxicidad es la presencia de un diente maxilar posterior agrandado ya sea acanalado o sólido. Se ha sugerido que la secreción de las glándulas de Duvernoy de las serpientes colúbridas permiten incapacitar a sus presas facilitándoles la alimentación, siendo factible que su función primaria sea inmovilizar a la presa y no matarla (Savitzky, 1980; Gans, 1978; Rosenberg *et al.*, 1985; Vest, 1981) y, tal vez, ayudar en la digestión (Gans, 1978; Jansen, 1987; Garland y Arnold 1983).

El aparato de inyección de veneno de los colúbridos presenta una morfología distinta al de los vipéridos. Se nombra sistema de veneno de baja presión al de los colúbridos y sistema de veneno de alta presión al de los vipéridos (Kardong y Lavin, 1993). En las serpientes colúbridas la secreción oral es introducida lentamente durante la alimentación al no haber músculos asociados a las glándulas, como en las serpientes vipéridas. La cantidad de secreción introducida en la presa generalmente no ha sido comparada con las serpientes venenosas salvo algunos trabajos con colúbridos muy venenosos como son *Dispholidus*, *Thelotornis* y *Rhabdophis* (Kochva, 1987; Rosenberg *et al.*, 1985).

La toxicidad de las secreciones de la glándula de Duvernoy varía en alto grado dentro de las especies colúbridas (Mittleman y Goris, 1978; Jansen, 1987; Hill y McKessy, 1997; Fontana *et al.*, 1996; Vest, 1981). Se han analizado las secreciones orales de algunas especies colúbridas que muestran componentes biológicamente activos similares a los producidos por las serpientes típicamente venenosas, como son actividades coagulantes, hemorrágicas, actividades fibrinógenas o fibrinolíticas y edema (Kornalik *et al.*, 1978; Rosenberg *et al.*, 1985; 1992; Assakura *et al.*, 1992).

Mientras que ha habido investigaciones de las acciones biológicas del veneno de serpientes elápidas y vipéridas, poco se ha hecho para elucidar las acciones de las secreciones orales colúbridas, debido a la pequeña cantidad de secreción que produce la glándula de Duvernoy (Hiestand y Hiestand, 1979; Ovadia, 1987; Assakura *et al.*, 1992; Kornalik *et al.*, 1978; Rosenberg *et al.*, 1985; 1992). Algunos de los trabajos donde han utilizado secreciones orales han sido reportados por: Rosenberg *et al.* (1985), indicando que dosis subletales de la secreción oral de *Malpolon monspessulanus*, *Spalerosophis diadema cliffordi* y *Thamnophis sirtalis parietalis* inyectadas en ratones de laboratorio causaron parálisis y respiración anormal, mientras que dosis más bajas reducían la movilidad. Vest (1981) inyectó ratones de laboratorio con secreción reconstituida de la glándula de Duvernoy de *Thamnophis elegans*, causando hemorragia localizada en el sitio de la inyección y hemorragia sistémica, sin mostrar manifestaciones inmediatas de dolor. Después de 150 minutos de la inyección letal los animales murieron mostrando dificultades respiratorias. Jansen (1983) sugirió que la secreción de la glándula de Duvernoy sirve por como agente antibacterial al encontrar que la secreción tiene un alto efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano, sugiriendo que la secreción puede funcionar en el mantenimiento de las superficies dentales por medio de una acción limpiadora. En otro trabajo Jansen (1987) propuso una acción mionecrótica de la secreción de la glándula de Duvernoy. Al acelerar la digestión, los venenos pueden permitir a las serpientes vaciar su estómago rápidamente, pudiendo escapar de los depredadores o moverse más rápido cuando persigue a una nueva presa (Garland y Arnold, 1983).

El sistema de inyección de veneno en colúbridos es poco eficiente comparado al de los vipéridos (Kardong, 1996). A pesar de esto se han registrado casos de envenenamientos colúbridos que serían el resultado de la inoculación de cantidades muy pequeñas de secreciones orales de la glándula de Duvernoy (Hayes *et al.*, 1993). Así, se esperaría que el grado de toxicidad aumente si las secreciones orales fueran inoculadas en proporción equivalente de los venenos (Rodríguez-Robles y Thomas, 1992). Debido a esto es importante investigar cuál es el efecto de estas secreciones orales y venenos si son inoculadas simulando cantidades equivalentes para conocer el potencial de toxicidad de los colúbridos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Comparar el efecto tóxico de las secreciones orales y venenos de algunos colúbridos y vipéridos con dosis controladas para determinar si el bajo efecto de las secreciones orales de colúbridos es un problema de función del aparato venenoso o de la letalidad de las secreciones orales.

Objetivos particulares

1. Describir y comparar el efecto tóxico de dosis equivalentes de secreciones orales y venenos en un gradiente, en función del a) tiempo de envenenamiento del primer ratón, b) tiempo de muerte del primer ratón y c) la proporción de ratones muertos, mediante la inyección intraperitoneal en ratones de igual masa.
2. Detectar la diferencia que se produce entre las curvas de mortalidad por envenenamiento con secreciones orales colúbridas y venenos vipéridos.
3. Describir el daño en órganos y tejidos causado por las secreciones de Duvernoy y los venenos en ratones de laboratorio.
4. Reportar los rendimientos de las secreciones orales de las especies colúbridas y los venenos de las especies vipéridas y conocer la relación que existe entre la masa del veneno y secreciones orales vs. la masa corporal de las serpientes.
5. Determinar la concentración de proteína de las muestras de secreciones orales y venenos de las de las especies *Trimorphodon tau*, *T. biscutatus*, *Salvadora bairdi*, *Oxybelis fulgidus*, *Agkistrodon bilineatus*, *Crotalus molossus*, *C. basiliscus* y *Sistrurus ravus*.

HIPÓTESIS

Si la toxicidad de las serpientes colúbridas es igual a la de los vipéridos, entonces cantidades iguales tendrán el mismo efecto letal sobre las poblaciones de ratones.

JUSTIFICACIÓN

Las serpientes colúbridas son menos eficientes que las vipéridas para inyectar veneno y matar rápidamente a sus presas (Kardong, 1980, 1996), sin embargo, no se ha hecho un estudio para comparar el efecto tóxico con respecto a la misma cantidad de secreciones orales y venenos inyectados. En este sentido, es importante obtener información de las secreciones orales colúbridas y de sus propiedades tóxicas debido al desconocimiento que se tiene al respecto (De Lisle, 1982; McKinstry, 1983).

ANTECEDENTES

Forma y función del aparato venenoso

Glándula de Duvernoy. La glándula de Duvernoy, es una glándula tubular y compleja que en algunas especies colúbridas se encuentra en la región posterior supralabial, externa al ligamento cuadratomaxilar (De Lisle, 1982). La glándula de veneno en vipéridos y la glándula de Duvernoy en colúbridos forman un rudimento común embrionario asociado a los dientes con la parte trasera de la lámina dental. Cuando se encuentran simultáneamente dientes anteriores y posteriores en el maxilar, sólo el posterior presenta canal de secreción (Kochva, 1965; Kardong, 1980).

Aunque no está claro exactamente cuantas especies colúbridas poseen esta glándula, Taub (1967) encontró que estaba presente en alrededor de 250 de 300 especies que examinó. En dicho trabajo se reconocen cuatro arreglos distintos en Colubridae. La más simple y probablemente la más primitiva es una glándula mucosa supralabial que puede ser diferenciada anteriormente dentro de una glándula premaxilar o puede ser parte de una serie de lóbulos mucosos a lo largo de la cresta supralabial. El segundo patrón consiste en una glándula mucosa supralabial, con una predominante glándula de Duvernoy serosa mezclada con algunas células mucosas. El tercer patrón puede ser una variante o el precursor del segundo patrón y consiste de una glándula supralabial mucosa con algunas células serosas incluidas. El cuarto patrón está representado por la presencia de una glándula supralabial mucosa con una glándula de Duvernoy con células serosas. Taub (1967), notó una tendencia hacia la reducción en la altura de las células, aumento en la capacidad de almacenaje y en la separación de las células serosas de la glándula supralabial dentro de la glándula de Duvernoy (Kardong, 1980).

La glándula de Duvernoy de los colúbridos se diferencia de la glándula de veneno de vipéridos y elápidos en carecer de un espacio de almacenamiento en los túbulos y de una acción muscular para su rápida expulsión (Figura 1A). Se ha sugerido que el papel biológico de la glándula de Duvernoy es diferente del de las

serpientes venenosas más avanzadas, que más bien tiene que ver con una táctica de muerte rápida de la presa (Kardong, 1980). Son pocos los colúbridos que poseen grandes almacenes de lumen y músculos estriados que ejerzan fuerza mecánica sobre la glándula, resultando con una táctica de envenenamiento rápido análoga a la de los vipéridos, que permite matar rápidamente a la presa capturada (e. g. *Dispholidus typus* y *Thelotornis kirthlandi*; Kardong, 1980).

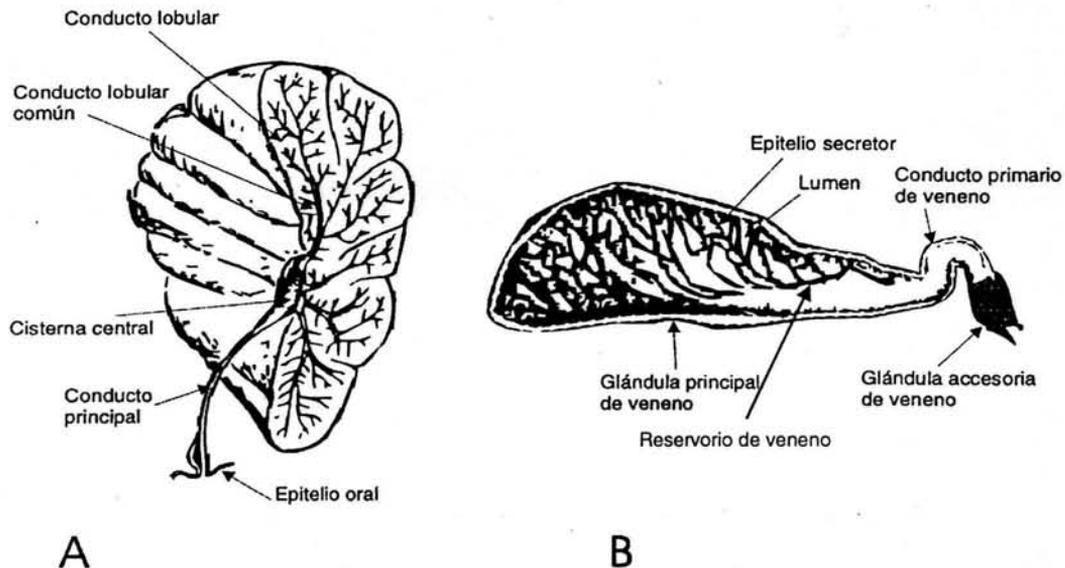


Figura 1. Glándula de Duvernoy y de veneno: Comparación entre colúbridos y vipéridos. A: En la figura se observa el arreglo del sistema de conductos internos de la glándula de Duvernoy, dichos conductos drenan en el parénquima. Es un simple conducto que parte de la cisterna central dentro de la glándula y se extiende en el epitelio oral rodeando el diente maxilar posterior. **B:** Esta figura muestra una vista sagital de la glándula de veneno, se observa el epitelio secretor así como un reservorio grande de veneno (Modificado de Weinstein y Kardong, 1994).

No se conoce completamente el mecanismo secretor de la glándula de Duvernoy. Se piensa que existe una etapa prolongada de reposo donde la glándula se encuentra inactiva, así como un periodo de actividad corto que puede durar varias horas asociado con la alimentación. Es posible que este periodo se encuentre controlado por inervación parasimpatomimética como parte de la regulación digestiva. La secreción serosa sale de las células durante el estado activo (De Lisle, 1982).

Glándulas de veneno. Las glándulas de veneno de los vipéridos, elápidos y serpientes de mar (hidrópidos) están situadas en el espacio entre el ojo y el ángulo de la boca. Las glándulas de veneno de las dos subfamilias vipéridas, Viperinae y Crotalinae son similares en forma y estructura pero el lumen de los crotálidos se encuentra en una posición más ventral (Kochva y Gans, 1966). La glándula es triangular, replegándose posteriormente a la unión cuadratomandibular, dorsalmente al hueso parietal y formando anteriormente en su extremo más elongado el conducto de la glándula de veneno. La glándula se une a varios huesos por medio de tres ligamentos: el cuadratomaxilar que conecta la articulación cuadratomandibular con el tejido conectivo periorbital, el ligamento cuadratoglandular que conecta el área dorsomedial de la glándula con la articulación cuadratotemporal, y el ligamento transversoglandular que conecta la articulación ectopterigoideo-pterigoideo con el aspecto ventromedial de la glándula (Kochva, 1958). En los vipéridos un músculo especial, el compresor glandular, ayuda a exprimir el veneno de las glándulas (Minton y Minton, 1980). La glándula de veneno tiene cuatro regiones: 1) la glándula de veneno principal, que abarca la mitad posterior de su longitud y consiste de un lumen central grande dentro del cual hay túbulos ramificados dicotomizados; 2) el conducto primario, donde el lumen se angosta; 3) la glándula accesoria, donde el lumen pasa por constricción presentando túbulos anteriores (formado por epitelio mucoso) y posteriores, donde se une con 4) el conducto secundario conectándose hacia los colmillos (Gans, 1978; Figura 1B).

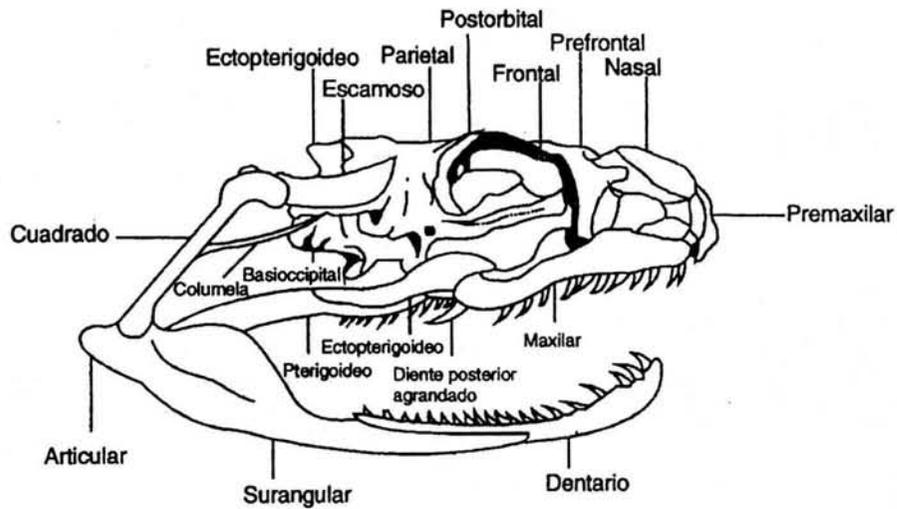
Las células secretoras forman el componente principal del epitelio glandular comprendiendo más del 80% del total celular. Hay cambios que ocurren en las células secretoras relacionándose con los estadios del ciclo secretor, donde el tamaño de las células secretoras se incrementa alrededor de cuatro días después de una extracción de veneno, aún en serpientes que han permanecido sin comer por un periodo de tiempo de hasta tres meses (De Lucca *et al.*, 1974). El complejo sistema de veneno tiene un desarrollo embrionario común originándose de la lámina dental del maxilar (Kochva, 1965, Kardong, 1980).

Casi todos los registros de extracciones de veneno a gran escala indican que, la cantidad de veneno por serpiente declina cuando ocurren sucesivas extracciones. En teoría, las extracciones repetidas de una serpiente sana pueden incrementar la producción de veneno a intervalos de quince a veinte días, debido a que el epitelio de la glándula de veneno se mantiene en fase secretora (Minton y Minton, 1980).

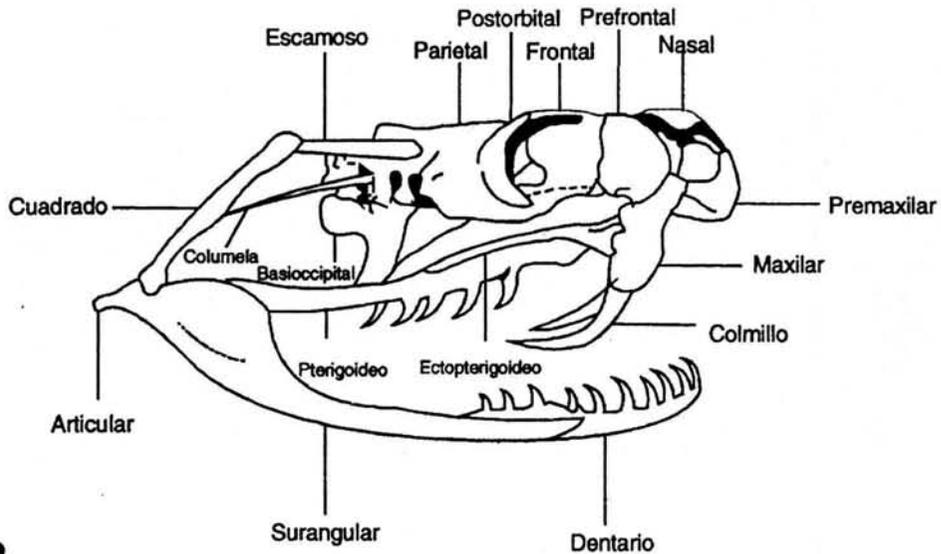
Dientes maxilares posteriores en colúbridos. Se conoce poco de la función de los dientes de serpientes colúbridas opistoglifas sugiriéndose que cumplen con un papel doble, la captura y tragado de la presa. Durante la captura, los movimientos del maxilar provocan que los dientes maxilares hagan contacto con la presa. Debido a que los dientes son largos, curvos y filosos en la cresta posterior, permiten que la penetración sea profunda. En el momento de la penetración actúan dos fuerzas separadas: un pinchazo y un golpe que corta. La elongación de los dientes posteriores provee una ventaja facilitando la entrada de las secreciones orales en la presa: especialmente cuando la presa es resbaladiza o cuando ésta ofrece resistencia; y de hecho, muchas especies colúbridas presentan canales de secreción en estos dientes (Kardong, 1979, 1980).

El diente maxilar posterior alargado de los colúbridos está presente a menudo, pero no universalmente. Se separa de los dientes anteriores por un diastema, existiendo variación en el tamaño y grado de acanalamiento del diente (Young y Kardong 1996). Los canales aunque generalmente son diferentes y están asociados con el diente maxilar posterior, pueden aparecer en todos los dientes maxilares. También canales débiles están presentes en palatino, pterigiodeo y otros huesos dentados de algunas especies (Young y Kardong, 1996; Figura 2A).

Colmillos en vipéridos. Los colmillos en vipéridos corresponden a los dientes maxilares anteriores alargados y curvos con la capacidad de proyectarse al frente.



A



B

Figura 2. Huesos del cráneo: Comparación entre colúbridos y vipéridos. A: Se observa el cráneo de un colúbrido. B: Cráneo de un vipérido. Las figuras no están escaladas (Tomado de Kochva, 1987).

Quando la serpiente muerde a su presa, el maxilar sufre una rotación extensiva hacia adelante quedando los colmillos en posición erecta (Kardong, 1980). Los colmillos son los primeros en hacer contacto con la presa inclinando la cúspide hacia delante de manera que coincide con la fuerza resultante en el momento de la

mordedura. Al impacto están presentes por lo menos tres fuerzas separadas: la causada por el cierre de las mandíbulas, la causada por la retracción del aparato mandibular y la de la curvatura de la punta del colmillo que se encuentra en estrecha relación con la fuerza resultante, incrementando la oportunidad de herir a la presa. La parte basal de los dientes está inclinada posteriormente, de tal manera que si la presa intenta escapar los dientes se hunden más profundamente (Kardong, 1980). Aunque los dientes de los vipéridos puedan jugar un papel mecánico secundario en el tragado, su papel biológico primario es introducir veneno para promover una muerte rápida de la presa.

Los colmillos anteriores de los vipéridos tienen un canal de veneno, siendo un tubo hueco distinto al de la cavidad pulpar del diente. Los detalles de la estructura de los colmillos y su posición en los huesos maxilares sugieren que los colmillos anteriores son homólogos de los colmillos maxilares posteriores de los colúbridos (Pough *et al.*, 1998; Figura 2B).

Inyección de veneno en colúbridos. La glándula de Duvernoy solamente se comprime por los músculos estriados de la quijada, el reservorio luminal donde se almacena la secreción oral es pequeño o está ausente, por lo que las secreciones no se descargan con un pulso a presión. Al no poseer colmillos huecos, la secreción en colúbridos escurre a través de surcos o canales de los dientes posteriores agrandados que pueden ser obstruidos con los tejidos de la presa (Figura 3A).

Como resultado de las bajas cantidades de secreción, el veneno no actúa durante la captura de la presa. Esto causa que el aparato asociado a la glándula de Duvernoy sea un sistema ineficiente para matar rápidamente (Kardong, 1980; Kardong y Lavin, 1993). Por ejemplo, en un trabajo para determinar la cantidad y distribución proporcional de la secreción de Duvernoy inoculada en el integumento y en las vísceras por mordida natural de *Boiga irregularis*, se determinó que cerca del 54% (1-5 mg) de la secreción alcanzó las vísceras, mientras que el resto permaneció en el integumento (Hayes *et al.*, 1993). Debido a que no existen

músculos estriados asociados a la glándula, las secreciones orales se liberan más lentamente que las especies vipéridas (Kardong y Lavin, 1993).

