



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Aproximación a la relación de la distancia
entre colmillos, el volumen de veneno y la
longitud corporal en *Bothropoides pubescens*
(Cope, 1869) (Squamata, Serpentes).

Silvana Baletta

Melitta Meneghel

Laboratorio de Sistemática e Historia Natural de Vertebrados

– IECA

Martín Bessonart; Raúl Maneyro

Setiembre de 2012

Indice

INDICE	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
HIPÓTESIS	7
OBJETIVOS.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
RESULTADOS	11
DISCUSIÓN	17
CONCLUSIONES	20
ANEXO I: INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA.....	21
BIOLOGÍA DE <i>BOTHROPOIDES PUBESCENS</i>	26
ANEXO II: DATOS DE EJEMPLARES	29
ANEXO III: RELACIÓN ENTRE PROTEÍNA TOTAL Y DISTANCIA ENTRE COLMILLOS.....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	50
AGRADECIMIENTOS.....	56

Resumen

En bibliografía, no hay estudios sobre la relación entre la distancia entre colmillos (DC) y el volumen de veneno (VV) que inyecta un ofidio ponzoñoso en una mordedura. Conocer la existencia de la misma podría mejorar el tratamiento médico en pacientes de ofidismo. En el mismo, se inyecta como mínimo 4 ampollas (40 ml) de suero antiofídico (SAO) obtenido a partir de equinos. Por tratarse de un suero heterólogo, se pueden producir reacciones adversas en los pacientes tratados (incluida la enfermedad del SAO), las que son de magnitud variable y muchas de ellas poco frecuentes o de difícil evaluación. La administración de dosis acotadas a las características de cada accidente ofídico podría disminuir la probabilidad de estas reacciones. Tampoco se ha estudiado la relación entre la DC y la longitud corporal total (LT) de un ejemplar. Se estudió la existencia de las relaciones antes mencionadas sobre la especie *Bothropoides pubescens*, por ser una de las cuatro especies ponzoñosas de Uruguay y una de las dos que causan entre 34 y 84 accidentes ofídicos anuales. Se utilizaron 41 hembras y 27 machos de la colección del Bioterio de Animales Ponzoñosos. Se mantuvieron sin alimentar durante dos semanas, se sedaron por anoxia con CO₂, se ordeñaron y fotografiaron y se midieron las variables. Los resultados indican que aunque el sexo influye sobre cada una de las variables de manera independiente, su influencia no es significativa en la relación entre las variables. La regresión lineal entre las variables DC y VV muestra una relación débil entre ellas ($R^2=0,336$, $b=0,026$, $p < 0,001$). Hay una relación más fuerte entre las variables DC y LT ($R^2=0,487$, $b=0,017$, $p < 0,001$). Se concluye que no existe dimorfismo sexual en la relación entre las variables. Existe relación entre DC y LT. La relación entre DC y VV es débil y no se pudo obtener una ecuación que permita la dosificación de SAO más eficiente. Existen otras variables que pueden influir en las medidas de las variables estudiadas y debería investigarse su grado de influencia.

Introducción

El veneno de los ofidios es una adaptación evolutiva para capturar e inmovilizar las presas y en algunos casos, iniciar los procesos de digestión, siendo usado de manera secundaria para defensa (Ernst & Zug, 1996; Pough *et al.*, 1998; Acosta, 2003; Young *et al.*, 2004). Las investigaciones sobre el veneno de los ofidios ponzoñosos se centran en su composición, efectos en presas y víctimas de accidentes ofídicos, el modo de inoculación, descripción del aparato inoculador y del mecanismo de expulsión de veneno (Leloup, 1973; Young *et al.*, 2004). Sin embargo, en la bibliografía no hay referencias a estudios que relacionen la distancia entre los colmillos con el volumen de veneno que un individuo pueda inocular en una mordedura. La existencia de esta relación podría aplicarse en los tratamientos médicos sobre pacientes de accidentes ofídicos. Estos accidentes son provocados por la mordedura defensiva de ofidios cuyo veneno provoca en la víctima una variedad de fenómenos farmacológicos y tóxicos (Ernst & Zug, 1996; Hayes *et al.*, 2002; Acosta, 2003; Negrin & Tortorella, 2006), frecuentemente letales (Hayes *et al.*, 2002). El tratamiento consiste en aplicar suero antiofídico (SAO) específico (ver Anexo I), por vía intravenosa. Un alto porcentaje de pacientes sufren la enfermedad del SAO, que se manifiesta entre los 8 y 15 días posteriores a la seroterapia, presentándose reacciones alérgicas de tipo anafiláctico y anafilactoide caracterizadas por urticaria, prurito, edema, artralgia y fiebre; su tratamiento consiste en la administración de esteroides. Aunque existen tests de sensibilidad al SAO, no se utilizan porque son poco efectivos y retardan el inicio del tratamiento (Acosta, 2003; Negrin & Tortorella, 2006). La enfermedad del SAO es causada por los residuos proteicos contenidos en el mismo debido a que se prepara inoculando equinos con dosis progresivas de veneno de la especie responsable del accidente, debido a diferencias interespecíficas en su composición, y cuando generan niveles adecuados de anticuerpos se sangra al animal y se procesa el plasma (Latifi, 1978; Pino & Menéndez, 2006).

En Uruguay *Bothropoides pubescens* (Figs. 1 y 2) y *Rhinocerophis alternatus* (Familia Viperidae) causan entre 34 y 84 accidentes ofídicos por año (Carreira *et al.*, 2005; Meneghel, com. pers.). Según la cartilla de ofidismo del Ministerio de Salud Pública (M.S.P.), debe aplicarse una dosis inicial de 4 ampollas (40ml) de SAO bivalente a un paciente adulto con sintomatología no aguda. Cada ampolla (10ml) neutraliza 15mg de veneno (peso seco) de *B. pubescens* y 25mg de veneno de *R. alternatus* (Carreira *et al.*,

2005; Pino & Menéndez, 2006). La dosis inicial fue estimada por el volumen máximo de veneno extraído a un sólo animal en el Bioterio de Animales Ponzosos (Meneghel, com. pers.). Se cree que esta dosis es excesiva en algunos casos de accidente ofídico, implicando que aumenta el riesgo para el paciente de sufrir la enfermedad del SAO (com. pers. Dra. María Noel Tortorella).

Existe evidencia que los volúmenes de veneno inyectados son menores que los obtenidos mediante el método de ordeño (Young & Zahn, 2001). Por otra parte, el ofidio puede inyectar diferentes dosis del veneno. Su expulsión diferencial resulta de la activación de sectores de la musculatura de la glándula, la variación en el volumen de veneno dentro de la misma y la resistencia diferencial al flujo de veneno entre su suministro y la presa, que pueden ser cuantificadas o controladas por el animal (Young & Zahn, 2001; Young *et al.*, 2002). Durante la inyección de veneno, la evaluación del ofidio podría operar en tres niveles: comportamental del encuentro (predatorio o defensivo), el tipo de presa (ratón o ave) y el tamaño (ratón o rata) (Young *et al.*, 2002). Las condiciones climáticas, estación, momento del día, número de mordeduras, son variables que pueden determinar el volumen de veneno inyectado (Kochva, 1960; Rubio, 1998), incluso dándose casos de penetración del colmillo sin inyección de veneno (mordedura seca), sin conocerse las bases incidentales y funcionales de la misma (Young & Zahn, 2001) (ver Anexo I). Generalmente, en la zona de la mordedura, se observan dos heridas (raramente una) puntiformes profundas provocadas por los colmillos del ofidio (Fig. 3), nítidas y separadas entre sí por hasta dos o tres centímetros (Negrin & Tortorella, 2006; Neira *et al.*, 2007). Estas pueden usarse para medir la distancia entre los colmillos del ofidio que provocó el accidente.

Los reptiles son polifodontos, por lo que cambian su dentición reemplazándose periódicamente en zócalos alternados, inclusive los colmillos (Peters, 1964; Rubio, 1998) (ver Anexo I). La familia Viperidae tiene dentición solenoglifa (ver Anexo I), cuyo cráneo tiene ocho puntos de rotación entre uniones de los huesos otorgándole un alto grado de quinesis controlada por ligamentos, superficies articulares y actividad muscular (Figs. 4, 5, 6 y 7), por lo que cada lado de la cabeza tiene movimiento independiente (Kardong, 1974; 1977; Kardong *et al.*, 1986; Pough *et al.*, 1999) (ver Anexo I). Las articulaciones de los huesos ectopterigoides-pterigoides y ectopterigoides-maxilar permiten que el colmillo se mueva en dirección antero-posterior, logrando la posición erecta del diente y tenga un modesto movimiento lateral, debido al diseño de las superficies articulares de los huesos y a

la presencia de ligamentos en las uniones de los mismos. De esta manera, el colmillo unido a la base del maxilar no presenta un desplazamiento lateral apreciable (ver Anexo I), ya que su articulación con el ectopterigoides restringe la rotación en un sólo plano y limita el movimiento en sentido del eje horizontal (Kardong, 1974; 1977). Dicho movimiento permite liberar la tensión lateral en la articulación prefrontal-maxilar cuando se le aplican fuerzas inusualmente grandes durante los movimientos de los colmillos en la ingesta de la presa (Kardong *et al.*, 1986) (Fig. 7). Aunque, algunos autores mencionan presencia de movimiento lateral del maxilar (ver Anexo I) y por ello se efectuó una experiencia piloto con ejemplares recién muertos de la especie *B. pubescens* (ver Anexo I), encontrando un pequeño desplazamiento.

Se ha observado que en los ofidios existe crecimiento alométrico de la cabeza en relación con el cuerpo. La alometría se refiere al cambio en tamaño o forma de una parte de un organismo, correlacionada con el cambio en tamaño o forma de otra parte del mismo durante la ontogenia de un individuo o taxón (Simpson *et al.*, 1960; Gomendio, 1994; Kardong, 1999). Según Forsman (1994), hay una fuerte asociación entre las tasas de crecimiento de la cabeza y el cuerpo de manera que un rápido crecimiento del individuo no desarrolla una cabeza de tamaño pequeño. Por otro lado, aunque no se encontró referencias específicas acerca del crecimiento de la glándula de veneno, Kochva (1978) trabajó en disección de glándulas de diversas especies y no menciona que las mismas tengan un crecimiento diferencial respecto al de la cabeza. McCue (2006), indica que el sistema de producción de veneno supone aproximadamente el 15% del volumen total de la cabeza en la mayoría de vipéridos y no menciona que éste porcentaje varíe durante el crecimiento de los ejemplares. Por lo tanto, estos autores sugieren que el crecimiento de la glándula acompaña al crecimiento de la cabeza y que existe una relación entre el tamaño de ésta y el volumen de veneno disponible. De esta manera, se considera que el ofidio presenta isometría en las estructuras que componen la cabeza y al aumentar de tamaño ésta, aumenta la distancia entre los colmillos, así como el tamaño de la glándula de veneno y por ende el volumen de veneno que pueda producir.

Hipótesis

Existe relación entre la Distancia entre Colmillos y el Volumen de Veneno máximo que puede inocular un ofidio ponzoñoso.

Objetivos

- a) Evaluar el dimorfismo sexual en la Distancia entre Colmillos, la Longitud Total corporal y el Volumen de Veneno.
- b) Analizar la relación entre la Distancia entre Colmillos y el Volumen de Veneno que un ejemplar puede inocular en una mordedura.
- c) Estudiar la relación entre la Distancia entre Colmillos y la Longitud Total corporal del ejemplar.

A partir de estos objetivos se obtendrían datos que aporten a un posible ajuste de la dosis inicial de SAO adecuada a cada caso de accidente ofídico, basado en la distancia entre las punciones que presente el paciente en la zona de la mordida.

Materiales y métodos

Los ejemplares del presente estudio se encuentran en el Bioterio de Animales Ponzosñosos (ver Anexo I), que cuenta con un razonable número de animales de *B. pubescens* en cautiverio, así como con instalaciones apropiadas para la obtención de los datos requeridos para el análisis. La información de colecta de cada ejemplar se presenta en el Anexo II.

Se utilizaron 41 hembras y 27 machos, juveniles y adultos (ver Anexo II). No se escogieron animales de longitudes menores a 530 mm, debido a que su talla pequeña dificulta el ordeño y pone en riesgo tanto al ejemplar como al técnico que lo manipula. En efecto, en experiencias anteriores se obtuvo escaso volumen de veneno, probablemente relacionado a problemas de la técnica de ordeño frente a ejemplares de pequeña talla.

Los animales no se alimentaron durante dos semanas, para asegurar que las glándulas hayan almacenado veneno (Leloup, 1973; Kochva, 1960; 1978; McCue, 2006), y posteriormente fueron ordeñados (Peters, 1964; Kochva, 1978). En animales ectotérmicos la producción de veneno por parte de la glándula depende de la temperatura del ambiente (Kochva, 1960; 1978; 1997). En el Bioterio se mantiene una temperatura ambiente que oscila entre 21 y 26°C durante todo el año, exceptuando un mes, frecuentemente julio, en el que se apaga la calefacción permitiendo que los animales invernen y no se efectúan ordeños.

Se sedó a los animales por anoxia utilizando gas carbónico (CO₂), que permite una manipulación más segura por parte del técnico, menor situación de estrés para el animal y menor pérdida de volumen de veneno durante el procedimiento de ordeño (De Biasi *et al.*, 1976/77).

Se recogió el veneno en vasos de Bohemia de 100 ml y 150 ml, uno por individuo, cuya abertura se cubrió con una lámina de plástico de 0,1mm de espesor sujeta bien tensa (Figs. 8 y 9).

Las técnicas para extraer el veneno de un ofidio ponzoñoso difieren dependiendo de la especie y del técnico. Para este trabajo se adecuó un método para especies solenoglifas descrito a continuación.

Se tomó el ejemplar por el cuello, inmediatamente detrás de la cabeza, con los dedos pulgar y mayor a cada lado. El ejemplar usualmente abre la boca y despliega los colmillos hacia delante hasta una posición casi vertical o erecta, de lo contrario es obligado a hacerlo por

medio de una pinza o una varilla (Figs. 8 y 9). Se posicionó la boca del animal hacia el centro del vaso de Bohemia y con el dedo índice apoyado sobre su cabeza se presionó hacia abajo para que los colmillos atravesaran el plástico dejando las marcas en el mismo (Figs. 10 y 11). Una vez que el veneno fue eliminado por el ofidio y disminuyó su flujo hacia el recipiente, se masajeó suavemente las glándulas (Fig. 9) situadas por detrás de los ojos asegurando la eliminación de veneno que el animal aún retiene dentro del lumen glandular (Peters, 1964; Leloup, 1973; Kochva, 1978; Latifi, 1978).

