

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



TRABAJO DE GRADUACIÓN.

Manejo de víboras de cascabel (*Crotalus simus*) en serpentarios para la extracción, procesamiento y determinación del veneno con fines de investigación en El Salvador.

PRESENTADOR POR:

ELIZABETH MONSERRATH COTO HERNÁNDEZ.

**PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA.**

CIUDAD UNIVERSITARIA, ABRIL DE 2023

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



TRABAJO DE GRADUACIÓN.

Manejo de víboras de cascabel (*Crotalus simus*) en serpentarios para la extracción, procesamiento y determinación del veneno con fines de investigación en El Salvador.

PRESENTADOR POR:

ELIZABETH MONSERRATH COTO HERNÁNDEZ.

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA.

ASESORES DE LA INVESTIGACIÓN

DOCENTE ASESOR:

MSc. MIGUEL ÁNGEL MORENO MENDOZA

ASESOR EXTERNO:

LIC. JOSÉ GUILLERMO MEJÍA VALENCIA

CIUDAD UNIVERSITARIA, ABRIL DE 2023

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



TRABAJO DE GRADUACIÓN.

Manejo de víboras de cascabel (*Crotalus simus*) en serpentarios para la extracción, procesamiento y determinación del veneno con fines de investigación en El Salvador.

PRESENTADOR POR:

ELIZABETH MONSERRATH COTO HERNÁNDEZ.

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA.

TRABAJO DE GRADUACIÓN APROBADO POR

EL TRIBUNAL CALIFICADOR:

LIC. MILAGRO ELIZABETH SALINAS DELGADO

PhD. WILLBER DAVID CASTRO GODOY

CIUDAD UNIVERSITARIA, ABRIL DE 2023

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
GOBIERNO UNIVERSITARIO



ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO
RECTOR

DR. RAÚL ERNESTO AZCÚNAGA LÓPEZ
VICE-RECTOR ACADÉMICO

ING. JUAN ROSA QUINTANILLA
VICE-RECTOR ADMINISTRATIVO

ING. FRANCISCO ALARCÓN
SECRETARIO GENERAL

LIC. RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARÍN
FISCAL

LIC. LUIS ANTONIO MEJÍA LIPE
DEFENSOR DE LOS DERECHOS UNIVERSITARIOS

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
AUTORIDADES



LICDO. MAURICIO HERNÁN LOVO
DECANO

M.Sc. ZOILA VIRGINIA GUERRERO MENDOZA
VICEDECANA

LIC. JAIME HUMBERTO SALINAS ESPINOZA
SECRETARIO

LIC. DOUGLAS BLADIMIR ALFARO CHÁVEZ
ADMINISTRADOR ACADÉMICO

M.SC. ANA MARTHA ZETINO CALDERÓN
DIRECTORA INTERINA DE LA ESCUELA DE BIOLOGÍA

DEDICATORIA

A mi increíble familia por ser el pilar más importante en mi vida y apoyarme en cada paso de mi formación, especialmente a mi madre y padre por permitirme alcanzar la herencia más grande que puede existir para mí, que es la educación, a mi hermano, por ser ese ser con quien puedo contar toda la vida.

A mi amado Wilson Martínez (QDDG), por ser un ejemplo que seguir y mi inspiración, por darme todo el apoyo, los consejos y ánimos para iniciar con este sueño tan loco que se convirtió en realidad, desde la construcción de mi perfil hasta donde estoy como profesional, como diría él: *“porque tengo muchas formas de pensarte, pero busco en cada una tu sonrisa”*, gracias por tanto chico pargueta.

A cada una de incontables personas que creyeron en mí y dieron un poco de su tiempo para dar cada paso en esta gran trayectoria, un párrafo no alcanzará para agradecerles.

A mis mejores amigos/as: del Instituto (May Alas y Bri Valle), de la Universidad (Carlos Santos, Gaby Montes, Liss Cabrera, Saúl Gámez, Diego López, Fabi Amador) y de la vida como casualidad premeditada (Vivian Escalante) por siempre estar, dejarme ser, ayudarme a mejorar y dar un toque de felicidad a mi vida.

A mi sobrino Walter Dariel por venirle a dar un destello de magia y brillo inexplicable a mi vida con su reciente llegada, *“Que tus deseos, se conviertan en metas y objetivos, los cuales puedas cumplir con el fruto de tu esfuerzo y dedicación, porque querer es poder”*.

A Dios por darme la sabiduría y el entendimiento para cada decisión en mi vida personal, académica y profesional.

A mis amadas serpientes por ser parte fundamental de nuestro equilibrio ecosistémico, por permitirme conocerlas, protegerlas, conservarlas y poder dejar una pequeña huella a nuestra nación, porque como dijo Baba Dioum un conservacionista senegalés:

“Conservaremos sólo aquello que amamos, amaremos sólo aquello que entendamos y entenderemos sólo aquello que hayamos aprendido”

AGRADECIMIENTOS

A mi amada familia: Mi madre, mi padre, mi hermano por guiarme desde pequeña, aceptar, apoyarme en mis ocurrencias y creer siempre en mí.

A mis profesores iniciales señora Maybel y Profe Oscar Duque por creer que lograría ser esa científica que tanto quise ser. A mis docentes de la Escuela de Biología por sus enseñanzas y forjarme como profesional.

A mis asesores: Lic. Miguel Moreno por aceptar mi tesis, instruirme en mis pruebas experimentales y apoyarme en cada una de mis decisiones y Lic. Guillermo Mejía, por su apoyo incondicional en cada parte de mi tesis, por sus consejos, su confianza y por haberse convertido en un amigo en toda la trayectoria de mi proyecto. A Nils Santos mi mentor, por enseñarme desinteresadamente todos sus conocimientos como herpetólogo, especialista en serpientes venenosas, por compartir experiencias profesionales conmigo, por ser un gran amigo.

Al Dr. Saúl Díaz por apoyarme en el espacio físico de CENSALUD y en cada vez que fuera necesario, PhD. Willber Castro, por apoyarme en la continuidad de mi proyecto en CENSALUD. A mis instructores y consejeros de tesis: Dr. Marvin Núñez, Lic. Vladlen Henríquez, Lic. Milagro Salinas, Lic. Ulises Guardado, Lic. Gerardo Ruiz, MSc. Oscar Amaya, MSc. Francisco Chicas, Mis amigos y colegas Carlos Santos, Jaime Mejía, Ana González, Leonel Palomo, Carlos Avilés, Wilson Martínez (QDDG). Mis amigos veterinarios Manuel Cortez y Miguel Chopin. Colaboradores del proyecto Rubén Darío, Erick Hernán, Juan Pascual, Cinthya Doñan, Raúl Magarín, Ana Margarita Pérez, Rodrigo Aymerich, Guillermo Argueta, Nicolas Santos, Wilfredo Pérez, Josué Alfaro, Kevin Alfaro, infinitos agradecimientos.

A la Iniciativa Centroamericana sobre Serpientes del cual soy parte, por instruirme y permitirme aprender de sus experiencias cada mes e involucrarme en sus proyectos, al programa de Ofidismo de la Universidad de Antioquia por abrirme un espacio y compartir el conocimiento de cada uno de ellos durante varias semanas, al Dr. Neri Castro por su valiosa asesoría en mis momentos de crisis, a las diversas entidades que hicieron posible esta investigación: Ministerio del Medio Ambiente y Recursos Naturales (MARN), Ministerio de Salud (MINSAL), Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), Laboratorio de Experimentación Animal (LEA), Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Laboratorio de Toxinas Marinas, de la Universidad de El Salvador.

A mi incondicional mejor amiga Fabiola Amador y su madre (Mayra Amador) por el apoyo en muchas fases de esta locura de tesis *“Una amistad de hormigas, unidas siempre amigas”*, a Vivian Escalante por darme los ánimos que necesité para culminar esta gran etapa y ser tan pura vida conmigo.

INDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
3. MARCO TEÓRICO	15
4. METODOLOGÍA.....	27
Metodología de campo.	27
Descripción del área de estudio.....	27
Metodología para la elaboración del manual de procedimientos de manejo de <i>Crotalus simus</i> , en cautiverio con fines de investigación en El Salvador.	28
Metodología para establecer el protocolo de extracción y de procesamiento de veneno de <i>Crotalus simus</i> con fines de investigación en El Salvador.	28
Animales experimentales.....	29
Determinación de la Dosis Letal Media del veneno (DL50).....	29
Procedimiento.....	29
Análisis estadístico	29
5. RESULTADOS:.....	30
6. DISCUSIÓN.....	40
7. CONCLUSIONES.....	43
8. RECOMENDACIONES	44
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
10. ANEXOS.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Componentes principales de venenos de serpientes.....	18
Tabla 2: Nombre de los procedimientos descritos en el manual de procedimientos de manejo de <i>Crotalus simus</i> , en cautiverio.....	31
Tabla 3: Rendimiento de veneno por individuo.....	37
Tabla 4: Rendimiento de veneno por estadio.....	37
Tabla 5: $0/4 = N^{\circ}$ de ratones muertos / N° de ratones inoculados.....	38
Tabla 6: Predicciones inversas obtenidas del modelo ajustado de la DL50.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sitios de registro y distribución potencial en El Salvador de víbora de cascabel (<i>Crotalus simus</i>)	16
Figura 2. Relación entre el tamaño total de la serpiente (cm) con el peso seco del veneno(mg).....	37
Figura 3. Diagrama de dispersión, curva de regresión y valores de pruebas estadísticas de los datos experimentales sobre la actividad letal del veneno.....	39

RESUMEN

La serpiente víbora de cascabel (*Crotalus simus*) es la especie más recurrente en accidentes ofídicos en El Salvador. Los estudios respecto a estos individuos son casi nulos y aún más hablando de su veneno en el país. Esta investigación, documenta el manejo específico de esta especie en cautiverio dentro de un serpentario para garantizar de manera eficaz y segura los diversos procesos que en él se realizan, siendo esta la base fundamental del estudio de veneno, destacando que se llevó a cabo la estandarización de los protocolos para la extracción y procesamiento de este, haciendo énfasis que el estudio de venenos desencadena una serie de investigaciones a futuro sobre diversas actividades biológicas que pueden realizarse dentro del país, encaminadas en el mundo de la venómica y proteómica. La caracterización de las actividades tóxicas de los venenos de serpientes es necesaria para el entendimiento de los procesos fisiopatológicos que se producen ante su mordedura; como también, para evaluar la potencia neutralizante de los antivenenos utilizados para tratar estos envenenamientos; proyectándose incluso a poder realizar la fabricación o búsqueda de un antiveneno de origen natural, trabajar con organismos nativos reduce costos y da una respuesta oportuna para la ciencia aportando a la reducción de la probabilidad de mortalidad y morbilidad en personas afectadas por accidentes ofídicos en el país.

Por otro lado, enriquecerá el conocimiento sobre este tipo de reptiles, aportará para la investigación de dichas especies y abrirá una nueva brecha para la ciencia en El Salvador. Además, en dicha investigación se trabajó con el veneno de esta especie con pruebas experimentales en ratones albinos suizos cepa Balb/C, para determinar la Dosis Letal Media (DL50), donde los valores correspondientes a esta actividad fueron diferentes, comparados con la población de Costa Rica; en cuanto a Guatemala presentó una mayor similitud.

1. INTRODUCCIÓN

Las serpientes y su importancia se derivan de sus exclusivas condiciones biológicas, su compromiso en la ecología, siendo un importante eslabón en la cadena alimenticia y en el equilibrio biológico, algunas por su toxicidad, causan morbilidad, mortalidad y secuelas de gran trascendencia tanto funcionales como económicas a la población. Gracias a su toxicidad se ha elaborado medicamentos de gran utilidad, el estudio de su veneno ha servido para descubrir grandes avances en la medicina como: mecanismos fisiológicos en la coagulación sanguínea, neurofisiológicos en la transmisión nerviosa y patológicos como la *Miastenia gravis*. Además de su impacto psicoemocional en el ser humano (Ángel, 2017).

Las mordeduras causadas por serpientes representan un riesgo para la salud pública en áreas tropicales y subtropicales del mundo (Mebis, 2002). La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha estimado que anualmente 5 millones de personas son mordidas por serpientes, de las cuales 2.5 millones presentan indicios de envenenamiento, causando 125,000 defunciones (Vásquez y Almendaño, 2009). La información epidemiológica sobre el envenenamiento ofídico en Centro América es escasa e incompleta, el número total de envenenamientos ofídicos en Centroamérica podría oscilar entre 4,500 y 5,000 casos por año, con cerca de 250 muertes; sin embargo, es probable que en algunos países exista un subregistro de casos, dado que el número exacto de personas no ha sido determinado porque no todos los afectados acuden a los centros de salud después de una mordedura (ICP, 2009).

En El Salvador desde el año 2010 al 2012, se han reportado 300 accidentes ofídicos por año (De Palma et al., 2013). En el 2015 se notificaron 4 muertes (Gutiérrez et al., 2020), en el año 2016 solo una muerte y 315 casos de personas mordidas por serpientes venenosas, el 68% (213) de los casos fueron ingresados para su tratamiento (De Palma, 2016). En el último quinquenio (2017 al 2021), se reportan 1,982 casos de ofidismo dando un promedio de 396 casos por año, de los cuales 923 necesitaron hospitalización, correspondientes a 184 hospitalizados por año (CIATOX, 2022). El domicilio de los casos es mayor en el área rural que en el área urbana, los departamentos con más incidencia son Santa Ana, Chalatenango, La Libertad y La Unión, se presentan en todos los meses del año especialmente en la época (lluviosa) de invierno, donde se incrementa la exposición debido a los cultivos en el área rural, crecimiento de la vegetación, incremento de búsqueda de alimentos por las serpientes debido a la fase de gestación y parto (CIATOX, 2022; De Palma et al., 2013, 2016; Gutiérrez et al., 2020). En el país los tipos de serpientes venenosas con más registros de mordeduras son: víbora cascabel (*Crotalus simus*) 50%, víbora castellana (*Porthidium ophryomegas*) 32%, seguida del tamagás

(*Agkistrodon bilineatus*) y el coral (*Micrurus nigrocinctus*). La parte anatómica más afectada son los pies (50%), las manos (41%). En estos casos, el acceso a suero antiofídico de origen equino es un serio problema, ya que el sistema de salud pública no cuenta con la fabricación de este, debido a la falta de un centro especializado que lo produzca, deben al importarse de Costa Rica, lo cual provoca un aumento de la probabilidad de morbilidad, mortalidad y dificultades en el tratamiento adecuado por accidentes ofídicos (De Palma et al., 2013; MINSAL, 2012).

En la actualidad, los estudios de actividades tóxicas, caracterización química, molecular y física de los venenos de serpientes, ayudan al mejor entendimiento de los procesos bioquímicos y fisiopatológicos que producen éstos posterior a la mordedura de serpientes, lo que aumenta el potencial neutralizante de los sueros antiofídicos cuando son administrados oportunamente (Roodt et al., 2005).

El Salvador no ha desarrollado acciones en el tema del ofidismo, a pesar de que las mordeduras por serpientes venenosas son consideradas como una enfermedad tropical desatendida y de la pobreza según la OMS en el 2019, generan un problema de salud pública, creando la necesidad de establecer un laboratorio especializado en el estudio de serpientes, que inicie con las primeras investigaciones científicas y tecnológicas, enfocadas principalmente sobre estudios de venenos y toxinas producidos por serpientes, estrategias para producir sueros antiofídicos, aplicaciones biotecnológicas de las toxinas y venenos de serpientes, con nuevos conocimientos que generarán la actividad investigativa de gran aporte para la ciencia en El Salvador, dándose a conocer a la comunidad científica internacional a través de publicaciones en revistas especializadas y aportando al mismo tiempo en la participación de charlas, capacitaciones, seminarios, talleres, congresos, etc. Dentro y fuera del país. En este sentido, el objetivo de la presente investigación fue: implementar el manejo de víboras de cascabel (*Crotalus simus*), para la extracción, procesamiento y determinación del veneno con fines de investigación en El Salvador. Esta información constituye una herramienta valiosa y fundamental, ya que; proporciona los conocimientos para desarrollar futuras investigaciones dentro del país.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

- Implementar el manejo de víboras de cascabel (*Crotalus simus*), para la extracción, procesamiento y determinación del veneno con fines de investigación en El Salvador.

Objetivos específicos

- Elaborar un manual de procedimientos de manejo de *Crotalus simus*, en cautiverio con fines de investigación en El Salvador.
- Establecer un protocolo de extracción y procesamiento de veneno de *Crotalus simus* con fines de investigación en El Salvador.
- Determinar dosis letal media del veneno de *Crotalus simus*, en ratones experimentales (*Mus musculus*) cepa Balb/C con fines de investigación en El Salvador.

3. MARCO TEÓRICO

En la actualidad más de 2,900 especies de serpientes son reconocidas mundialmente. Este grupo de vertebrados se encuentra en la Clase Reptilia, dentro del Orden Squamata (con escamas), y dentro de éste se agrupa en el Suborden Serpentes (ofidios o serpientes) (Solórzano, 2004).

Las serpientes en El Salvador se agrupan en 9 familias, 41 Géneros y 61 especies (Köhler et al., 2006; Morán et. al., 2015; Coto, et al., In Press; 2023), de las cuales la familia Viperidae destaca por poseer a los miembros que causan la mayoría de los accidentes ofídicos (envenenamientos por mordedura por serpiente). Dentro de la Familia Viperidae la serpiente *Crotalus simus*, comúnmente llamada cascabel, se destaca por ser una especie de gran tamaño y ser considerada como problema de salud pública por los envenenamientos ofídicos que provoca. La distribución del género *Crotalus* se extiende desde México, donde habitan la mayor cantidad de especies, hasta el Norte de Argentina (Campbell y Lamar 1989, 2004).