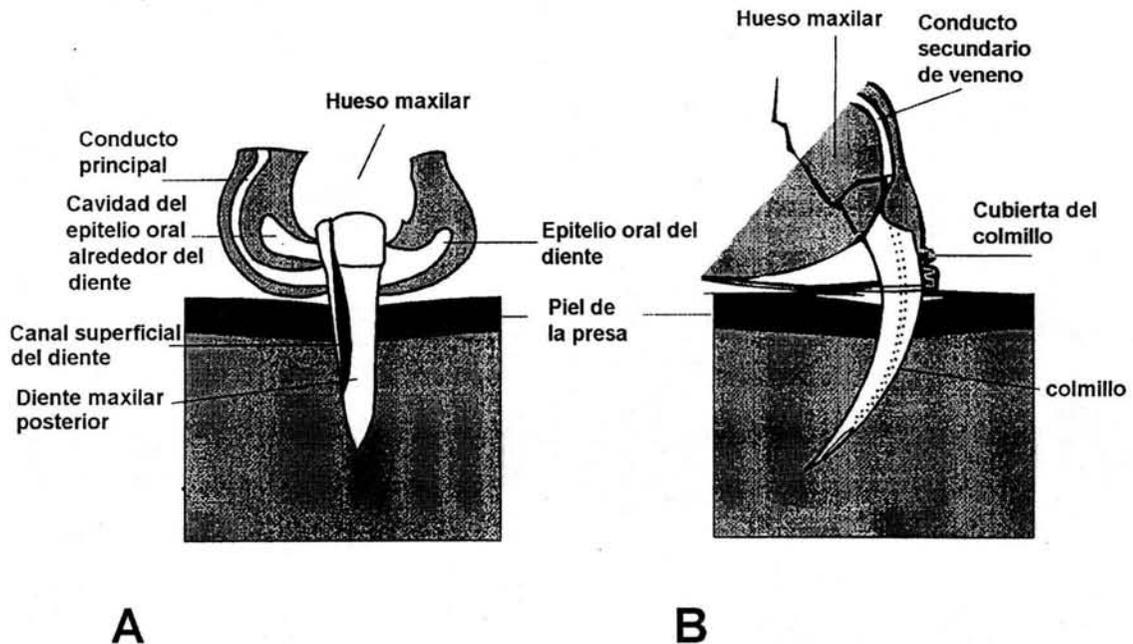


Figura 3. Inyección de veneno: Comparación entre colúbridos y vipéridos. A: Al penetrar la piel de la presa el epitelio oral permanece en la superficie y la secreción de Duvernoy escurre por el surco o canal del diente. B: Cuando el colmillo penetra la piel de la presa, la unión del conducto de veneno mantiene una alta presión y el veneno pasa sin obstrucción llegando profundamente a los tejidos (Tomado de Weinstein y Kardong, 1994).

Inyección de veneno en vipéridos. El aparato venenoso de vipéridos incluye un colmillo en asociación con una glándula de veneno, un reservorio grande y encapsulado y un músculo compresor glandular que oprime la glándula liberando el veneno (Kardong, 1980; Gans, 1978). El desarrollo de un canal de veneno cerrado y de un sello ajustado entre el conducto y la base del canal dentro del colmillo permiten desplegar el flujo de veneno en un sistema de alta presión (Kardong y Lavin 1993; Figura 3B). El músculo compresor glandular se extiende dorsal y lateralmente rodeando la glándula lateral, posterior y medialmente, insertándose también en la superficie lateral de la mandíbula. El sistema de inyección de veneno en vipéridos va acompañado por un cambio en la estrategia de captura, de una mecánica a una química, donde la toxicidad del veneno juega un papel importante (Kardong y Lavin, 1993).

Uno de los factores más importantes para determinar el peligro de una mordedura de serpiente es la cantidad de veneno inyectado (Klauber, 1956; Minton y Minton, 1980). Los factores que la influyen incluyen el tamaño y apetito de las serpientes, así como el tamaño de las presas (Hayes *et al.* 1995). La cantidad de veneno inyectado es muy variable, ya que las serpientes pueden inyectar el contenido completo o parcial de sus glándulas de veneno al momento de morder (Minton y Minton, 1980; Gans, 1978), o bien, pueden morder sin inyectar veneno alguno (Gennaro *et al.*, 1961). Un trabajo con resultados relativamente consistentes muestra que el vipérido *Vipera palaestinae* inyecta cerca del 11% de su veneno en una mordida promedio, pero en la mayoría de las mordidas liberó menos de 50 mg (cerca de 10 mg liofilizado; Kochva, 1960). Un estudio de Hayes *et al.* (1995) indicó que el tiempo de muerte de la presa no varía con el tamaño de la serpiente ni con el tamaño de la presa. El tiempo de muerte de la presa no está correlacionado con la cantidad de veneno inyectado, ni con el lugar de la mordida, concluyendo que *Crotalus viridis oreganus* inyecta una cantidad mayor de veneno en presas grandes. Esto sugiere que las serpientes poseen una capacidad intrínseca de medir el veneno que inyectan, siendo determinantes, los ojos y órganos termosensibles como sistema de respuesta multisensorial para la discriminación en el tamaño de la presa antes de ser mordida.

Efectos y propiedades de las secreciones de Duvernoy. Las investigaciones recientes de las secreciones de Duvernoy han indicado que las especies colúbridas generalmente poseen secreciones que varían en el grado de toxicidad. El sistema de Duvernoy es muy ineficiente para matar presas rápidamente. Los disfolídinos *Dispholidus typus* y *Thelotornis*, y los natricinos *Rhabdophis tigrina* y *Rhabdophis subminiata*, producen secreciones orales altamente tóxicas, así que son excepciones a esta tendencia (Weinstein y Smith, 1993).

El envenenamiento por colúbridos puede ser dividido en dos grupos, uno que causa envenenamiento sistémico además de síntomas locales, y otro que causa únicamente envenenamiento local en el sitio de la mordida. La manifestación más seria del envenenamiento colúbrido es la coagulopatía

(condición que afecta al proceso de coagulación sanguínea) asociada con extensas hemorragias internas y externas. La mayoría de envenenamientos colúbridos involucra síntomas confinados a la extremidad mordida y generalmente incluyen dolor, inflamación que puede involucrar el miembro completo y equimosis local (mancha negroazulada en la piel producida por la filtración de sangre de los vasos lesionados), inflamación regional de los nodos linfáticos y rigidez, dolor en las articulaciones, náusea, linfadenitis (inflamación de los ganglios linfáticos), linfangitis (inflamación de los vasos linfáticos) y parestesias (sensación anormal, como de quemazón, hormigueo o entumecimiento) (Minton, 1990; 1996).

Una secreción oral, al igual que los venenos, se describe por sus características tales como, color, composición química, viscosidad, contenido de proteína y toxicidad, determinadas generalmente bajo condiciones de laboratorio. El contenido líquido es usualmente el doble al de un veneno, y más blanco.

Aun cuando las propiedades tóxicas de las secreciones orales probadas en laboratorio presenten una potencialidad alta, esta podría no tener un significado biológico en cuanto a la sobrevivencia de la especie ya que hay una especificidad de los venenos hacia las presas de que se alimentan determinadas especies siendo estas más sensibles al veneno (Kardong, 1996). La creencia de que las glándulas orales son adaptaciones para matar a la presa puede resultar no ser cierto, ya que en las secreciones se ocultan varios papeles biológicos observados cuando se examinan minuciosamente y experimentalmente (Rodríguez-Robles y Thomas, 1992; Kardong, 1996).

Efectos y propiedades de los venenos vipéridos. Los venenos vipéridos generalmente se manifiestan como un patrón de hemorragias y necrosis, aunque existen excepciones. La secuencia de eventos en un envenenamiento es similar al envenenamiento con secreciones de Duvernoy. En ambas, el animal se manifiesta al principio intranquilo irritable e hiperactivo, rascando o mordiendo el sitio de inyección. Después empieza un periodo de calma, durante el cual se acumulan junto a otros animales de laboratorio permaneciendo alerta. Se oscurece el sitio de la inyección exudando fluido con sangre mientras se inflama. Puede haber un

periodo corto de actividad casi normal seguido por otro estado de quietud que eventualmente termina en colapso y muerte. La autopsia muestra hemorragia extensa bajo el área inflamada, la piel alrededor del sitio de inyección se necrosa, puede haber petequias en el corazón, pulmones, intestino y otros órganos manifestada por manchas rojo purpúreas del tamaño de la punta de alfiler producida por una hemorragia intradérmica o subcutánea. Si la dosis es subletal, presentan un estado de abatimiento y daño alrededor del sitio de inyección por un día o más, el animal está débil, anoréxico y apático antes de recobrar su salud (Minton y Minton, 1980).

En dosis proporcionalmente grandes cuando una serpiente muerde a su presa, los venenos vipéridos matan con rapidez, tal vez debido al efecto directo sobre el sistema cardiovascular. Para que la serpiente asegure su alimento, el veneno debe ser capaz de inmovilizar a la presa pronto (Minton y Minton, 1980). Otro papel biológico de los venenos es neutralizar ciertos productos tóxicos de la presa (Kardong, 1980).

Al igual que las secreciones de Duvernoy (Kardong, 1996, Mejía; 1987), el veneno además de inmovilizar contiene sustancias que actúan como enzimas, como activadores o inhibidores enzimáticos o como agentes que bloquean los receptores celulares, que resulta en el desequilibrio de los sistemas biológicos esenciales de la presa. Los venenos son de naturaleza compleja y están compuestos por:

a) Enzimas donde la variedad y cantidad presentes en determinado veneno están en relación con la especie y confiere al veneno propiedades diferentes. La hialuronidasa y la fosfolipasa A₂ son comunes en casi todos los venenos. Los efectos farmacológicos de las enzimas son: acción procoagulante y fibrinolítica, liberación de quininas, daño capilar local y tisular y hemólisis. Se ha comprobado la presencia de enzimas proteolíticas en el veneno (Thomas y Pough, 1979) apoyando su papel digestivo (Kardong, 1980). Estas enzimas incrementan la velocidad de digestión que es una ventaja al ingerir presas relativamente grandes (Gans, 1961).

b) Proteínas y polipéptidos no enzimáticos como son:

1. Neurotoxinas que son las principales proteínas tóxicas de los venenos de elápidos que bloquean la transmisión neuromuscular y producen la muerte de los animales por parálisis respiratoria.
 2. Miotoxinas siendo polipéptidos que provocan contractura del músculo esquelético y producen mionecrosis local, existen en los venenos vipéridos y se reúnen en cuatro grupos: Fosfolipasas A miotóxicas, miotoxinas básicas, cardiotoxinas y miotoxinas hemorrágicas.
 3. Hemorraginas que son metaloproteínas responsables de manifestaciones hemorrágicas y edemáticas.
- c) Carbohidratos, lípidos, iones como Zn, Ca, Mg, Na, K, Fe, Co, detritus celulares y aminos bioquímicas como son la histamina, serotonina, bradiquinina y acetilcolina, que están involucradas en la producción del dolor, edema y la alteración de la presión arterial (Minton y Minton, 1980).

La composición fisicoquímica es variable con la especie. Existen variaciones entre ejemplares de la misma especie, relacionados con la edad y la distribución geográfica. La toxicidad del veneno de cualquier especie dependerá de las sustancias que estén presentes, el tamaño y estado de salud de la serpiente, la cantidad de veneno que utiliza, así como la naturaleza de su presa, ya que los venenos tienden a ser más efectivos en la presa natural de que se alimentan (Mattisson, 1990; Minton y Minton, 1980).

Determinación de toxicidad. Evaluar el poder biológico de las toxinas es complejo debido a que existe mucha variabilidad tanto en las toxinas como en los animales de laboratorio donde se prueban. Entre mamíferos existe una variación significativa del efecto de la toxicidad aún entre especies cercanamente relacionadas, como es el caso de ratones y ratas (Minton y Minton, 1980). Para la mayoría de los ensayos de toxicidad las rutas de inyección son intravenosa, intraperitoneal o subcutánea. La inyección intraperitoneal, en la cual la aguja se inserta en la cavidad abdominal, es fácil de realizar y los resultados son consistentes. Para casi todos los venenos, la dosis letal intraperitoneal es intermedia a la intravenosa y subcutánea (Minton y Minton, 1980).

La dosis letal 50 (LD50), es la dosis que mata a la mitad de los animales en un grupo experimental, variando la dosis de toxinas hasta que la mayoría de los animales que reciben la dosis más alta mueren y la mayoría de los que reciben la dosis más baja sobreviven (Minton y Minton, 1980).

Los venenos retienen su toxicidad y la mayoría de sus propiedades durante años si son almacenados alejados de la luz y de la humedad. Se ha reportado que los venenos liofilizados retienen sus propiedades letales por alrededor de quince años, aún cuando algunas de sus actividades enzimáticas se pierden o disminuyen (Minton y Minton, 1980).

MATERIAL Y MÉTODOS

Especies de estudio

Se obtuvieron muestras de secreciones orales de cuatro especies colúbridas y los venenos de cuatro especies vipéridas. Se usaron dos organismos de cada especie. Las especies colúbridas son *Trimorphodon tau*, *T. biscutatus*, *Salvadora bairdi* y *Oxybelis fulgidus*, y las especies vipéridas *Agkistrodon bilineatus*, *Crotalus molossus*, *C. basiliscus* y *Sistrurus ravus*. Las especies colúbridas se seleccionaron con base en los siguientes criterios: a) los cuatro géneros presentan evidencias de poseer secreciones orales tóxicas; b) existe información reportada para *Trimorphodon biscutatus* con la cual se podrían comparar los resultados obtenidos para esta especie, y; c) es posible utilizar la técnica de estimulación parasimpatomimética en colúbridos, sin importar el tamaño de los organismos.

Las especies vipéridas se seleccionaron en base a los siguientes criterios: a) forman parte de dos colecciones donde son mantenidas con las condiciones requeridas, lo cual facilita las extracciones de veneno, y; b) ambas colecciones de serpientes se ubican cerca de la UNAM, lo que facilitó el manejo y proceso de liofilización de los venenos.

Tres especímenes de *Trimorphodon tau* y tres de *T. biscutatus* fueron recolectados en la Reserva de La Sierra de Huautla, Morelos, del 20 a 28 de febrero del 2002. Las siguientes especies colúbridas fueron facilitadas por Reptilmex, Morelos: dos organismos de *Salvadora bairdi*, un organismo de *Coniophanes vittatus*, un organismo de *Hypsiglena torquata* y un organismo de *Pseudoleptodeira* sp. Dos organismos de la especie *Oxybelis fulgidus*, fueron mantenidos y facilitados por el Herpetario de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Las especies vipéridas se obtuvieron de dos colecciones vivas: El Laboratorio de Biodiversidad de la Dirección General de Divulgación de la Ciencia, UNAM y la colección particular. Se utilizaron dos organismos de cada especie: *Agkistrodon bilineatus*, *Crotalus atrox*, *Crotalus molossus*, *Crotalus basiliscus*, *Crotalus triseriatus* y *Sistrurus ravus*.

Mantenimiento de las especies colúbridas

Las serpientes colúbridas a nuestro resguardo se mantuvieron en cajas de plástico transparente de 50 X 40 X 50 cm. La abertura de ventilación fue colocada en la parte central de la tapa. Se evitaron aberturas dentro de las jaulas para seguridad en el manejo y evitar el escape de los organismos. Se utilizaron varias capas de periódico para cubrir la parte inferior de las jaulas (Ashley y Burchfield, 1968). A todas las especies se les ofrecieron ratones proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM que fueron aceptados en la mayoría de las veces. El agua se ofreció *ad libitum* colocándose en recipientes de plástico dentro de las cajas de las serpientes cambiándose diariamente (Ashley y Burchfield, 1968; De Roodt, *et al.*, 1998). A pesar del relativo riesgo para los especímenes, se utilizó el método de inserción con fórceps cuando las serpientes no se alimentaban por sí solas, con la finalidad de que los animales no se debilitaran progresivamente (Ashley y Burchfield, 1968). Para esto se insertaron los roedores en la boca de las serpientes aplicando una presión mínima y manualmente se colocaron en el esófago. Después de introducir el alimento las serpientes fueron liberadas cuidadosamente para que el resto del proceso de ingestión continuara normalmente. No se presentaron casos en los que las serpientes vomitaran al roedor o sangraran. Las jaulas de las serpientes se limpiaron constantemente con el fin de prevenir enfermedades y para simplificar la alimentación. Los especímenes tuvieron que ser aislados por lo menos cuarenta días antes de ser utilizados para extracción de secreciones orales. Se inspeccionaron los especímenes de cualquier desorden anotándose el daño que pudiera ocurrir durante el manejo o mantenimiento como lo indican Ashley y Burchfield (1968).

Todas las especies de serpientes colúbridas excepto los organismos de la especie *Oxibelys fulgidus* fueron mantenidos en el Instituto de Biología UNAM, a una temperatura de 27° C y con ciclo de 12 horas luz 12 horas oscuridad según lo sugieren Rosenberg *et al.* (1985) y Ashley y Burchfield (1968).

Extracción de secreciones orales de colúbridos. La extracción de las secreciones orales de las serpientes colúbridas históricamente ha sido un proceso difícil debido a las pequeñas cantidades que son liberadas de la base del diente posterior. Dado que estos dientes pueden presentar surcos o canales abiertos, la secreción debe ser recolectada en la base de los dientes. Diferentes métodos para intentar maximizar la producción en las recolectas de la secreción de Duvernoy incluyen: la maceración de las glándulas (Kornalik *et al.*, 1978), la colección de veneno con membranas absorbentes lavables (Theakston *et al.*, 1979) y la recolecta en la base de los dientes posteriores aspirándolo con micropipeta (Vest, 1981). Los problemas utilizando estos métodos son numerosos ya que con algunos es difícil aislar la secreción oral de la saliva, complicando subsecuentemente el análisis (Glenn *et al.*, 1992). Las secreciones obtenidas por microaspiración pueden ser cuantificadas, pero hacerlo con las producciones de especies pequeñas de bajo rendimiento ha sido complicado (Vest, 1981; Hill y Mackessy, 1997).

Se ha demostrado que con el método de estimulación parasimpatomimética se pueden obtener producciones muy altas de secreciones orales. Con este método las serpientes no se tienen que sacrificar y se pueden realizar repetidas extracciones a la misma serpiente sin que haya efectos aparentes (Hill y Mackessy, 1997). El método de extracción de secreciones orales es muy efectivo. Involucra el uso de anestesia ketamina seguida por una estimulación parasimpatomimética con pilocarpina de la glándula de Duvernoy (Rosenberg, 1992). Este método permite recolectar cantidades de secreción suficientes para analizar las muestras a detalle incluyendo pruebas de letalidad y ensayos enzimáticos, ya que se pueden recolectar volúmenes suficientes. Gracias a esta técnica ha sido posible la investigación de las secreciones de Duvernoy (Rosenberg, 1992).

Las extracciones de las secreciones orales se llevaron a cabo durante los meses de abril a junio del 2002 en el Laboratorio de Anfibios y Reptiles en el Instituto de Biología, UNAM, así como en el Herpetario de La Facultad de Ciencias, UNAM.

Los pasos llevados a cabo en la recolecta de las secreciones orales son los siguientes:

1. Las serpientes fueron removidas de sus cajas utilizando un gancho herpetológico y pesadas en una balanza electrónica marca Sartorius modelo BL610 para calcular la dosis correspondiente de los medicamentos utilizados para cada organismo. Fue importante manipular a las serpientes lo menos posible (Ashley y Burchfield, 1968) evitando estresarlas.

2. Las serpientes fueron anestesiadas individualmente con clorhidrato de Ketamina, recibiendo una inyección intramuscular con jeringas de insulina de 50 y 100 unidades. La dosis administrada a las serpientes fue de 60 mg/kg de peso vivo (Rosenberg, 1992). La ketamina es una droga segura y ampliamente usada en las serpientes venenosas y no venenosas. En pequeñas dosis produce un efecto tranquilizante que facilita el examen y manejo clínico, mientras que en dosis mayores permite realizar cirugías y manipulaciones mayores. La ketamina es un agente anestésico ideal para tales trabajos (Cooper, 1974). Está reportado que la mayoría de los exámenes de rutina y tratamientos pueden realizarse con dosis de 22 a 66 mg/ kg. Con una dosis de 66 mg/kg, se pueden mantener tranquilas las serpientes de 2 a 3 días y pueden transportarse por largas distancias con menor estrés (Glenn *et al.*, 1972). Después de 30 minutos las serpientes pudieron ser manejadas sin riesgo de mordedura o envenenamiento. La dosis usada de esta droga tuvo un rango de duración de 24 a 48 horas, lapso durante el cual los animales no requirieron de terapia de apoyo y reanimación. La anestesia no tuvo efectos negativos posteriores en el comportamiento y hábitos alimenticios de las serpientes y sus efectos se eliminaron en su totalidad en un periodo de 48 horas.

3. Después de que las serpientes estuvieron tranquilizadas, fueron inyectadas con una solución salina de pilocarpina para estimular el flujo de las secreciones glandulares a una dosis de 7.5 mg/ kg de peso vivo (Hill y Mackessey, 1997). La pilocarpina es uno de los estimulantes preferidos para inducir el flujo de la secreción de las células de la glándula de Duvernoy (Rosenberg *et al*, 1985). Esta

droga parece no alterar el perfil de proteína de la secreción (Marmary *et al.*, 1987; Rosenberg, 1992).

La inyección de pilocarpina generalmente causó un flujo de secreción después de 5 minutos y en todas las especies dicho flujo inicial fue lento, excepto para *Salvadora bairdi* que en promedio fue de 3 minutos. El flujo de secreción se incrementó marcadamente durante la colección de secreciones, el cual varó de 25 minutos para *Trimorphodon tau*, 40 minutos para *Oxybelis fulgidus* y *Salvadora bairdi* y más de 50 minutos para *Trimorphodon biscutatus*. Estos tiempos se refieren al flujo constante de la secreción, sin embargo, las secreciones continuaron por más de una hora. En pruebas para las serpientes *Pseudoleptodeira sp.* y *Coniophanes vittatus* el flujo de las secreciones orales tardó generalmente 25 minutos.