Se midió el volumen del veneno extraído con pipetas de 1ml, de apreciación 0,01ml y micropipetas de 50 μ l y 900 μ l.

Se fotografió cada ejemplar, luego del ordeño, junto a una escala (Figs. 1 y 2) para medir la longitud total del cuerpo mediante el programa de PC SNAKEMEASURER (Versión 1,0.0).

Se midió la distancia entre los orificios dejados por los colmillos en el plástico (Fig. 12). Se eligió un criterio para tomar dichas medidas con el menor error posible, debido a que la impresión en el plástico variaba en cuatro casos:

- a) orificios muy nítidos y de fácil identificación.
- b) orificios que, a pesar de ser muy nítidos, eran gruesos y con el plástico arrugado en los bordes.
- c) orificios desgarrados, cuando el animal perfora la lámina y desplaza el maxilar hacia atrás provocando un desgarro en la misma. Se obtiene un patrón con dos marcas para un mismo colmillo: la perforación inicial y el extremo posterior y final del desgarro.
- d) orificios supernumerarios: una vez que el animal había perforado el plástico, levantó un maxilar y volvió a bajarlo perforando nuevamente, dejando dos impresiones para un mismo colmillo.

Se midió la distancia entre los colmillos desde el centro de un orificio hasta el centro del otro. Para ello se colocó una hoja de papel blanco debajo del plástico, éste se estiró dejándolo tenso sobre el papel y se marcó el centro del orificio con un lápiz de mina de grosor 0,5mm (Fig. 11). Al retirar el plástico se midió la distancia entre los puntos marcados en la hoja con un calibre de apreciación 0,05mm (Fig. 12). En impresiones correspondientes al caso c) mencionado arriba, se tomó como referencia el primer orificio, origen del desgarro. Esto se debe a que el plástico no ofrece la misma resistencia que el ofidio encontraría cuando muerde

a su víctima. Ante situaciones del caso d) anteriormente descrito, se tomó como impresión del colmillo al orificio de mayor grosor y con frecuencia manchado con veneno seco en los bordes. En este último caso, se midió la distancia de las dos impresiones, que fueron comparadas dando una diferencia bastante despreciable. Es poco probable, aunque no imposible, que el animal levante y vuelva a bajar el colmillo durante la mordedura en la víctima. El cuerpo de esta última se adecua a la boca del ofidio de forma más anatómica que el vaso de Bohemia. Sin embargo, dependiendo de la posición de la superficie de la presa y del ángulo en que incide el ápice del colmillo durante el contacto inicial con la presa, puede dificultarse el ingreso del mismo y el ofidio corrige levantando el maxilar y reinsertando nuevamente (Hayes *et al.*, 2002).

Para tomar las medidas se emplearon normas de seguridad debido a que los plásticos tenían gotas de veneno ya cristalizado. Se usaron guantes descartables, lentes de protección, tapaboca y túnica y se higienizó todo el instrumental de medición con alcohol iodado una vez finalizado el trabajo, para desnaturalizar la ponzoña.

Cada ejemplar fue sexado mediante manipulación manual. Ese análisis se basó en los caracteres secundarios que se aprecian en la especie, principalmente a nivel de la región caudal (Fitch, 1981; Meneghel, 1997; Morales Fagundes, 1998; Carreira *et al.*, 2005) (ver Anexo I). Por manipulación manual se determinó el alargamiento y engrosamiento caudal en los machos y, en algunos casos, se provocó eversión de un hemipene (Peñuela G., 2004).

Se aplicó tests de Mann-Whitney, ANCOVA y Regresión Lineal sobre las variables Distancia entre Colmillos (DC), Volumen de Veneno (VV) y Longitud Total corporal (LT). Se usó el programa estadístico, SPSS 15.0 para procesar los datos (Canavos, 1988; Kinnear & Gray, 2008).

Resultados

Se estudió dimorfismo sexual entre las variables con el test de Mann-Whitney (Tabla I), comparando cada variable con el sexo, designando $\alpha=0,05$. Para la variable DC el $U=360,5$, $Z=-2,419$, $p < 0,016$; para la variable VV el $U=275$, $Z=-3,217$, $p < 0,001$ y para la variable LT el $U=218$, $Z=-4,116$, $p < 0,001$. Por lo tanto, la variable sexo influye sobre cada una de las variables. El test de ANCOVA para la relación de VV sobre DC sugiere que la interacción entre Sexo y DC no es significativa en la predicción de VV, $F(1, 62)=1,450$, $p=0,233$ y que las medias ajustadas en la población son iguales reafirmando lo anterior, $F(1, 63)=3,190$, $p=0,079$ (Tabla IIa y IIb). Para la relación de DC sobre LT sugiere que la interacción entre Sexo y LT no es significativa en la predicción de DC, $F(1, 63)=1,116$, $p=0,295$ y que las medias ajustadas en la población son iguales, $F(1, 64)=0,107$, $p=0,744$ (Tabla IIIa y IIIb). El test de Kolgomorov-Smirnof (Tabla IV) indica que las variables DC ($D=0,082$, $p=0,755$), LT ($D=0,114$, $p=0,350$) y VV ($D=0,156$, $p=0,081$) muestran distribución normal.

La Regresión lineal (Tablas V y VI) muestra una relación débil entre las variables VV y DC ($R^2=0,336$, $b=0,026$, $p < 0,001$) (Gráfico 1). Hay una relación más fuerte entre las variables DC y LT ($R^2=0,487$, $b=0,017$, $p < 0,001$) (Gráfico 2). El análisis de residuos de la regresión con variable dependiente VV (Tabla VII y VIII) indica que los mismos presentan normalidad ($D=0,116$, $p=0,335$), homocedasticidad (Levene= $3,131$, $p=0,082$) e independencia aunque el test de Durbin-Watson está en el límite de aceptación ($D-W=1,398$). El análisis de residuos de la regresión con variable dependiente DC (Tabla VII y VIII) indica que los mismos cumplen con normalidad ($D=0,132$, $p=0,197$), independencia ($D-W=2,126$) y homocedasticidad (Levene= $4,345$, $p=0,041$), aunque el valor de éste último se encuentre en el límite del nivel de significación.

Algunos ejemplares de la muestra no presentan datos de una de las variables, por lo tanto hay diferentes N dependiendo de la variable estudiada. El ejemplar N106 tiene una longitud total corporal de 1454,4 mm, siendo mayor a la longitud máxima documentada en cautiverio y la mayor para la especie. El volumen de veneno más alto obtenido (1,2 ml) en los ordeñes se le extrajo al ejemplar N101 (Tablas IXa y IXb).

Tabla I: Estadísticos de contraste del test de Mann - Whitney aplicado a las tres variables para estudiar dimorfismo sexual. Los resultados indican que el sexo influye sobre las mismas.

	DC (mm)	LT (mm)	VV (ml)
U de Mann-Whitney	360,500	218,000	275,000
W de Wilcoxon	738,500	596,000	626,000
Z	-2,419	-4,116	-3,217
p	< 0,05	< 0,001	< 0,01

Tabla II: Resultados del test de ANCOVA para estudiar la influencia del Sexo en la relación de las variables Volumen de Veneno y Distancia entre Colmillos. a) valores de F mostrando la interacción entre las variables. b) valores de F que sugieren que las pendientes de la relación para ambos sexos son iguales.

a)

	Suma de cuad. tipo III	gl	Media cuadrática	F	p
Modelo corregido	1,043	3	0,348	12,801	< 0,001
Intersección	0,007	1	0,007	0,256	0,615
Sexo	0,013	1	0,013	0,482	0,490
DC	0,254	1	0,254	9,350	0,003
Sexo * DC	0,039	1	0,039	1,450	0,233
Error	1,683	62	0,027		
Total	6,924	66			
Total corregida	2,726	65			

b)

	Suma de cuad. tipo III	gl	Media cuadrática	F	p
Modelo corregido	1,003	2	0,502	18,345	< 0,001
Intersección	0,050	1	0,050	1,815	0,183
DC	0,642	1	0,642	23,466	< 0,001
Sexo	0,087	1	0,087	3,190	0,079
Error	1,723	63	0,027		
Total	6,924	66			
Total corregida	2,726	65			

Tabla III: Resultados del test de ANCOVA para estudiar la influencia del Sexo en la relación de las variables Distancia entre Colmillos y Longitud Total corporal. a) valores de F mostrando la interacción entre las variables. b) valores de F que sugieren que las pendientes de la relación para ambos sexos son iguales.

a)

	Suma de cuad. tipo III	gl	Media cuadrática	F	<i>p</i>
Modelo corregido	715,639	3	238,546	20,722	< 0,001
Intersección	0,103	1	0,103	0,009	0,925
Sexo	13,938	1	13,938	1,211	0,275
LT	324,038	1	324,038	28,148	< 0,001
Sexo * LT	12,842	1	12,842	1,116	0,295
Error	725,251	63	11,512		
Total	15517,493	67			
Total corregida	1440,891	66			

b)

	Suma de cuad. tipo III	gl	Media cuadrática	F	<i>p</i>
Modelo corregido	702,798	2	351,399	30,470	< 0,001
Intersección	1,784	1	1,784	0,155	0,695
LT	544,532	1	544,532	47,216	< 0,001
Sexo	1,238	1	1,238	0,107	0,744
Error	738,093	64	11,533		
Total	15517,493	67			
Total corregida	1440,891	66			

Tabla IV: Resultados del test de Kolgomorov-Smirnof muestran normalidad en las variables. *D*_ coeficiente de Kolgomorov-Smirnof, *p*_ nivel de significación.

	VV (ml)	DC (mm)	LT (mm)
N	66	68	67
D	0,156	0,082	0,114
Z de Kolmogorov-Smirnov	1,266	0,674	0,932
<i>p</i>	0,081	0,755	0,350

Tabla V: Resultados Regresión Lineal para el modelo en el que la Distancia entre Colmillos (DC) es la variable predictora y el Volumen de Veneno (VV) es la variable dependiente; y el modelo donde la variable predictora es Longitud Total del cuerpo (LT) y la variable dependiente es Distancia entre Colmillos (DC). R _ coeficiente de regresión múltiple, R^2 _estimativo de la proporción de varianza estimada para la regresión, p _ nivel de significancia.

Modelo	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	p
Variable Predictora DC	0,580	0,336	0,326	0,168167	< 0,001
Variable Predictora LT	0,698	0,487	0,479	3,37258	< 0,001

Tabla VI: Valores de las constantes de la ecuación de regresión: constante de la ecuación, B _ pendiente o coeficiente de regresión, t _ estadístico del test de t que testea linealidad entre las variables, p _ nivel de significancia.

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	p
	B	Error típ.	Beta		
Constante	- 0,131	0,070		-1,857	0,068
Variable dependiente VV	0,026	0,005	0,580	5,691	< 0,001
Constante	-0,534	1,958		-0,273	0,786
Variable dependiente DC	0,017	0,002	0,698	7,854	< 0,001

Tabla VII: Estadísticos sobre los residuos para cada modelo, con variable dependiente Volumen de Veneno y variable dependiente Distancia entre Colmillos respectivamente.

Modelo		Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica	N
Variable dependiente VV	Valor pronosticado	0,06046	0,51523	0,25220	0,118716	66
	Residual	-0,262933	0,777790	0	0,166868	66
	Valor pronosticado típ.	-1,615	2,216	0	1,000	66
	Residuo típ.	-1,564	4,625	0	0,992	66
Variable dependiente DC	Valor pronosticado	8,2771	23,5547	14,4948	3,26032	67
	Residual	-6,54603	6,07114	0	3,34694	67
	Valor pronosticado típ.	-1,907	2,779	0	1,000	67
	Residuo típ.	-1,941	1,800	0	0,992	67

Tabla VIII: Resultados de los test de Kolgomorov-Smirnof para Normalidad, test de Durbin-Watson para independencia y test de Levene para homocedasticidad sobre los residuos de la regresión lineal.

Modelo	N	D	p	Durbin-Watson	Levene	p
Variable dependiente VV	66	0,116	0,335	1,398	3,131	0,082
Variable dependiente DC	67	0,132	0,197	2,126	4,345	0,041

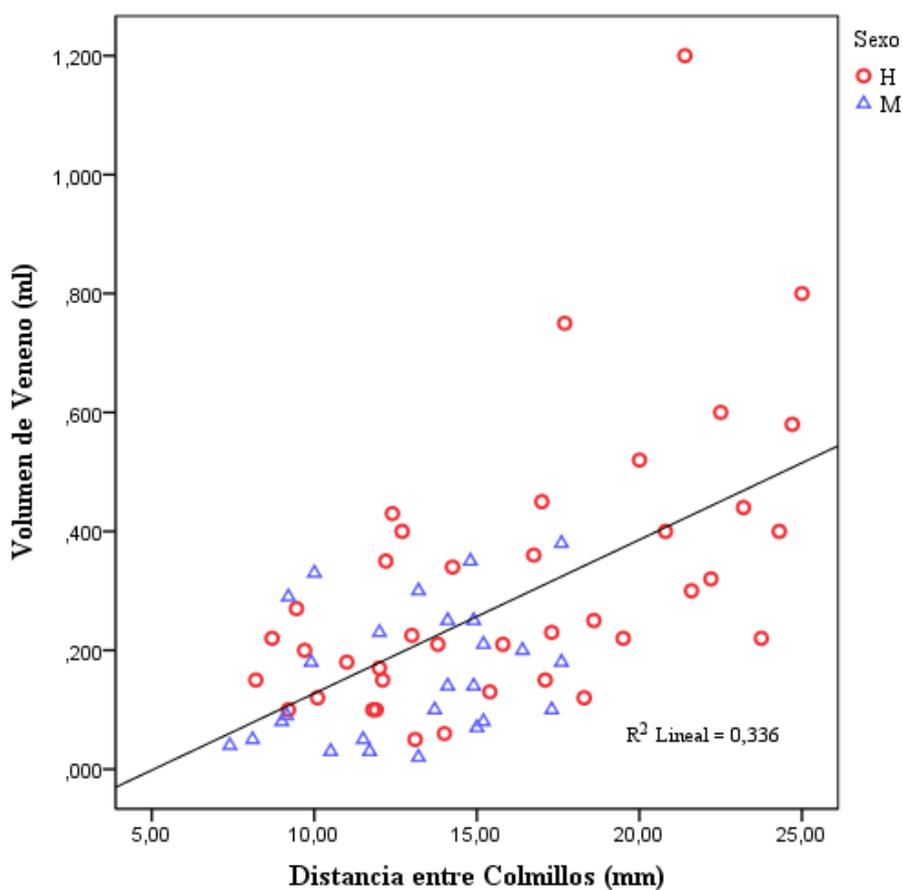


Gráfico 1: Volumen de Veneno (VV) en función de la Distancia entre Colmillos (DC). Los Puntos rojos corresponden a las hembras y los puntos azules corresponden a los machos. El punto más separado corresponde al ejemplar N101 al que se le extrajo un volumen de 1,2 ml de veneno, siendo mayor al volumen extraído a ejemplares de dimensiones similares. La línea negra marca la pendiente de la Regresión Lineal $R^2=0,336$.