Este género moderadamente largo es solamente del nuevo mundo; su nombre viene del griego *Krotalon*, que significa “chinchin”. *Crotalus simus* es una especie muy grande, pesada y peligrosa serpiente. La presencia de un cascabel en la punta de la cola es quizás el rasgo que posiblemente mejor la diferencie de las otras venenosas. Los machos pueden medir hasta 1.6 metros, mientras que las hembras solo 1.5 metros. La cabeza presenta forma triangular si se le observa dorsalmente, y se observa una diferencia con respecto al cuello. Los ojos son grandes con apariencia rugosa. La cola termina en cascabel queratinizado. Las glándulas de veneno son bastante grandes y los dientes inyectoros muy largos. Su color es amarillento con una serie de grandes rombos oscuros marginados de claro; en los costados ostenta unos puntos grandes entre los rombos. En el cuello tienen dos largas rayas longitudinales, muy características de la especie. La región ventral es blanco amarillento (Álvarez, 1984; Lee, 1996; Campbell, 1998; Solórzano, 2004).

Esta serpiente es terrestre y posiblemente diurna, crepuscular o nocturna dependiendo de la época del año. Durante los meses fríos del año son encontradas regularmente de día, mientras que en los meses con más calor de la época lluviosa su actividad tiende a ser crepuscular y nocturna. Su tamaño y disposición impredecible hacen de esta serpiente, una de las más peligrosas de Centro y Sur América. La postura de defensa además de ser peculiar es espectacular. Se alimenta de roedores y otros mamíferos pequeños, aunque ocasionalmente puede comer aves y lagartijas. Esta serpiente al igual que otras del género *Crotalus* es vivípara. Las hembras pueden dar de 15-47 neonatos, los cuales pueden medir de 31 a 32 cm (Campbell, 1998; Köhler et al., 2006; Lee, 1996).

Su distribución ecológica en El Salvador es de Bosque Tropical Deciduo Latifoliado de Tierras Bajas, Bosque Tropical Semideciduo Latifoliado de Tierras Bajas, Submontano y Montano Inferior, Bosque Tropical Semideciduo Mixto Submontano y Montano Inferior, Sabanas y Vegetación Primaria sobre Lava Volcánica. Puede habitar en zonas de cultivo. Se distribuye entre el nivel del mar y los 2,000 msnm. Esta víbora tiene registro a nivel nacional (Figura 1) en los departamentos de Ahuachapán, La Unión, San Salvador, San Vicente, Sonsonate (Köhler et al., 2006), La Libertad (Köhler et al., 2006; Morán, 2013), Santa Ana (Henríquez 2010; Köhler et al., 2006; Vreugdenhil et al., 2011), Cuscatlán, Cabañas, Chalatenango, San Miguel (Herrera et al., 2007) y Morazán (Vreugdenhil et al., 2011).

El estatus de conservación de esta especie a nivel mundial aún no ha sido evaluado. A nivel nacional la especie se encuentra listada como Amenazada de Extinción (MARN, 2015). Esta especie sufre bastante presión por parte de la población ya que se cree que su carne posee propiedades curativas para enfermedades de la piel e incluso para el cáncer. Se han encontrado restos de esta serpiente en casas de los pobladores e incluso en muchas ocasiones son encargos que realizan hierberos a la gente local para poder vender el producto en los negocios que poseen (Henríquez, 2013). La especie *Crotalus simus* es la única serpiente venenosa de El Salvador que se clasifica en la categoría 1 de mayor importancia médica (WHO, 2017).



Figura 1. Sitios de registro y distribución potencial en El Salvador de víbora de cascabel (*Crotalus simus*) (Henríquez et al, 2023).

Las serpientes venenosas tienen en común la capacidad de inocular veneno a través de dientes especializados llamados colmillos (Costa y Giordano, 2014), éstas utilizan sus venenos para matar y algunas veces inmovilizar a sus presas (en la mayoría de los casos vertebrados) así como para defensa en contra de depredadores (Lomonte et al., 2014). Dicho veneno es producido en las glándulas especializadas que, filogenéticamente, son los equivalentes a las parótidas, estas glándulas presentan células de tipo epitelial que vierten su secreción en canalículos que desembocan en un receptáculo (lumen), en donde es almacenada hasta su expulsión. El lumen continúa por un conducto que desemboca en el canal del colmillo inoculador (Bolaños, 1984).

Los venenos de serpiente son mezclas complejas de moléculas biológicas que perturban los sistemas fisiológicos vitales de manera efectiva, en especial aquellos relacionados con el movimiento, la respiración y circulación (Das et al., 2011; Koh y Manjunatha, 2011). Este contiene alrededor de un 25% de sólidos totales de los cuales entre un 70-90% están constituidos por proteínas y polipéptidos de relativamente alto peso molecular, esta alta concentración de sólidos le confiere al veneno alta viscosidad. El resto de los componentes (10-30%) lo forman sustancias orgánicas de bajo peso molecular, tales como carbohidratos, péptidos pequeños, aminoácidos libres, aminas y nucleótidos, como también compuestos inorgánicos y elementos, tanto aniónicos como catiónicos (Bolaños, 1984).

Estos venenos ofrecen percepciones interesantes y con frecuencia únicas dentro de campos biológicos como la farmacología (descubrimiento de drogas) (King, 2011) inmunología (terapias para envenenamientos) (Harrison et al., 2011; Williams et al., 2011), y biología estructural (unión e interacción de proteínas) (Dutertre y Lewis, 2010). La investigación de la composición de estos venenos y la caracterización de sus componentes tóxicos es de vital importancia en la comprensión de la fisiopatología de los envenenamientos y por lo tanto el desarrollo de tratamientos adecuados (Bénard et al., 2014), esto es de particular relevancia para las poblaciones de serpientes de diferentes áreas geográficas con componentes hemorrágicos y/o neurotóxicos en sus venenos (Martínez et al., 2013).

Un aspecto importante en el estudio y composición de los venenos es la variación ontogenética (Calvete et al., 2010; Lomonte et al., 1983; Mackessy et al., 2003). Entre los distintos estadios de vida de las serpientes los venenos se pueden presentar con composiciones bioquímicas y farmacológicas bastante distintas (Tabla 1), observándose esta diferencia más pronunciada entre vipéridos que elápidos (Mackessy, 2010).

Tabla 1: Componentes principales de venenos de serpientes (Mackessy, 2010).

Nombre del componente	Actividad biológica
Enzimas	
Fosfodiesterasa	Depleción de di-trinucleotidos y nucleótidos cíclicos; hipotensión
5'-Nucleotidasa	Liberación de nucleósidos
Fosfomonoesterasa Alcalina	Incierto
Hialorunidasa	Disminuye la viscosidad intersticial, difusión de los componentes del veneno
L-amino ácido oxidasa (homodimero)	Inducción de apoptosis, daño celular
Metaloproteinasas de veneno de serpientes: M12 reprotisinas PIII, PII, PI	Hemorragia, mionecrosis, coagulopatías, predigestión de la presa
Serino proteasas tipo trombina	Depleción rápida de fibrinógeno; alteración de la homeostasis
Tipo kalickreina	Induce una caída rápida en la presión sanguínea, inmovilización de la presa
“Arginina esterasa”	Incierto; predigestión de la presa tal vez
Enzimas fosfolipasas A_2 (Grupo II)	Miotoxicidad, neurotoxicidad, inducción de edema, hidrólisis de fosfolípidos
Proteínas no enzimáticas/péptidos	
Proteínas secretorias ricas en Cisteína (CRisPs)/helveprinas	Induce hipotermia, inmovilización de la presa
Factores de crecimiento de nervios	Desconocido, se presume apoptosis
Algunas subunidades de neurotoxinas pre-sinápticas	Contribución a la neurotoxicidad potenciando la acción de la subunidad PLA_2
Letinas tipo C	Anticoagulante, modulador plaquetario
Desintegrinas	Inhibición plaquetaria; promueve hemorragia
Miotoxinas no PLA_2	Mionecrosis, analgesia, inmovilización de la presa
Péptidos potenciadores de bradiquinina	Dolor, hipotensión; inmovilización de la presa
Inhibidores tripéptidos	Estabilización de los componentes del veneno
Compuestos orgánicos pequeños	
Purinas y pirimidinas	Hipotensión, parálisis, apoptosis, necrosis; inmovilización de presa
Citrato	Estabilización del veneno, inhibición de hidrolasas

Los envenenamientos por mordeduras de serpientes de la familia Viperidae, subfamilia Crotalinae son caracterizados por prominentes alteraciones a nivel local; incluyendo hemorragia, edema, formación de ampollas y necrosis, efectos que pueden resultar en secuelas permanentes; desarrollándose muy rápidamente después del envenenamiento (Gutiérrez et al., 2000). Estos no sólo son los venenos más complejos, en comparación con los de los venenos de otras familias, sino también contienen las proteínas de mayor peso molecular. El grado de envenenamiento resulta de la combinación de los diferentes efectos producidos por

los componentes proteicos presentes en el veneno (Incio et al., 1993; Gutiérrez et al., 2000; Lomonte et al., 1993; Otero et al., 1992, 1996).

Los venenos de las serpientes poseen una composición variable, también existen diferencias importantes en las actividades enzimáticas y clasificados en efectos locales y sistémicos no sólo entre distintas especies de la misma familia, sino también diferencias intraespecíficas entre poblaciones de distintas zonas geográficas (Franischetti et al., 2000; Otero et al., 1992). Como consecuencia, los venenos de las diferentes especies y entre individuos de la misma especie, pero de distintas poblaciones, producen distintos efectos locales y sistémicos, por lo que se requiere un tratamiento clínico diferente para cada caso (Ferreira et al., 1992).