El uso de la pilocarpina inyectada intramuscularmente no mostró efectos adversos en los hábitos conductuales y de alimentación durante el tiempo que duró la toma de muestras. Los efectos de esta droga se eliminaron en su totalidad alrededor de 24 horas después de aplicada.

4. La recolección de las secreciones orales se realizó colocando dorsalmente a las serpientes con la boca abierta para proveer una entrada de aire. La secreción se obtuvo inmediatamente después por aspiración (Figura 4) con micropipetas de 50 μ l colocadas dentro de la lámina dental alrededor del diente posterior agrandado (Hill y Mackessy, 1997). El proceso de aspiración duró la mayoría de las veces hasta una hora hasta que el flujo cesaba. Se estimó el volumen de la secreción transfiriéndose a viales estériles graduados de 2 ml. Las muestras de secreción se mantuvieron congeladas en un recipiente con hielo seco (-20 C), hasta que se liofilizaron. Para obtener suficiente secreción para la prueba de toxicidad se requirieron tres extracciones por cada organismo (Rosenberg *et al.*, 1985) excepto para *Trimorphodon tau*, donde se requirieron seis extracciones. Las especies *Pseudoleptodeira sp.*, *Coniophanes vittatus* e *Hypsiglena torquata* tuvieron un rendimiento muy bajo por tal motivo no se incluyeron en el análisis. No se llevó a

cabo más de una extracción de secreciones orales por semana por espécimen sugerido por (Rosenberg *et al.*,1985).

5. Las secreciones orales liofilizadas se almacenaron en viales de plástico estériles y se mantuvieron en refrigeración, se pesaron en una balanza analítica y se resuspendieron cuando fue necesario (Hill y Mackessy, 1997).

6. Los organismos fueron alimentados con ratones vivos después de 48 horas de la extracción de secreciones orales.

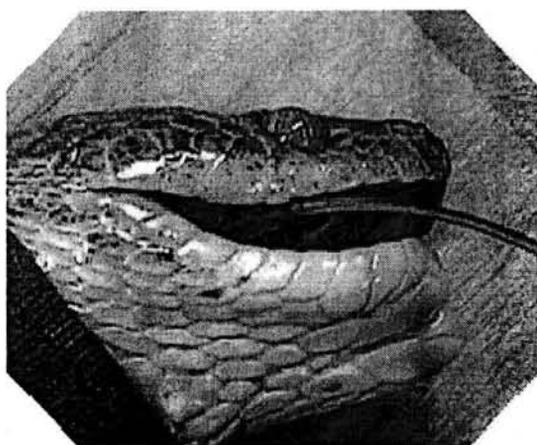


Figura 4. Extracción de secreciones orales para los colúbridos por estimulación parasimpatomimética. En la figura se observa un organismo *Trimorphodon biscutatus*, el cual se encuentra anestesiado y la secreción oral se recolecta por aspiración directamente del diente agrandado utilizando una micropipeta.

Extracción de venenos vipéridos. Este es un procedimiento simple, aunque riesgoso. Para realizarlo se retiró a la serpiente de su terrario con la ayuda de un gancho herpetológico, evitando estresar al animal en el mayor grado posible. Se oprimió la cabeza de la serpiente hacia abajo, justo detrás de la mandíbula, mientras un ayudante controló el cuerpo. Al abrir la boca, se aplicaron los colmillos de la serpiente en un vaso de precipitados cubierto con látex previniendo la contaminación del veneno por otras secreciones de la boca, simulando las condiciones de una mordida natural (Minton y Minton, 1980; Figura 5). Las muestras individuales del veneno de las serpientes se colocaron en viales de

plástico graduados y estériles rotulándose con el nombre de la especie y el número de extracción. Después de la extracción, las muestras se congelaron lo más rápido posible en un recipiente con hielo seco. El proceso de extracción de veneno generalmente fue rápido variando de 3 a 5 minutos. El veneno del ejemplar *S. ravus* 2 se contaminó con sangre durante las extracciones 2 y 3. Para *C. triseriatus* no se obtuvo un volumen suficiente debido a que la serpiente se encontraba mudando los dos colmillos. Esta última especie fue excluida del experimento.

Se recolectó el veneno de todas las especies vipéridas en estudio. El manejo de los organismos, así como el transporte, liofilización y almacenamiento de los venenos, fueron los mismos que para las secreciones orales colúbridas. Para obtener condiciones homogéneas, se planeó la extracción de veneno semanalmente, al igual que las secreciones orales (Rosenberg, 1985).

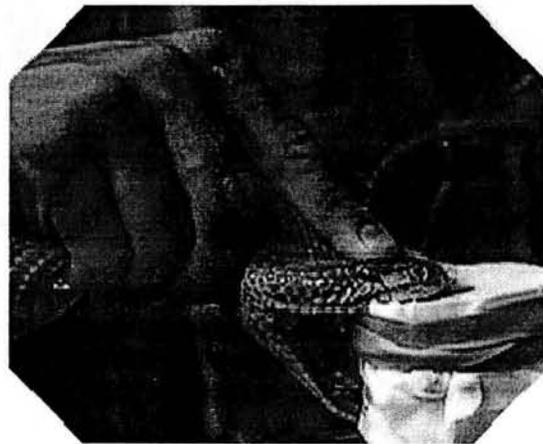


Figura 5. Extracción de veneno para las serpientes vipéridas. En la figura se observa la extracción de veneno de *Crotalus basiliscus* mordiendo una cubierta de látex sujeta a una copa de vidrio, donde se recolecta el veneno.

Liofilización. La liofilización se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM en una liofilizadora marca Labconco modelo 77500, (Labconco, 1997). La deshidratación es un proceso importante en la preservación de compuestos biológicos y el método de liofilización es usado principalmente para sustancias sensibles al calor. La naturaleza no destructiva de este proceso se ha demostrado por la retención de la viabilidad en algunos compuestos biológicos. En

el proceso de liofilización el agua es removida de los materiales congelados, convirtiendo el agua congelada directamente en vapor sin la formación intermedia de agua líquida. La base de este proceso es la sublimación que involucra la absorción de calor de la muestra congelada para vaporizar el agua, el uso de una bomba de vacío para remover el vapor de agua de la superficie de la muestra, la transferencia y depósito del vapor de agua dentro de un condensador y la remoción de calor del condensador por medio de un sistema de refrigeración.

Determinación del efecto tóxico de las secreciones orales y venenos. Para estudiar el efecto tóxico de las secreciones orales y los venenos se estudió la asociación entre las variables de respuesta cuantitativa a) tiempo de envenenamiento del primer ratón; b) tiempo de muerte para el primer ratón, y; c) proporción de ratones muertos; y variables explicativas cualitativas Familias y especies. Se realizó la determinación del efecto tóxico con las secreciones resuspendidas de todas las especies colúbridas excepto las de las especies *Pseudoleptodeira* sp., *Coniophanes vittatus* e *Hypsiglena torquata*, debido a los bajos rendimientos obtenidos. De las especies vipéridas no se utilizó el veneno liofilizado de *Crotalus triseriatus* a causa de su bajo rendimiento, ni el de *Crotalus atrox* ya que en la literatura se reportan efectos primariamente neurotóxicos, a diferencia de la tendencia de los efectos hemolíticos de las demás especies en el estudio.

Para realizar las pruebas se resuspendieron las secreciones orales y venenos (Rosenberg *et al.*, 1985; Vest, 1981) y se mezclaron todas las muestras liofilizadas obtenidas por organismo y se liofilizaron de nuevo para asegurar su homogeneidad.

Para estimar el efecto tóxico de las secreciones orales y los venenos se inyectaron en 1280 ratones machos albinos de laboratorio cepa ICR, con peso corporal de 18 a 20.5 gr comprados en Bioterio México, S.A. de C.V. Se formaron 128 grupos de diez individuos cada uno, probándose ocho dosis para cada especie de serpiente en estudio. La primer dosis fue de 0.1 mg. Las siguientes dosis

utilizadas aumentaron consecutivamente, siendo: 0.3, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5 y 9 mg, con la finalidad de contar con un gradiente.

Para calcular la cantidad del reconstituido que se inyectó por ratón, primero se separó el total de la secreción o veneno liofilizado obtenido por organismo en ocho tubos con las dosis en mg antes mencionadas. El peso total del liofilizado se dividió entre la suma del peso de los 10 ratones que constituyeron un grupo, obteniéndose la proporción en mg de la dosis que le corresponde a cada ratón de acuerdo a su peso. Conociendo esta proporción, se calculó el volumen del reconstituido que se le inyectó a cada ratón manteniendo la cantidad de liofilizado correspondiente después de reconstituirse cada dosis en 2 ml de solución fisiológica salina que se inyectó inmediatamente en los ratones después de agitar dicha dosis.

La cantidad liofilizada de secreciones orales y venenos utilizada por especie fue de 31.9 mg por cada grupo de 80 ratones, que corresponde en promedio a un rango de 0.9 a 0.001 mg de secreción oral o veneno inyectados a cada ratón proporcional a la dosis. El protocolo de experimentación se presenta en el Cuadro 1.

Los ratones se pesaron individualmente en la balanza, se marcaron en la cola con plumón permanente y fueron colocados en cajas de policarbonato con tapaderas, las cuales fueron facilitadas por el Bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM. El experimento se realizó en un cuarto con temperatura constante de 25° C (Thomas y Pough, 1979). Las inyecciones se aplicaron en el cuadrante bajo derecho del abdomen de los ratones (Minton y Minton 1980). Los animales inyectados fueron observados de inmediato y se registró el tiempo de envenenamiento del primer ratón, el tiempo de muerte para el primer ratón y el número de ratones muertos. El periodo de observación duró 24 horas.

Cuadro 1. Protocolo para la experimentación con secreciones orales y venenos. Obteniéndose las secreciones orales de cuatro especies colúbridas y los venenos de cuatro especies vipéridas. Se utilizaron dos organismos de cada especie. Para cada organismo se requirieron 31.9 mg de veneno para realizar las pruebas de toxicidad. La primer dosis utilizada fue 9 mg, la última 0.1 mg. Cada una de las dosis se inyectó en un grupo de 10 ratones administrándose el veneno proporcional al peso corporal de los animales.

Especies/Dosis en mg	0.1	0.3	1.5	3.0	4.5	6.0	7.5	9.0
1. <i>Trimorphodon tau</i>	*	*	*	*	*	*	*	*
2. <i>T. biscutatus</i>	*	*	*	*	*	*	*	*
3. <i>Salvadora bairdi</i>	*	*	*	*	*	*	*	*
4. <i>Oxybelis fulgidus</i>	*	*	*	*	*	*	*	*
5. <i>Agkistrodon bilineatus</i>	*	*	*	*	*	*	*	*
6. <i>Crotalus molossus</i>	*	*	*	*	*	*	*	*
7. <i>Crotalus basiliscus</i>	*	*	*	*	*	*	*	*
8. <i>Sistrurus ravus</i>	*	*	*	*	*	*	*	*

Cada asterisco (*) es un grupo de 10 ratones.

Para explicar la relación entre dosis y efecto tóxico se evaluó el porcentaje de ratones envenenados y muertos durante el tiempo de experimentación, considerando los síntomas de excitabilidad, convulsiones y espasmos neuromusculares, hemorragia gastrointestinal, disnea, edema y fallas respiratorias (Minton y Minton 1980; Hayes *et al.*, 1995; Jansen, 1987; Rosenberg *et al.*, 1992) caracterizando las respuestas tiempo de envenenamiento y tiempo de muerte para el primer ratón.

Análisis de mortalidad. Se realizó un análisis de mortalidad que involucrara el tiempo y la variable respuesta muerte del primer ratón utilizando la comparación de dos curvas con la técnica de Kaplan-Meier. Esta técnica permite estudiar la mortalidad de dos grupos de individuos (Dawson-Sanders y Trapp, 1994).

La prueba para la hipótesis nula de que las funciones de mortalidad para ratones inyectados con secreciones orales y venenos es la misma basada en muestras aleatorias es la prueba de log-rank. Esta prueba está ideada para detectar una diferencia que se produce entre dos curvas de mortalidad cuando la tasa de sobrevivencia en un grupo es mayor que la correspondiente tasa en un segundo grupo y la observación entre las dos tasas es constante a lo largo del tiempo (Dawson-Sanders y Trapp, 1994).

Para la comparación de mortalidad se suman el número de muertes observadas y esperadas en ambos grupos por separado y en todos los tiempos, la fórmula es la siguiente:

$$T = \frac{(O1 - E1)^2}{E1} + \frac{(O2 - E2)^2}{E2}$$

Donde:

T = Tiempo.

$O1$ y $O2$ = El número de muertes observadas en ambos grupos.

$E1$ y $E2$ = La cifra de muertes esperadas.

Examen de patología

A los animales que sucumbieron a las inyecciones de secreciones orales o de venenos se les realizó necropsia y se anotó cualquier cambio macroscópico presente en el tejido (Weinstein y Smith, 1993). Se realizaron exámenes anatómico-patológico y de los daños más representativos en los ratones y se prepararon cortes histológicos y laminillas de los tejidos indicando el daño observado con el microscopio.

Los cortes histológicos y las laminillas fueron realizados con el método de inclusión en parafina, en el cual un procesador automático de tejidos deshidrata los tejidos con alcohol a diferentes concentraciones. Los cortes histológicos se tiñeron con hematoxilina-eosina conservándose las laminillas y bloques de parafina para futuras observaciones.

Determinación de rendimiento líquido, peso seco liofilizado y concentración de proteína de las secreciones orales y venenos

Se determinó el rendimiento líquido de las secreciones orales y venenos cuantificando el volumen total al momento de la extracción registrándose cada extracción y en cada organismo. El peso seco liofilizado se cuantificó en una balanza analítica por extracción y por organismo, estudiándose el efecto que tiene el peso corporal de las serpientes sobre los rendimientos liofilizados.

La determinación de proteína se llevó a cabo con el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), el cual se basa en la amplificación de la reacción de biuret por la reacción subsiguiente del reactivo Folin fenol (Folin y Ciocalteu, 1972). La reacción de Biuret se establece por la formación de complejos de iones cúpricos con los enlaces peptídicos de las proteínas. En esta reacción se adiciona sulfato de cobre a una solución alcalina de proteínas y como resultado de la formación del complejo entre los iones cúpricos y los enlaces peptídicos se produce un color violeta púrpura (Scopes, 1987). Posteriormente, el reactivo de Folin fenol (heteropolifósforo ácido de molibdeno y tungsteno) puede ser reducido para dar hidróxido de molibdeno y tungsteno de color azul. Estos productos se deben a la presencia de aminoácidos reductores como la tirosina, triptofano y cisteína, así como la formación del complejo de Biuret ocurriendo la reducción del reactivo Folin-fenol (Wu *et al.*, 1978). La reacción de Biuret con proteínas es independiente de la composición de la proteína; sin embargo, la pureza de la proteína y el estado de asociación pueden influenciar los resultados obtenidos con el reactivo de Biuret (Goren y Li, 1986). Algunos constituyentes de la solución como son buffer Tris, iones amonio, sacarosa, aminas primarias y glicerol pueden interferir con la reacción (Gornall *et al.*, 1949).

Se estimó la concentración de las muestras de secreciones orales y venenos con base en una curva estándar de albúmina mediante el uso de la ecuación de la recta calculando la concentración real.

La concentración de proteína se determinó en el extracto original de las secreciones orales y de los venenos usando la siguiente fórmula:

$C = \text{Fracción de peso seco [peso seco (mg)/ volumen recolectado (ml)]}$

Donde:

Fracción de peso seco = Concentración determinada/ concentración original.

Concentración determinada = Concentración estimada por la absorbancia (D.O.)
usando la curva estándar de albúmina.

Concentración original = La preparada para el ensayo (2 mg/ml).

Peso seco en mg = Cantidad total de secreción oral o veneno liofilizada.

Volumen total = Volumen total (ml) recolectado por especie.

Análisis estadísticos

Se llevó a cabo un análisis exploratorio de datos con la finalidad de verificar que los datos cumplieran con los supuestos de los análisis paramétricos. Los datos que no lo hicieron, se transformaron las variables en estudio como lo sugiere Montgomery (2003). Los supuestos utilizados en todos los análisis paramétricos son:

1. La varianza de las poblaciones debe ser homogénea.
2. La distribución de las poblaciones debe ser normal.
3. Los valores observados en la muestra deben ser independientes.

Se decidió estudiar los resultados obtenidos de tiempo de envenenamiento para el primer ratón, tiempo de muerte para el primer ratón y la proporción de ratones muertos separados para cada Familia de serpientes y estudiar la influencia de las dosis en estas respuestas. Este procedimiento fue motivado porque se observó que las respuestas entre Familias eran distintas al ser la varianza de la Familia Viperidaè homogénea pero en la Familia Colubridae heterogénea. Así se evitaron enmascaramientos por información encubierta o distorsionada en las comparaciones.

Utilizando el programa SPSS versión 10.0, se obtuvieron los promedios ± 1 desviación estándar de todas las variables respuesta estudiadas, y para evaluar las diferencias entre familias, especies y dosis, se realizaron los procedimientos

estadísticos mencionados a continuación considerando un $\alpha=0.05$ como significativo.

Análisis de varianza de una vía (ANDEVA). Para contrastar las diferencias entre las medias de la respuesta bajo estudio, en las dos familias de serpientes, se utilizó el análisis de varianza de una vía, considerando el tiempo de envenenamiento del primer ratón (Y1), el tiempo de muerte para el primer ratón (Y2) y la proporción de ratones muertos (Y3). El análisis de varianza se define como la técnica mediante la cual la variación total presente en un conjunto de datos se divide en varios componentes (en el estudio: familia, especies y dosis).

El análisis de varianza se usa para contrastar hipótesis acerca de las medias de diversos factores. Se aplica ampliamente en investigación pues explicita las fuentes de variación importantes para explicar la variabilidad de la respuesta (Marques de Cantú, 1991).

Si después de efectuar el ANDEVA se rechaza la hipótesis de nulidad, se considera que hay evidencias suficientes para concluir que las variantes estudiadas de los factores en estudio modifican la respuesta en consideración (Kuehl, 2001).

Prueba de Tukey. Una vez probadas diferencias significativas entre los niveles de cada una de las respuestas con el análisis de varianza (ANDEVA), se utilizó la prueba de Tukey (diferencia honestamente significativa), para probar entre que pares están las diferencias considerando todas comparaciones posibles (Lindman, 1992; Box *et al.*, 1989).

Polinomios ortogonales. Se estudió la tendencia de la respuesta al cambiar los valores de la variable explicativa con el método de polinomios ortogonales o de comparaciones de tendencia. Este es uno de los procedimientos que se siguen de manera natural cuando hay diferencia entre dos promedios y la variable explicativa es cuantitativa y equiespaciada. El método de polinomios ortogonales es el que ofrece una mayor cantidad de información para explotar ya que indican un cambio

numérico en la respuesta al cambiar también los valores numéricos de las dosis utilizadas o variable explicativa (Kuehl, 2001). Este modelo se puede ajustar a los datos observados con muchos de los programas de regresión disponibles para computadora (Kuehl, 2001).

Regresión lineal simple. Para estudiar la asociación entre variables cuantitativas se realizaron análisis de regresión lineal simple considerando el rendimiento de las secreciones orales y venenos contra el peso corporal de las serpientes. Por otro lado, la concentración de proteína de las muestras totales recolectadas se estimó mediante una curva estándar de albúmina, con base en la cual se calculó la concentración en las muestras recolectadas.

La regresión lineal simple permite estudiar la asociación y probable relación entre dos variables cuantitativas continuas, X y Y. Uno de sus objetivos principales es predecir o estimar el valor de la variable dependiente-respuesta (Y) a partir de la variable explicativa (X) (Mendoza y Sánchez, 2001). El modelo más sencillo es cuando se considera una asociación de tipo lineal entre la respuesta y la variable explicativa (Mendoza y Sánchez, 2001). El modelo se llama lineal simple porque los parámetros son lineales y porque solo usa una variable explicativa (independiente) para predecir la respuesta.

Regresión lineal múltiple. Para estudiar si el rendimiento es dependiente del peso corporal o si existen otros factores asociados, se realizó una regresión lineal múltiple entre el rendimiento de secreciones orales y rendimiento de venenos con el peso corporal.

La regresión lineal múltiple es una extensión de la regresión lineal simple con dos o más variables independientes cuantitativas. Mientras más variables se incluyan en el modelo, más variación habrá, incrementándose la varianza, por lo que es necesario hacer ajustes en el modelo de acuerdo a los grados de libertad. De esta manera, el cálculo de los coeficientes de regresión es más complejo. En la regresión múltiple, un coeficiente de regresión obtenido indica cuanto cambia el valor probable de Y cada vez que X aumenta una unidad, mientras que se

conservan los valores de todas las demás variables constantes en la ecuación de regresión.

El coeficiente de correlación se representa como R en vez de r y el coeficiente de determinación como R^2 pero su interpretación es igual que en la regresión lineal simple (Mendoza y Sánchez, 2001).

Al existir un comportamiento lineal entre el rendimiento de secreciones orales y de venenos con respecto al peso de los organismos para colúbridos y vipéridos, resulta importante estudiar el comportamiento en cada una de las Familias investigando si existe diferencia en la ordenada y diferencia en la pendiente (Varela, 1997).

El análisis de regresión lineal múltiple se realizó con el modelo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \beta_2 Z + \beta_{1,2} XZ$$

Donde :

Y= Rendimiento de secreciones orales y venenos en mg

X1= Peso de la serpiente en gr.