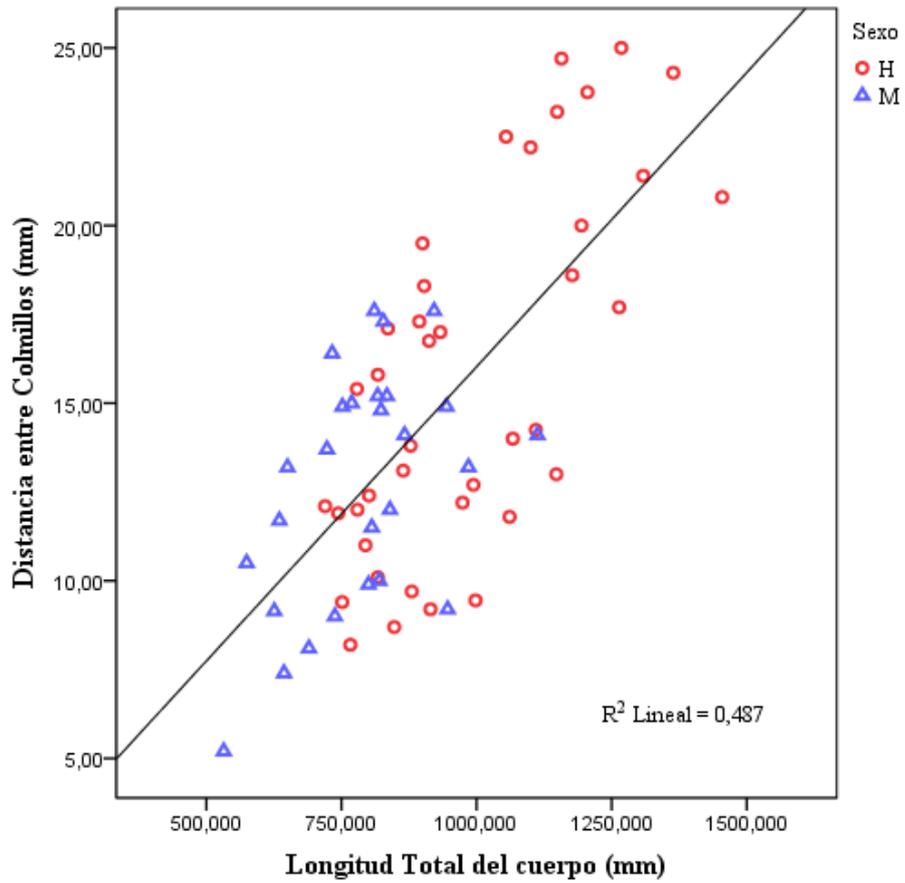


Gráfico 2: Distancia entre Colmillos (DC) en función de la Longitud Total corporal (LT). Los Puntos rojos corresponden a las hembras y los puntos azules corresponden a los machos. La línea negra marca la pendiente de la Regresión Lineal $R^2=0,487$.

Discusión

El análisis de los datos sugiere que aunque el Sexo influye sobre cada variable Distancia entre Colmillos, Volumen de Veneno y Longitud Total de manera independiente, no influye de forma significativa en la relación entre VV y DC y entre DC y LT. Por lo tanto, no hay dimorfismo sexual significativo respecto a las variables estudiadas. Las pendientes de las regresiones de las variables presentan en el extremo inferior sólo datos de ejemplares machos mientras que en el extremo superior sólo hay datos de hembras; esto se debe a que los animales de talla pequeña que se usó en la muestra eran sólo machos, sesgando indirectamente la misma. Lo que debería observarse sería datos de ambos sexos a lo largo de toda la pendiente, menos en el extremo superior que correctamente deben verse hembras ya que son las que llegan a tamaños grandes.

La regresión entre VV y DC muestra que existe relación lineal entre las variables, este resultado es fortalecido por el test de Ancova, aunque esta relación es débil. Esto podría deberse a que existen otras variables que pueden modificar los datos de VV y DC y que no se tomaron en cuenta durante la medición de dichos datos.

Aunque la relación lineal entre DC y LT corporal es mayor que la relación estudiada anteriormente, también es baja sugiriendo la existencia de otras variables que influyen en esta relación. La variable LT corporal presenta un único valor posible en cada ejemplar en un tiempo dado debido a que la especie sólo va a aumentar de longitud con el crecimiento.

Los valores de la DC pueden tener más de un valor en un individuo en un mismo tiempo por dos razones principalmente: el recambio de los colmillos y el grado de quinesis que presenta el cráneo de vipéridos. Como se mencionara en introducción (ver también Anexo I), el recambio de colmillos se produce en zócalos contiguos en cada maxilar (Figs. 6, 13 y 14). De esta manera, un individuo con un mismo tamaño puede tener tres posiciones diferentes de los colmillos en los zócalos, lo que implica tres diferentes distancias entre los colmillos. La distancia mayor entre los colmillos se da cuando ambos zócalos externos están ocupados, la menor cuando ambos zócalos internos están ocupados y una medida intermedia a las anteriores cuando un zócalo interno y otro externo son ocupados. Por lo tanto, cada valor de la variable DC va a depender de los zócalos ocupados en el momento de su medición y esto significa que un animal en el momento de la mordedura podría dejar una marca con tres medidas diferentes posibles. En el caso de obtener una ecuación lineal esto podría dar un resultado erróneo.

Los ocho puntos de rotación entre los huesos que permiten la alta movilidad del cráneo (ver Introducción y Anexo I) no modifican los valores de DC en el mismo ejemplar. Sin embargo, si existe un desplazamiento lateral del hueso maxilar y por lo tanto del colmillo, cada ejemplar podría dar mordidas con diferentes marcas de colmillos y por lo tanto diferentes valores de DC. Se estaría frente a la misma situación planteada anteriormente, si se obtuviera una ecuación lineal daría resultados erróneos. La literatura citada en Introducción y Anexo I, indica que el desplazamiento lateral es muy pequeño o casi nulo en especies estudiadas con dentición solenoglifa, pero no hay estudios acerca de *B. pubescens* y por lo tanto, no se puede asegurar si su influencia sobre la variable DC es de magnitud despreciable. Los resultados de la experiencia piloto descrita en Anexo I, generan una duda sobre el grado de influencia de este movimiento sobre la variable estudiada, ya que se obtuvo una variación promedio de 2,44 mm de separación entre los colmillos. Aunque, no se puede asegurar que un ejemplar vivo alcance ese grado de movilidad lateral debido a la presencia de ligamentos, musculatura y terminales nerviosas que puedan infligir algún dolor limitando el movimiento y por este motivo se debería estudiar en animales vivos para conocer cuánto es que se están modificando los resultados obtenidos en éste trabajo.

La influencia de la posición del colmillo según el zócalo y la quinesis craneal lateral de los colmillos sobre los valores de DC explica que en la muestra haya animales del mismo sexo y similar longitud corporal con distancias entre colmillos muy diferentes y animales con una misma distancia entre colmillos que eliminan diferentes volúmenes de veneno (ver Gráficos 1 y 2), y también explica los valores débiles de las relaciones de la DC con LT y VV. Al conocer el rango de valores que puede variar DC se podría aproximar una ecuación que calcule la dosis más segura de SAO para aplicar a cada paciente.

A pesar que existe variación en el volumen de veneno inyectado en una mordedura por motivos medioambientales, funcionales de la glándula productora y el aparato inoculador, por comportamiento del animal, físicos por la posición del colmillo y el sitio de la mordida, por control del sistema nervioso (ver Introducción y Anexo I), es importante saber que el volumen de veneno obtenido por el procedimiento de ordeño siempre es mayor que el inoculado (ver Introducción y Anexo I). En el ordeño el ofidio mantiene su capacidad de controlar el volumen de veneno que elimina del lumen de la glándula en cada mordedura, pero en el actual trabajo dicha capacidad fue muy disminuida en los animales debido a que fueron sedados con CO₂ para ordeñarlos. Por lo tanto, si con estos resultados se calcula la

dosis de SAO necesaria para neutralizar el volumen de veneno que se obtiene de un animal en el ordeño, la misma cubriría cualquier volumen de veneno inyectado por un animal de las mismas dimensiones en una mordedura tanto defensiva como ofensiva.

Aunque muchas variables influyen en la producción de veneno por la glándula (ver Introducción y Anexo I), estas son descartadas en el actual trabajo debido a las condiciones estables de cautiverio y la metodología usada para la obtención de los datos (Materiales y métodos). La literatura no indica el tiempo que se debe dejar a un ejemplar de *B. pubescens* sin alimentar (o sea, sin morder) para obtener el mayor volumen de veneno, almacenado en el lumen de la glándula, en un ordeño (ver Anexo I). Es importante conocer el tiempo necesario para que el lumen de la glándula de veneno se llene y así asegurar que la ecuación que se obtenga se basa en el máximo de veneno que un animal pueda producir. Debido a que los animales, usados en este trabajo, tuvieron el mismo lapso de tiempo para producir y almacenar veneno en la glándula, se debería obtener el grado de relación entre las variables independientemente del tiempo requerido para el máximo almacenamiento en el lumen de la glándula. En este caso, se produce diferencias sobre las constantes de la regresión lineal y por lo tanto la ecuación que se obtendría daría resultados de dosis de SAO, para cada mordedura, errados.

La dosis de SAO depende de la cantidad de veneno en mg de peso seco (ver Introducción). Aunque en este trabajo se usó el volumen de veneno en ml, los resultados de la experiencia mostrada en el Anexo III demuestran que existe una relación lineal entre los logaritmos naturales (ln) de la Proteína Total (PT) contenida en VV. Por lo tanto, si se encuentra una relación entre DC y VV, se puede relacionar con PT y calcular la dosis de SAO necesaria para cada caso. Además, si el veneno almacenado en el lumen aumenta su concentración de proteína, al calcular la dosis de SAO requerida para volúmenes de veneno obtenidos en el ordeño, se sabe que la concentración de proteína inyectada en una mordedura es menor y también estaría cubierta en este caso.

Conclusiones

No existe dimorfismo sexual significativo en las variables, eso significa que independientemente del sexo del animal que cause el accidente ofídico se podría obtener una dosis ideal de SAO.

La relación entre la Longitud Total corporal, la Distancia entre Colmillos y el Volumen de Veneno existe pero su linealidad es débil y está influenciada por otras variables características principalmente por la clase de dentición y la quinesis craneal. El grado de influencia de estas variables debe ser estudiado para conocer los rangos que fluctúan los resultados. Debido a ello no fue posible obtener una ecuación que facilite la dosificación del SAO para cada accidente ofídico.

Una aplicación práctica podría ser obtener una tabla con intervalos de valores de distancias entre colmillos y que a cada intervalo le corresponda una dosis determinada de SAO, que posteriormente se compararían con datos clínicos.

Como el volumen de veneno obtenido en un ordeño y su concentración de proteína es mayor que lo inyectado en una mordedura defensiva, se estaría dando siempre mayor dosis de SAO que la necesaria y ésta cubriría los niveles de veneno que tenga el paciente en su sistema. Sin embargo, en algunos casos de accidente ofídico la dosis calculada sería menor que la que se está administrando actualmente y así se podría disminuir el riesgo de enfermedad del SAO.

Para obtener una relación entre las variables que permita llegar a una dosis de SAO viable para cada accidente ofídico, se deberá investigar el grado de influencia de cada variable que pueda alterar los datos de las variables estudiadas: distancia entre los zócalos, grado de desplazamiento lateral del maxilar y el período de ayuno requerido para la especie que permita obtener el máximo de producción de veneno de las glándulas que cada ejemplar sea capaz de producir.

Anexo I: Información complementaria

En los ofidios, las secreciones de veneno son producidas en glándulas orales especializadas, asociadas a dientes generalmente modificados (colmillos) para una inoculación más eficiente, que se localizan en el hueso maxilar (Peters, 1964; Ernst & Zug, 1996; Pough *et al.*, 1998; Rubio, 1998; Acosta, 2003; Young *et al.*, 2004). Los sistemas de inyección de veneno son frecuentemente divididos en sistemas de colmillos frontales y de colmillos posteriores. Hay dos tipos de colmillos frontales: solenoglifo (Figs. 4, 5 y 6) presente en los ofidios de la familia Viperidae y el género *Atractaspis* (Familia Atractaspididae) y proteroglifo, característico en la familia Elapidae. El sistema de colmillos posteriores u opistoglifo se encuentra en el resto de los géneros de Atractaspididae y en casi la mitad de los miembros de la familia Colubridae, mientras que la otra mitad de esta última familia carece de colmillos y en general se considera no ponzoñosa para humanos (Deufel & Cundall, 2006). Esta agrupación de la dentición se basa en similitudes superficiales de los colmillos y maxilares, pero probablemente no refleja agrupaciones naturales (Deufel & Cundall, 2006; Pyron *et al.*, 2011). Aunque los patrones de evolución de los sistemas de veneno permanecen inciertos, se identificaron patrones morfológicos y funcionales dentro de las familias. Actualmente, se considera que los diferentes sistemas de eliminación de veneno se desarrollaron independientemente en Viperidae, Atractaspididae y Elapidae.