Manutención de serpientes en cautiverio

Establecer colonias de serpientes en condiciones de cautiverio es importante no solo para mejorar nuestro entendimiento de la biología de las serpientes, sino que también para contar con fuentes de venenos para la inmunización de los animales empleados como fuente de inmunoglobulinas, para la producción de antivenenos ofídicos (Gómez, 2015)

Dependiendo del uso que se le dé a la colección (exhibición o producción de veneno), las serpientes son manejadas de modo diferente, lo cual las expone a diferentes grados de estrés. Por ejemplo, las serpientes empleadas en la producción de antivenenos son periódicamente anestesiadas y sometidas a procedimientos de extracción de veneno, lo cual en el largo plazo les produce un deterioro de sus glándulas de veneno, que no ocurre en las serpientes destinadas a exhibición (Giannotti et al., 2013).

Para la manutención de serpientes en cautiverio, además de los cuidados a la hora de manipular serpientes venenosas para la obtención del veneno, se deben considerar los aspectos ambientales específicos de cada especie de serpiente, tales como temperatura y humedad relativa. En el caso de *Crotalus simus* se mantiene por debajo del 80% de humedad relativa y entre 26°C y 28°C (Manual de Procedimientos del Serpentario, 2015).

Los recintos empleados para la manutención de serpientes tienen que ser de un tamaño apropiado para la talla del animal, proporcionar un gradiente térmico y un sustrato adecuado. Todo esto con el fin de asegurar el bienestar de las serpientes cautivas que conforman una colección (Ashley y Burchfield, 1968; Murphy y Armstrong, 1978).

Se ha documentado que los primeros tres meses en cautiverio son los más críticos en términos de supervivencia y adaptación en serpientes capturadas en la naturaleza (Braz et al., 2012), la incapacidad para adaptarse al entorno en

cautiverio, es conocida como síndrome de mala adaptación o inadaptación al cautiverio, ha sido reconocida como la principal causa de muerte en reptiles en cautiverio (Cowan, 1980; DeNardo, 2006). Este síndrome se define como los efectos patológicos del estrés en un animal relacionado con el ambiente de cautiverio y puede causar anorexia y emaciación, entre otras consecuencias (Cowan, 1968). Incluso cuando el cautiverio proporciona las condiciones físicas adecuadas, no existe garantía de que un animal pueda prosperar en cautiverio (DeNardo, 2006).

Construcción de terrario

En el momento de construir un terrario normalmente se tienen en cuenta dos aspectos, uno de ellos es el bienestar animal y posiblemente el más importante (Mattison, 1982). Este aspecto incluye las necesidades para una vida óptima del animal, dentro de un terrario que simule lo mejor posible su hábitat natural y su tamaño, cuya longitud diagonal debe corresponder al menos a la longitud total del animal (Mader, 2006; Raiti, 2012).

Temperatura

En general las serpientes necesitan de 5 cosas que comprenden la calefacción, el sustrato, el refugio, la iluminación y el agua. Los terrarios deben tener un gradiente de temperatura para que la serpiente pueda regular su temperatura corporal. Lo anterior se logra creando una zona fresca y una zona cálida. La serpiente rotará en estas dos zonas dependiendo de sus necesidades (Mattison, 1982).

Algunas personas no recomiendan el uso de las planchas pues el calor puede ser muy localizado. Las serpientes grandes que tienen piedras o planchas térmicas generalmente se enrollan encima de ellas, permaneciendo un periodo de tiempo prolongado, lo que aumenta el riesgo de quemaduras en la piel (Mader, 2006). Las zonas de temperatura fresca se logran creando escondites con troncos, cortezas o con algún sustrato que permita a la serpiente enterrarse (Mattison, 1982).

Iluminación

Algunas personas aseguran que el mejor método de iluminación es la luz solar, pues esta luz ofrece todos los rangos del espectro ultravioleta. Los rayos UV permiten la síntesis de vitamina D3, importante para regular el metabolismo de calcio y minerales (Brames, 2006). En cautiverio se ha observado distintos individuos que deben alimentarse forzosamente, tal vez afectados por la escasa luz solar que reciben dentro de un terrario (Mader, 2006).

Si el espacio es cerrado se puede disponer de fuentes de iluminación, incluyendo luz ultravioleta. Los tubos fluorescentes con luz UV han sido muy utilizados por los beneficios mencionados (Brames, 2006). Sin embargo, es importante tener en cuenta el momento de mayor actividad del animal, es decir si es crepuscular,

nocturno o diurno, pues los animales nocturnos no necesitan rayos UV en tan alta cantidad. Los rayos UV pueden ser dañinos en exceso para los animales, en especial los animales nocturnos y crepusculares. Los rayos UV pueden causar cataratas y daños en la retina en algunos animales (Adkins et al., 2003). Es posible que estos daños se puedan presentar en mayor grado en animales nocturnos, por lo tanto, no es recomendable sacarlos al sol pues es una conducta que no realizan en libertad, ni disponer de gran cantidad de luz dentro del terrario (Mader, 2006).

Humedad y ventilación

La ventilación está relacionada de manera importante con la humedad en un terrario. Es necesario siempre informarse del hábitat natural de la especie que se mantiene en cautiverio, pues claramente la humedad es distinta en un desierto, en una selva tropical o en un bosque seco. La humedad se puede disminuir aumentando los orificios de ventilación en el terrario. Si se busca un terrario con gran humedad se deben quitar agujeros de ventilación para que el agua evaporada permanezca en el terrario. Es posible incrementar la humedad colocando un recipiente de agua cerca a la fuente de calefacción o realizando aspersiones diarias con agua (Mattison, 1982).

Los terrarios deben colocarse en lugares donde no haya fuertes corrientes de aire, pues será difícil controlar la temperatura y humedad. Se deben evitar los extremos, pues la humedad en exceso puede traer infecciones cutáneas debido a hongos y problemas respiratorios. Poca humedad podría desencadenar problemas en la muda, pues como se indicó anteriormente es recomendable aumentar la humedad durante la muda (Mader 2006). Se recomienda instalar un recipiente con agua en donde la serpiente pueda sumergirse si así lo desea (Mattison, 1982).

Sustrato

En el momento de disponer el sustrato se debe tener en cuenta ciertos parámetros. El sustrato debe ser fácil de limpiar y contener una baja carga de microorganismos. No debe causar obstrucciones en el sistema digestivo por ingestión accidental. El sustrato debe asimilar las condiciones del hábitat natural para que el animal pueda desenvolverse apropiadamente (Mader, 2006). Algunos de los sustratos más usados son los siguientes:

- Las toallas de papel y el periódico facilitan la higienización, aunque es preferible utilizar este último sin tinta a color pues pueden ser tóxicas (Mattison, 1982).
- La fibra de coco y la turba rubia también son utilizadas frecuentemente para los terrarios (Mader, 2006). Estos sustratos son usados con fines agrícolas, por tal motivo se debe buscar un producto libre de fertilizantes y pesticidas.
- La arena cálcica es recomendada por algunas personas que aseguran que no causan impactación por ser de calcio. Normalmente la arena no se

recomienda debido a que la ingestión accidental es muy común (Mader, 2006).

Refugio

Para disminuir el estrés de un animal en cautiverio se debe disponer de un refugio en el cual el animal pueda ocultarse por completo (Mader, 2006; Raiti, 2012). Como se ha mencionado anteriormente la muda para las serpientes es un periodo estresante y son más irritables, por tal motivo suelen esconderse durante esos días. Los ofidios también necesitan esconderse durante los momentos de inactividad y en el periodo de hibernación (Mattison, 1982).

Alimentación

Las serpientes son oportunistas en cuanto a su alimentación, es decir que pueden pasar meses sin comer y se comerán una presa de gran tamaño si tienen la oportunidad. Lo anterior hace que el estudio del apetito de las serpientes sea interesante. Aparentemente la saciedad es una respuesta por cambios a nivel hormonal y demás factores fisiológicos (Nielsen et al., 2011). Se debe tener en cuenta que existen especies especialistas, por eso siempre se debe investigar sobre la serpiente que se desea mantener. La frecuencia de alimentación varía con la edad y con la especie. Los animales infantiles requieren alimentarse dos veces a la semana, mientras que los adultos pueden alimentarse una vez a la semana teniendo en cuenta el peso de la dieta (Mader, 2006).

En el caso de los viperidos hacen intervalos más largos y sobre presas de mayor tamaño, se sabe de tiempos de supervivencia muy largos, en completo ayuno (Murphy y Henderson, 1997; Green, 1997), según Gasc 1994 el tiempo de supervivencia de ayuno en *Crotalus durissus* es de 26 meses.

En cautividad en los zoológicos y serpentarios las serpientes aceptan ratones, ratas o pollos cada 10 a 15 días en cantidad acorde con la receptividad de la especie y su tamaño. Sin embargo, cuando se reúnen las condiciones adecuadas del refugio, como temperatura, humedad, oscuridad y habilidad del cuidador, las serpientes aprenden a comer animal muerto, aun en el estado de descomposición. También se ha podido mantener serpientes vivas en buen estado de salud durante varios años, mediante el suministro de animales previamente procesado y conservado en refrigeración, lo mismo que bajo dietas artificiales que tienen la ventaja de ser balanceadas y libres de parásitos. Algunas especies adultas de *Lachesis muta* y *Crotalus durissus terrificus* en cautiverio rechazan generalmente el alimento (Ángel, 2017).