Z= Familias

Z=0, Familia Colubridae; Z=1, Vipéridos

β_1 , β_2 y $\beta_{1,2}$ = Parámetros de la regresión

β_0 = Parámetro constante

Si se supone Z=0, el modelo será:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X \text{ (modelo A)}$$

Si Z=1 será:

$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \beta_2 + \beta_{1,2} X$, al agrupar términos el modelo se puede escribir como

$$Y = (\beta_0 + \beta_2) + (\beta_1 + \beta_{1,2}) X \text{ (modelo B)}$$

Al comparar los modelos A y B se tienen las siguientes consideraciones:

1. El modelo A y el modelo B son iguales cuando β_2 y $\beta_{1,2}$ sean cero, en este caso la relación entre el rendimiento de secreciones orales y veneno y el peso de las serpientes es lineal y es la misma para las dos Familias, teniendo la misma ordenada (β_0) y la misma pendiente (β_1).
2. En caso de que sólo β_2 sea cero entonces las pendientes son diferentes de las rectas y las ordenadas son las mismas.
3. En caso de que $\beta_{1,2}$ sea igual con cero las ordenadas de las rectas son diferentes y las pendientes son iguales.
4. En el caso de que tanto β_2 como $\beta_{1,2}$ sean diferentes de cero, entonces, los comportamientos lineales entre el rendimiento de secreciones orales y de venenos y el tamaño de la serpiente son distintos, pues las ordenadas y las pendientes son distintas.
5. Finalmente, si $\beta_1=0$, $\beta_2=0$ y $\beta_{1,2}=0$, entonces, no hay asociación lineal entre el rendimiento de las secreciones orales y de veneno y el tamaño de la serpiente.

Al ser el rendimiento dependiente del peso de los organismos siendo este explicado por el peso (gr) solamente e igual en las dos Familias, el modelo por estimar sería:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \beta_2 Z + \beta_{1,2} XZ$$

$$Y = \beta_0 + \beta_1 (\text{peso en gramos}) + \beta_2 (\text{Familia}) + \beta_{1,2} (\text{peso en gr}) \text{ Familia.}$$

Donde:

$$\beta_0; \beta_2 \text{ y } \beta_{1,2} = 0$$

Prueba t de Student. Para comparar la concentración de proteína de las muestras de secreciones orales y de venenos, se utilizó la prueba de t de Student. Esta prueba es la indicada cuando se desea comparar dos grupos independientes (Mendoza y Sánchez, 2001).

La fórmula para hacer el cálculo es:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Donde:

$$s_p = \sqrt{\frac{[(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2]}{(n_1 + n_2 - 2)}}$$

RESULTADOS

Tiempo de envenenamiento para el primer ratón: Comparación entre las dosis de secreción oral y de veneno inyectadas

La transformación raíz cuadrada $Y_{ij} = \sqrt{Y_{ij}}$ (Montgomery, 2003), ofreció la mejor aproximación para que los datos de la respuesta tiempo de envenenamiento del primer ratón cumplieran con las suposiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas que exigen los tratamientos estadísticos.

Familia Colubridae. El análisis de varianza (ANDEVA) con la respuesta tiempo de envenenamiento para el primer ratón indica que las dosis presentan diferencias altamente significativas ($F_{42}^5=2.44$; $p<.0001$) siendo altamente significativo. Esto indica que hay diferencias significativas entre al menos dos de las dosis. La prueba de Tukey mostró diferencia ($p< 0.0001$) entre las dosis 0.1, 0.3 y 1.5 mg.

Por otro lado, en la Figura 6 se observa que conforme aumenta la dosis, el tiempo de envenenamiento para el primer ratón disminuye siguiendo una correlación múltiple con tendencia negativa. Al observar dicha figura notamos que las dosis que causaron síntomas de envenenamiento son a partir de 1.5 mg y no apareció síntoma alguno en las dosis 0.1 y 0.3 mg revisadas hasta 1440 minutos.

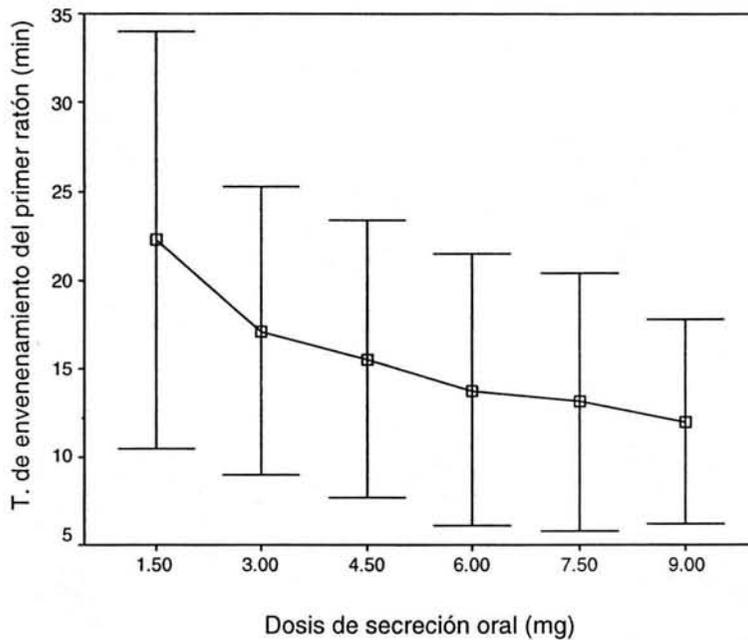


Figura 6. Promedios \pm 1 DE del tiempo de envenenamiento para el primer ratón y la dosis de secreción oral inyectada.

Para la Figura 6 es de interés ajustar un modelo que indique la magnitud de cambio del tiempo de envenenamiento para el primer ratón de acuerdo a la dosis aplicada. Esto se realizó con el uso de los polinomios ortogonales dado que las dosis son igualmente espaciadas. Hay una correlación negativa $R = -0.697$ mg/min, entre la dosis y el tiempo de envenenamiento para el primer ratón. Es decir, cuando aumenta la dosis, el tiempo de envenenamiento para el primer ratón disminuye.

En la Figura 7, se puede ver que el modelo cuadrático ajusta los valores observados. El cambio en la respuesta es mayor en dosis bajas. Donde las dosis 1.5 a 4.5 mg muestran a una diferencia de 6.18 minutos, y conforme aumenta la dosis se tiende a una estabilidad de la respuesta. El cambio de la dosis 6 a la 9 mg corresponde a 1.25 minutos.

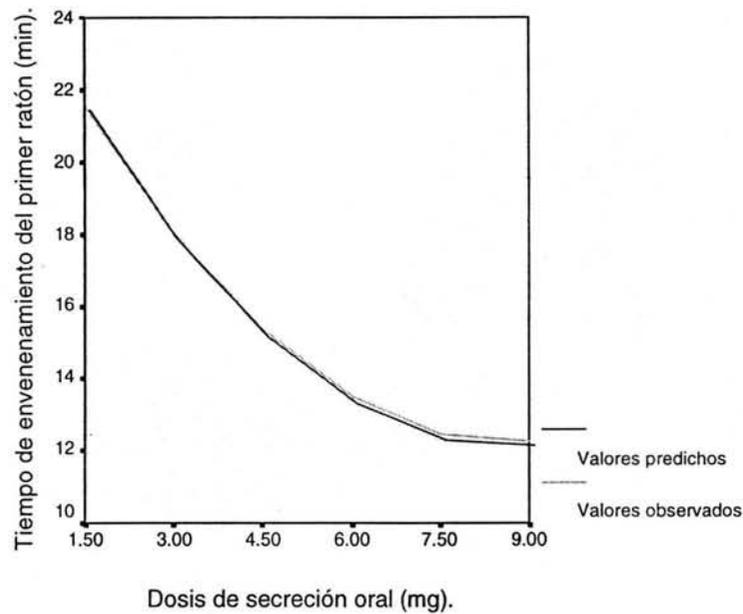


Figura 7. Ajuste de datos por el método de polinomios ortogonales del tiempo de envenenamiento del primer ratón y la dosis de secreción oral inyectada comparando los valores observados con los predichos por el modelo.

Familia Viperidae. El análisis de varianza (ANDEVA) para la respuesta tiempo de envenenamiento para el primer ratón indica que presentan diferencias altamente significativas ($F_{56}^7 = 2.18, p=0.008$). Con el procedimiento de Tukey se observaron diferencias únicamente entre las dosis 0.1 y 0.3 con 9.0 mg ($p=0.014$ y $p=0.048$ respectivamente).

En la Figura 8 se puede observar que en todas las dosis existe efecto de envenenamiento, conforme aumentan dichas dosis disminuyendo nuevamente el tiempo de envenenamiento en correlación negativa.

El modelo matemático que indicó la fuerza de cambio del tiempo de envenenamiento para el primer ratón de acuerdo a la dosis de veneno aplicada, resultó ser un polinomio de grado uno. La correlación es de $R = -0.731$ mg/min, entre la dosis y el tiempo de envenenamiento del primer ratón, siendo el modelo lineal al que se ajustan los valores observados.

En la Figura 9 se observa el ajuste del modelo lineal para los valores observados, en donde se aprecia que conforme aumenta la dosis, el tiempo de envenenamiento para el primer ratón disminuye. El cambio en las seis dosis

corresponde a un cambio de poco más de un minuto y es relativamente constante para todas las dosis.

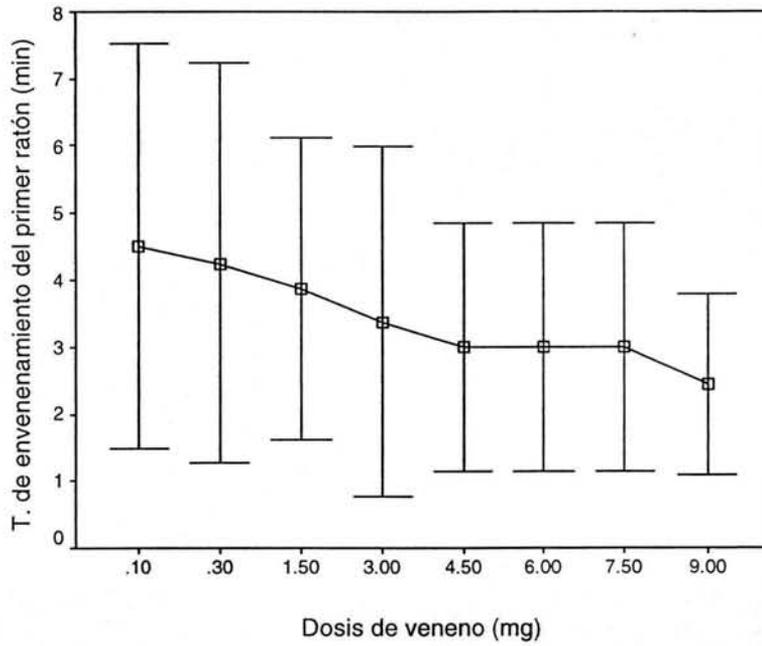


Figura 8. Promedios \pm 1 DE del tiempo de envenenamiento para el primer ratón y la dosis de veneno inyectada.

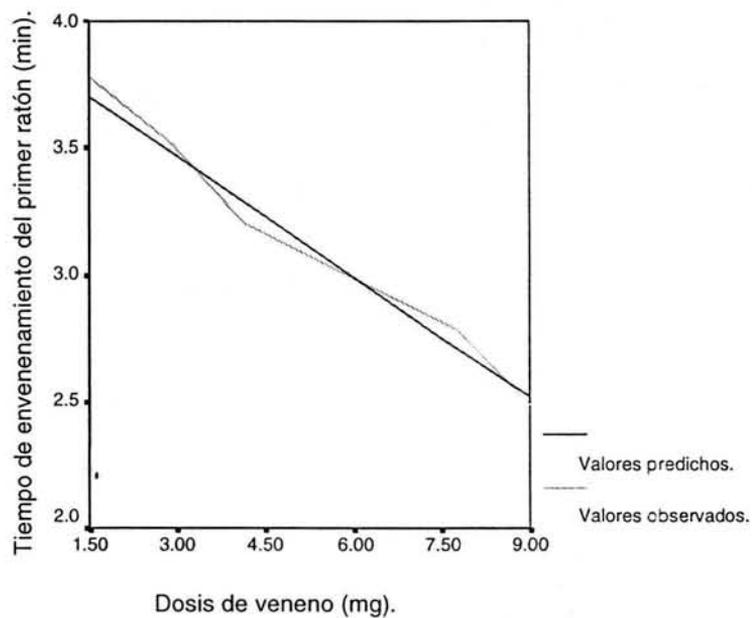


Figura 9. Ajuste de datos por el método de polinomios ortogonales para el tiempo de envenenamiento del primer ratón y la dosis de veneno inyectada comparando los valores observados con los predichos por el modelo.

En la figura 10 se observa la diferencia entre las líneas de tendencia del tiempo de envenenamiento del primer ratón causados por la inyección de secreciones orales y venenos a diferentes dosis.

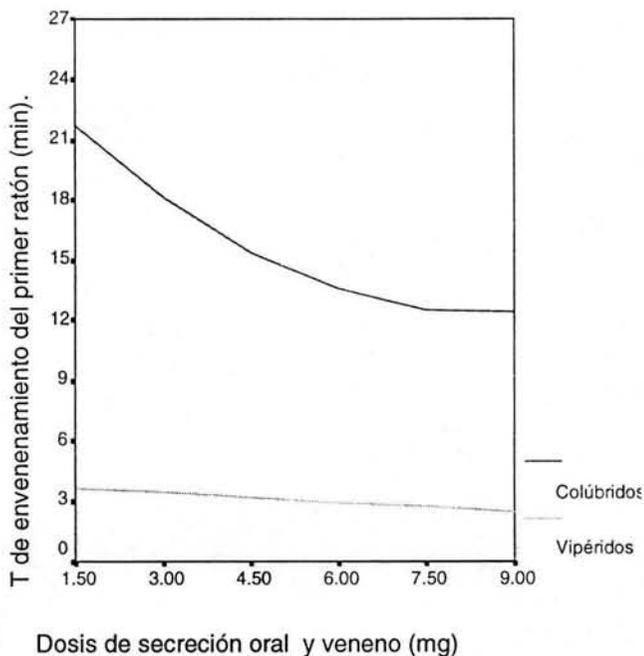


Figura 10. Comparación de las tendencias del tiempo de envenenamiento del primer ratón entre colúbridos y vipéridos.

Tiempo de muerte del primer ratón: Comparación entre las dosis de secreción oral y de veneno inyectadas

Al igual que el caso anterior la transformación raíz cuadrada $Y_{ij} = \sqrt{Y_{ij}}$ (Montgomery, 2003), ofreció la mejor aproximación para que los datos de la respuesta tiempo de muerte del primer ratón cumplieran con las suposiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas que exigen los tratamientos estadísticos.

Familia Colubridae. El análisis de varianza (ANDEVA) con la respuesta tiempo de muerte para el primer ratón indica que el efecto de dosis es diferente

($F_{17}^5 = 2.81$; $p = 0.033$), esto quiere decir que el tiempo de muerte para el primer ratón es significativo con respecto a la dosis, existiendo diferencia en por lo menos dos de las dosis. La prueba de Tukey mostró que existen diferencias entre todos los pares de dosis ($p = 0.001$) excepto entre 0.1 y 0.3 ($p = 1$), 6.0 y 4.5 ($p = .592$) y 6.0 con 7.5 y 9.0 mg ($p = .392$ y $p = .114$ respectivamente).

El tiempo de muerte para el primer ratón se registró a partir de la dosis 1.5 mg. Los resultados indican que conforme se aumenta la dosis el tiempo de muerte disminuye, tal y como se puede apreciar en la Figura 11.

El modelo de polinomios ortogonales de grado dos se ajustó con los valores observados. Con este modelo se concluyó que existe correlación $R = -0.978$ mg/min entre la dosis y el tiempo de muerte para el primer ratón, indicando una alta correlación entre las variables.

El modelo cuadrático se representa gráficamente en la Figura 12, el cual ajusta con los datos observados. El cambio en el tiempo de muerte para el primer ratón es mayor en dosis bajas (1.5 a 4.5 mg) que corresponde a un cambio de 297.25 minutos y en las dosis altas (6 a 9 mg) el cambio es menor con 52.25 minutos.

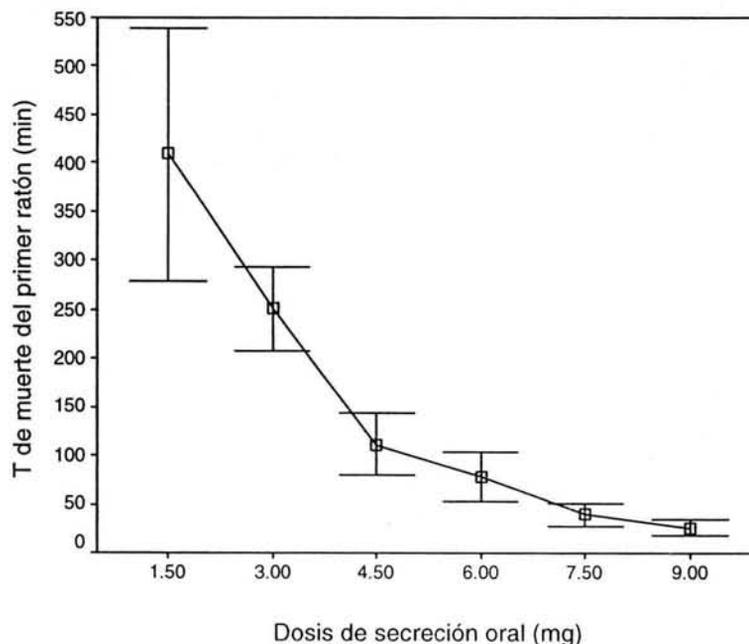


Figura 11. Promedios ± 1 DE del tiempo de muerte para el primer ratón y la dosis de secreción oral inyectada.

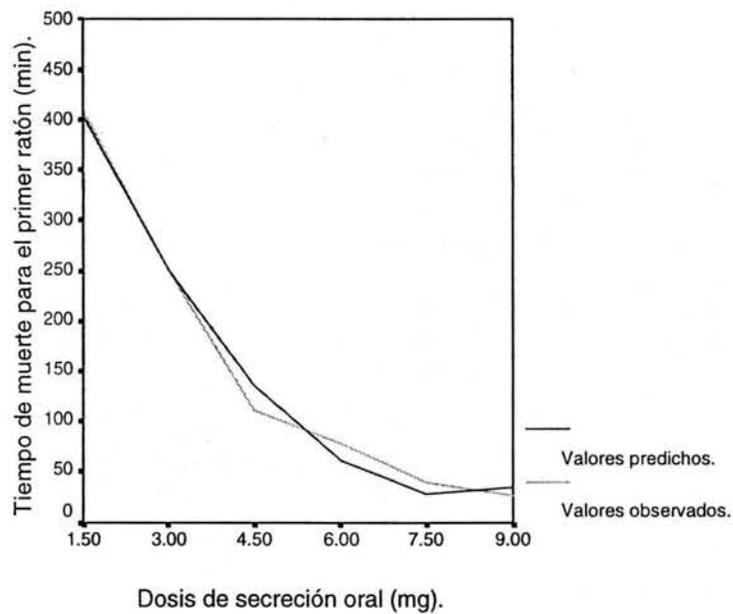


Figura 12. Ajuste de datos por el método de polinomios ortogonales para el tiempo de muerte del primer ratón y la dosis de secreción oral inyectada comparando los valores observados con los predichos por el modelo.

Familia Viperidae. En este caso el ANDEVA muestra que existe una diferencia altamente significativa ($F_{30}^7 = 2.20$); $p < 0.0001$) indicando que el tiempo de muerte para el primer ratón es diferente con respecto a la dosis, en al menos dos de las dosis. Con la prueba de Tukey se observaron diferencias entre las dosis 0.1 y 0.3 mg con la dosis 9.0 mg ($p = 0.014$ y $p = 0.048$ respectivamente).

En la Figura 13 se observa que al aumentar las dosis, el tiempo de muerte para el primer ratón disminuye y el cambio es mayor de la dosis 0.1 a 3 mg. Este cambio corresponde a 120.3 minutos, pero de la dosis 4.5 a 9 mg, el cambio parece ser constante y corresponde a 14.81 minutos.

Los datos observados se ajustaron con un modelo cuadrático mostrando una correlación de $R = -0.783$ mg/min entre la dosis y el tiempo de muerte para el primer ratón. En la Figura 14 se pueden ver estos datos graficados, donde el modelo se ajusta a los datos observados. El cambio es mayor en las dosis 1.5 a 4.5 mg con 33.75 minutos, y en las dosis altas 6 a 9 mg el cambio corresponde a 7.06 minutos.

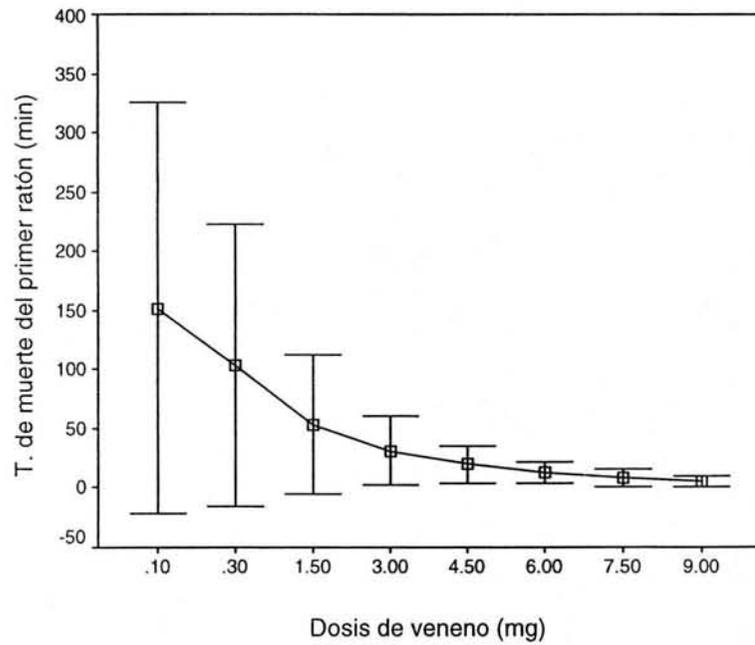


Figura 13. Promedios \pm 1 DE del tiempo de muerte para el primer ratón de acuerdo a la dosis de veneno inyectada.