En vipéridos el colmillo inoculador es largo respecto al tamaño de la serpiente, recurvado y está ubicado sobre un hueso maxilar corto y altamente móvil (Fig. 5, 6 y 13). Este hueso está reducido (Pough *et al.*, 1998; 1999), puede bascular entre 90° y 120° según Pough *et al.* (1999) y sólo sostiene colmillos, no hay otro tipo de diente maxilar (Peters, 1964; Pough *et al.*, 1998; 1999; Carreira *et al.*, 2005). Los colmillos son más largos que los demás dientes del animal y están conectados con las glándulas secretoras de veneno por medio de un conducto por el que el veneno viaja a través del canal del colmillo hasta el orificio proximal del diente; este último termina en una punta filosa (Peters, 1964; Kardong & Lavin-Murcio, 1993; Rubio, 1998; Pough *et al.*, 1998; 1999; Deufel & Cundall, 2006) y no muestra una sutura que conecte los orificios ovales de entrada y salida del veneno (Deufel & Cundall, 2006), excepto en crías. La glándula de veneno está contenida en una cápsula sobre la que se inserta el músculo *compressor glandulae*. Durante la mordedura, la mayoría de los músculos de la mandíbula se contraen y los huesos cuadrado, pterigoides y ectopterigoides

empujan al hueso maxilar por medio de una conexión entre ellos provocando la erección total de los colmillos (Carreira *et al.*, 2005; Kardong & Lavin-Murcio, 1993; Pough *et al.* 1998). El maxilar tiene una articulación altamente móvil con el prefrontal, éste articula con la caja craneana en otra unión móvil. Ligamentos que abarcan a cada articulación caudalmente, controlan una hiperextensión de las mismas. El ectopterigoides, alargado, articula con la superficie posterior de la maxila en forma dorsal a los colmillos. El palatino es delgado y sus conexiones al maxilar y al hocico son móviles facilitando la protracción del arco palato-maxilar durante la rotación de los colmillos. El hocico también es muy móvil alrededor de su unión a la caja craneana, reaccionando a los movimientos palatinos (Deufel & Cundall, 2006). Hay algunas evidencias que indican un pequeño movimiento lateral del maxilar, estudios en *Agkistrodon piscivorus* (con dentición solenoglifa) durante la mordedura e ingestión de la presa, mostraron que la rotación del hueso maxilar ocurre sólo en un plano parasagital con un pequeño componente de movimiento lateral, ya que su articulación con el ectopterigoides restringe la rotación a un sólo plano y limita el movimiento en el eje horizontal. Kardong (1974) menciona que Frazzetta encontró un desplazamiento lateral considerable en boideos (dentición aglifa), pero también menciona que hay diferencias en la quinesis entre las diferentes especies. No es conocido que en *B. pubescens* exista desplazamiento lateral de los maxilares, esto implicaría que los colmillos tengan un movimiento lateral que puede cambiar la medida de la distancia entre ellos durante la mordida. Ante esta interrogante, se efectuó una prueba piloto con 5 ejemplares recién muertos a los que se les abrió la boca y con una pinza se llevó los colmillos a posición erecta, característica en la acción de mordedura. Se separó los colmillos en sentido lateral con un calibre y se midió la máxima separación a la que llegaron (distancia interna entre colmillos). La diferencia entre la distancia interna entre los colmillos sin desplazamiento lateral y con un máximo de desplazamiento lateral varió con una media de $2,44 \pm 0,05$ mm (rangos: 1,8 - 2,9 $\pm 0,05$ mm).

Los reptiles al ser polifiodontos, tienen una serie de dientes de reemplazo creciendo detrás del funcional (Fig. 6), ascendiendo en orden de tamaño dentro de una envoltura de tejido y se mueven hacia delante a medida que se desarrollan, reemplazando los dientes que se mudan. El colmillo funcional es reemplazado en una secuencia ordenada existiendo dos zócalos contiguos en cada hueso maxilar para su recambio, pero sólo uno es ocupado por un colmillo funcional en todo momento (Figs. 6, 13 y 14) que se reemplaza alternadamente y que

permanece en ellos hasta perderse, según la teoría de Tomes (Peters, 1964; Deufel & Cundall, 2006). Dicha teoría se ha confirmado en estudios de diversos crotálicos incluyendo el género *Bothrops* (Anthony, 1970) en el que estaba incluida la especie *B. pubescens* hasta el trabajo de Fenwick *et al.* (2009).

Según Rubio (1998), la profundidad de penetración, si uno o ambos colmillos penetran y el lugar de la mordedura determinan la cantidad de veneno inyectado. Sin embargo, para Hayes (1992) existe poca relación entre la duración de contacto del colmillo y el sitio de penetración en una mordedura con el volumen de veneno inyectado, confirmado por Young & Zahn (2001), y que el sitio de penetración del colmillo es al azar debido a las acciones evasivas del roedor. Se registró la inyección de veneno en forma independiente en una penetración isolaral o colateral en la presa, sugiriendo que la actividad de los músculos extrínsecos de la glándula de veneno está sincronizada durante dicha inyección, siendo descrita en estudios de electromiograma (EMG) de mordeduras en vipéridos por Kardong *et al.* (1986). El músculo compresor de la glándula (*compressor glandulae*) se sitúa lateral y dorsalmente a ésta, aplicándole presión cuando se contrae y permitiendo la expulsión de veneno; los demás músculos de la cabeza también ejercen presión pero en menor grado (Kochva, 1978). Los conductos de veneno discurren entre la musculatura y se ensanchan dentro de un saco triangular largo inmediatamente posterior a los ojos. Cuando los músculos unidos a la glándula se contraen, una dosis de veneno es forzada a través de los colmillos dentro de la herida de la presa (Rubio, 1998). Young *et al.* (2000) aplicaron estímulos idénticos a las superficies ventral, dorsolateral, dorsomedial y medial del músculo *compressor glandulae* y obtuvieron un patrón de expulsión diferencial de veneno evidenciando que la dosificación del veneno inyectado depende del músculo que se estimula y del grado de dicho estímulo. Estudios con Elapidae y Viperidae, muestran convergencia evolutiva, a pesar de diferencias morfológicas, donde la musculatura extrínseca de la glándula funciona aumentando la presión intraglandular, siendo el desplazamiento de los dientes un prerequisite para la expulsión del veneno (Young *et al.*, 2000; 2004). El volumen de veneno inyectado en una mordedura dependiendo del tamaño y tipo de presa se ha cuantificado por diferentes métodos como ser comparación de tests de ELISA y análisis de proteínas entre diferentes presas (Hayes, 1992). Según Rubio (1998) la dosis inyectada es proporcional al tamaño de la presa, aunque para Young & Zahn (2001) la inyección de veneno es influida por el contexto comportamental y Hayes *et al.* (2002) estudiaron que en *Crotalus atrox* un mismo blanco en contexto predatorio

y otro defensivo registran diferencias volumétricas y temporales, siendo mayor el volumen inyectado durante la mordedura defensiva y es aún mayor ante un riesgo de muerte para el ofidio. Por otro lado, se han observado entre el 20-30% en mordeduras defensivas a humanos presentando marcas de colmillos sin una reacción local o sistémica (Offerman *et al.*, 2001; Tanen *et al.*, 2001; Hayes *et al.*, 2002), aunque Young *et al.* (2000) indica que el 50% de accidentes son “mordeduras secas”. Hayes *et al.* (2002) sugieren dos hipótesis para las mordeduras secas defensivas, éstas pueden resultar de una decisión deliberada por el ofidio (hipótesis de medición de veneno), confirmada por Young & Zahn (2001), o por fuerzas cinemáticas durante la mordedura (hipótesis de fuerzas cinemáticas). El volumen de veneno inyectado también varía según la especie de serpiente estudiada en condiciones experimentales, en mordeduras defensivas de *Vipera russelli*, los adultos inyectan un 45% del veneno en las primeras mordeduras y los juveniles eliminan un 53% (Tun Pe & Khin Aung Cho, 1986). Kochva (1960) observó que *V. palaestinae* inyecta menos del 20% del contenido de la glándula, con un promedio de 11% en mordeduras ofensivas.

El tipo de blanco y tamaño se evalúan por sistemas quimiosensor, visual y termal, mientras que los encuentros defensivos desencadenan una liberación hormonal y durante el estrés se registran cambios fisiológicos de respuestas neurales (Young *et al.*, 2002). Hayes *et al.* (2002) indicaron que la cantidad de veneno eliminado está bajo control del sistema nervioso central y puede variar respecto a circunstancias intrínsecas y extrínsecas del animal. Yamanouye *et al.* (1997) encontraron que en *B. jararaca*, el sistema nervioso simpático juega un importante rol en la producción y secreción de veneno.

En *V. palaestinae*, las glándulas de veneno pueden producir y almacenar hasta más de 1g de volumen de veneno en su lumen extendido (Kochva *et al.*, 1975). Se comprobó que la regeneración de veneno luego de un ordeño, en diversas especies de viperinos, crotalinos y elápidos, es muy rápida y sigue un patrón similar a una curva de saturación. El pico de la síntesis de veneno fue entre los primeros 4-8 días y disminuyó en las 2 a 3 semanas posteriores al ordeño, mientras el epitelio glandular retorna a su estado inactivo (Kochva, 1997; Yamanouye *et al.*, 1997). Este epitelio sintetiza y secreta el veneno que es acumulado en los primeros días alcanzando un máximo de 7 a 5 mg de proteína en 35 mg de veneno por día. El primer veneno acumulado en el lumen es de una muy baja concentración de proteína cercana al 10-15% del peso seco (Kochva *et al.*, 1975; Kochva, 1978). La secreción de veneno decrece considerablemente y la curva de acumulación baja los niveles cerca de 20

días luego del ordeño. En *C. durissus terrificus*, *V. palaestinae* y *V. ammodytes* las glándulas ordeñadas muestran una actividad de 8 a 10 veces mayor que las no ordeñadas. Se presume que la síntesis nueva de veneno y la secreción es controlada localmente por la cantidad de veneno acumulada presente en el lumen de la glándula (Kochva *et al.*, 1975). Las serpientes nunca o casi nunca vacían el contenido del lumen de sus glándulas en una mordedura (Kochva, 1960; 1978; Kochva *et al.*, 1975), en sólo una de cada 100 mordeduras el animal inyecta la mitad del veneno almacenado (Kochva, 1978; Kochva *et al.*, 1975). Bajo condiciones naturales los vipéridos siempre tienen veneno en sus glándulas y es probablemente muy raro que las vacíen por completo. Durante la mordedura ellos usan aproximadamente entre el 7-11% de su veneno (Kochva *et al.*, 1975). Aunque no se conoce el costo de la producción y almacenamiento de veneno, la inyección alta o total del mismo podría ser desventajoso para el ofidio debido a que quedaría impedido de capturar una presa o defenderse de ataques (Hayes *et al.*; 2002). El volumen de veneno acumulado en la glándula es variable a niveles tanto intra como interespecíficos (Kochva, 1997). Grisolíá *et al.* (1986) relacionaron el volumen de veneno obtenido en el ordeño con el ayuno en *C. durissus terrificus*, concluyendo que con un ayuno de 90 días se podría extraer un máximo volumen de veneno. Por otro lado, Leloup (1973) especificó un rendimiento de extracción de veneno óptimo de 28 días sin alimentar a los animales, si se aumentaba ese período, decaía la obtención de veneno. Estudios con *C. atrox* mostraron que los volúmenes de veneno inyectados son menores que los obtenidos mediante el método de ordeño (Young & Zahn, 2001).

Generalmente, las especies que causan accidentes ofídicos se mantienen en cautiverio para extracción de veneno con fines de producción de SAO e investigación (Leloup, 1973; Kochva, 1978). En Uruguay esta tarea se efectúa en el Bioterio de Animales Ponzosñosos, ubicado en el Instituto de Higiene (I. de H.) y cuya función principal es abastecer de veneno al Departamento de Desarrollo Biotecnológico y Producción de dicho instituto que elabora SAO bivalente (válido para *B. pubescens* y *R. alternatus*). El Bioterio fue creado en 1992 a través de un convenio suscrito entre las Facultades de Ciencias y de Medicina (Meneghel, 1999; Carreira *et al.*, 2005) y financiado inicialmente por la CSIC.

En Uruguay habitan cuatro especies ponzoñosas: *B. pubescens*, *C. durissus terrificus* y *R. alternatus* pertenecientes a la familia Viperidae y *Micrurus altirostris* que pertenece a la familia Elapidae.

Biología de *Bothropoides pubescens*

B. pubescens (Figs. 1 y 2) pertenece a la familia Viperidae, cuya característica más relevante es el tipo de dentición solenoglifa, que implica una gran modificación de los huesos del cráneo. Se ubica en la subfamilia Crotalinae (Oppel, 1811), que se caracteriza por presentar una foseta loreal (órgano sensorial termo receptor) profunda a cada lado del hocico (Carreira *et al.*, 2005). Su distribución abarca el estado de Río Grande do Sul, Brasil y Uruguay. En Uruguay se encuentra probablemente en todo el territorio, faltando aún registros de su presencia en los departamentos de Paysandú, Río Negro, Soriano, Colonia, Flores y Montevideo (Meneghel, 1997; Achaval, 2001; Carreira *et al.*, 2005).

Es una especie terrestre que habita en serranías pedregosas y mares de piedra secos o húmedos y ambientes similares (Vaz Ferreira & Sierra de Soriano, 1960; Lema, 1973; Campbell & Lamar, 1989; Meneghel, 1997), así como en zonas bajas de bañados aunque menos frecuentemente (Carreira *et al.*, 2005).

Su cuerpo es de complexión y tamaño medios y su longitud máxima registrada es de 1180 mm (medida de una hembra en cautiverio) y una mínima para neonatos correspondiente a 220 mm (Meneghel, 1997). Con un aspecto general grisáceo, color de fondo castaño grisáceo más o menos intenso, según el ejemplar. Presenta un diseño dorsolateral de manchas castaño oscuras a negruzcas en forma de trapecio, con la base menor apoyada en la línea media dorsal y los bordes oblicuos delineados en un tono blanquecino difuso. Por debajo de la base del polígono hay un par de manchas secundarias, pardas y ovaladas, cuyos bordes laterales enfrentados a los lados del trapecio también pueden presentar pigmentación clara. Estos diseños pueden alternarse o enfrentarse con los de la serie del flanco opuesto. Entre los dibujos trapezoidales, aparecen manchas oscuras adyacentes a la línea media dorsal, que en caso de diseño estrellado, se juntan en ambos lados, apareciendo como manchas mayores. Este patrón está sujeto a gran variación, existiendo algunos ejemplares con diseños redondeados e incluso ocelados. Por debajo del diseño descrito aparece una serie de manchas paraventrales oscuras, sobre un color de fondo más claro que el dorsal y que en la mayoría de los ejemplares se tiñe de color salmón claro. El diseño cefálico se compone de tres a cinco manchas gruesas, irregulares, castaño oscuras, sobre fondo más claro, rodeadas de un halo blanquecino en algunos ejemplares y dispuestas en forma más o menos simétrica, delimitando a veces una cruz. Generalmente hay una mancha impar sobre el hocico; el primer

par de manchas se ubica entre las supraoculares; el segundo generalmente se extiende, describiendo una curva hasta la base del cuello. Banda postocular muy oscura, extendiéndose hasta el ángulo mandibular o más atrás. Supralabiales manchadas de castaño oscuro sobre fondo blanco, en disposición irregular, en barreado, o en gran profusión, de forma que los labios parecen totalmente oscuros. El área ventral es clara, salpicada de pequeñas manchas castaño claras u oscuras, difusas, que se agrupan en la base de cada escama (Meneghel, 1997).