En especies venenosas cazar presas vivas representa un beneficio metabólico ya que el envenenamiento funciona como un proceso de predigestión. Permitir que las serpientes se estimulen y realicen actividad física ayuda a mantener a un reptil

depredador en mejores condiciones que en un entorno estacionario, estancado y libre de estímulos. Se recomienda alimentar a las serpientes con presas criadas en cautiverio y no con presas silvestres capturadas, debido a que estas últimas pueden ser vectores de parásitos, bacterias, hongos o virus (Rossi, 2005).

Para serpientes que tienen problemas o que requieren privacidad para alimentarse, se recomienda ofrecerles los alimentos al final del día y abandonar las instalaciones para evitar distracciones o la inducción de un comportamiento defensivo durante el proceso de alimentación de la serpiente. La alimentación forzada siempre debe ser un último recurso, en caso de que el espécimen siga rechazando los alimentos y presente pérdida de peso crítica. En estos casos ofrecer presas enteras debe reanudarse tan pronto como sea posible (AZA, 2009).

Las serpientes que son capturadas del medio silvestre o neonatas en algunos casos no reconocen las ratas que se les ofrecen como una presa debido a la diferencia de olor a sus contrapartes salvajes. En estos casos lo recomendable es alentar a la serpiente a alimentarse de presas naturales ya sean peces, ranas o serpientes y posteriormente colocarles los ratones con estos olores. En el caso de los neonatos, en vida silvestre se alimentan casi exclusivamente de invertebrados, anfibios y pequeños reptiles, estos pueden responder bien frente al aroma de ratones recién nacidos roseados con agua de sardina enlatada (sin sabor), yema de huevo cruda o un trozo de piel de otra especie de serpiente (AZA, 2009).

Signos y enfermedades que considerar mientras los especímenes se encuentren en cautiverio:

Las enfermedades en los reptiles pueden ser difíciles de detectar y cuando esto sucede puede ser demasiado tarde. En cautiverio muchas enfermedades y problemas se dan por mal manejo de los animales (Wellehan y Gunkel, 2004; Raiti, 2012). A continuación, se presenta una sinopsis de los principales signos de enfermedad en los ofidios. Se recomienda consultar la literatura citada para profundizar los aspectos aquí brevemente señalados, en especial los textos de Fontanillas et al., 2000; Mader, 2006; Raiti, 2012.

Signos del sistema integumentario

Las quemaduras frecuentemente se presentan por el mal acceso a las rocas y lámparas de calefacción. En caso de que esto ocurra se debe proporcionar fluidos y electrolitos al paciente y cubrir la herida con vendajes semipermeables (Wellehan y Gunkel, 2004).

Es frecuente observar heridas y úlceras en la piel de las serpientes como producto de continuos golpes por intentar escapar o por mordeduras (Mader, 2006). Estas heridas pueden infectarse, pero si se corrige la causa del problema, el animal puede curarse por sí mismo después de varias mudas (Wellehan y Gunkel, 2004).

También pueden presentarse ectoparásitos como garrapatas, las cuales pueden removerse manualmente. La presencia de garrapatas puede detectarse por disecdisis, porque la serpiente se sumerge continuamente en el agua o por un pequeño polvo blanco sobre la piel. La disecdisis consiste en la muda incompleta de la serpiente e indica que algo anda mal en el ambiente o con el animal. Puede darse porque la temperatura, humedad, sustrato y refugio no son los adecuados; también se presenta por deshidratación, malnutrición o manipulación durante la muda (Mader, 2006).

Signos del sistema musculoesqueléticos

A este nivel se pueden presentar distintas lesiones como parálisis, fracturas y deformidades. Las parálisis normalmente se generan por lesiones en la columna vertebral, abscesos, tumores u obstrucciones intestinales. Las fracturas de las costillas pueden ser comunes y generalmente no necesitan ser tratadas, a menos que el involucre un órgano vital. Las fracturas de la cabeza pueden ser difíciles de detectar, por lo que se debe buscar señales como asimetría del cráneo o de dolor en el animal. Las fracturas de la mandíbula también tienden a curarse sin tratamiento, sin embargo, no se le debe ofrecer alimento al animal por un tiempo (Mader, 2006).

Signos del sistema gastrointestinal

La anorexia puede presentarse en animales que no estén alojados en condiciones abióticas adecuadas, que estén bajo mucho estrés, que van a entrar en su momento de hibernación o de gravidez. Igualmente, también puede asociarse con obstrucciones, abscesos o tumores. La regurgitación puede darse por obstrucciones gastrointestinales, abscesos, por el gran tamaño de la presa, temperatura ambiental inadecuada, por un alto grado de estrés o porque la frecuencia de alimentación es muy alta (Fontanillas et al., 2000; Mader, 2006). La diarrea puede presentarse porque la dieta ofrecida no es la adecuada, por temperatura inapropiada o por parásitos gastrointestinales (Mader, 2006).

Las obstrucciones intestinales pueden detectarse a través de radiografías o del ultrasonido. Si la ingestión de un cuerpo extraño no resulta en la perforación de un órgano, es posible que se pueda tratar fácilmente con terapia de fluidos y condiciones ambientales adecuadas, en caso contrario se debe recurrir a cirugía (Wellehan y Gunkel, 2004).

Signos del sistema cardiovascular

La anemia puede presentarse debido a parásitos hematófagos, pérdida de sangre, errores en laboratorios clínicos, septicemia (infecciones) o neoplasia (tumores). Al igual que las serpientes anémicas, los animales con baja temperatura, en shock o deshidratados pueden presentar muy baja frecuencia cardíaca (Mader, 2006).

Signos del sistema respiratorio

Los signos presentados en las serpientes por enfermedades respiratorias incluyen estornudos, aumento de sonidos respiratorios, respiración con la boca abierta, formación de burbujas en las fosas nasales, cabeza y cuello elevados, entre otros. La disnea o dificultad respiratoria puede estar causada por obstrucción de las fosas nasales, granulomas en la tráquea, exposición a toxinas o irritantes como el tabaco o el incienso, aumento de la mucosa traqueal y pulmonar, entre otros (Mader, 2006). Las causas extrapulmonares de la disnea pueden ser inflamación gastrointestinal, distocia, tumores y abscesos (Wellehan y Gunkel, 2004).

Signos del sistema nervioso

La ataxia puede presentarse en los ofidios por exposición a toxinas (sustancias fenólicas o insecticidas), golpes en la cabeza, enfermedades virales, deficiencia de tiamina, entre otros. Algunos autores la asocian también a la hipoglicemia. Las deficiencias de tiamina y biotina pueden dar origen a convulsiones. La deshidratación o la sobredosis pueden generar incoordinación, ataques epilépticos o incluso la muerte en las serpientes. La epilepsia también puede ser causada por traumas en la cabeza, parásitos, abscesos y encefalitis (Mader, 2006).

Signos del sistema reproductivo

Algunas veces la incapacidad reproductiva de las serpientes se debe a la identificación errónea de los sexos o a condiciones ambientales inadecuadas. Otra de las razones puede ser una obstrucción o infección en el tracto reproductivo de la hembra. La distocia es una condición en la que la hembra retiene la camada completa o parte de ella (Mader, 2006). Esto puede deberse a condiciones ambientales inadecuadas, a obesidad o a baja condición corporal. Otra razón de mayor gravedad es malformación del tracto reproductivo, huevos rotos, presencia de cistolitos y obstrucciones, entre otros (Wellehan y Gunkel, 2004).

Las radiografías al igual que estudios hematológicos y el ultrasonido permiten observar las causas anteriormente descritas. En caso de que exista obstrucciones se deben remover con cirugía, en caso contrario se deben proporcionar buenas condiciones ambientales, con lo que el animal podría solucionar el problema. Un prolapso cloacal es la eversión de los hemipenes, tracto reproductivo, del colon o de la vejiga. Puede ser causado por la distocia, constipación, parásitos, cistolitos, entre otros. Los exámenes coprológicos y hematológicos pueden ayudar a determinar si el prolapso cloacal es a causa de una infección (Wellehan y Gunkel, 2004). El acordamiento quirúrgico se emplea frecuentemente para tratar los prolapsos cloacales (Mader, 2006).

Medicina preventiva

Con el fin de prevenir enfermedades e infecciones se debe considerar algunos factores como la cuarentena, los exámenes físicos, las muestras coprológicas y hematológicas, entre otros (Mader, 2006). La cuarentena se utiliza con el fin de evitar el contagio de enfermedades o el ingreso de estas a la colección (Varela et al., 2014). El espacio destinado para la cuarentena debe ser separado del resto de la colección zoológica y en lo posible los procedimientos con animales en cuarentena deben realizarse después de la colección (Mader, 2006). El ingreso a las áreas cuarentenarias debe contar con pediluvios, así como con sustancias apropiadas para la desinfección de superficies (Mader, 2006; Varela et al., 2014).