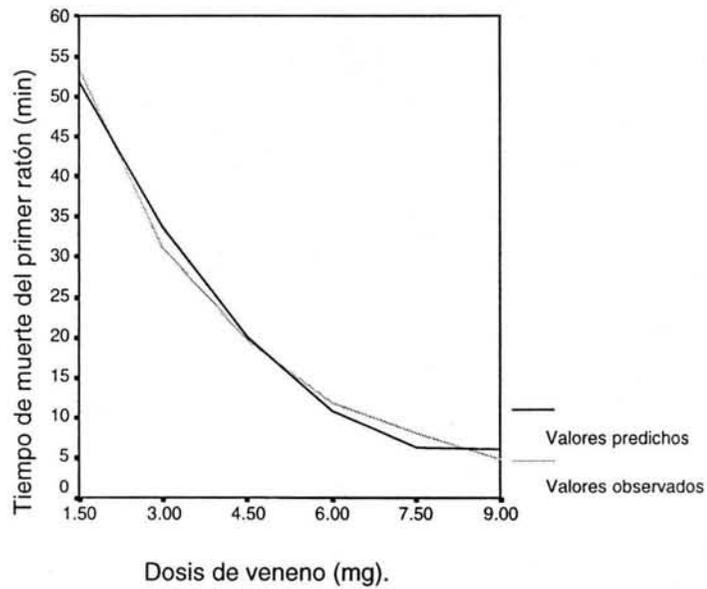


Figura 14. Ajuste de datos por el método de polinomios ortogonales para el tiempo de muerte del primer ratón y la dosis de veneno inyectada comparando los valores observados con los predichos por el modelo.

En la figura 15 se observa la diferencia entre las líneas de tendencia del tiempo de muerte del primer ratón causados por la inyección de secreciones orales y venenos a diferentes dosis.

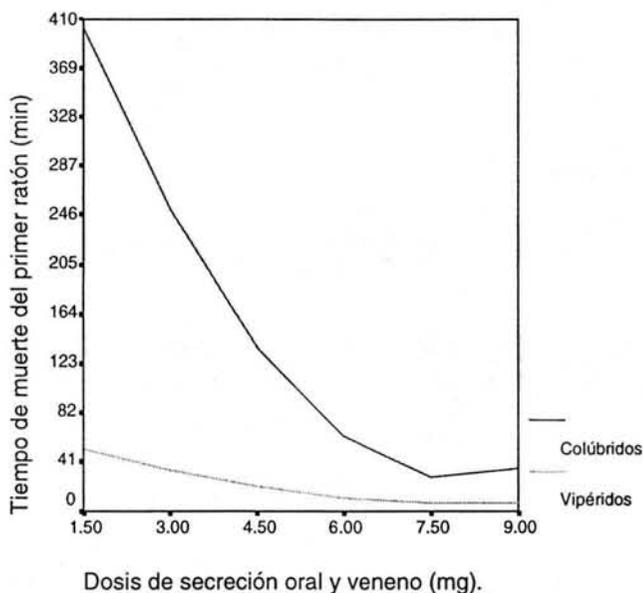


Figura 15. Comparación de las tendencias del tiempo de muerte del primer ratón entre colúbridos y vipéridos.

Proporción de ratones muertos: Comparación entre las dosis de secreción oral y de veneno inyectadas

La transformación del arcoseno $w = \arcsen(x/2)$ donde $x = (y+3/8)/(n+3/4)$ y w es la variable transformada (Montgomery, 2003), ofreció la mejor aproximación para que los datos de la respuesta proporción de ratones muertos cumplieran con las suposiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas que exigen los tratamientos estadísticos.

Familia Colubridae. El efecto de dosis fue altamente significativo en la relación de ratones muertos con respecto a la dosis ($F_{18}^5 = 2.77$; $p=0.009$), existiendo al menos una diferencia significativa entre dos de las dosis, La prueba de Tukey todos los

pares de dosis mostraron diferencias entre si (de $p=0.014$ a $p= 0.0001$) excepto en las dosis 0.3 con 0.1 ($p=1$) y 4.5 ($p=.244$), 6 con 4.5 ($p=.220$), 7.5 ($p=.316$) y 9 ($p=.214$).

En la Figura 16 se observa que en las dos primeras dosis no hay ratones muertos; sin embargo, los ratones pudieran estar envenenados, lo que es comprobable si se hiciera un estudio anatomopatológico. También se observa que a partir de la dosis 1.5 mg, la proporción de ratones muertos aumenta conforme aumenta la dosis.

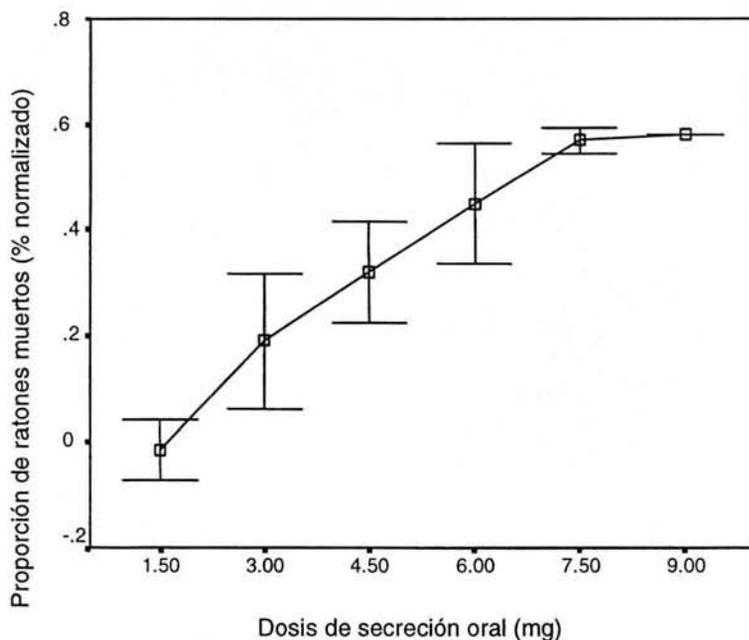


Figura 16. Promedios \pm 1 DE de la proporción de ratones muertos y la dosis de secreción oral inyectada.

El modelo de polinomios ortogonales de grado uno es el que mejor describe el cambio en la respuesta mostrando una correlación de $R= 0.852$ entre la dosis y la proporción de ratones muertos. La Figura 17 muestra el ajuste de los datos observados con el modelo lineal existiendo una correlación positiva. Es decir, al aumentar la dosis la proporción de ratones muertos se incrementa, siendo el cambio parecido y constante en todas las dosis.

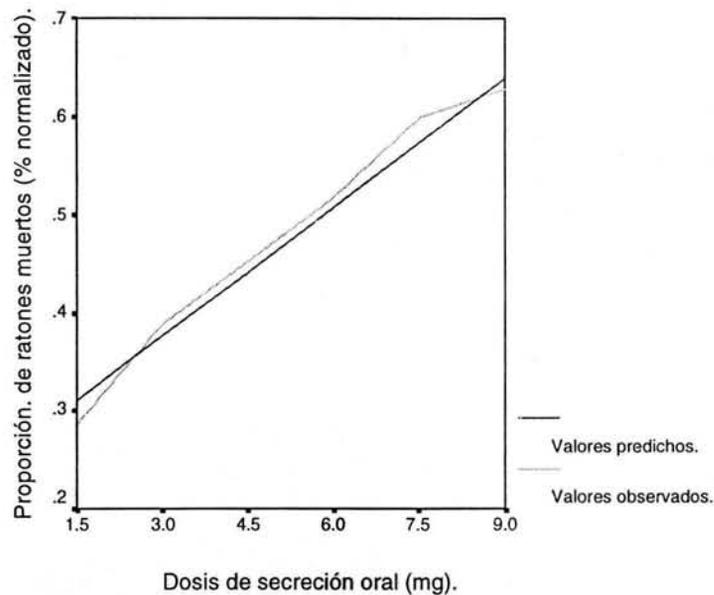


Figura 17. Ajuste de datos por el método de polinomios ortogonales para la proporción de ratones muertos y la dosis de secreción oral inyectada comparando los valores observados con los predichos por el modelo.

Familia Viperidae. El ANDEVA mostró que el efecto de dosis de veneno en la proporción de ratones muertos mostró diferencia significativa ($F_{56}^7 = 2.18$, $p < 0.0001$), indicando que existe al menos una diferencia entre dos de las dosis. La prueba de Tukey indicó que todos los pares son diferentes ($p = 0.0001$) excepto 0.3 y 0.1 mg ($p = .825$) y ambas son diferentes de 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5 y 9.0 mg (de $p = 1$ a $p = .825$).

En la Figura 18 se observa que hay una correlación positiva entre la proporción de ratones muertos y la dosis de veneno inyectado, situación que se observa desde la primera dosis de veneno. Dicha proporción se incrementa notablemente a partir de la dosis 1.5 mg y se mantiene aproximadamente constante hasta la dosis 9.0 mg.

El análisis con el método de polinomios ortogonales mostró un ajuste con el modelo lineal. La correlación entre la dosis y la proporción de ratones muertos es de $R = 0.717$ mg/ proporción de ratones muertos (normalizados). En la Figura 19 se observa como se ajusta el modelo lineal a los valores observados, donde existe una correlación positiva, siendo el cambio parecido y constante en todas las dosis.

Nótese que la gráfica muestra a que el cambio de la proporción de ratones muertos (normalizados) ocurre de 0.8 a 1.

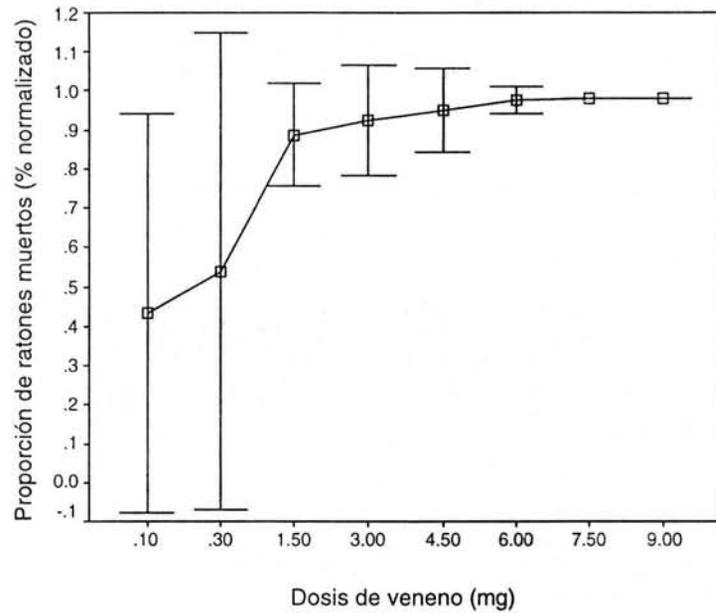


Figura 18. Promedios ± 1 DE de la proporción de ratones muertos y la dosis de veneno inyectada.

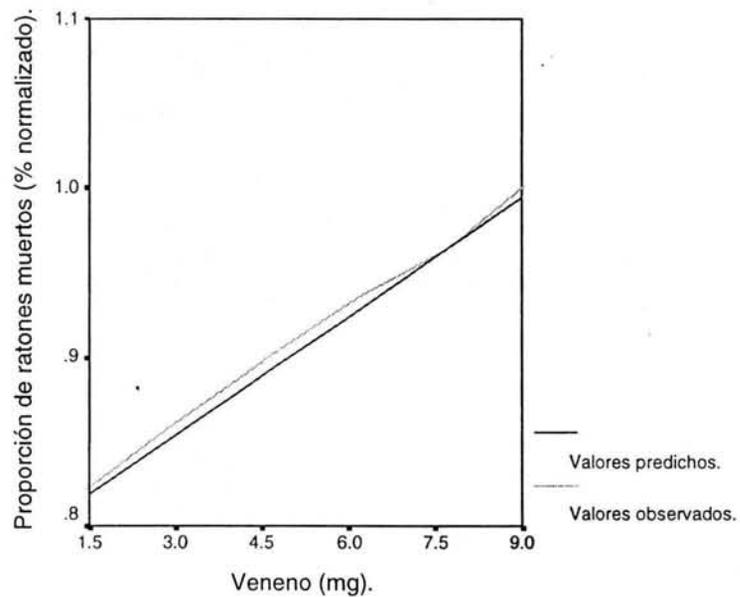


Figura 19. Ajuste de datos por el método de polinomios ortogonales para la proporción de ratones muertos y la dosis de veneno inyectada comparando los valores observados con los predichos por el modelo.

En la figura 20 se observa la diferencia entre las líneas de tendencia en la proporción de ratones muertos causados por la inyección de secreciones orales y venenos a diferentes dosis.

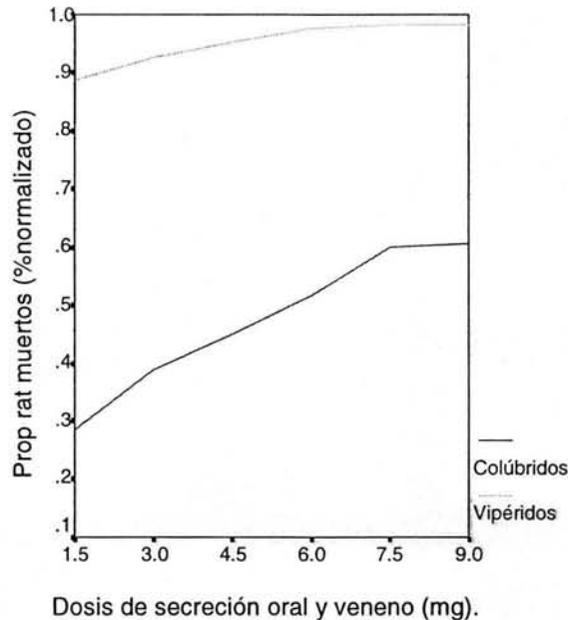


Figura 20. Comparación de las tendencias de la proporción de ratones muertos entre colúbridos y vipéridos.

Estudio del efecto de las dosis y de las especies en el tiempo de envenenamiento para el primer ratón

Colúbridos. Con el ANDEVA, se destaca que la interacción dosis-especie tiene un efecto dependiente de la especie ($F_{56}^7 = 2.18$, $p < 0.0001$), que quiere decir que el efecto no es el mismo entre las especies.

En la Figura 21 se observa que existe una interacción sinérgica entre especies y dosis, gráficamente se pueden comparar las tendencias; por ejemplo, *Oxybelis fulgidus* se ajusta a un modelo cuadrático donde el cambio es mayor en dosis bajas (1.5 a 3 mg) correspondiendo a 4.5 minutos y en las dosis más altas (4.5 a 9 mg) el cambio es de 2.5 minutos. Otro caso es la interacción de *Salvadora bairdi* que se ajusta a un modelo lineal donde el cambio se mantiene constante.

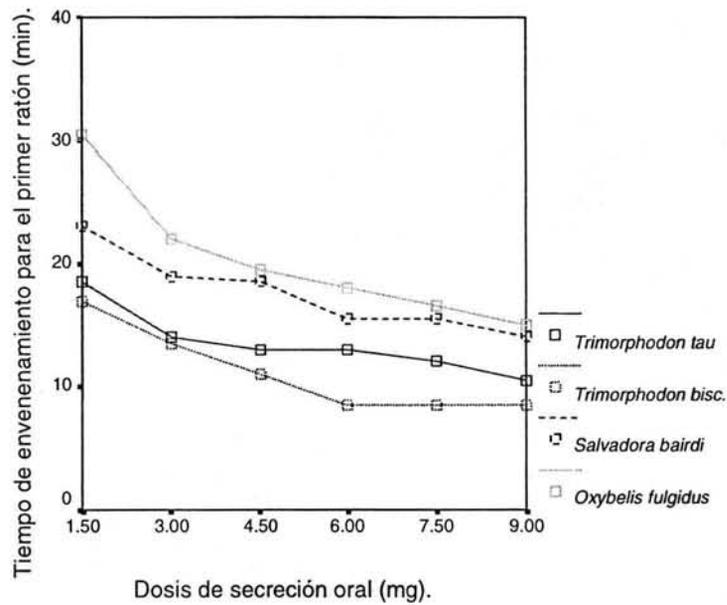


Figura 21. Interacción dosis-especies del tiempo de envenenamiento para el primer ratón.

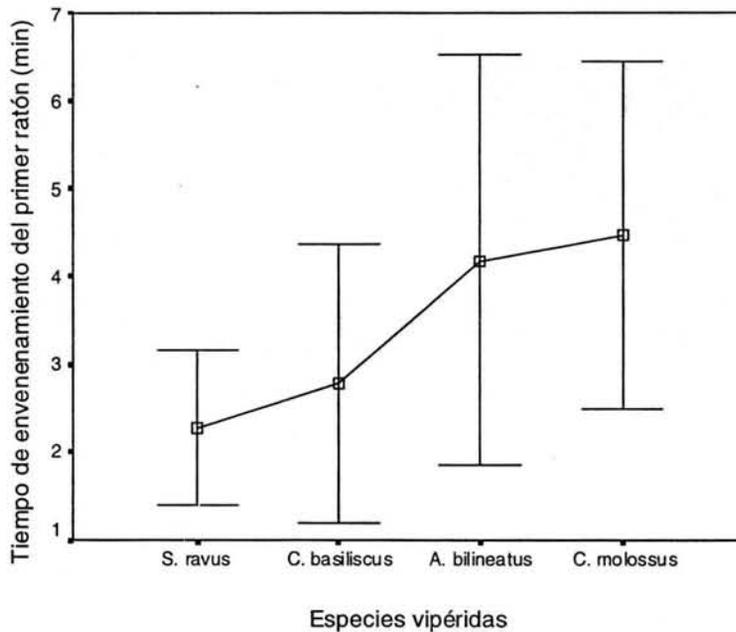


Figura 22. Efecto de especie en el tiempo de envenenamiento del primer ratón, representada por el promedio \pm 1 DE. La especie con mayor efecto tóxico es *Sistrurus ravus* con un tiempo promedio de envenenamiento del primer ratón de 2.28 minutos. Se consideraron las dosis 0.1 a 9 mg.

Vipéridos. El ANDEVA con la respuesta tiempo de envenenamiento para el primer ratón muestra que no hubo interacción dosis-especies ($F_{60}^3 = 2.76$, $p = 0.187$), indicando que el efecto de cada dosis es el mismo en todas las especies (Figura

8). Sin embargo, el factor especie fue altamente significativo ($F_{60}^3 = 2.76$, $p < 0.0001$), siendo *Sistrurus ravus* la especie con mayor impacto en el envenenamiento del primer ratón con un valor promedio de tiempo de envenenamiento de 2.28 minutos (Figura 22).

Estudio del efecto de las dosis y de las especies en el tiempo de muerte para el primer ratón

Colúbridos. El ANDEVA con la respuesta tiempo de muerte para el primer ratón no mostró diferencia con la interacción dosis-especies ($F_{23}^2 = 3.42$, $p = 0.553$). El efecto de dosis es el mismo en las especies colúbridas y la dosis 9 mg la de mayor impacto, ya que en esta dosis, el tiempo de muerte del primer ratón es menor, como se puede observar en la Figura 11.

Vipéridos. El análisis de varianza (ANDEVA) con la respuesta tiempo de muerte para el primer ratón no mostró diferencia en la interacción dosis especies ($F_{60}^3 = 2.76$, $p = 0.096$). Igual al caso anterior, el efecto de dosis es el mismo en las especies y la dosis 9 mg la de mayor impacto, ya que en esta dosis el tiempo de muerte del primer ratón es menor, como se puede observar en la Figura 13.

El factor especie fue altamente significativo ($F_{60}^3 = 2.76$, $p < 0.0001$). En la Figura 23 se observan las especies con mayor impacto en el tiempo de muerte siendo *Crotalus molossus* a los 22.25 minutos y *Sistrurus ravus* los 31.22 minutos.

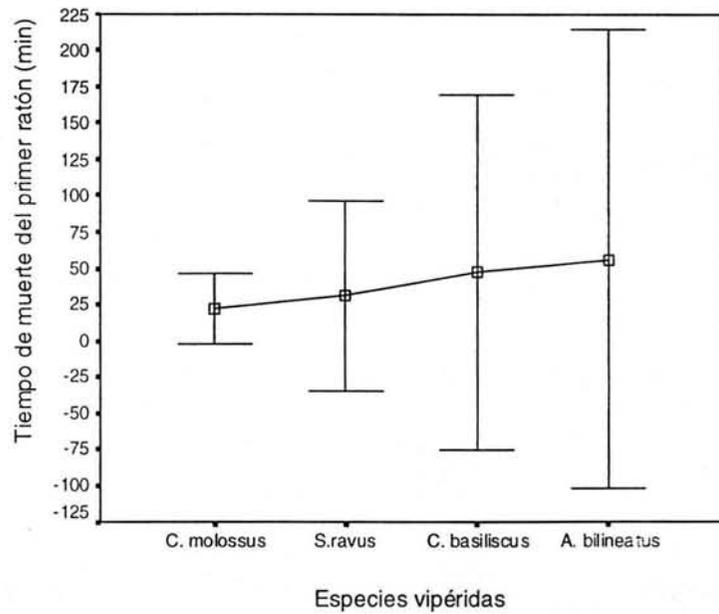


Figura 23. Promedio \pm 1 DE del tiempo de muerte para el primer ratón por especie considerando las dosis 0.1 a 9 mg.