La lepidosis consiste en escamas lanceoladas carenadas, más pequeñas en la cabeza que en el resto del cuerpo. La escama rostral es cuadrangular y no visible dorsalmente, las supraoculares presentan un canto prominente y están separadas entre sí por 8-9 (5-11, según da Silva en Carreira *et al.*, 2005) intersupraoculares (Carreira *et al.*, 2005). Presencia de 2 internasales, 2 preoculares y 2-3 postoculares; una serie de 2-4 suboculares, extendiéndose en 2 ó 3 filas sobre las supralabiales. Escama loreal presente en contacto con la foseta termo receptora, 8-10 labiales superiores y 10-11 inferiores con 1-3 en contacto con la primera general. 166-183 escamas ventrales, anal entera, subcaudales divididas oscilando de 37-49 en hembras y 43-53 en machos. 23-29 filas de escamas dorsales carenadas en el medio del cuerpo (Meneghel, 1997; Carreira *et al.*, 2005).

B. pubescens se encuentra activa tanto en el día como en la noche. Su alimentación comprende ratones, ratas, otros pequeños mamíferos, aves, anfibios, escolopendras y otros reptiles como lagartijas e incluso ofidios (Meneghel, 1997). Es un animal irritable y más agresivo que *R. alternatus* (Carreira *et al.*, 2005). Es importante aclarar que *B. pubescens* no está incluida en ninguna categoría de amenaza (Morales Fagundes & Carreira Vidal, 2000; Canavero *et al.* 2010).

Existe dimorfismo sexual en adultos de *B. pubescens*, las hembras presentan mayor tamaño corporal y cola más corta que los machos (Figs. 1 y 2) (Fitch, 1981; Meneghel, 1997; Almeida & Martins, 1999; Carreira *et al.*, 2005). Los órganos copuladores pares de los machos (hemipenes), se alojan invaginados en la base de la cola, ventral al septo horizontal y están separados del tegumento lateral y subcaudal por delgadas láminas de músculo ventral superficial. Estos órganos, junto con los músculos retractores asociados a los mismos (Dowling & Savage, 1960), producen un abultamiento en la región caudal proximal, que en *B. pubescens* es marcadamente visible. También se encontró diferencias sexuales en el largo y ancho de la cabeza a nivel de los ojos (Meneghel, 1997; Morales Fagundes, 1998). Morales

Fagundes (1998) confirmó las diferencias de tamaños indicando que las mismas no son tan marcadas, pero encontró variaciones significativas respecto a largos de tronco y cola y al largo y ancho de cabeza a la altura de los ojos (hocico). La reproducción es aparentemente bianual, siendo una especie que pone camadas que oscilan entre 2-18 crías; el menor peso registrado en una cría fue de 4g (Almeida & Martins, 1999; Carreira *et al.*, 2005).

Anexo II: Datos de ejemplares

Los datos obtenidos con la metodología descrita en Materiales y métodos, se muestran en las tablas IXa y IXb. Los datos de colecta de los ejemplares de *B. pubescens* utilizados en el trabajo y que pertenecen al plantel de animales del Bioterio de Animales Ponzos, Montevideo-Uruguay, se presentan a continuación de las tablas.

Tabla IXa: Datos de las variables estudiadas junto con el código de los ejemplares hembras de *B. pubescens*, que integran la colección del Bioterio de Animales Ponzos. Para algunos ejemplares, no se cuenta con todos los datos. DC_ Distancia entre Colmillos, LT_ Longitud Total del cuerpo, VV_ Volumen de Veneno, H_ Hembras.

Ejemplar	Sexo	DC	LT (mm)	VV (ml)
N3	H	14,25	1109,76	0,34
N4	H	11,8	1061	0,1
N49	H	10,1	817,2	0,12
N50	H	25	1267,7	0,8
N93	H	17,7	1263,8	0,75
N101	H	21,4	1308,4	1,2
N106	H	20,8	1454,4	0,4
N109	H	24,3	1364	0,4
N128	H	22,2	1099,912	0,32
N134	H	14	1067	0,06
N139	H	18,6	1176,93	0,25
N142	H	20	1194,066	0,52
N143	H	23,75	1205,16	0,22
N146	H	21,6	-	0,3
N155	H	22,5	1054,4	0,6
N180	H	9,2	914,62	0,1
N196	H	23,2	1149	0,44
N198	H	13	1147,65	0,225
N199	H	24,7	1157	0,58
N202	H	18,3	903	0,12

Ejemplar	Sexo	DC	LT (mm)	VV (ml)
N205	H	16,75	912	0,36
N208	H	12,2	974	0,35
N209	H	17,3	894	0,23
N210	H	11,9	743,9	0,1
N212	H	13,1	864,2	0,05
N213	H	9,4	751,3	-
N214	H	12	779,6	0,17
N220	H	9,45	998,04	0,27
N222	H	9,7	880	0,2
N250	H	17	932,71	0,45
N251	H	15,4	778,45	0,13
N256	H	15,8	817,35	0,21
N258	H	11	794,37	0,18
N259	H	17,1	836,04	0,15
N268	H	12,4	801	0,43
N289	H	12,7	994,01	0,4
N328	H	8,2	766,4	0,15
N330	H	12,1	719,7	0,15
N331	H	19,5	900	0,22
N349	H	13,8	877,86	0,21
N350	H	8,7	847,47	0,22

Tabla IXb: Datos de ejemplares machos de *B. pubescens* usados en el trabajo, con su código correspondiente al Bioterio. DC_ Distancia entre Colmillos, LT_ Longitud Total del cuerpo, VV_ Volumen de Veneno, M_ Machos.

Ejemplar	Sexo	DC (mm)	LT (mm)	VV (ml)
N54	M	17,6	921,21	0,38
N102	M	14,1	1112,6	0,25
N111	M	14,9	751,76	0,14
N112	M	13,7	723,062	0,1
N127	M	17,6	810,79	0,18
N132	M	14,9	944,2	0,25
N136	M	15,2	834	0,21
N140	M	14,8	822,957	0,35
N145	M	13,2	985	0,3
N163	M	9	737,7	0,08
N179	M	10	820	0,33
N182	M	16,4	732,7	0,2
N195	M	9,9	800	0,18
N200	M	14,1	866,57	0,14
N203	M	15	769	0,07
N206	M	13,2	650	0,02
N215	M	17,3	827,7	0,1
N219	M	9,2	946,39	0,29
N249	M	5,2	532	-
N257	M	11,7	635	0,03
N261	M	10,5	574,4	0,03
N269	M	8,1	689,7	0,05
N329	M	7,4	643,6	0,04
N332	M	12	839,52	0,23
N347	M	15,2	817	0,08
N385	M	11,5	806	0,05
N386	M	9,15	625,55	0,09

- N3 *Bothropoides pubescens*. Estancia "Don Horacio", Rincón de la Vassoura, TACUAREMBO. 12.XII.1987. Col.: F. Achaval. Ingreso Serpentario: 2.X.1992.
- N4 *Bothropoides pubescens*. Quebrada de los Cuervos, TREINTA Y TRES. 26.VIII.1990. Col.: M. D. Meneghel. Ingreso Serpentario: 2.X.1992.
- N49 *Bothropoides pubescens*. Pozo Hondo, Tambores, TACUAREMBO. 2.IX.1995. Col.: A. Olmos. Ingreso Serpentario: 4.IX.1995.
- N50 *Bothropoides pubescens*. Quebrada de los Cuervos, TREINTA Y TRES. 5.I.1996. Col.: S. Carreira. Ingreso Serpentario: 8.I.1996.
- N54 *Bothropoides pubescens*. Jaureguiberry, CANELONES. 6.III.1996. Obs.: Cruzando la calle, entre casas, 19:30 h. Col.: S. Carreira. Ingreso Serpentario: 19.III.1996.
- N93 *Bothropoides pubescens*. Madre (N 50): Quebrada de los Cuervos, TREINTA Y TRES. 5.I.1996. Col.: S. Carreira. Obs.: Nacida en cautiverio ~ 2.IV.1996. Ingreso Serpentario: 4.IV.1996.
- N101 *Bothropoides pubescens*. Establecimiento "La Escondida", Jaureguiberry, CANELONES. 25.VIII.1996 Obs.: En monte, entre ramas, en el suelo. Col.: E. Coppes; Leg.: S. Carreira. Ingreso Serpentario: 11.IX. 1996.
- N102 *Bothropoides pubescens*. Quebrada de los Cuervos, TREINTA Y TRES. 7.IX.1996. Obs.: Bajo piedra pequeña. Col.: E. González. Ingreso Serpentario: 2.X.1996.
- N106 *Bothropoides pubescens*. Lunarejo, RIVERA. 23.XI.1996. Obs.: A la sombra de una piedra, junto a cañada, gajo del A° Lunarejo; 28 °C, 14h. Col.: A. Olmos. Ingreso Serpentario: 18.XII.1996.
- N109 *Bothropoides pubescens*. Establecimiento "La Escondida", Jaureguiberry, CANELONES. 14.XI.1996. Obs.: Alrededor de las viviendas. Col.: E. Coppes; Leg.: S. Carreira. Ingreso Serpentario: 18.XII.1996.
- N111 *Bothropoides pubescens*. Establecimiento "La Escondida", Jaureguiberry, CANELONES. X-XI.1996. Obs.: Alrededor de las viviendas. Col.: E. Coppes; Leg.: S. Carreira. Ingreso Serpentario: 18.XII.1996.

- N112 *Bothropoides pubescens*. Establecimiento “La Escondida”, Jaureguiberry, CANELONES. X-XI.1996. Obs.: Alrededor de las viviendas. Col.: E. Coppes; Leg.: S. Carreira. Ingreso Serpentario: 18.XII.1996.
- N127 *Bothropoides pubescens*. Establecimiento “La Escondida”, Jaureguiberry, CANELONES. 15.III.1997. Col.: E. Coppes; Leg.: S. Carreira. Ingreso Serpentario: 2.IV.1997.
- N128 *Bothropoides pubescens*. Cerro Áspero, Sierras de La Blanqueada, Ruta 16, a 40 km de Castillos, ROCHA. 12.IV.1997. Col.: J.C. Gambarotta & G. Geymonat. Ingreso Serpentario: 16.IV.1997.
- N132 *Bothropoides pubescens*. Potrerillo de Santa Teresa, ROCHA. IV.1997. Obs.: Junto a la casa del Guardaparque. Col.: D. Roibal. Ingreso Serpentario: 30.IV.1997.
- N134 *Bothropoides pubescens*. Establecimiento “La Escondida”, Jaureguiberry, CANELONES. V.1997. Col.: E. Coppes; Leg.: S. Carreira. Ingreso Serpentario: 26.VI.1997.
- N136 *Bothropoides pubescens*. Establecimiento “La Escondida”, Jaureguiberry, CANELONES. V.1997. Col.: E. Coppes; Leg.: S. Carreira. Ingreso Serpentario: 26.VI.1997.
- N139 *Bothropoides pubescens*. Nacida en Zoológico de Villa Dolores, MONTEVIDEO. 1997. Ingreso Serpentario: 29.XI.1997.
- N140 *Bothropoides pubescens*. Nacida en Zoológico de Villa Dolores, MONTEVIDEO. 1997. Ingreso Serpentario: 29.XI.1997.
- N142 *Bothropoides pubescens*. Nacida en Zoológico de Villa Dolores, MONTEVIDEO. 1997. Ingreso Serpentario: 29.XI.1997.
- N143 *Bothropoides pubescens*. Nacida en Zoológico de Villa Dolores, MONTEVIDEO. 1997. Ingreso Serpentario: 29.XI.1997.
- N145 *Bothropoides pubescens*. Nacida en Zoológico de Villa Dolores, MONTEVIDEO. 1997. Ingreso Serpentario: 29.XI.1997.
- N146 *Bothropoides pubescens*. Nacida en Zoológico de Villa Dolores, MONTEVIDEO. 1997. Ingreso Serpentario: 29.XI.1997.
- N155 *Bothropoides pubescens*. Punta Negra, MALDONADO. 31.V.1998. Obs.: En montón de leña. Col.: C. Delfino. Ingreso Serpentario: 3.VI.1998.

- N163 *Bothropoides pubescens*. Nacida en Zoológico de Villa Dolores, MONTEVIDEO. 1998. Ingreso Serpentario: 9.XII.1998.
- N179 *Bothropoides pubescens*. Establecimiento “La Escondida”, Jaureguiberry, CANELONES. 8-11.III.1999. Col.: E. Coppes; Leg.: S. Carreira. Ingreso Serpentario: 18.III.1999.
- N180 *Bothropoides pubescens*. Establecimiento “La Escondida”, Jaureguiberry, CANELONES. 8-11.III.1999. Col.: E. Coppes; Leg.: S. Carreira. Ingreso Serpentario: 18.III.1999.
- N182 *Bothropoides pubescens*. Establecimiento “La Escondida”, Jaureguiberry, CANELONES. 8-11.III.1999. Col.: E. Coppes; Leg.: S. Carreira. Ingreso Serpentario: 18.III.1999.
- N195 *Bothropoides pubescens*. Bajada de Pena, Tranqueras, RIVERA. X.1999. Leg.: R. Píriz. Ingreso Serpentario: 17.XI.1999.
- N196 *Bothropoides pubescens*. La Escondida, Jaureguiberry, CANELONES. X. 1999. Col.: E. Coppes. Ingreso Serpentario: 5.I.2000.
- N198 *Bothropoides pubescens*. La Escondida y alrededores, Jaureguiberry, CANELONES. 2000. Col.: E. Coppes. Ingreso Serpentario: 22.XI.2000.
- N199 *Bothropoides pubescens*. La Escondida y alrededores, Jaureguiberry, CANELONES. 2000. Col.: E. Coppes. Ingreso Serpentario: 22.XI.2000.
- N200 *Bothropoides pubescens*. La Escondida, Jaureguiberry, CANELONES. 2000. Col.: E. Coppes. Ingreso Serpentario: 22.XI.2000.
- N202 *Bothropoides pubescens*. Madre: alrededores del zoológico de San Carlos, MALDONADO. Obs.: Nacido en cautiverio el 24.II.2001. Leg.: A. Villalba. Ingreso Serpentario: 29.III.2001.
- N203 *Bothropoides pubescens*. Madre: alrededores del zoológico de San Carlos, MALDONADO. Obs.: Nacido en cautiverio el 24.II.2001. Leg.: A. Villalba. Ingreso Serpentario: 29.III.2001.