El tiempo mínimo de un periodo de cuarentena es de 60 días, sin embargo, para animales sospechosos de portar alguna enfermedad, el tiempo puede ser de 90 días o más (Mader, 2006; Raiti, 2012). La cuarentena también se utiliza como un periodo de adaptación a una nueva dieta, a un mayor contacto y a un nuevo ambiente. Con el fin de evitar cualquier estrés en un animal recién llegado, los exámenes físicos deberían retrasarse hasta que el animal se encuentre más adaptado (Mader, 2006). Como protocolo cuarentenario se recomienda además de la valoración clínica completa, el examen coprológico, el hemo leucograma y perfil bioquímico de hígado y riñón (Miller, 1999; Raiti, 2012).

Como se ha dicho anteriormente muchos problemas en las serpientes se deben a condiciones ambientales inadecuadas, por eso la medicina preventiva debe iniciar desde la adecuación del terrario. La limpieza rutinaria y el uso de desinfectantes como clorhexidina solución de hipoclorito de sodio son esenciales para el buen manejo. En caso de usar hipoclorito se debe esperar cierto tiempo hasta que el químico se haya disipado, pues puede ser perjudicial (Mader, 2006). La desparasitación periódica ayuda a prevenir muchas enfermedades causadas por hongos y ectoparásitos. Para diversos tipos de acordamiento terapéutico se recomienda previamente coleccionar muestras que permitan una aproximación clínica apropiada (Mader, 2006; Raiti, 2012).

4. METODOLOGÍA

Metodología de campo.

El período de colecta comprendió de agosto de 2019 a agosto 2022. Iniciando con la identificación de los puntos donde se frecuentan ver los especímenes de *Crotalus simus*, donde se solicitaba a los campesinos y lugareños de dicha zona, que dieran aviso en caso de ver un individuo, para ser colectados por medio de rescate, una vez se localizaban los individuos se procedió a realizar la captura del animal, dicho proceso se llevó a cabo en diferentes áreas del país, en su mayoría zonas agrícolas.

Se georreferenciaron los lugares de captura. La técnica de la sujeción fue firme y suave para evitar dañar al animal, se hizo mediante el equipo herpetológico: tong y un gancho serpentero para inmovilizar de manera más segura al animal, procediendo a meter a la serpiente en una bolsa de tela, posteriormente la boca de la bolsa se cerró colocándola en el suelo y poniendo un gancho sobre ésta entre el ofidio y la salida, para seguidamente amarrar la salida; existiendo un objeto entre la serpiente y la zona del nudo. Las bolsas se tomaron arriba del nudo y se mantuvieron alejadas del cuerpo donde se introducían en cubetas plásticas para mayor seguridad. Las bolsas no se mantuvieron expuestas a temperaturas extremas o al sol directo y ni con aire acondicionado. También se realizaron capturas introduciendo a la serpiente directamente en la caja de contención herpetológica, con la técnica de gancho-gancho y tong-gancho. Finalmente, cada animal fue trasladado de forma segura al serpentario ubicado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud de la Universidad de El Salvador, para pasar un proceso de chequeo clínico y cuarentena.

Descripción del área de estudio.

El estudio se realizó en la Universidad de El Salvador, detallando las áreas a continuación:

Mantenimiento de serpientes en cautiverio: Las serpientes se mantuvieron en cautiverio en un espacio físico debidamente estructurado como Serpentario, con las condiciones óptimas para la tenencia en cautiverio de la especie *Crotalus simus*. Ubicado en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD). Dicho serpentario fue inspeccionado por el Ministerio del Medio Ambiente y Recursos Naturales para verificar que se cumplieran con los requerimientos necesarios para mantener estas especies en cautiverio.

Pruebas experimentales: Para las pruebas experimentales con animales se realizó en el Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD). Donde se hicieron ensayos con veneno. Para las pruebas en el procesamiento de liofilización del veneno se realizaron en el Laboratorio de Toxinas Marinas de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad de El Salvador.

Metodología para la elaboración del manual de procedimientos de manejo de *Crotalus simus*, en cautiverio con fines de investigación en El Salvador.

Se realizó un estudio bibliográfico con base a recopilaciones de trabajos publicados (Mata, 2012; Flores, 2018), pero en su mayoría acorde a experiencias adquiridas a través de capacitaciones, cursos, charlas, reuniones y pasantías con profesionales expertos en el grupo de los ofidios venenosos, a nivel regional, donde se tuvo el apoyo especial del herpetólogo salvadoreño Vladlen Henríquez, realizando adaptaciones de acuerdo con la realidad del país en el desarrollo de los procedimientos que ejecutan en cada uno de ellos.

Metodología para establecer el protocolo de extracción y de procesamiento de veneno de *Crotalus simus* con fines de investigación en El Salvador.

Establecimiento del protocolo de extracción de veneno: Para el protocolo de extracción de veneno se realizó una búsqueda bibliografía y se tomó como referencia un protocolo utilizado en Colombia (SU 2009) adaptado a El Salvador, donde se tuvo el apoyo del herpetólogo guatemalteco especialista en serpientes venenosas Nils Santos para la redacción y practica de dicho protocolo, se recopiló todo el equipo, material e indumentaria necesaria para llevar a cabo el procedimiento de manera segura y exitosa.

Establecimiento del protocolo de procesamiento de veneno: Para el protocolo de procesamiento de veneno se realizó una recopilación (de) información en base a la experiencia de diferentes investigadores que ejecutaban dicho procedimiento, entre ellos: Dra. Vitelbina Núñez de la Universidad de Antioquia, Colombia y Dr. Neri Castro de la Universidad Autónoma de México, se tuvo apoyo de Investigadores pertenecientes al Laboratorio de Investigación en Productos Naturales (Dr. Marvin Núñez y Lic. Ulises Guardado) y el Laboratorio de Toxinas Marinas (Lic. Gerardo Ruíz y MSc. Oscar Amaya), de la Universidad de El Salvador, donde se realizaban reuniones para discutir la propuesta inicial paso a paso acorde al equipo de laboratorio con el que se realizaría desde la centrifugación hasta la liofilización del veneno, se hicieron varias pruebas piloto con plasma sanguíneo humano para poner la prueba a punto y no gastar veneno, una vez con la prueba a punto se realizaron con muestras de veneno.

Animales experimentales

Para los ensayos experimentales se utilizaron ratones Balb/c de ambos sexos, con un peso corporal entre 18 a 20 g, con aproximadamente 5 semanas de nacidos, todos pertenecientes al Laboratorio de Experimentación Animal de CENSALUD, se mantendrán en condiciones de temperatura y humedad relativa controlada de 22 ± 2 °C y entre 50 - 60 % respectivamente, con un ciclo luz - oscuridad de 12/12 horas, los ratones serán marcados con ácido pícrico para su identificación individual, todos fueron examinados clínicamente previo a cada ensayo para certificar su estado de salud. Se alimentaron a base de concentrado peletizado para roedores y agua a voluntad (LEA, 2010).

Para realizar el protocolo se utilizaron: jeringas plásticas de 1.0 mL, ratones de 18 a 20 gramos de peso, veneno liofilizado, solución amortiguada con fosfatos (PBS) preparada y aforada a un pH 7.2 (Anexo 1).

Determinación de la Dosis Letal Media del veneno (DL50)

La actividad letal es el efecto toxicológico que más frecuentemente se estudia al caracterizar un veneno. Este efecto es el resultado de la acción de componentes neurotóxicos que interfieren con los procesos de la sinapsis neuromuscular. En el caso de la mayoría de los venenos de serpientes de la familia Viperidae, la letalidad tiene una causalidad multifactorial, ya que intervienen diferentes componentes (metaloproteinasas, serina proteinasas, fosfolipasas A2 y otros) que causan sangrado, coagulopatía y alteraciones hemodinámicas que provocan la muerte. Experimentalmente, este efecto se estudia mediante la inyección de diferentes dosis de veneno, generalmente por la vía intraperitoneal (i.p.) o por la vía intravenosa, observándose si los animales mueren o sobreviven al cabo de un período de tiempo (ICP, 2007).

Procedimiento

Se preparó la solución madre de veneno a una concentración de 5 mg/mL empleando como disolvente una solución amortiguadora de fosfatos aforada a un PH 7.2 estéril centrifugada durante 3 minutos. Posteriormente se inyectó a 10 grupos de 4 ratones cada uno con una jeringa de 1 mL por la vía intraperitoneal la cantidad de 0.2 mL de diferentes soluciones de veneno: 5, 10, 15, 17, 18, 20, 25, 32, 35, 50 ug/ratón. Sometiéndolos a un periodo de observación entre los 10 minutos y 48 horas post-inoculación, se anotó el número de ratones muertos en cada dosis de veneno (Anexo 2).

Análisis estadístico

Se realizó una prueba probit de mortalidad para determinar la DL50 con un límite de confianza del 95%. Para la elaboración de la gráfica y el análisis estadístico se utilizó el software Statgraphics.

5. RESULTADOS:

Trabajo de campo; colecta de los ejemplares de víboras de cascabel.