Estudio del efecto de las especies y de las dosis en la proporción de ratones muertos

Colúbridos. El ANDEVA con la respuesta proporción de ratones muertos no mostró diferencia significativa en la interacción dosis-especies ($F_{60}^3 = p= 0.698$), entonces el efecto de dosis es el mismo entre las especies. El factor dosis fue altamente significativo ($F_{60}^3 = 2.76, p<0.0001$), como se muestra en la Figura 16 la dosis con mayor impacto corresponde a la de 9 mg.

Vipéridos. El ANDEVA con la respuesta proporción de ratones muertos para especies y dosis mostró que la interacción dosis-especies fue significativa estadísticamente ($F_{60}^3 = 2.76, p<0.0001$). En la Figura 24 se observa que existe una interacción sinérgica entre las especies y dosis, indicando que el efecto de la dosis

en la proporción de ratones muertos depende de la especie, siendo el efecto de la dosis diferente en cada especie.

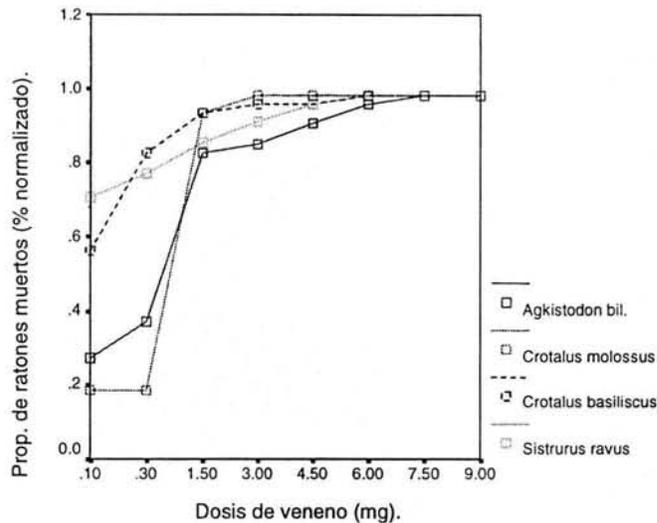


Figura 24. Interacción dosis-especies con respecto a la proporción de ratones muertos; el efecto de las dosis en las especies es diferente. Por ejemplo la tendencia de *Sistrurus ravus* parece ser lineal, en comparación con la forma cuadrática de *Crotalus basiliscus*, en donde los mayores cambios ocurren en las primeras dosis (0.1 a 1.5 mg).

Análisis de mortalidad

El análisis de mortalidad considerando el tiempo de muerte para el primer ratón para las dos Familias, comparando dos curvas con la técnica de Kaplan-Meier, mostró hay diferencia significativa en la mortalidad causada por las secreciones orales y venenos ($p < 0.0001$), siendo mayor para los venenos vipéridos. En el Cuadro 2 se muestran los grupos de ratones del experimento, el número de eventos que corresponde a la mortalidad acumulada, y los casos censurados que son los ratones que no mueren durante el experimento. En la Figura 25 se observan las curvas de mortalidad de las dos Familias.

Cuadro 2. Análisis de mortalidad en ratones causada por secreciones orales y venenos por Familia (0.1 a 9 mg).

	Grupos de 10 ratones	Número de eventos (mortalidad)	Casos censurados (ratones que no mueren)	% censurado
secreciones orales	64	26	38	59.38
venenos	64	58	6	9.38
Total	128	84	44	34.38

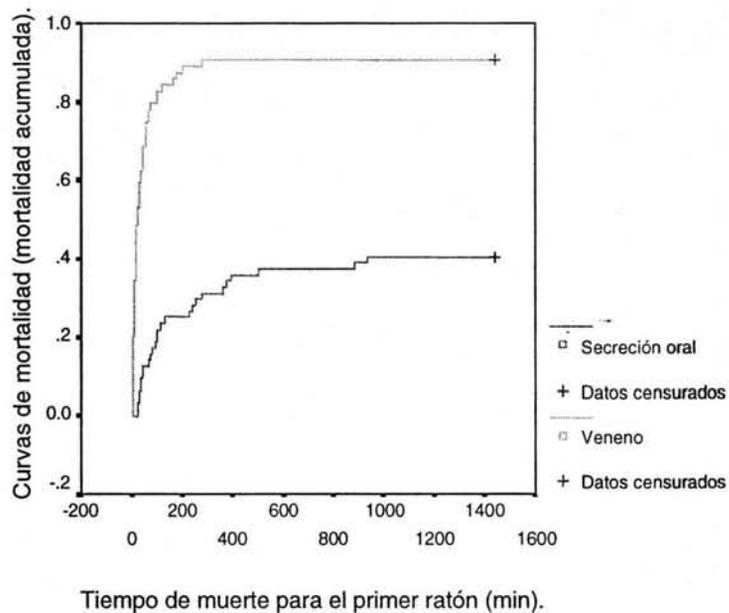


Figura 25. Curvas de mortalidad de ratones causadas por la inyección de secreciones orales y venenos. Los casos censurados corresponden a los ratones que no murieron durante el experimento. Los valores de mortalidad y casos censurados se encuentran en el Cuadro 2.

Comparación de la mortalidad causada por secreciones orales y venenos por Familias y dosis. Considerando Familias y dosis, el análisis mostró tres comportamientos de mortalidad de acuerdo a la dosis. En primer lugar, para las dosis 0.1 y 0.3 (Cuadro 3) se observó que el número de eventos de muerte fueron cinco para los vipéridos y cero para los colúbridos, siendo significativo ($p=0.008$) para cada una de las dosis. Esto quiere decir que la mortalidad causada es diferente entre las Familias.

Cuadro 3. Análisis de mortalidad para ratones causada por secreciones orales y venenos por Familia en dosis de 0.1 y 0.3 mg. Nótese que el comportamiento es el mismo para cada una de las dosis.

	Dosis	Número de eventos	Casos censurados	% censurado
secreciones orales	0.1	0	8	100
	0.3	0	8	100
venenos	0.1	5	3	37.5
	0.3	5	3	37.5

El análisis muestra que la mortalidad es diferente para las dosis 0.1 y 0.3 mg. En la Figura 26 se muestran las curvas de mortalidad para dichas dosis donde se observa que los colúbridos no ocasionan muertes, mientras que los vipéridos causan alrededor del 60%.

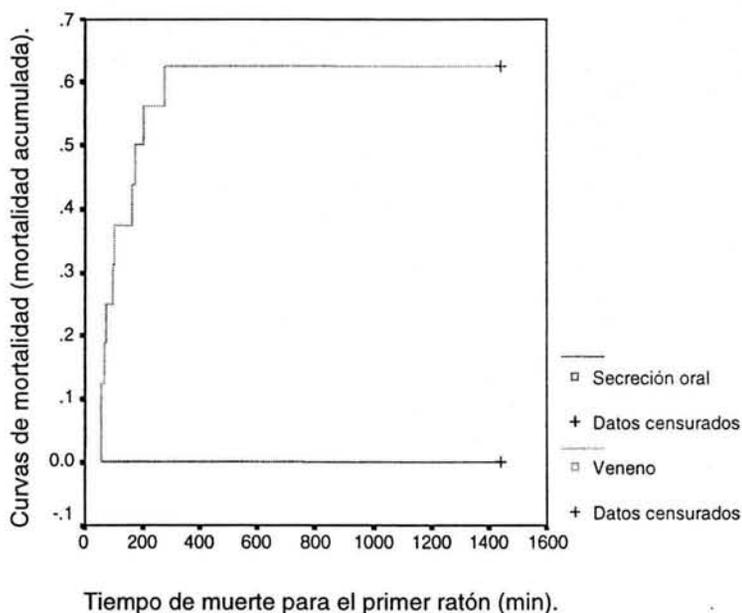


Figura 26. Curvas de mortalidad para las dosis 0.1 y 0.3 mg de secreciones orales y venenos. Las curvas tienen el mismo comportamiento para ambas dosis, es decir, para colúbridos en las dosis 0.1 y 0.3 mg no hubo mortalidad y para los vipéridos en las dosis 0.1 y 0.3 mg se presentaron 5 eventos en cada una.

El segundo comportamiento corresponde al observado en las dosis intermedias (1.5 a 6 mg), donde hubo ocho eventos de muerte en vipéridos y cuatro en colúbridos para cada una de las dosis, existiendo diferencia significativa

entre las dosis ($p < 0.0001$). En el Cuadro 4 se pueden observar los eventos de mortalidad acumulada y casos censurados, los valores corresponden a cada una de las dosis.

Cuadro 4. Análisis de mortalidad en ratones causada por secreciones orales y venenos por Familia en dosis de 1.5, 3, 4.5 y 6 mg. Nótese que el comportamiento es el mismo para cada una de las dosis.

	Dosis (mg)	Número de eventos	Casos censurados	% censurado
secreciones orales	1.5	4	4	50
	3	4	4	50
	4.5	4	4	50
	6	4	4	50
venenos	1.5	8	0	0
	3	8	0	0
	4.5	8	0	0
	6	8	0	0

La mortalidad nuevamente fue mayor con los venenos como se puede observar en la Figura 27, donde los venenos producen una mortalidad cercana al 100% y las secreciones orales alrededor del 50%.

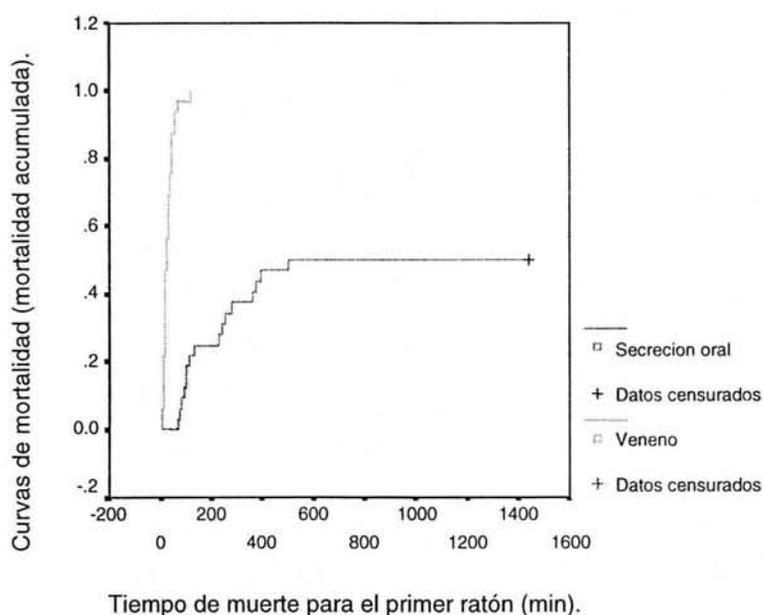


Figura 27. Curvas de mortalidad para ratones causadas por secreciones orales y venenos con dosis de 1.5 a 6 mg.

El tercer comportamiento se observó en las dosis 7.5 y 9 mg, existiendo diferencia estadística ($p < 0.0001$). Como se aprecia en el Cuadro 5, hubo ocho muertes para los vipéridos y cinco para los colúbridos en cada una de las dosis.

Cuadro 5. Análisis de mortalidad en ratones causada por secreciones orales y venenos por Familia en dosis de 7.5 y 9 mg. Nótese que el comportamiento es el mismo para cada una de las dosis.

	Dosis	Número de eventos	Casos censurados	% censurado
secreciones orales	7.5	5	3	37.5
	9.0	5	3	37.5
venenos	7.5	8	0	0
	9.0	8	0	0

En la Figura 28 se muestran las curvas de mortalidad para las dosis 7.5 y 9 mg. Los vipéridos producen una mortalidad del 100% y los colúbridos del 62.5%.

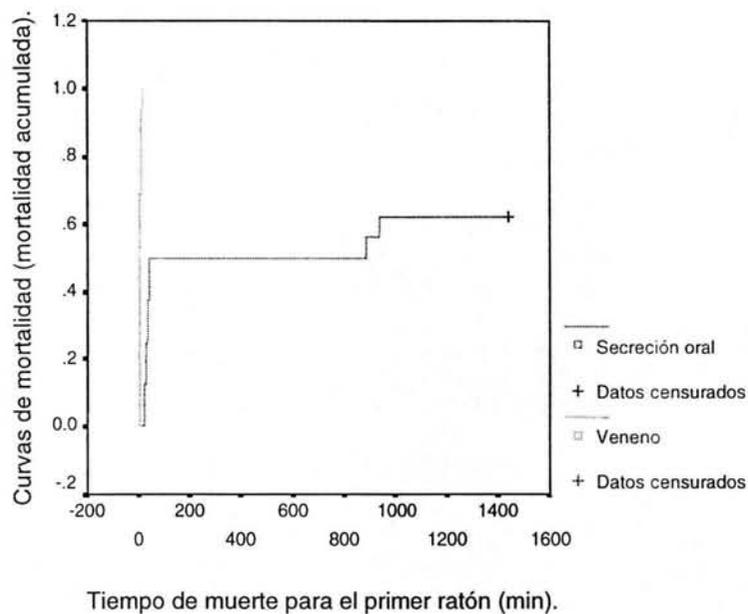


Figura 28. Curvas de mortalidad de ratones causada por secreciones orales y venenos en dosis de 7.5 y 9 mg. El comportamiento es el mismo para cada una de estas dosis.

Cambios anatomo-patológicos en ratones inyectados con secreciones orales

En los ratones inyectados con secreciones orales no se observaron cambios macroscópicos en las dosis 0.1 y 0.3 mg. Sin embargo, para las dosis 1.5 y 3 mg se apreció inflamación y edema en el sitio de inyección, observándose enrojecimiento de las áreas inflamadas, aumento de volumen y líquido serosanguíneo.

Conforme aumentaron las dosis de 4.5 mg en adelante, la hemorragia, inflamación y edema eran más notorios. A partir de la dosis 1.5 mg, los signos antes mencionados se encontraron en diferentes órganos de la mayoría de los ratones inyectados: corazón, pulmón, riñón, hígado, bazo, tracto gastrointestinal y piel. No se observaron ratones con hemorragia nasal inyectados con secreciones orales.

Cambios anatomo patológicos en ratones inyectados con venenos

Los cambios macroscópicos se observaron en todos los ratones inyectados con venenos a partir de la dosis 0.1 mg. Los órganos afectados fueron los mismos

que en el caso de los ratones inyectados con secreciones orales. En el sitio de inyección se observó inflamación, edema, hemorragia, además de alopecia, que no presentaron los ratones inyectados con secreciones orales. Se observó que las hemorragias y necrosis aumentaron gradualmente en órganos internos conforme aumentó la dosis. La mayoría de los ratones inyectados con venenos presentaron sangrado nasal a partir de la dosis 1.5 mg.

En las Figuras 29 y 30 se muestran los daños macroscópicos en algunos órganos de los ratones inyectados con secreciones orales y venenos con la dosis 9 mg/10 ratones. En la figura 31 se pueden observar los órganos de un ratón que no fue inyectado ni con secreción oral ni con veneno.

Examen microscópico

Se examinaron en el microscopio muestras de corazón, pulmón, riñón, hígado, bazo, tubo gastrointestinal y piel de 160 ratones inyectados en la dosis 9 mg con secreciones orales y venenos. Los resultados del daño microscópico se presentan en el Cuadro 6.

Al realizar el análisis de los datos de daño microscópico para colúbridos y vipéridos se observó lo siguiente:

1. En corazón, hígado, bazo y tracto gastrointestinal todos los ratones estuvieron dañados.
2. En piel, riñón y pulmón, en 12 de los 80 ratones inyectados con secreciones orales no tuvieron daño (Cuadro 7).

Cuadro 7. Número de ratones que presentaron daño en piel, riñón y pulmón por efecto de las secreciones orales y venenos.

	Colúbridos	Vipéridos
Ratones con daño	68	80
Ratones sin daño	12	0
Total	80	80



Figura 29. Se muestra el daño macroscópico causado por la secreción oral de *Trimorphodon biscutatus*. Se observan petequias en el corazón (1), hemorragias en pulmón (2), hígado (3) y pared abdominal (4).

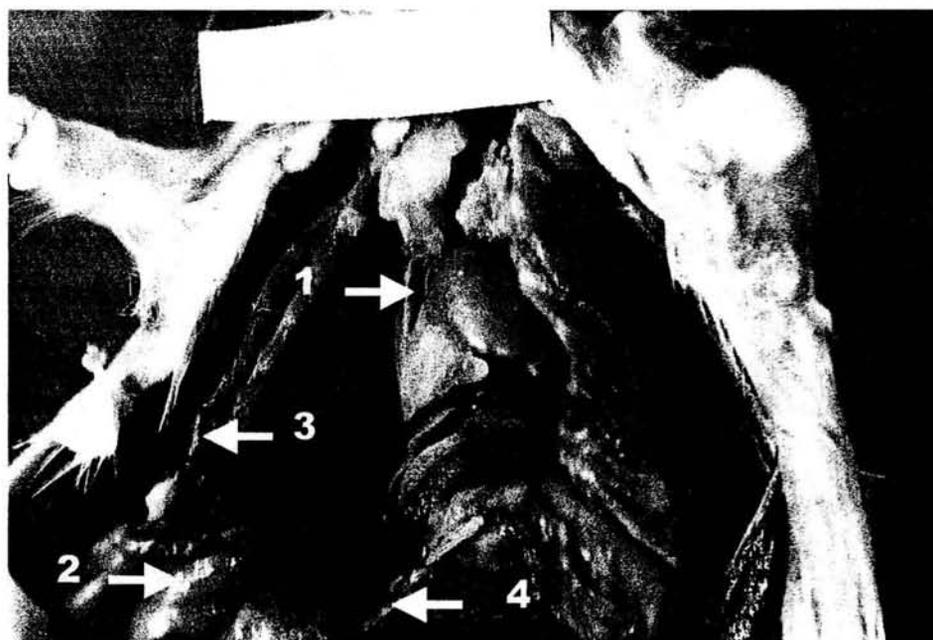


Figura 30. Se muestra el daño macroscópico causado por el veneno de *Sistrurus ravus*. Se observa congestión pulmonar (1) e intestinal (2) y de los músculos torácicos y abdominales (3) así como en la periferia de los lóbulos hepáticos (4).



Figura 31. Se muestran los órganos internos de un ratón que no fue inyectado con secreción oral ni con veneno. No se observan hemorragias ni edemas.

Cuadro 6. Daño microscópico en corazón, pulmón, hígado, riñón, bazo, tubo gastrointestinal y piel en ratones inyectados con secreciones orales y venenos en la dosis 9 mg.

Especie	Corazón	Pulmón	Hígado	Riñón	Bazo	Tubo gastrointestinal.	Piel
<i>Trimorphodon tau</i>	Congestión de miocardio	Congestión y hemorragia intraalveolar	Trombos de eritrocitos en la vena porta, hemorragia del tejido adiposo	Congestión	Sin cambios	Sin alteraciones	Hemorragia en el sitio de inyección
<i>Trimorphodon biscutatus</i>	Congestión del miocardio	Congestión y hemorragias intraalveolares	Trombos de eritrocitos	Trombos de eritrocitos	Sin cambios	Congestión de los vasos de la pared	Hemorragia en el sitio de inyección
<i>Salvadora bairdi</i>	Congestión del miocardio	Congestión y hemorragia intercelulares	Congestión y trombos de la vena porta	Hemorragia en túbulos renales	Congestión	Sin cambios	Hemorragia en el sitio de inyección
<i>Oxybelis fulgidus</i>	Congestión del miocardio	Hemorragias intraalveolares	Trombos de eritrocitos	Congestión y hemorragia intersticial	Hemorragias	Sin cambios	Hemorragia en el sitio de inyección
<i>Agkistrodon bilineatus</i>	Congestión del miocardio	Congestión intraalveolar	Trombos de eritrocitos	Congestión y hemorragia focal	Congestión	Hemorragia del tejido adiposo	Hemorragia en el sitio de inyección
<i>Crotalus molossus</i>	Congestión y hemorragia del miocardio	Congestión y hemorragia intersticial	Congestión vascular	Hemorragia y congestión intersticial	Sin cambios	Congestión y trombosis	Hemorragia en el sitio de inyección
<i>Crotalus basiliscus</i>	Congestión del miocardio	Congestión intraalveolar	Congestión y hemorragia de la vena porta	Congestión y hemorragia	Congestión y hemorragias	Hemorragias del tejido adiposo	Hemorragia en el sitio de inyección
<i>Sistrurus ravus</i>	Congestión del miocardio	Congestión intraalveolar	Congestión de la vena porta	Congestión y hemorragia	Hemorragias	Congestión de los vasos de la pared	Hemorragia en el sitio de inyección

En los cortes histológicos de hígado congestionado se observó que las venas centrolobulillares y los sinusoides se encontraban distendidos y con gran cantidad de sangre. En el bazo se observaron los sinusoides repletos de sangre y pigmento hemático en los macrófagos. En pulmón la red capilar se encontró repleta de sangre y de un material de color rosa (edema) en los alveolos, donde se pueden encontrar glóbulos rojos (Figuras 32 y 33; en la Figura 34 se muestra un corte histológico de pulmón sin envenenamiento). En corazón los capilares de las fibras musculares presentaban una gran cantidad de eritrocitos (Figuras 35 y 36; en la Figura 37 se observa el corte histológico de corazón de un ratón no envenenado). En riñón la cápsula y médula renal presentaron acumulación de glóbulos rojos. En músculo se observó daño en los capilares de las fibras musculares y en piel en los vasos sanguíneos o capilares hipodérmicos se encontró una gran cantidad de eritrocitos. En los ratones inyectados con secreciones orales, se observó que el daño a nivel microscópico fue menor que en

los inyectados con venenos que manifestaron mayores áreas con hemorragia y edema.