N205 *Bothropoides pubescens*. Madre: alrededores del zoológico de San Carlos, MALDONADO. Obs.: Nacido en cautiverio el 24.II.2001. Leg.: A. Villalba. Ingreso Serpentario: 29.III.2001.

N206 *Bothropoides pubescens*. Madre: alrededores del zoológico de San Carlos, MALDONADO. Obs.: Nacido en cautiverio el 24.II.2001. Leg.: A. Villalba. Ingreso Serpentario: 29.III.2001.

N208 *Bothropoides pubescens*. Madre: alrededores del zoológico de San Carlos, MALDONADO. Obs.: Nacido en cautiverio el 24.II.2001. Leg.: A. Villalba. Ingreso Serpentario: 29.III.2001.

N209 *Bothropoides pubescens*. Madre: alrededores del zoológico de San Carlos, MALDONADO. Obs.: Nacido en cautiverio el 24.II.2001. Leg.: A. Villalba. Ingreso Serpentario: 29.III.2001.

N210 *Bothropoides pubescens*. Madre: alrededores del zoológico de San Carlos, MALDONADO. Obs.: Nacido en cautiverio el 24.II.2001. Leg.: A. Villalba. Ingreso Serpentario: 29.III.2001.

N212 *Bothropoides pubescens*. Madre: alrededores del zoológico de San Carlos, MALDONADO. Obs.: Nacido en cautiverio el 24.II.2001. Leg.: A. Villalba. Ingreso Serpentario: 18.IV.2001.

N213 *Bothropoides pubescens*. Madre: alrededores del zoológico de San Carlos, MALDONADO. Obs.: Nacido en cautiverio el 24.II.2001. Leg.: A. Villalba. Ingreso Serpentario: 18.IV.2001.

N214 *Bothropoides pubescens*. Madre: alrededores del zoológico de San Carlos, MALDONADO. Obs.: Nacido en cautiverio el 24.II.2001. Leg.: A. Villalba. Ingreso Serpentario: 18.IV.2001.

N215 *Bothropoides pubescens*. Punta Negra, MALDONADO. 12.IV.2001. Obs.: En alrededores de la casa. Col.: C. Delfino. Ingreso Serpentario: 18.IV.2001.

N219 *Bothropoides pubescens*. La Escondida, Jaureguiberry, CANELONES. X.2001. Col.: E. Coppes. Leg.: S. Carreira. Ingreso Serpentario: 5.XII.2001.

N220 *Bothropoides pubescens*. Estancia San Juan, Puesto Los Cerros (31°00'45,2" S - 55°39'61" W), RIVERA. 24.XI.2001. Obs.: En actividad, desplazándose entre pajas. Nublado, con viento, fresco. Col.: J. Rivero & F. Achaval. Ingreso Serpentario: 5.XII.2001.

N222 *Bothropoides pubescens*. Potrero Los Cerros, Estancia San Juan, Sierra de la Aurora (31°00'41" S - 55°39'25" W), RIVERA. 15.XII.2001. Obs.: Bajo piedra. Col.: C. Llaguno & F. Achaval. Ingreso Serpentario: 19.XII.2001.

N249 *Bothropoides pubescens*. Nacida en Zoo San Carlos, MALDONADO. Obs.: (Padres de las inmediaciones) 24.II.2002. Leg.: A. Villalba. Ingreso Serpentario: 4.IV.2002.

N250 *Bothropoides pubescens*. Nacida en Zoo San Carlos, MALDONADO. Obs.: (Padres de las inmediaciones) 24.II.2002. Leg.: A. Villalba. Ingreso Serpentario: 4.IV.2002.

N251 *Bothropoides pubescens*. Nacida en Zoo San Carlos, MALDONADO. Obs.: (Padres de las inmediaciones) 24.II.2002. Leg.: A. Villalba. Ingreso Serpentario: 4.IV.2002.

N256 *Bothropoides pubescens*. Nacida en Zoo San Carlos, MALDONADO. Obs.: (Padres de las inmediaciones) 24.II.2002. Leg.: A. Villalba. Ingreso Serpentario: 4.IV.2002.

N257 *Bothropoides pubescens*. Nacida en Zoo San Carlos, MALDONADO. Obs.: (Padres de las inmediaciones) 24.II.2002. Leg.: A. Villalba. Ingreso Serpentario: 4.IV.2002.

N258 *Bothropoides pubescens*. Nacida en Zoo San Carlos, MALDONADO. Obs.: (Padres de las inmediaciones) 24.II.2002. Leg.: A. Villalba. Ingreso Serpentario: 4.IV.2002.

N259 *Bothropoides pubescens*. Nacida en Zoo San Carlos, MALDONADO. Obs.: (Padres de las inmediaciones) 24.II.2002. Leg.: A. Villalba. Ingreso Serpentario: 4.IV.2002.

N261 *Bothropoides pubescens*. Nacida en Zoo San Carlos, MALDONADO. Obs.: (Padres de las inmediaciones) 24.II.2002. Leg.: A. Villalba. Ingreso Serpentario: 4.IV.2002.

N268 *Bothropoides pubescens*. Jaureguiberry, CANELONES. XII.2002. Ingreso Serpentario: 4.XII.2002.

N269 *Bothropoides pubescens*. Jaureguiberry, CANELONES. XII.2002. Ingreso Serpentario: 4.XII.2002.

N289 *Bothropoides pubescens*. Inmediaciones de Zoo San Carlos, MALDONADO. Obs.: Mantenido en el Zoo por años, reproduciéndose con N290. Leg.: A. Villalba. Ingreso Serpentario: 27.II.2003.

- N328 *Bothropoides pubescens*. Jaureguiberry, CANELONES. 11.II.2004. Leg.: Dr. Speranza. Ingreso Serpentario: 11.II.2004.
- N329 *Bothropoides pubescens*. Jaureguiberry, CANELONES. 9-19.II.2004. Leg.: Dr. Speranza. Ingreso Serpentario: 20.II.2004.
- N330 *Bothropoides pubescens*. Jaureguiberry, CANELONES. 9-19.II.2004. Leg.: Dr. Speranza. Ingreso Serpentario: 20.II.2004.
- N331 *Bothropoides pubescens*. Jaureguiberry, CANELONES. 9-19.II.2004. Leg.: Dr. Speranza. Ingreso Serpentario: 20.II.2004.
- N332 *Bothropoides pubescens*. Jaureguiberry, CANELONES. 9-19.II.2004. Leg.: Dr. Speranza. Ingreso Serpentario: 3.III.2004.
- N347 *Bothropoides pubescens*. Jaureguiberry, CANELONES. 16/XII/2004 Col.: Dr. Speranza. Ingreso Serpentario: 8.XII.2004.
- N349 *Bothropoides pubescens*. Jaureguiberry, CANELONES. Aprox. 2-3/I/2005. Col.: Dr. Speranza. Ingreso Serpentario: 11.II.2005.
- N350 *Bothropoides pubescens*. Jaureguiberry, CANELONES. Aprox. 24.I.2005. Obs.: Pare el 20.IV.2005, peso posparto: 305,6 g. Col.: Dr. Speranza. Ingreso Serpentario: 11.II.2005.
- N385 *Bothropoides pubescens*. Uruguay. II/2006. Ingreso Serpentario: VII.2006.
- N386 *Bothropoides pubescens*. Ruta Interbalnearia, km 117, antes de Solanas. Maldonado. 27/II/2006. Col: E. Russi. Ingreso Serpentario: VII.2006.

Anexo III: Relación entre Proteína Total y Distancia entre Colmillos

La dosis de SAO se calcula según la cantidad de proteína del veneno en mg que neutraliza. Debido que en el trabajo se usó los datos con volumen de veneno en ml, se estudió la relación entre la Proteína Total contenida en el veneno (PT) y el Volumen de Veneno obtenido en el ordeño (VV) así como con la Distancia entre Colmillos (DC). Para ello se extrajo y midió la PT en diecisiete muestras de veneno extraídas en los ordeños. Se centrifugó cada muestra con aceleración de 12000 g durante 20 minutos a 4 °C, para descartar el material insoluble, y se pesó el sobrenadante (Tabla X). Los residuos de la regresión no son homocedasticos, por lo tanto se transformó las variables por medio de logaritmo natural (ln). Para las variables lnPT en función de lnVV (Gráfico 3) el resultado de la regresión (Tabla XII) da un $R^2=0,923$, $b=0,973$ ($p < 0,001$) indica que existe una relación lineal entre los logaritmos de las variables. La regresión de ln PT en función de lnDC (Gráfico 4) con un $R^2=0,554$, $b=2,283$ ($p < 0,001$) muestra una relación lineal menor entre los logaritmos naturales de las variables (Tablas XII y XIII).

Se concluye que existe relación lineal entre los logaritmos naturales de las variables estudiadas PT y VV y entre PT y DC.

Tabla X: Datos de la variable Proteína Total junto con los datos correspondientes a cada muestra de ejemplares de *B. pubescens*, que integran la colección del Bioterio de Animales Ponzosñosos. DC_ Distancia entre Colmillos, VV_ Volumen de Veneno, PT_ Proteína Total.

Ejemplar	DC (mm)	VV (ml)	PT (mg)
N49	10,1	0,12	32,54794524
N50	25,0	0,80	188,5700553
N93	17,7	0,75	180,2811824
N101	21,4	1,20	201,5284788
N102	14,1	0,25	37,53905311
N106	20,8	0,40	95,24633502
N109	24,30	0,40	79,71160779
N132	14,9	0,25	43,01850517
N136	15,2	0,21	42,87815427
N163	9,0	0,08	23,84042296
N206	13,2	0,02	4,072098053
N210	11,9	0,10	24,24417207
N214	12	0,17	33,6813266
N215	17,3	0,10	24,9651526
N222	9,7	0,20	18,05335256
N269	8,1	0,05	9,372746936
N330	12,1	0,15	19,48089402

Tabla XI: Resultados del test de Kolmogorov-Smirnov para testear normalidad de los logaritmos naturales (ln) de las variables Volumen de Veneno (VV), Proteína Total (PT) y Distancia entre Colmillos (DC).

	ln VV	ln PT	ln DC
N	17	17	17
D	0,108	0,160	0,098
Z de Kolmogorov-Smirnov	0,447	0,661	0,404
<i>p</i>	0,988	0,774	0,997

Tabla XII: Resultados Regresión Lineal para el modelo en el que lnDC es la variable predictora y el lnPT es la variable dependiente; y el modelo donde la variable predictora es lnVV y el lnPT es la variable dependiente. R_ coeficiente de regresión múltiple, R²_estimativo de la proporción de varianza estimada para la regresión, *p*_ nivel de significancia.

Modelo	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	<i>p</i>
Variable Predictora lnDC	0,745	0,554	0,525	0,72674	< 0,001
Variable Predictora lnVV	0,961	0,923	0,918	0,30258	< 0,001

Tabla XIII: Valores de las constantes de las ecuaciones de regresión: constante de la ecuación, B_ pendiente o coeficiente de regresión, t_ estadístico del test de t que testea linealidad entre las variables, *p*_ nivel de significancia.

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	<i>p</i>
	B	Error típ.	Beta		
Constante	-2,430	1,416		-1,716	0,107
Variable predictora lnDC	2,283	0,528	0,745	4,320	< 0,001
Constante	5,240	0,140		37,377	< 0,001
Variable predictora lnVV	0,973	0,073	0,961	13,386	< 0,001

Tabla XIV: Estadísticos sobre los residuos para cada modelo, con variable predictora lnDC y variable predictora lnVV respectivamente.

Modelo		Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica	N
Variable predictora lnDC	Valor pronosticado	2,3457	4,9185	3,6413	0,78488	17
	Residual	-2,05640	1,06429	0,00000	0,70366	17
	Valor pronosticado tip.	-1,651	1,627	0,000	1,000	17
	Residuo típ.	-2,830	1,464	0,000	0,968	17
Variable predictora lnVV	Valor pronosticado	1,4328	5,4179	3,6413	1,01259	17
	Residual	-0,78065	0,38924	0,00000	0,29297	17
	Valor pronosticado tip.	-2,181	1,755	0,000	1,000	17
	Residuo típ.	-2,580	1,286	0,000	0,968	17

Tabla XV: Resultados de los test de Kolgomorov-Smirnof para Normalidad, test de Durbin-Watson para independencia y test de Levene para homocedasticidad sobre los residuos de la regresión lineal.

Modelo	N	D	ρ	Durbin-Watson	Levene	ρ
Variable predictora lnDC	17	0,204	0,480	1,985	0,015	0,904
Variable predictora lnVV	17	0,153	0,823	1,808	1,893	0,189

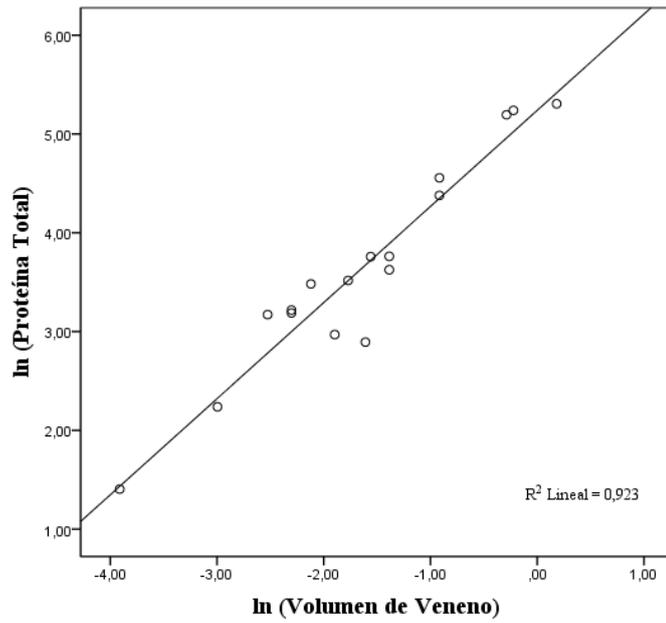


Gráfico 3: ln de Proteína Total (lnPT) en función del ln de Volumen de Veneno (lnVV). La línea negra marca la pendiente de la Regresión Lineal $R^2=0,923$.