Se colectaron un total de 13 ejemplares (entre el año 2019 a 2022) de los cuales 4 individuos presentaron síndrome de inadaptación al cautiverio y se tomó la decisión de liberarlos. Quedando 9 especímenes cada uno de estos fue adquirido por medio de rescate en diferentes zonas del país (Anexo 3).

Propuesta de manual de procedimientos de manejo de *Crotalus simus*, en cautiverio con fines de investigación en El Salvador.

Se elaboró un manual que está integrado por los procedimientos que se ejecutan en el serpentario; ya que describe paso a paso como se realizan las actividades, logrando el cumplimiento de las atribuciones asignadas a la misma, a través de su estructura y con el trabajo constante de quienes tienen la oportunidad de formar parte. El manual tuvo por objetivo desarrollar una propuesta técnica de manejo y mantenimiento de serpientes víboras de cascabel en cautiverio que describa los procedimientos que se realizan, con el fin de aportar a la investigación de dichas especies abriendo una nueva brecha para la ciencia en El Salvador.

Dicho manual detalla cómo debe estar estructurado un serpentario, respecto a las instalaciones, como el área de cuarentena, área de trabajo, área donde se encuentran los recintos y qué tipo de recintos hay en el lugar, que es lo que contienen, demostrando que se basa en lineamientos que deben seguirse para asegurar el bienestar de los especímenes. Además, describe e ilustra los equipos y herramientas utilizadas para el manejo de serpientes, sueros antiofídicos, personal técnico, normas de seguridad para manipular y mantener animales venenosos.

Finalmente expone los procedimientos de manejo de *Crotalus simus*, en cautiverio, especificando los pasos a seguir de los diversos procesos que en él se realizan de manera eficaz y segura; cada uno de los procedimientos cuenta con un objetivo, normas generales del procedimiento, descripción de las actividades representado por una tabla indicando el nombre del procedimiento, área responsable, cada paso de la actividad, puesto y área a quien corresponde dicha actividad y la evidencia que se obtiene al realizar la actividad del procedimiento (El manual completo se encuentra anexo al final de este documento).

En la siguiente tabla se muestra el nombre de los procedimientos descritos en el manual:

Tabla 2. Nombre de los procedimientos descritos en el manual de manejo de *Crotalus simus*, en cautiverio.

N°	Nombre del Procedimiento
1	Ingreso de Ejemplares por Nacimientos
2	Ingreso de Ejemplares por Donaciones
3	Ingreso de Ejemplares por Rescate, Localización o Expedición
4	Egreso de Ejemplares por Decesos
5	Egreso de Ejemplares por Eutanasia
6	Egreso de Ejemplares por Concesión
7	Egreso de Ejemplares por Fuga o Escape
8	Ficha de Manejo Biológico de las Serpientes de la Colección
9	Monitoreo Diario de la Colección del Serpentario
10	Limpieza de Recintos de Exhibición
11	Entrega de Dietas a los Animales
12	Libro de Reporte de Eventualidades (hojas control)
13	Accidente Ofídico
14	Ingreso de Animales a la Cuarentena Veterinaria
15	Manejo de Espacios Temporales (terrarios con placa térmica, con foco)
16	Manejo de Bioterios
17	Plan Profiláctico
18	Suministro de Medicamentos y Productos Afines
19	Control del Suministro de Medicamentos y Productos Afines
20	Suministro Anual de Materiales y Equipos
21	Trabajos Académicos (Proyectos de Investigación, Graduación, Servicio Social, Pasantías y Voluntariado)
22	Plan de Contingencia y Procedimiento Operativo Normalizado para Caso de Sismos o Terremotos
23	Plan de Contingencia y Procedimiento Operativo Normalizado para Caso de Incendio
24	Plan de Contingencia y Procedimiento Operativo Normalizado para Caso de Cierre de la Universidad de El Salvador

Propuesta de protocolo de extracción de veneno.

Para realizar la extracción de veneno, se puede hacer de dos formas: Por medio de la mordida de intención, donde se somete al animal que muerda y que decida la cantidad de veneno que quiere inocular y la otra es la extracción de veneno por ordeño, donde se somete al animal que muerda pero en este caso se le presionan manualmente las glándulas segregadoras de veneno para sacar todo el veneno posible, esta es la actividad de mayor cuidado y atención para el trabajo de investigación, debido a esto se programa previamente o se realiza con determinada frecuencia, las extracciones preferiblemente se hacen cada tres meses, debe

realizarse por la mañana, ya que; es cuando las serpientes tienen menor actividad. Veinte cuatro horas antes del día de la extracción se dejan listos los materiales (limpios y autoclavados). El día del ordeño se retiran los materiales de la autoclave utilizando guantes de látex.

Para la extracción de veneno son necesarios los siguientes materiales:

- Tubos eppendorf de 1.5 y 2 mL
- Viales de vidrio de 5 y 10 mL
- Embudos de vidrio
- Papel toalla
- Alcohol 90%
- Isopos largos
- Clorhexidina 5%
- Guantes de látex
- Micropipetas
- Puntas
- Bata de laboratorio
- Redecilla para el cabello
- Tubos de restricción
- Ganchos serpenteros
- Gacho en L
- Tong
- Careta o lentes y mascarrilla
- Agua destilada
- Suero antiofídico
- Pinzas
- Soporte metálico para colocar los materiales de extracción.

Para realizar la extracción de veneno es necesario conocer lo siguiente:

Manipulación de los especímenes

Los ganchos herpetológicos frecuentemente se usan para manipular serpientes, pues son el método más seguro si se usan correctamente. Al momento de elegir el gancho adecuado para manejar una serpiente se tendrá en cuenta su longitud, pues el gancho deberá ser más largo que dos tercios que la serpiente. Esta distancia es el rango aproximado de ataque de las serpientes. El gancho deberá ser suficientemente fuerte para soportar el peso de la serpiente (Lock 2008). Además, se utilizarán tubos acrílicos de restricción, siendo estos de acuerdo con el tamaño de cada espécimen.

Sujeción por la cabeza

Esta acción se realiza cada vez que se requiera extraer veneno, la serpiente deberá ser colocada en una mesa lisa, cuya altura debe alcanzar la cintura de la persona que manipula al ofidio y tener un ancho adecuado para el tamaño de las serpientes que habitualmente se manejen en el laboratorio.

A continuación, se describen los pasos a seguir para la extracción de veneno:

1. Verificar que el espécimen esté vivo
2. Asegurarse que haya suficiente espacio para manipular la serpiente; de no poseer suficiente espacio, éste se modificará.
3. Se colocará el terrario en el suelo.
4. Una persona destapará la caja, mientras otra persona manipula la serpiente con ganchos serpenteros.
5. Una vez la serpiente sea controlada, se colocará el espécimen en un tubo de restricción; el cual se sostendrá con un tong.
6. Para poder manipular la serpiente, un tercio o la mitad de su cuerpo debe estar dentro del tubo; una vez dentro del tubo, se estimula la serpiente hasta que su cabeza salga por el otro extremo del tubo.
7. Cuando la cabeza esté fuera, se sostendrá de la cola para evitar que este avance y se salga del tubo.
8. Se procederá a colocar el gancho L en la cabeza para inmovilizarla el dedo índice se coloca sobre el cráneo de la serpiente, el dedo pulgar y dedo medio sostendrá los laterales de la cabeza al momento de ir retirando el gancho (La sujeción de la serpiente por la cabeza debe realizarse en forma rápida y precisa) (Anexo 4).
9. Se acercará al embudo y se procede a abrir la mandíbula de la serpiente en la orilla de dicho embudo (Anexo 5).
10. Con la mano libre el sujetador oprime de forma suave, y de la mandíbula hacia los colmillos, en la parte del maxilar superior por los dos lados para forzar la salida del veneno de la glándula (Anexo 6).
11. Utilizando una solución antiséptica (Clorhexidina 5%, yodo), se limpia la cavidad bucal y los colmillos con isopos largos uno por cada colmillo, para proceder a guardar la serpiente en su respectivo terrario y nuevamente asegurada (Anexo 7).
12. Una vez obtenida la muestra de veneno; manteniendo la serpiente inmovilizada, ésta se trasladará de nuevo a la caja con el tubo y se deslizará poco a poco hasta que salga completamente el tubo y esté en el terrario; mientras la serpiente se desliza la otra persona resguarda al manipulador con la tapadera del terrario para evitar que la serpiente se escape.
13. Cuando la serpiente esté completamente dentro se cierra el terrario y se asegura para evitar que el espécimen se escape.

Se repite todo el procedimiento cada tres meses

Propuesta de protocolo de procesamiento de veneno de serpiente

Seguridad ocupacional:

1. Previo a realizar cualquiera de las etapas del procedimiento, en donde se tenga contacto con el veneno de serpiente, utilizar la indumentaria adecuada que incluye: gabacha, mascarilla desechable (diferente a la utilizada por bioseguridad), guantes y lentes protectores. Adicionalmente se debe contar con alcohol y papel absorbente para hacer limpieza de superficies por derrames.
2. El protocolo consta de dos sesiones. Al terminar cada sesión, se debe descartar la mascarilla, los guantes utilizados y lavar los lentes protectores o limpiarlos con alcohol y papel absorbente.