Figura 32. Corte histológico 5X campo claro (c.c.) del parénquima pulmonar de ratón donde se muestran los cambios microscópicos causados por la secreción oral de *Trimorphodon biscutatus*. Las zonas más oscuras (1) representan los capilares alveolares repletos de eritrocitos, signo de hemorragia y congestión intraalveolar.



Figura 33. Corte histológico 5X c.c. de pulmón de ratón inyectado con veneno de *Sistrurus ravus* en donde se aprecia una mayor congestión intraalveolar (1) que *Trimorphodon biscutatus*.



Figura 34. Corte histológico 5X c.c. de pulmón de ratón sin envenenamiento. No se observa congestión intraalveolar.

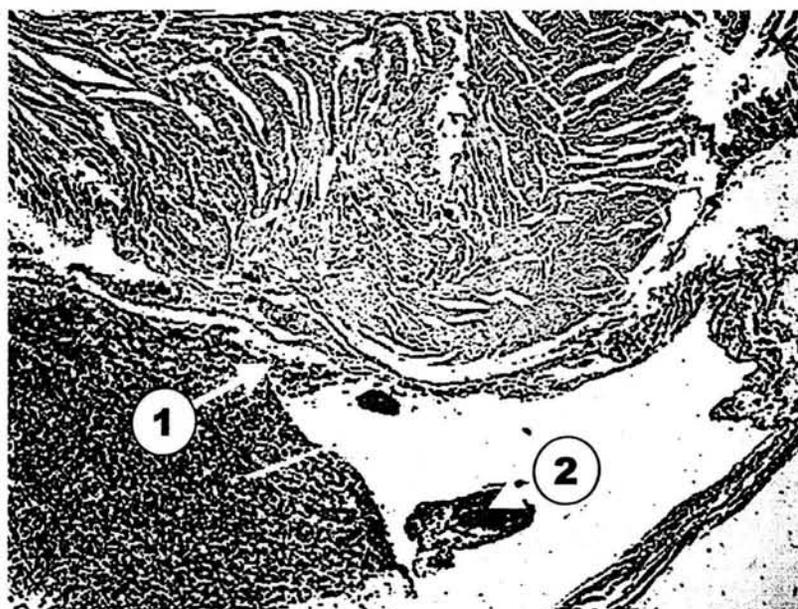


Figura 35. Se muestra un corte histológico 5X c.c. de músculo cardíaco en donde se pueden observar los cambios microscópicos causados por la secreción oral de *Trimorphodon biscutatus* en ratón. Se observa la presencia de eritrocitos (1) y trombo (2).



Figura 36. Corte 5X c.c. del tejido muscular cardiaco de ratón en donde se aprecia un trombo (1), indicando el efecto causado por el veneno de *Sistrurus ravus*.



Figura 37. Corte 5X c.c. del tejido muscular cardiaco de ratón no envenenado ni con secreción oral ni con veneno.

Estudio del rendimiento de secreciones orales y de venenos y su relación con el peso corporal de los organismos en ambas Familias

Durante la extracción de secreciones orales en colúbridos mediante estimulación parasimpatomimética se observaron diferentes respuestas en el tiempo que tardó la pilocarpina en hacer efecto, variando de 3 a 10 minutos. La mayoría de las veces se obtuvieron volúmenes suficientes que se pudieron cuantificar, liofilizar y almacenar (Figura 38).



Figura 38. Muestras de secreciones orales de *Trimorphodon biscutatus* recolectadas, liofilizadas y almacenadas en tubos de plástico graduados y estériles. Las muestras pertenecen a dos organismos.

En el Cuadro 8 se muestran los rendimientos promedio ± 1 DE (desviación estándar) de secreción oral para las especies colúbridas.

Cuadro 8. Rendimiento promedio \pm 1 DE en μ l y mg de secreciones orales. Sólo se presentan los rendimientos de secreciones orales de las especies con las que se realizaron pruebas de toxicidad.

Especie	Promedio \pm DE del rendimiento en (μl)	Promedio \pm DE del rendimiento en (mg)
<i>Trimorphodon tau</i>	29.16 \pm 3.85	8.0 \pm 4.13
<i>Trimorphodon biscutatus</i>	165 \pm 11.53	37.66 \pm 3.60
<i>Salvadora bairdi</i>	85.83 \pm 14.71	17.43 \pm 6.55
<i>Oxybelis fulgidus</i>	101.66 \pm 6.56	19.33 \pm 4.42

Las extracciones de veneno para las especies vipéridas dieron rendimientos altos (Cuadro 9) de tal manera que los venenos procesados pudieron ser utilizados para realizar pruebas de toxicidad (Figura 39).

Cuadro 9. Rendimiento promedio \pm 1 DE en μ l y mg de veneno. Se presentan los rendimientos de las especies vipéridas utilizadas en el protocolo para experimentación.

Especie	Promedio \pm DE del rendimiento en (μl)	Promedio \pm DE del rendimiento en (mg)
<i>Agkistrodon bilineatus</i>	31.66 \pm 10.58	70.65 \pm 7.2
<i>Crotalus basiliscus</i>	32.5 \pm 12.3	61.11 \pm 8.6
<i>Sistrurus ravus</i>	7.5 \pm 1.6	27.35 \pm 3.4
<i>Crotalus molossus</i>	40.83 \pm 14.1	77.53 \pm 2.5



Figura 39. Muestras de veneno de la especie *Sistrurus ravus* las cuales fueron cuantificadas, liofilizadas y almacenadas en tubos de plástico estériles y graduados. Las muestras pertenecen a un organismo.

Se obtuvo que existe una correlación de aproximadamente de 0.8 ($r=0.764$) entre el rendimiento de secreciones orales y veneno vs. el peso de los organismos. Al aplicar regresión lineal múltiple al modelo $Y = \beta_0 + \beta_1X + \beta_2Z + \beta_{12}XZ$, indica que existe influencia del peso en el rendimiento de secreciones orales y venenos por la Familia y por la Familia-peso de los organismos. En el Cuadro 10 se muestran los coeficientes que indican la cantidad que influyen para explicar la respuesta de la variable rendimiento que se encuentra junto con ellos ($\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{1,2}$).

Cuadro 10. Coeficientes de la ecuación estimada con regresión lineal múltiple.

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	T	Sig. (p)
		B	Error Std.	Beta		
β_0	(Constante)	28.082	48.857		0.575	0.574
β_1	PESOG	0.327	0.118	1.203	2.778	0.014
β_2	FAMILIA	1.206	33.7	0.008	0.036	0.972
$\beta_{1,2}$	PESOXFAM	-0.00926	0.097	-0.401	-0.956	0.354

La correlación indica que existe una relación positiva entre el tamaño de la serpiente y la cantidad obtenida de veneno en ambas Familias. Por otra parte, se encontró que el rendimiento secreciones orales y venenos de 0.327 mg/ gr (β_1) es el mismo en los organismos de ambas Familias.

Concentración de proteína de las secreciones orales y venenos

En el Cuadro 11 se muestra la concentración total de proteína en las muestras.

Cuadro 11. Concentración total de proteína en las muestras de secreciones orales y venenos.

Colúbridos	Concentración	Vipéridos	Concentración
<i>Trimorphodon tau</i> 1	0.19 g/ml	<i>Agkistrodon bilineatus</i> 1	2.37 g/ml
<i>T. tau</i> 2	0.15 g/ml	<i>A. bilineatus</i> 2	2.28 g/ml
<i>T. biscutatus</i> 1	0.15 g/ml	<i>Crotalus basiliscus</i> 1	1.41 g/ml
<i>T. biscutatus</i> 2	0.21 g/ml	<i>C. basiliscus</i> 2	2.13 g/ml
<i>Oxybelis fulgidus</i> 1	0.06 g/ml	<i>C. triseriatus</i> 1	0.47 g/ml
<i>O. fulgidus</i> 2	0.11 g/ml	<i>C. triseriatus</i> 2	0.56 g/ml
<i>Salvadora bairdi</i> 1	0.08 g/ml	<i>Sistrurus ravus</i> 1	1.64 g/ml
<i>S. bairdi</i> 2	0.08 g/ml	<i>S. ravus</i> 2	6.55 g/ml

La prueba *t* entre las medias de la concentración de proteína para colúbridos y vipéridos rechazó la *H₀* que indica que la discrepancia que hay entre los valores observados y el supuesto de que los promedios son iguales, por lo que la concentración de proteína entre las dos poblaciones es diferente. Para determinar si la discrepancia es suficiente para rechazar *H₀*, entonces se calculó la probabilidad que tienen de ocurrir siendo altamente significativa ($p=0.009$). La concentración de proteína de las secreciones orales fue de 53.26 % en promedio, y en los venenos de 90.81%. En términos de estimación por intervalo se tiene que la concentración de proteína es al menos de 0.6 y a lo mucho de 3.49 mayor en los

venenos vipéridos que en las secreciones orales de los colúbridos. En promedio la concentración de proteína es aproximadamente el doble en venenos que en secreciones orales.

DISCUSIÓN

Tiempo de envenenamiento para el primer ratón

En el presente trabajo se encontró que el tiempo de envenenamiento para el primer ratón tanto para colúbridos como para vipéridos corresponde a una relación dosis-respuesta: al aumentar la dosis de secreción oral y de veneno el envenenamiento fue más rápido. Algunos trabajos experimentales donde se han inyectado secreciones orales colúbridas en ratones de laboratorio (Vest *et al.*, 1991; Vest, 1981; 1988; Rosenberg, 1992; Rosenberg *et al.*, 1985) han reportado que el tiempo de envenenamiento es muy variable dependiendo de las especies, presentando síntomas inmediatamente después de la inyección (Vest *et al.*, 1991; Vest, 1981; 1988; Rosenberg, 1992; Rosenberg *et al.*, 1985) y menores a una hora (Weinstein *et al.*, 1991; Vest, 1981). En el caso de los venenos vipéridos, los ratones se envenenan inmediatamente después de la inyección (Hayes *et al.*, 1995). Para colúbridos el malestar y los síntomas de envenenamiento aumentan conforme aumenta la dosis (Weinstein *et al.*, 1991; Vest *et al.*, 1991, Vest, 1981; 1988; Rosenberg, 1992; Rosenberg *et al.*, 1985, Hayes *et al.*, 1995). En dichos trabajos, la dosis base fue de 1mg/ml, a partir de la cual se derivaron las dosis administradas y con la ayuda de un programa estadístico se determinó la dosis que tuvo efecto deletéreo en la mitad de la población, es decir, DL50. En el presente trabajo se tuvo un gradiente experimental muy fino que corresponde a un intervalo de 0.9 a 0.01 mg para cada ratón, lográndose detectar los límites de cambio a partir de donde no hay efecto tóxico hasta alcanzar el 100% de mortalidad con secreciones orales. Las dosis empleadas corresponden de 10 a 1000 veces menores de lo que inyecta un vipérido en una mordida natural. Se observó que algunos ratones inyectados con secreción oral a dosis mayores de 0.15 mg a cada ratón presentaron síntomas de envenenamiento, postrándose un momento; sin embargo, al transcurrir el tiempo los ratones recobraron su salud (hasta 16 horas después). Esto último es congruente con resultados presentados en algunos trabajos de letalidad (Vest *et al.*, 1991; Vest, 1981; 1988; Rosenberg, 1992;

Rosenberg *et al.*, 1985) donde los ratones se recuperan del efecto tóxico después de un tiempo.

En las Figuras 6 y 8 se pueden comparar las tendencias entre colúbridos y vipéridos en el tiempo de envenenamiento del primer ratón, donde se observa que en dosis 0.1 y 0.3 mg no ocurren envenenamientos para los colúbridos. La comparación del efecto tóxico en el tiempo de envenenamiento del primer ratón se muestra en la Figura 10, mostrando que es aproximadamente 4 veces mayor en la dosis 1.5 mg en vipéridos que en colúbridos y 3 veces mayor en la dosis 9 mg. Las dosis son las mismas para cada una de las muestras, pero el tiempo que tarda el veneno en tener un efecto tóxico es más rápido en los vipéridos.

En esta misma figura se observa también que en vipéridos el efecto tóxico no depende directamente de la dosis, pues se obtiene que el modelo ajustado es una función lineal con pendiente negativa. Sin embargo, la curva del modelo cuadrático ajustado para colúbridos genera una relación de la dependencia dosis-tiempo de envenenamiento del primer ratón. Estos resultados son afines a los obtenidos de la literatura para colúbridos (Vest *et al.*, 1991; Vest, 1981; 1988; Rosenberg, 1992; Rosenberg *et al.*, 1985) donde se indica que el tiempo de envenenamiento está directamente ligado a la dosis, sin haber hecho un trabajo experimental de gradiente de dosis. Sin embargo, las dosis utilizadas por ellos son mayores que las inyectadas en este trabajo por lo que no se detecta el cambio a partir de una dosis sin efecto tóxico.

Tiempo de muerte del primer ratón

En el presente trabajo se observó que el tiempo de muerte del primer ratón tanto para colúbridos como para vipéridos nuevamente corresponde a una relación dosis-respuesta. Cuando se inyectan secreciones orales, el tiempo de muerte para ratones también es muy variable y puede ir desde tres minutos a varias horas como la han reportado Weinstein *et al.* (1991), Vest *et al.* (1991), Vest (1981, 1988), Rosenberg (1992) y Rosenberg *et al.* (1985). En el caso de los ratones inyectados con venenos según Hayes *et al.* (1995) este tiempo puede ir de dos a seis minutos inyectando de 5 a 17 mg por ratón. En el presente trabajo se encontró

que la magnitud de cambio es mayor en las dosis 1.5 a 4.5 mg. Dicha relación se pierde a dosis mayores apoyándose el trabajo de Hayes *et al.* (1995) donde no se encontró correlación entre la cantidad de veneno y el tiempo de muerte de los ratones. Este estudio demuestra que la relación dosis respuesta no es un principio básico del todo verdadera, ya que el efecto tóxico es constante a cualquier dosis matando al ratón rápidamente independientemente de la cantidad inyectada de veneno. De acuerdo a los papeles primarios biológicos sugeridos (Kardong, 1996) los vipéridos requieren una muerte rápida de la presa, aun cuando en condiciones naturales existe un gasto innecesario del veneno. El gradiente experimental más fino del presente trabajo muestra que los vipéridos no necesitan inyectar a un ratón más de 0.45 mg en promedio para matarlo, aún cuando naturalmente podrían inyectar hasta 17.3 mg en una sola mordida.

Comparando las tendencias entre el tiempo de muerte del primer ratón causado por inyecciones de secreciones orales y venenos (Figuras 11 y 13) se observa que en dosis 0.1 y 0.3 mg no ocurren muertes para los colúbridos. En la Figura 15 se observa que el efecto tóxico en el tiempo de muerte del primer ratón es aproximadamente 8 veces mayor en la dosis 1.5 mg para los vipéridos pero solamente 5 veces mayor en la dosis 9.0 mg. El tiempo de muerte del primer ratón es más rápido al inyectar venenos que secreciones orales. Inyectando secreciones orales la magnitud de cambio es mayor entre las dosis 1.5 a 6 mg.

Proporción de ratones muertos

En colúbridos y vipéridos se observó la relación dosis-respuesta donde se incrementó la muerte al aumentar la dosis de secreción oral y de veneno. Cabe mencionar que en las secreciones orales de *Salvadora bairdi* y *Oxybelis fulgidus* no provocaron muertes, sin embargo, si causaron envenenamiento. Este modo de acción de la secreción oral puede resultar similar al efecto de inmovilización de la presa sugerido por varios autores (Gans, 1978; Savitzky, 1980), apoyando la idea que la función primaria de la secreción de la glándula de Duvernoy es tranquilizar a la presa. En el caso de los vipéridos se ha sugerido que el veneno sirve para inmovilizar y matar rápidamente a la presa (Kardong, 1986; Hayes, 1992). Esta

situación se refleja en el número de ratones muertos causada por la acción de los venenos.

Las tendencias en la proporción de ratones muertos causados por la inyección de secreciones orales y venenos se pueden comparar en las Figuras 16 y 18, donde en dosis 0.1 y 0.3 mg no ocurren muertes de ratones inyectados con secreciones orales. Comparando el efecto tóxico de la proporción de ratones muertos (Figura 20) se tiene que los venenos matan una proporción de ratones de aproximadamente 3 veces mayor en la dosis 1.5 mg y 1.5 veces mayor en la dosis 9 mg. A partir de la dosis 6 mg, el 100% de los ratones mueren por veneno inyectado, siendo el 40% más que los ratones que mueren por inyección de secreciones orales.

Daño macroscópico y microscópico en los ratones inyectados

Al inyectar los ratones con secreciones orales y venenos se encontraron lesiones hemorrágicas y edematosas a nivel macroscópico y microscópico en corazón, pulmón hígado, bazo, riñón, asas intestinales, músculo y piel. Esta información es acorde cuando se trata de venenos vipéridos (Russell *et al.*, 1997), donde generalmente se afectan dichos órganos.

Sin embargo, cuando se inyectan secreciones orales (Assakura *et al.*, 1992; Weinstein *et al.*, 1991; Prado-Franceschi *et al.*, 1998; Vest *et al.*, 1991, Vest, 1981; 1988; Rosenberg *et al.*, 1992; 1985; Rodríguez-Robles y Thomas, 1992; Jansen, 1987; Hayes *et al.*, 1993) no se ha registrado daño en hígado y bazo, el cual se reporta por primera vez en el presente trabajo. Es posible que el daño esté relacionado a las especies colúbridas utilizadas en este estudio, ya que son distintas a las utilizadas en los experimentos anteriores.

Aunque los órganos dañados generalmente fueron los mismos al inyectarse secreciones orales o venenos, el daño fue mayor en los ratones inyectados con venenos, presentando hemorragias y edemas de mayor tamaño. Estos resultados también concuerdan con la literatura donde se observa que los venenos vipéridos causan daño hemorrágico-sistémico (Russell *et al.*, 1997; Minton y Minton 1980; Minton, 1990; Mattisson, 1990, 1996), en comparación del daño hemorrágico y

formación de edema en los tejidos proximales al sitio de la inyección que ocurre con las secreciones orales colúbridas (Minton, 1980, 1990; Vest *et al.*, 1991, 1981; 1988; Rosenberg *et al.*, 1992; 1985; Rodríguez-Robles y Thomas, 1992; Jansen, 1987; Hayes *et al.*, 1993).

También se observó que las secreciones orales y venenos afectan proporcionalmente los órganos antes mencionados conforme se aumenta la dosis, apoyando la idea de que las secreciones orales (Jansen, 1987; Rodríguez-Robles y Thomas, 1993; Hayes *et al.*, 1993; Finley *et al.*, 1994; Kardong, 1996; Garland y Arnold, 1983) y venenos (Thomas y Pough, 1979; Kardong, 1996; Minton y Minton 1980; Hayes *et al.*, 1995) tienen funciones digestivas. La relación entre mayor área afectada a mayor dosis cuando se inyectan secreciones orales ha sido observado por Weinstein *et al.* (1991), Fontana *et al.* (1996), Vest *et al.* (1991) y Rosenberg *et al.* (1992).

Rendimiento y concentración de proteína de secreciones orales y venenos

o se encontraron reportes en la literatura sobre el rendimiento de secreciones orales para contrastarse con los obtenidos en el presente estudio, a excepción de *Trimorphodon biscutatus* que Hill y Mackessy (1997) reportan un promedio de 130 μ l y contenido sólido de 6.34 mg. El promedio registrado en este trabajo para la misma especie fue de 165 μ l que es ligeramente mayor al antes reportado; sin embargo, el rendimiento del contenido sólido es de 37.66 mg, siendo seis veces mayor. La técnica de extracción de secreciones orales es la misma en ambos trabajos y posiblemente la diferencia en el contenido sólido se deba a variabilidad individual o a que nuestros ejemplares fueran de mayor tamaño.

Al contrastarse los venenos con los datos obtenidos en Minton y Minton (1980), se encontraron valores similares, pero estos autores no indicaron el número de organismos utilizados.

La mayor diferencia en el rendimiento entre las secreciones orales y los venenos corresponde al contenido sólido (mg), siendo 3 veces mayor en los vipéridos que en los colúbridos. Sin embargo, el contenido líquido en microlitros es 3 veces mayor en colúbridos que en vipéridos.

Este estudio coincide con los resultados de Kochva *et al.* (1982) y De Roodt (1998) donde describen una relación positiva entre el tamaño de los vipéridos y la cantidad obtenida de veneno. Se reporta por primera vez que esta relación también se guarda en los colúbridos, además de que el rendimiento en relación al peso es estadísticamente el mismo (0.327 mg/gr de peso vivo); tanto para colúbridos como vipéridos.

Se ha reportado que las secreciones orales y venenos tienen una concentración de proteína que puede ir del 20 al 100% en secreciones orales (Hill y MacKessy, 1997; 2000) y generalmente 90% en venenos vipéridos (Ernst, 1992). En este trabajo se encontró que en promedio para los colúbridos la concentración de proteína de las muestras fue de 53.26 % y para los vipéridos de 90.81 %. Estos datos indicarían que las especies de colúbridos utilizadas en términos cualitativos resultarían ser medianamente venenosas. En el caso de los vipéridos indica una mayor letalidad.

Con base en estos resultados también se podría medir indirectamente la letalidad de las secreciones orales y de los venenos relacionando la concentración de proteína de las muestras al tiempo de envenenamiento, tiempo de muerte y proporción de ratones muertos. Se esperaría que un veneno vipérido por tener una concentración mayor fuera más letal y la proporción de ratones envenenados y muertos mayor que lo visto en colúbridos.