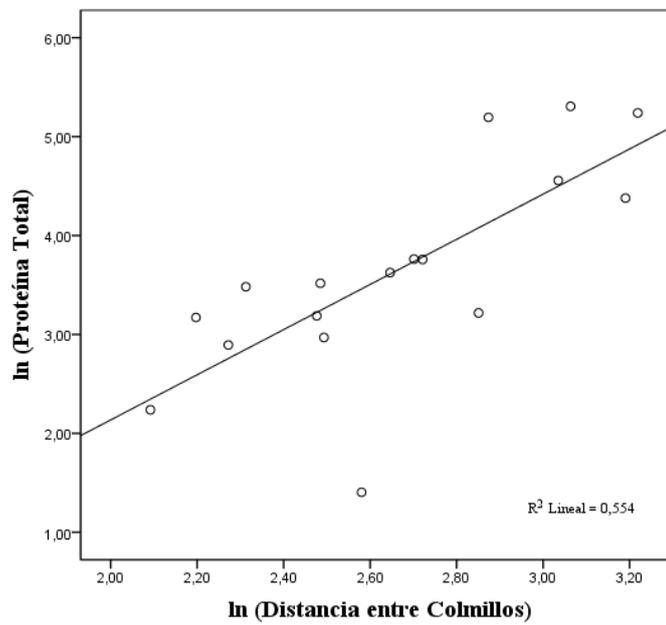


Gráfico 4: ln de la Proteína Total (lnPT) en función del ln de la Distancia entre Colmillos (lnDC). La línea negra marca la pendiente de la Regresión Lineal $R^2=0,554$.



Figura 1: Ejemplar de *Bothropoides pubescens* (N106) perteneciente a la colección del Bioterio de Animales Ponzñosos, fotografiado junto a una escala para medir su longitud con un programa de PC, SNAKEMEASURER. Este animal tiene la mayor longitud establecida en cautiverio para la especie (1454,4 mm), sin embargo no produjo el mayor volumen de veneno obtenido en el presente trabajo (Foto: S. Carreira).



Figura 2: Ejemplar macho de *B. pubescens* (N386), aunque este ejemplar es un juvenil se puede observar que la base de la cola del animal es más gruesa que la de las hembras en las fotografías anteriores (Foto: S. Carreira).



Figura 3: Mordedura en un paciente de accidente ofídico en Uruguay. Se desconoce si fue causada por *B. pubescens* o *R. alternatus*. La imagen muestra claramente las impresiones dejadas por los colmillos situados sobre los huesos maxilares (Foto cedida por M. N. Tortorella, Médico del CIAT).

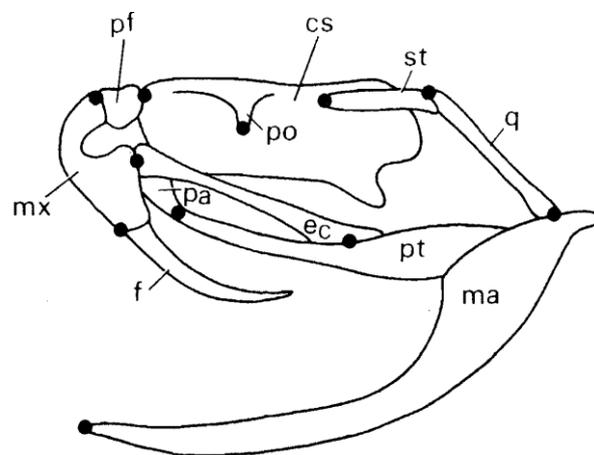


Figura 4: Esquema que muestra los elementos óseos del cráneo de un ofidio solenoglifo (Género *Crotalus*) visto lateralmente. Los círculos negros indican las uniones de los huesos que presentan desplazamientos kinemáticos. cs: caja craneana; ec: ectopterigoides; f: colmillo; ma: mandíbula; mx: maxila; pa: palatino; pf: prefrontal; po: proceso postorbital; pt: pterigoides; q: cuadrado; st: supratemporal (Extraído de Kardong *et al*, 1986).

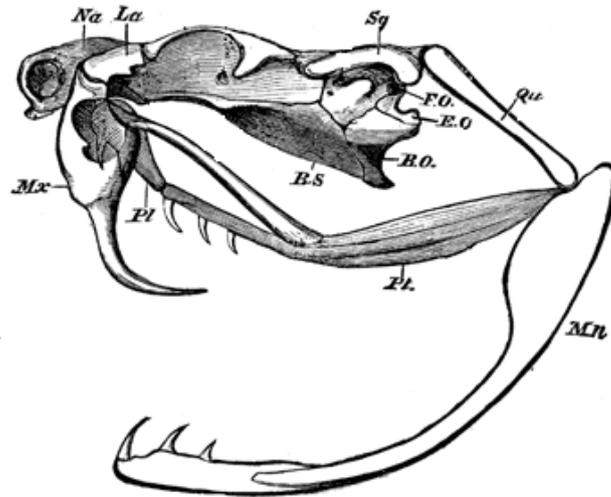


Figura 5: Cráneo de ofidio del género *Crotalus*, dentición solenoglifa. vista lateral. B.O._ basi-occipital, B.S._ basi-esfenoides, E.O._ exoccipital, F.O._ fossa ovalis, La_ unión lacrimal y pre-frontal, Mn_ mandíbula, Mx_ maxila, Na_ nasal, Pl_ palatino, Pmx_ pre-maxila, Pt_ pterigoides, Qu_ cuadrado, Sq_ escamoso. (Modificado de Parker & Haswell, 1900).

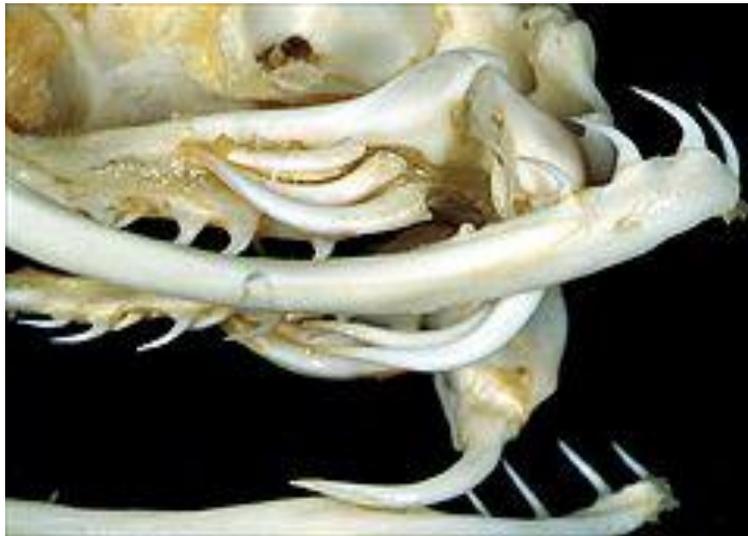


Figura 6: Cráneo de un ofidio solenoglifo (*Crotalus atrox*), visto ventrolateralmente. En el maxilar derecho se observan dos colmillos funcionales, uno en cada zócalo, que corresponde a una etapa durante el recambio de dientes. En el maxilar izquierdo hay un único colmillo funcional ocupando el zócalo interno, en ambos lados se aprecia una hilera de colmillos de reemplazo creciendo en posición ventral (Extraído de <http://zoltantakacs.com/>, Zoltan Takacs Home Base, derechos reservados).

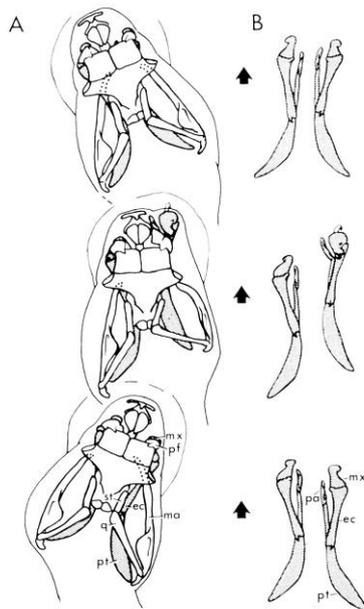


Figura 7: Vista dorsal de la posición de los huesos del cráneo dibujados a partir de diversas radiografías tomadas en cada una de las tres fases de ingesta: retención, avance y cerrar (en orden desde abajo hacia arriba). A_ muestra el desplazamiento de los huesos relacionados entre ellos y la rotación de la cabeza durante el ciclo de ingestión. B_ patrones de movimiento de los huesos de la unidad palato-maxilar (no se muestra el prefrontal). Se aprecia un desplazamiento lateral entre las maxilas, muy nítido en B. ec_ ectopterigoides, ma_ mandíbula, mx_ maxila, pa_ palatino, pf_ prefrontal, pt_ pterigoides, q_ cuadrado, st_ supratemporal (Extraído de Kardong, 1977).



Figura 8: Vaso de Bohemia con una lámina plástica cubriendo la abertura. Con este método se obtendrá un patrón de la mordedura del ejemplar durante el ordeño que será medido posteriormente (Foto: S. Carreira).



a)



b)

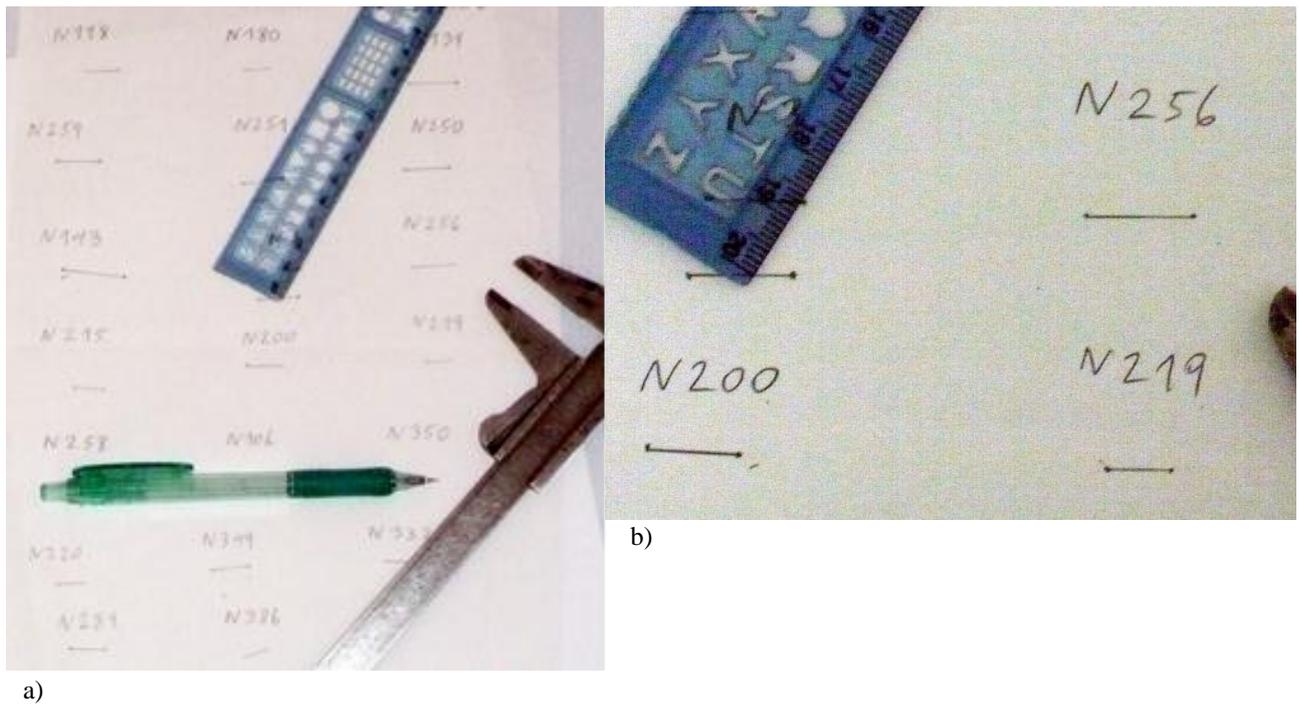
Figura 9: Etapa de ordeñe donde se efectúa un suave masaje sobre las glándulas de veneno del animal asegurando extraer el mayor volumen de veneno posible. a) nótese la posición de los dedos pulgar y mayor sujetando la cabeza del animal, mientras el dedo índice presiona la cabeza hacia abajo, provocando que el ofidio muerda hacia el centro del vaso de Bohemia y deje una nítida impresión de los colmillos sobre la lámina tirante de plástico. b) se aprecia con mayor claridad el veneno ya extraído dentro del vaso de Bohemia y una gota de veneno sobre la superficie de la lámina de plástico. Este caso se produjo con varios animales, por lo tanto se midió el volumen de las gotas con micropipetas dando un valor despreciable (Foto: S. Carreira).



Figura 10: En esta imagen se observan los colmillos de un ofidio, en éste caso dentición proteroglifa, perforando una lámina de plástico. A pesar de que el ejemplar no tiene el mismo tipo de dentición que la especie usada en este trabajo (con dentición solenoglifa), las flechas en la imagen muestran la perforación del plástico por parte de los colmillos (Modificado de <http://zoltantakacs.com/>, Zoltan Takacs Home Base, derechos reservados).



Figura 11: Lámina de plástico estirada con la mano sobre una hoja para marcar con un lápiz en el centro de los orificios dejados por los colmillos. Las manchas amarillas que se aprecian debajo de las marcas de los colmillos son resto de veneno seco. Una vez se marcó los orificios sobre la hoja de papel, se mide la distancia entre los mismos en la hoja con un calibre (Foto: S. Baletta).



a)

b)

Figura 12: Hoja de papel con marcas de las distancias entre colmillos de varios ejemplares: a) los puntos fueron unidos por una línea y se colocó el código de cada ejemplar para identificar cada dato, la distancia entre colmillos fue medida con un calibre, b) vista que muestra con más detalle las marcas de la Distancia entre Colmillos junto con el código del ejemplar (Foto: S. Baletta).

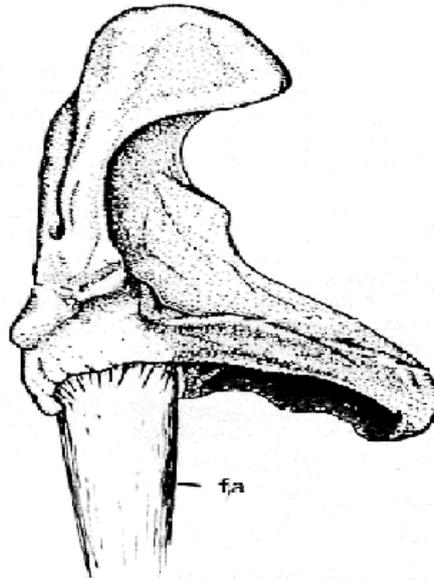


Figura 13: Vista posterior de hueso maxilar derecho donde se puede apreciar los zócalos para los colmillos, en el interno hay un colmillo funcional mientras que el externo está vacío. Sobre la base del hueso hay varios procesos que articulan con el borde anterior del ectopterigoides. fa_colmillo (Modificado de Kardong, 1974).