Aproximación de los resultados a la biología de colúbridos y vipéridos

Los colúbridos y vipéridos tienen diferentes sistemas de inyección de veneno con una función biológica primaria distinta (Kardong, 1996). La toxicidad de las secreciones orales y venenos cumplen su cometido de acuerdo a esta función biológica. En el caso de los vipéridos, un sistema de inyección de alta presión y alta toxicidad produce una muerte casi instantánea de las presas, lo que no sucede con los colúbridos. Sin embargo, esto no significa que los colúbridos sean menos exitosos que los vipéridos ya que al final de cuentas ambos sistemas cumplen la misma función, atrapar la cantidad suficiente de presas para garantizar su

supervivencia. El sistema de inyección de los vipéridos es simplemente más especializado que el de los colúbridos.

El efecto tóxico de la inyección de veneno o secreción oral dependerá del tiempo que tarda la presa en morir. Esto quiere decir que un colúbrido con dientes posteriores agrandados y un sistema de inyección de baja presión provocará que la presa tarde más en morir que cuando un vipérido muerde a su presa con un sistema de inyección de alta presión, colmillos largos y un pulso de veneno continuo inyectado profundamente (Kardong, 1980).

El efecto tóxico de la inyección en vipéridos quizá sea derivada de una disminución en el gasto energético (búsqueda, captura de la presa, inyección y producción del veneno), aun cuando exista un gasto innecesario de veneno inyectado a cada presa. Las serpientes vipéridas son especialistas en proporcionar una inyección profunda, lo que asegura el envenenamiento y la muerte del individuo. De acuerdo a los resultados, la dosis de secreción oral requerida para dar muerte a una presa es mayor para colúbridos que para vipéridos por lo que los colúbridos necesitan dar mordidas repetidas para incrementar el volumen de secreción oral inyectada. Además aun recurren a la estrategia primitiva de constricción para asegurar a la presa.

Los resultados del presente trabajo no pretenden ser interpretados como un estimado de la cantidad inyectada en una mordida natural. Aquí más bien se observa el efecto tóxico de las secreciones orales comparadas con los venenos vipéridos a mayor detalle en un gradiente a partir de dosis con mínimo efecto tóxico, independientemente al hecho de que una secreción oral o veneno llevara a cabo su función en condiciones naturales.

CONCLUSIONES

El enfoque que se le dio a este trabajo es distinto al de los trabajos realizados anteriormente.

1. El estudio es novedoso al hacer la comparación del efecto tóxico inyectando dosis equivalentes en un gradiente fino de secreciones orales y venenos buscando la dosis límite donde una secreción oral no causa envenenamiento y describiendo su efecto al incrementar la dosis.
2. El estudio muestra información básica sobre las secreciones orales y su efecto tóxico de los colúbridos *Trimorphodon tau*, *Oxybelis fulgidus* y *Salvadora bairdi*.
3. Se utilizaron cuatro especies colúbridas, en vez de solo una como usualmente se hace en otros estudios.

Los resultados y las conclusiones más sobresalientes del trabajo son:

1. El tiempo de envenenamiento del primer ratón es mayor con la inyección de secreciones orales que con venenos. El tiempo de envenenamiento con secreciones orales fue casi seis veces mayor a dosis 1.5 mg y casi cinco veces mayor a dosis 9 mg.
2. El tiempo de muerte del primer ratón es mayor con la inyección de secreciones orales que con venenos. Las secreciones orales tardaron aproximadamente ocho veces más tiempo en matar un ratón que los venenos en la dosis 1.5 mg y seis veces más en la dosis 9 mg.
3. La proporción de ratones muertos es el punto más sobresaliente resultando diferencias entre secreciones orales y venenos. Se obtuvo que en las dosis 1.5 mg y 9 mg los venenos matan el doble de ratones que las secreciones orales. El veneno mata cerca del 90% de los ratones a partir de la dosis 1.5 mg y en colúbridos el número de muertes aumenta de conforme aumenta la dosis registrando hasta el 60% a dosis 9 mg.
4. Las curvas de mortalidad por Familia y las dosis de 0.1 a 9 mg, indican que los venenos tardan hasta 200 minutos para matar el 90% de las veces en

comparación con las secreciones orales que para matar el 40% de las veces requieren poco más de 1000 minutos.

5. Las interacciones dosis-especie significativas indican que el efecto de la dosis depende de la especie.
6. Los efectos a nivel histológico de la acción causada por las secreciones orales son los mismos que los causados por venenos y ocurren en corazón, intestino, pulmón, bazo, hígado y piel. Es el primer reporte de afección en el hígado y bazo causado por secreciones orales.
7. Los colúbridos tienen secreciones orales con una concentración de proteína de cerca de la mitad menos que los venenos vipéridos. La concentración corresponde al 53.26% en secreciones orales y 90.81%, argumentando la menor letalidad de las secreciones colúbridas.
8. Se reporta por primera vez que al igual que vipéridos, la correlación entre el tamaño de las serpientes y la cantidad obtenida de secreciones orales se mantiene en los colúbridos, guardando estadísticamente la misma relación que es de 0.327 mg/gr de peso vivo.
9. El efecto tóxico de las secreciones orales en el experimento está regulado por la dosis, tiempo de envenenamiento y tipo de secreción oral por especie colúbrida. Sin embargo, en condiciones naturales está regulado además por el rendimiento líquido, sólido y concentración de proteína, la profundidad de inyección y especificidad hacia las presas.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

LITERATURA CITADA

- Ashley D. H. y M. P. Burchfield. 1968. Maintenance of a snake colony for the purpose of venom extraction. *Toxicon*. 3: 267-275.
- Assakura, M. T., M. G. Salomao, G. Puortato y F. R. Mandelbaum. 1992. Hemorrhagic, fibrinolytic and edema-forming activities of the venom of the colubrid snake *Philodryas olfersii*. *Toxicon* 30: 427-428.
- Box, E. P., W. G. Hunter, y J. S. Hunter, 1989. Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. Ed. Reverté. Barcelona, España. 675 pp.
- Cooper, J. E. 1974. Ketamine hydrochiride as an anesthetic for East African reptiles. *Vet. Rec.* 95: 37-41.
- Dawson Saunders B, Trapp RG. 1994. Bioestadística Médica. México: El Manual Moderno.
- de Araújo, M. E. y A. C. dos Santos. 1997. Cases of human envenoming caused by *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: Colubridae) *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 30: 517-519.
- De Lisle, H. F. 1982. Venomous colubrid snakes. *Bulletin of the Chicago Herpetological Society*. 17: 1-17.
- De Lucca, F. L., A. Hadad, E. Kochva, A. M. Rothschild y V. Valeri. 1974. Protein synthesis and morphological changes in the secretory epithelium of the venom gland of *Crotalus durissus terrificus* at different times after manual extraction of the venom. *Toxicon*. 12: 361-368.

- De Roodt, A. R., J. A. Dolab, P. P. Galarce, E. Gould, S. Litwin, J. C. Dokmetjian, L. Segre y J. C Vidal. 1998. A study on the venom yield of venomous snakes species from Argentina. *Toxicon*. 36: 1949-1957
- Douglas, M.D., W. McGehee, A. Willis, E. Findlay y E. Russell. 1984. Prolonged Defibrination after a bite from a "nonvenomous" snake. *Jama*. 251:925-926.
- Ernst, C. H. 1992. *Venomous reptiles of North America*. Smithsonian Institution Press. Washington and London. 236 pp.
- Ferlan, I., A. Ferlan, T. King, y F. Russell. 1983. Preliminary studies on the venom of the colubrid snake *Rhabdophis subminatus* (red-necked keelback). *Toxicon* 21: 570-574.
- Finley, R. B. Jr., D. Chiszar y H.M. Smith. 1994. Field observations of salivary digestion of rodent tissue by the wandering garter snake, *Thamnophis elegans vagrans*. *Bulletin of the Chicago Herpetological Society*. 29: 5-6.
- Folin, O y Ciocalteu V. 1972. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 73:627.
- Fontana, M. D., M. G. Heleno y O. Vital. 1996. Mode of action of Duvernoy's gland extracts from the colubrid *Dryadophis bifossatus* in the chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. *Toxicon*. 34: 1187-1190.
- Fritts, T. H., M. J. McCoid y R. L. Haddock. 1994. Symptoms and circumstances associated with bites by the brown tree snake (Colubridae: *Boiga irregularis*) on Guam. *Journal of Herpetology*. 28: 27-33.
- Gans, C. 1961. The feeding mechanism of snakes and its possible evolution. *American Zoologist*. 1: 217-227.

- Gans, C. 1978. Reptilian venoms: some evolutionary considerations. Pp.1-42, *en: Biology of the Reptilia*. Vol. 8, Physiology Gans B.C. y Gans K.A. (eds.). Academic Press, New York, New York.
- Garland, T. Jr. y S. J. Arnold. 1983. Effects of a full stomach on locomotory performance of juvenile garter snake (*Thamnophis elegans*). *Copeia*. 1983: 1092-1096.
- Gennaro, J.F., R. R. S. Leopold Jr. y T. W. Merriam. 1961. Observations on the actual quantity of venom introduced by several species of crotalid snakes in their bite. *Anat. Rec.* 139: 303.
- Glenn, J. L., R. Straight y C. C. Snyder. 1972. Ketamine as an anesthetic for snakes. *Am. J. Vet. Res.* 33: 1901-1903.
- Glenn, J. L., L. W. Porras; R. D. Novahec y R. C. Straight. 1992. Analysis of the Duvernoys gland and oral secretions of *Hydrodynastes gigas* (Duméril, Bibron, and Dumeril) (Reptilia: Serpentes). Pp. 19-26. *en: Strimple P.D. (ed.), Contributions in Herpetology*. Greater Cincinnati. Herpetological Society, Cincinnati, OH, 111 pp.
- Goren M.P y J.T. Li. 1986. The coomassie brilliant blue method underestimates drug-induced tubular proteinuria. *Clinical Chemistry*. 32, 386-388.
- Gornall, A. G, Bardawill, C. J. y David, M. M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of the Biological Chemistry*. 177, 751-766.
- Hayes, W. K. y R. Hayes. 1985. Human envenomation from the bite of the eastern garter snake, *Thamnophis s. sirtalis*. (Serpentes: Colubridae). *Toxicon* 23: 719-721.

- Hayes, W. K., P. Lavín-Murcio y K. V. Kardong. 1993. Delivery of Duvernoy's secretion into prey by the brown tree snake, *Boiga irregularis* (Serpentes: Colubridae). *Toxicon*. 31: 881-887.
- Hayes, W. K. 1992. Factors influencing venom expenditure by prairie rattlesnake *Crotalus v. viridis* feeding on wild mice. *Toxicon*. 30: 449-460.
- Hayes, W. K., P. Lavín-Murcio y K. V. Kardong. 1995. Northern Pacific Rattlesnakes *Crotalus viridis oregonus*. Meter venom when feeding on prey of different sizes. *Copeia*. 1995: 337-343.
- Hiestand, P. C. y R. R. Hiestand. 1979. *Dispholidus typus* snake venom: purification and properties of the coagulant principle. *Toxicon*. 17: 489-498.
- Hill, R. E. y S. P. Mackessy. 1997. Venom yields from several species of colubrid snakes and differential effects of ketamina. *Toxicon*. 35: 671-678.
- Hill, R. E. y S. P. Mackessy. 2000. Characterization of venom (Duvernoy's secretion) from twelve species of colubrid snakes and partial sequence of four venom proteins. *Toxicon* 38: 1663-1687).
- Jansen, D. W. 1983. A possible function of the secretion of Duvernoy's gland. *Copeia*. 1983: 262-264.
- Jansen, D. W. 1987. The mionecrotic effect of Duvernoy's gland secretion of the snake *Thamnophis elegans vagrans*. *Journal of Herpetology*. 21: 81-83.
- Johnson, J. D. 1988. Comments on the report of envenomation by the colubrid snake *Stenorrhina freminvillei*. *Toxicon*. 26: 519-521.

- Kardong, K. V. 1979. "Protovipers" and the evolution of snake fangs. *Evolution*. 33: 433-443.
- Kardong, K. V. 1980. Evolutionary patterns in advanced snakes. *American zoologist*. 20: 269-282.
- Kardong, K. V. 1986. The strike behaviour of the rattlesnake, *Crotalus viridis oregonus*. *Journal of Comparative Psychology*. 100: 304-314.
- Kardong, K. V. 1996. Snake toxins and venoms: an evolutionary perspective. *Herpetologica*. 52: 36-46.
- Kardong K. V. y Lavin-Murcio P. V. 1993. Venom delivery of snakes as high-pressure and low-pressure systems. *Copeia*. 1993: 644-650
- Kirchberg, J. S. y T. M. Davidson. 1991. Envenomation by the colubrid snake *Atractaspis bibronii*: a case report. *Toxicon*. 29: 379-381.
- Klaasen, C.D. y Watkins III, J.B. 2001. Casarett & Doull; Manual de Toxicología. La ciencia básica de los tóxicos. 5ª ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 981 pp.
- Klauber, L. M. 1956. Rattlesnakes. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, 2 vols.
- Kochva, E. 1960. A quantitative study of venom secretion by *Vipera palestinae*. *American Journal of trop. Med. Hyg.* 9: 381-390.

- Kochva, E. 1965. The development of the venom gland in the opisthoglyph snake *Telescopus fallax* with remarks on *Thamnophis sirtalis* (Colubridae, Reptilia). *Copeia*. 1965: 147-154.
- Kochva, E. 1958. The head muscles of *Vipera palestinae* and their relation to the venom gland. *Journal of Morphology*. 102: 23-54.
- Kochva, E. y C. Gans. 1966. Histochemistry of venom glands of some crotalinae snakes. *Copeia*. 506-515.
- Kochva, E. 1978. Oral glands of the Reptilia, Pp.43-161. *en*: Gans C. y Gans K.A. (eds.) *Biology of the Reptilia*. Vol. 8. Academic Press, New York.
- Kochva, E. 1987. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Toxicon*. 25: 65-106.
- Kornalik, F., E. Táborská y D. Mebs. 1978. Pharmacological and biochemical properties of a venom gland extract from the snake *Thelotornis kirtlandi*. *Toxicon*. 16: 535-542.
- Kuehl, R. O. 2001. *Diseño de experimentos. Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones*. Segunda edición. The University of Arizona. Thomson Learning. 666 pp.
- Labconco. 1997. *FreeZone. 4.5 Liter Benchtop. Freeze Dry System. Model 77500. Instruction Manual*.
- Lindman, H. R. 1992. *Analysis of variance in experimental design*. Springer-Verlang. New York, Inc. 531 pp.

- Loomis, T. A. 1982. *Fundamentos de Toxicología*. Acribia. Zaragoza. España. 274 pp.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of the Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- Marques de Cantú, M. J. 1991. *Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico-Biológicas*. McGraw-Hill interamericana de México. 657 pp.
- Marmary, Y. L, P. C. Fox y B. J. Baum. 1987. Fluid secretion rates from mouse and rat parotid glands are markedly different following pilocarpine stimulation. *Comp. Biochem. Physiol.* 88: 307-310.
- McDowell, S. B. 1987. Systematics. *En: Snakes, Ecology and Evolutionary Biology*. R. A. Seigel, J. T. Collins, y S. S. Novak (eds.). McGraw-Hill. Pp 5-43.
- McKinstry, D. M. 1978. Evidence of toxic saliva in some colubrid snakes in the United States. *Toxicon*. 16: 523-534.
- McKinstry, D. M. 1983. Morphologic evidence of toxic saliva in colubrid snakes: a checklist of world genera. *Herpetological Review*. 14: 12-15.
- Mejía, R. A. 1987. *Serpientes de Colombia. Su relación con el hombre. Homenaje a la Academia de medicina de Medellín. Ediciones especiales del fondo rotatorio de publicaciones. Secretaria de educación y cultura de Antioquia. Medellín. 229 pp.*
- Mendoza, N. V. M. y R. M. A. Sánchez. 2001. *Análisis y difusión de resultados científicos. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado Proyecto PAEP 100900-1.*

- Minton, S. A. 1979. Beware: nonpoisonous snakes. *Clinical Toxicology*. 15: 259-265.
- Minton, S. A. 1990. Venomous bites by nonvenomous snakes: an annotated bibliography of colubrid envenomation. *Journal of Wildlife Medicine*. 1: 119-127.
- Minton, S. A. 1996. Are there any nonvenomous snakes? An update on colubrid envenoming. *Advances in Herpetoculture*, Special publications of the International Herpetological Symposium, Inc. 1: 127-134.
- Minton, S. A. y M. R. Minton. 1980. Revised Edition. *Venomous Reptiles*. Charles Scribner's Sons, New York, N.Y.
- Mittleman, M. B. y R. C. Goris. 1978. Death caused by the bite of the Japanese colubrid snake *Rhabdophis tigrinus* (Reptilia, Serpentes, Colubridae). *J. Herpetol.* 12: 109-111.
- Montgomery, D. C. 2003. Universidad Estatal de Arizona. Diseño y análisis de experimentos. Segunda edición. Limusa Wiley. 686 pp.
- Ovadia, M. 1987. Isolation and characterization of a hemorrhagic factor from the venom of the snake *Atractaspis engaddensis*. *Toxicon*. 25: 621-630.
- Pinto, R. N., N. J. Da Silva y S. D. Aird. 1991. Human envenomation by the South American opisthoglyph *Clelia clelia plumbea*. *Toxicon*. 29: 1512-1516.
- Pough, F.H., R. M. Andrews, J. E. Cadle, M. L. Crump, A. H. Savitzky y K. D. Wells. 1998. *Herpetology*. Prentice Hall. Pp. 75-133.

- Prado-Franceschi, J. S., J.C. Hyslop, A.L. Andrade, M. T. Assakura, A.P. Reichl, M.A. Cruz-Hofling y L. Rodrigues-Simioni. 1998. Characterization of a miotoxin from the Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas olfersii* (green snake): effects on striated muscle and the neuromuscular junction. *Toxicon* 36: 1407-1421.
- Rodriguez-Robles, J. A. y R. Thomas. 1992. Venom Function in the Puerto Rican racer, *Alsophis portoricensis*. *Copeia*. 1992: 62-68.
- Rosenberg, H. I. 1992. An improved method for collecting secretion from Duvernoys gland of colubrid snakes. *Copeia*. 1992: 244-246.
- Rosenberg, H. I., A. Bdolah, y E. Kochva. 1985. Lethal factors and enzymes in the secretion from Duvernoy's gland of three colubrid snakes. *Journal of Experimental Zoology*. 233: 5-14.
- Rosenberg, H. I., S. Kinamon, E. Kochva, y A. Bdolah. 1992. The secretion of Duvernoy's gland of *Malpolon monspessulanus* induces haemorrhage in the lungs of mice. *Toxicon* 30: 920- 924.
- Russell, F. E., F. G. Walter, T. A. Bey, y M. C. Fernandez. 1997. Review article - Snakes and snakebite in Central America. *Toxicon*. 35: 1469-1522.
- Savitzky, A. H. 1980. The role of venom delivery strategies in snake evolution. *Evolution*. 34: 1194-1204.
- Scopes, R. K. 1987. Protein purification. Principles and Practice, 2nd Ed. Springer-Verlag, New York. 380 pp.
- Senter, P. 1998. A bite from the Rear-Fanged Colubrid *Psammophis phillipsii*. *Herpetological Review*. 29: 216-217.

- Taub A. M. 1967. Comparative histological studies on Duvernoy's gland of colubrid snakes. *Bulletin of the American Museum of Natural history*. 138: 1-50.
- Theakston, R. D. G., H. A. Reid y J. D. Romer. 1979. Biological properties of the red neck keel back snake (*Rhabdophis subminatus*). *Toxicon*, 17: 190.
- Thomas, R. G. y F. H. Pough. 1979. The effect of rattlesnake venom on digestion on prey. *Toxicon*. 17: 221-228.
- Varela-Hernández, G. J. 1997. Uso de las variables indicadoras "Dummy" en los modelos de regresión. Testimonial de la conferencia para obtener el diploma de la especialización en estadística aplicada. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Vest, D. K. 1981. The toxic secretion of the wandering garter snake, *Thamnophis elegans vagrans*. *Toxicon*. 19: 831-839.
- Vest, D. K. 1988. Some effects and properties of Duvernoy's gland secretion from *Hypsiglena torquata texana*. *Toxicon*. 26: 417-419.
- Vest, D. K., S.P. Mackessy, y K. V. Kardong. 1991. The unique Duvernoy's secretion of the brown tree snake (*Boiga irregularis*). *Toxicon* 29: 532-535.
- Weinstein, S. A. y L. A. Smith. 1993. Chromatographic profiles and properties of Duvernoy's secretions from some Boigine and Dispholidine colubrids. *Herpetologica*. 49: 78-94.
- Weinstein, S. A., D. Chiszar, R. C. Bell y L. A. Smith. 1991. Lethal potency and fractionation of Duvernoy's secretion from the brown tree snake, *Boiga irregularis*. *Toxicon* 29: 401-407.

Williams, P. L., James, R. C. y Stephen M. R. 2000. *The Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications*. 2nd ed. Willey-Interscience, USA, 603 pp.

Wu, A. E., Wu, J. C. y Herp, A. 1978. Polypeptide linkages and resulting structural features as powerful chromogenic factors in the Lowry phenol reaction. Studies on a glycoprotein containing no Lowry phenol-reactive amino acids and on its desialylated and deglycosylated products. *Biochememical Journal*. 175, 47–51

Young, B. A. y K. V. Kardong. 1996. Dentitional surface features in snakes (Reptilia: Serpentes). *Amphibia-Reptilia*. 17: 261-276.

Zug, G., J. P. Caldwell, y L. J. Vitt. 2001. *Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Academic Press. USA. 630 p.