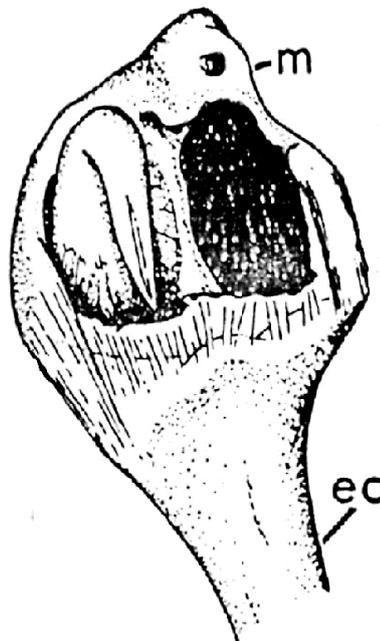


Figura 14: Vista ventral de la articulación maxilar-ectopterigoides derecha. Se aprecia los dos zócalos, uno con un colmillo funcional y el otro con el colmillo ausente. m_ maxilar, ec_ ectopterigoides (Modificado de Kardong, 1974).

Bibliografía

- Achaval, F. 2001.** Actualización sistemática y mapas de distribución de los reptiles del Uruguay. *Smithsonian Herpetological Information Service*, 129: 1–21.
- Acosta, O. 2003.** Fisiopatología y tratamiento de la intoxicación ofídica. Jornadas Latinoamericanas de Fármaco-toxicología Veterinaria. Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires. Sin paginar.
- Almeida, M. T. & Martins, M. 1999.** História natural de *Bothrops neuwiedi pubescens* (Serpentes, Viperidae). V Congreso Latinoamericano de Herpetología. Publicación Extra. Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo, 50: 26.
- Anthony, J. 1970.** Anatomie de l'appareil venimeux des reptiles. En: Grassé, P-P. (Ed). *Traité de zoologie*. Tomo XIV. Reptiles. Caractères généraux et anatomie. Fascicule II. Masson et C^{ie}, Paris. pp. 549-598.
- Campbell, J. A. & Lamar, W. W. 1989.** The venomous reptiles of Latin America. Comstock Publishing Associates, Ithaca. xii + 425 pp.
- Canavos, G. C. 1988.** Probabilidad y estadística. Aplicaciones y métodos. McGraw-Hill – Interamericana, Mexico. xx + 652 pp.
- Canavero, A.; Carreira, S.; Langone, J. A.; Achaval, F.; Borteiro, C.; Camargo, A.; da Rosa, I.; Estrades, A.; Fallabrino, A.; Kolenc, F.; López-Mendilaharsu, M. M.; Maneyro, R.; Meneghel, M.; Nuñez, D.; Prigioni, C. M. & Ziegler, L. 2010.** Conservation status assessment of the amphibians and reptiles of Uruguay. *Iheringia*, 100(1): 5-12.
- Carreira, S.; Meneghel, M. & Achaval, F. 2005.** Reptiles de Uruguay. Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Montevideo. 640 pp.
- De Biasi, P.; Belluomini, H. E.; Hoge, A. R. & Puerto, J. 1976/77.** Uso do gás carbônico na extração de veneno de serpentes. *Memorias do Instituto Butantan*, 40/41: 167-172.
- Deufel, A. & Cundall, D. 2006.** Functional plasticity of the venom delivery system in snakes with a focus on the poststrike prey release behavior. *Zoologischer Anzeiger*, 245: 249-267.

- Dowling, H. G. & Savage, J. M. 1960.** A guide to the snake hemipenis: A survey of basic structure and systematic characteristics. *Zoologica*, New York Zoological Society, 45(1): 17-31.
- Ernst, C. H. & Zug, G. R. 1996.** Snakes in question. The Smithsonian answer book. Smithsonian Institution, Washington. 203 pp., 64 figs.
- Fenwick, A.; Gutberlet Jr. R.; Evans, J. & Parkinson, C. 2009.** Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 156: 617- 640.
- Fitch, H. 1981.** Sexual size differences in reptiles. The University of Kansas Museum of Natural History, Miscellaneous Publication, 70: 1-72.
- Forsman, A. 1994.** Growth rate and survival in relation to relative head size in *Vipera berus*. *Journal of Herpetology*, 28(2): 231-238.
- Gomendio, M. 1994.** La evolución del cuidado parental. En: Carranza, J. (Ed.). *Etología. Introducción a la ciencia del comportamiento*. Universidad de Extremadura, Madrid. pp. 407-442.
- Grisolía, C. S.; Stanchi, N. O. & Peluso, F. O. 1986.** Relación entre el período de ayuno y cantidad de veneno extraído de ofidios en cautiverio. *Revista Argentina de Producción Animal*, 6 (7-8): 513-516.
- Hayes, W. K. 1992.** Factors associated with de mass of venom expended by prairie rattlesnakes (*Crotalus v. viridis*) feeding on mice. *Toxicon*, 30(4): 449-460.
- Hayes, W. K.; Herbert, S. S.; Rehling, G. C. & Gennaro, J. F. 2002.** Factors that influence venom expenditure in viperids and other snake species during predatory and defensive contexts. En: Schuett, G.; Hoggren, M. & Greene, H. (Eds.) *Biology of the vipers*. Biological Sciences Press, Traverse City, IL. pp. 207-233.
- Kardong, K. V. 1974.** Kinesis of the jaw apparatus during the strike in the cottonmouth snake, *Agkistrodon piscivorus*. *Forma et Functio*, (7): 327-354.
- Kardong, K. V. 1977.** Kinesis of the jaw apparatus during swallowing in the cottonmouth snake, *Agkistrodon piscivorus*. *Copeia*, 1977 (2): 338-348.

- Kardong, K. V. 1999.** Vertebrados. Anatomía comparada, función, evolución. 2ª Edición. McGraw-Hill – Interamericana. Madrid. xx + 732 pp.
- Kardong, K. V. & Lavin-Murcio, P. A. 1993.** Venom delivery of snakes as high-pressure and low-pressure systems. *Copeia*, 1993 (3): 644-650.
- Kardong, K. V.; Dullemeijer, P. & Fransen, J. A. M. 1986.** Feeding mechanism in the rattlesnake *Crotalus durissus*. *Amphibia-Reptilia*, (7): 271-302.
- Kinnear P. R. & Gray C. D. 2008.** SPSS 15 Made simple. University of Aberdeen Psychology Press, New York. xiii + 620 pp.
- Kochva E. 1960.** A quantitative study of venom secretion by *Vipera palaestinae*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 9: 381-390.
- Kochva, E. 1978.** Oral glands of the Reptilia. In: Gans, C. & Gans, K. A. (Eds.) *Biology of the Reptilia*. Vol. 8. Academic Press, London. pp. 43-161.
- Kochva, E. 1997.** The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Toxicon*, 1997. 25(1): 65-106.
- Kochva, E.; Oron, U.; Bdolah, A. & Allon, N. 1975.** Regulation of venom secretion and injection in viperid snakes. 4th International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins. *Toxicon*, (13): 104.
- Latifi, M. 1978.** Commercial production of anti-snakebite serum. In: Gans, C. & Gans, K. A. (Eds.) *Biology of the Reptilia*. Vol. 8. Academic Press, London. pp. 561-588.
- Leloup, P. 1973.** Essais de rationalisation dans le maintien d'un serpentarium à but industriel. *Acta Tropica*, 30 (4): 281-311.
- Lema, T. de. 1973.** As serpentes do estado do Rio Grande do Sul. *Iheringia, Série Divulgação*, 3: 19-33.
- McCue, M. D. 2006.** Cost of producing venom in three North American pitviper species. *Copeia*, 2006 (4): 818–8251.
- Meneghel, M. D. 1997.** Anatomía visceral y aparato circulatorio de los Crotalidae de Uruguay. Tesis de Maestría en Biología, opción Zoología. PEDECIBA, Montevideo. xii + 128 pp, 98 figs., 16 tabs.

- Meneghel, M. D. 1999.** Primer serpentario uruguayo para producción de suero antiofídico. Actas V Jornadas de Zoología del Uruguay. Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay 2^a ép., 11:31.
- Morales Fagundes, S. 1998.** Dimorfismo sexual en *Bothrops neuwiedi pubescens* (COPE, 1869) de Uruguay. Trabajo de pasaje de curso de Anatomía Comparada. Orientación Zoología Vertebrados. Facultad de Ciencias. Universidad de la República, Montevideo. 16 pp.
- Morales Fagundes, S. & Carreira Vidal, S. 2000.** Calificación del estado de conservación de la fauna de ofidios (Reptilia, Squamata, Serpentes) del Uruguay. Facena, 16: 45-51.
- Negrin, A. & Tortorella, M. N. 2006.** ¿Cómo se manifiesta el ofidismo en Uruguay? En: Carreira, S.; Negrin, A.; Tortorella, M. N.; Pino, A. & Menéndez, C. (Eds.) Ofidismo en Uruguay. Especies venenosas y características del accidente ofídico. CID/CEUR, Montevideo. pp. 41-58.
- Neira, P.; Jofré, L.; Oschilewski, D.; Subercaseaux, B. & Muñoz, N. 2007.** Mordedura por *Philodryas chamissonis*. Presentación de un caso y revisión de la literatura. Revista Chilena de Infectología, 24 (3): 236-241.
- Offerman, S. R.; Smith, S. & Derlet, R. D. 2001.** Does the aggressive use of polyvalent antivenin for rattlesnake bites result in serious acute side effects? Western Journal of Medicine, 175: 88-91.
- Parker, T. J. & Haswell, W. A. 1900.** A manual of zoology. The MacMillan Company, New York. xxv + 563 pp.
- Peñuela, G. 2004.** Reproducción en ofidios. Boletín GEAS, 4 (1): 5 - 12.
- Peters, J. A. 1964.** Dictionary of Herpetology. Hafner Publishing Company. New York and London. xii + 393 pp., 30 figures.
- Pino, A. & Menéndez, C. 2006.** Producción de suero antiofídico. En: Carreira, S.; Negrin, A.; Tortorella, M. N.; Pino, A.; Menéndez, C. (Eds.). Ofidismo en Uruguay. Especies venenosas y características del accidente ofídico. CID/CEUR, Montevideo. pp. 59-65.
- Pough, F. H.; Manis, C. M. & Heiser, J. B. 1999.** Vertebrate life. 5th edition. Prentice-Hall, New Jersey. xviii + 734 pp. + 4G + 20SI + 7AI.

- Pough, F. H.; Andrews, R. M.; Cadle, J. E.; Crump, M.L.; Savitzky, A.H. & Wells, K.D. 1998.** Herpetology. Prentice-Hall, New Jersey. xii + 579 pp.
- Pyron, R. A.; Burbrink, F. T.; Colli, G. R.; Montes de Oca, A. N.; Vitt, L. J.; Kuczynski, C. A. & Wiens, J. J. 2011.** The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and comparison of support methods for likelihood trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 58 (2): 329–342.
- Rubio, M. 1998.** Rattlesnakes: Portrait of a predator. Smithsonian Institution Press, Washington. xxxii + 240 pp.
- Simpson, G. G.; Roe, A. & Lewontin, R. C. 1960.** Quantitative zoology. Revised Edition. Harcourt, Brace and Company, Burlingame, NY. 440 pp.
- Tanen, D. A.; Ruha, A-M.; Graeme, K. A. & Curry, S. C. 2001.** Epidemiology and hospital course of rattlesnake envenomations cared for at a tertiary referral center in central Arizona. *Academic Emergency Medicine*, 8 (2): 177-182.
- Takacs, Z.** <http://zoltantakacs.com>, Zoltan Takacs Home Base --- último acceso 10.IV.2008.
- Tun Pe & Khin Aung Cho. 1986.** Amount of venom injected by Russell's viper (*Vipera russelli*). *Toxicon*, 24: 730–733.
- Vaz-Ferreira, R. & Sierra de Soriano, B. 1960.** Notas sobre reptiles del Uruguay. *Revista de Facultad de Humanidades y Ciencias*, 18: 133-205.
- Yamanouye, N.; Britto, L. R. G.; Carneiro, S. M. & Markus, P. 1997.** Control of venom production and secretion by sympathetic outflow in the snake *Bothrops jararaca*. *The Journal of Experimental Biology*, 200: 2547-2556.
- Young, B. A. & Zahn, K. 2001.** Venom flow in rattlesnakes: Mechanics and metering. *The Journal of Experimental Biology*, 204: 4345–4351.
- Young, B. A.; Lee, C. E. & Daley, K. M. 2002.** Do snakes meter venom? *BioScience*, 52(12): 1121-1126.
- Young, B. A. & Zahn, K.; Blair, M. & Lalor, J. 2000.** Functional subdivision of the venom gland musculature and the regulation of venom expulsion in rattlesnakes. *Journal of Morphology*, 246: 249-259.

Young, B. A.; Dunlap, K.; Koenig K. & Singer, M. 2004. The buccal buckle: the functional morphology of venom spitting in cobras. *The Journal of Experimental Biology*, (207): 3483–3494.

Agradecimientos

Un especial agradecimiento para el profesor Federico Achaval quien fue el primero que propuso este trabajo. A Santiago Carreira por iniciar con la investigación, material fotográfico y dirigir los ordeños. A Jorge Gastaldi, Pablo Miguez y Graciela Izquierdo por la ayuda estadística imprescindible. A Martín Bessonart y Raúl Maneyro por la ayuda estadística y apoyo. A Clara Menéndez por prestar material de laboratorio y enseñanza técnica en medidas de volúmenes de veneno. A Miguel Arocena, Victoria Gradín, Elazar Kochva y Marcello Machado que me facilitaron bibliografía desde el exterior. Al equipo del Bioterio de Animales Ponzosñosos por apoyo técnico en los ordeños. A Martín Baraibar por los datos usados en el Anexo III. A Sabrina Riverón por bibliografía, apoyo técnico y moral. A mi madre, mi hermana Bettina, la comunidad AsíEs, amigos y la familia Gastaldi que me apoyaron y empujaron para finalizar.