SESIÓN I

Procedimiento previo de la muestra:

1. Repartir el veneno previamente recolectado (por extracción manual) en tubos eppendorf (no sobrepasar el 75% de su capacidad), debidamente rotulados y previamente pesados, en cantidades similares y registrar su peso. **Nota:** Si los venenos han sido congelados, estos deben ser descongelados gradualmente y proceder con los siguientes pasos una vez lleguen a temperatura ambiente. Prolongar por mucho tiempo el primer paso puede reducir la actividad del veneno debido a lisis de detritos celulares que active enzimas que degraden el veneno.
2. Centrifugar por 3 minutos a 12,000 RPM. **Nota:** Se debe equilibrar la centrifuga ubicando tubos en pares y dejando en lados opuestos los tubos con igual volumen.
3. Se separa el sobrenadante en tubos eppendorf (no se deben llenar del todo solamente el 50% de su capacidad). Recuperar el veneno utilizando agua destilada.
4. Agregar una tapa extra con agujeros (hechos con una aguja caliente) o tapar con trozos de aluminio con agujeros (hechos con un alfiler) a cada uno de los tubos eppendorf que facilitará su posterior liofilización.
5. Congelar a -70 °C por 4 horas o de manera instantánea con nitrógeno líquido (-196 °C), hielo seco (-78.5 °C) o una mezcla de hielo seco con acetona (-78 °C). **Nota:** Es recomendable congelar instantáneamente, ya que se forman capas de concentración si se congela a -70°C en un freezer. **Cuidado:** Manejar los agentes de congelación instantánea con cuidado, así como también evitar el contacto de materiales que han estado en contacto con

dichos agentes, estos pueden congelar los tejidos rápidamente y provocar lesiones serias.

6. Colocar los tubos en el soporte de metal (especial para eppendorf) y ubicarlo dentro de un frasco de liofilización de 750 mL o 1L. Ubicar un filtro entre el agujero del tapón del frasco con el adaptador metálico y presionar con el adaptador metálico para unir las partes. **Nota:** Se recomienda enfriar previamente el soporte de metal, tapón, frasco de liofilización y adaptador metálico para evitar descongelamiento de la muestra por transferencia de calor debido al diferencial de temperatura.

Lista de chequeo previo a la liofilización:

1. Revisar que no exista humedad en el sistema del serpentín y colector del liofilizador, de lo contrario, retirar con papel absorbente suave.
2. Revisar que la manguera de drenado se encuentre libre de humedad y con el tapón debidamente instalado.
3. Usando una tela o papel que no deje pelusa, limpiar el empaque de la tapa de la cámara de colección y otras superficies sellantes para asegurarse que estén libre de suciedad o contaminantes que puedan causar una fuga de vacío. No se necesita grasa para lograr un vacío adecuado en las superficies sellantes.
4. Revisar que el casquillo de gas (gas ballast) de la bomba de vacío se encuentre cerrado.
5. Revisar que las válvulas estén cerradas (la parte plana de la válvula debe encontrarse hacia arriba).

Configuración e inicio de la liofilización:

1. Encender la unidad de refrigeración del liofilizador por medio del botón lateral derecho con al menos 30 minutos de anticipación a la temperatura del colector (-40 °C). Asegurarse que la configuración sea “manual” para el inicio de la bomba de vacío.
2. Encender la bomba de vacío. Esperar a que la temperatura llegue a -50 °C y la presión se encuentre a menos de 0.133 mbar.
3. Conectar el frasco de liofilización (en donde se encuentran las muestras) a uno de los puertos de muestra utilizando el tubo adaptador de metal. Girar la válvula hasta la posición de abierto (la parte plana de la válvula se encuentra hacia abajo), esto generará un vacío en el frasco.
4. Esperar a que la lectura de presión y temperatura se estabilicen.
5. Programar un tiempo de liofilización de 24 horas sí la cantidad es menos de 1 mL, 48 horas sí es más de 1 mL, a -50°C.

SESIÓN II

Finalización de la Liofilización y apagado del equipo:

1. Una vez terminado el tiempo de liofilización, se retira la muestra girando nuevamente la válvula a la posición de cerrado (la parte plana de la válvula se encuentra hacia arriba), lo que ventilará el contenedor y lo equilibrará con la presión atmosférica. Desconectar con cuidado el adaptador con el frasco de la válvula.
2. Cuando se termine de utilizar el liofilizador, apagar primero la bomba de vacío, abrir una de las válvulas lentamente para equilibrar la presión interna con la atmosférica y apagar la unidad de refrigeración.

Procedimiento posterior de la muestra:

1. Retirar el soporte metálico del tubo de liofilización y retirar los tubos liofilizados. Limpiar el soporte metálico e interior del frasco de liofilización con papel absorbente humedecido con alcohol etílico.
2. Quitar la tapa con agujeros y tapar los tubos con su tapadera original.
3. Pesar los tubos con su contenido liofilizado.
4. Almacenar los tubos eppendorf liofilizados a 4°C en un recipiente libre de humedad con agente desecante. **Nota:** Se sugiere el uso de sílica gel previamente activada (calentada en un horno de convección a 110 - 120 °C por 1 - 2 horas) como agente desecante.

Limpieza del liofilizador:

1. Abrir la manguera de desagüe lateral izquierda del liofilizador, colocando un recipiente para recibir el descarte y esperar que todo el hielo formado se derrita.
2. Retirar todas las partes exteriores del equipo con mucho cuidado.
3. Dejar que las partes del equipo alcancen la temperatura ambiente.
4. Lavarlas con solución jabonosa diluida y un mascón suave.
5. Retirar la espuma con agua purificada o destilada.
6. Secar con un paño suave cada una de las partes.

Procesamiento de veneno:

Los resultados obtenidos de las extracciones y el procesamiento para obtener veneno liofilizado se muestran en la tabla 3 y 4. Donde los ejemplares marcados con asterisco (*) son animales cuyo veneno fue utilizado para la determinación de dosis letal media. También se puede observar una relación entre el tamaño de la serpiente con el peso seco del veneno (Figura 2).

Tabla 3. Rendimiento de veneno por individuo.

Muestra	Talla (cm)	mL/ordeño	mg / ordeño
<i>Crotalus simus 1</i>	52	0.5	6
<i>Crotalus simus 2</i>	58	0.5	28.33333333
<i>Crotalus simus 3</i>	59	0.5	14
<i>Crotalus simus 4</i>	85.6	0.7	11.2
<i>Crotalus simus 5</i>	87.8	0.7	19.6
<i>Crotalus simus 6</i>	94.5	1.2	88
<i>Crotalus simus 7*</i>	127.5	1.2	229.09
<i>Crotalus simus 8*</i>	147.4	1.2	220.8
<i>Crotalus simus 9*</i>	156.5	1.5	387

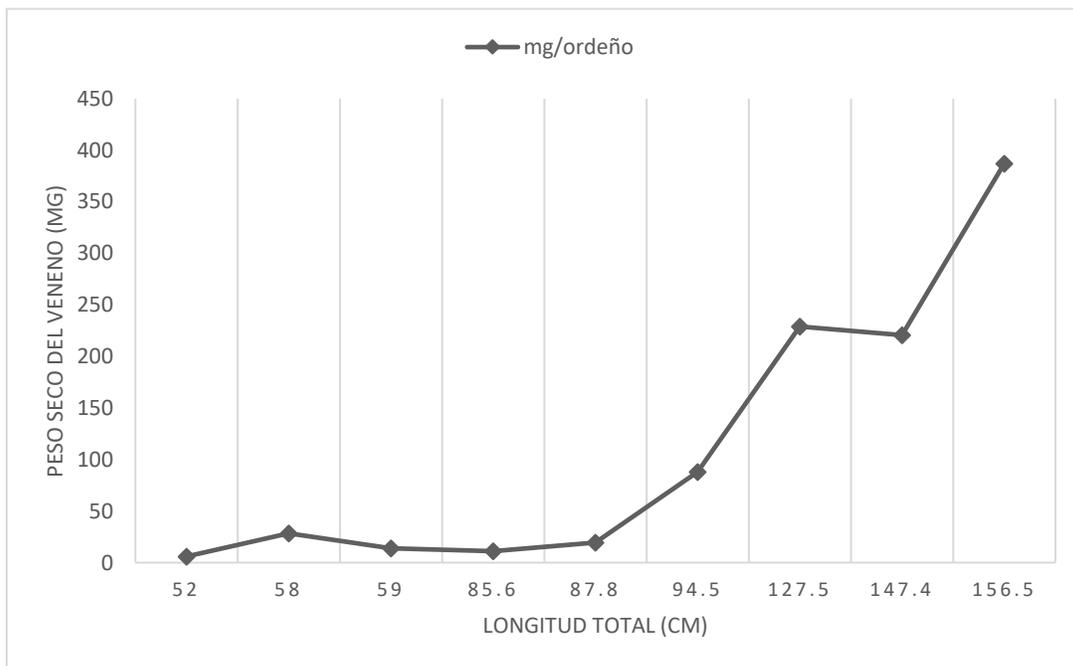


Figura 2. Relación entre el tamaño total de la serpiente (cm) con el peso seco del veneno (mg).

Tabla 4. Rendimiento de veneno por estadio.

Muestra	N° de individuos	mL/ordeño	mg / ordeño
<i>Crotalus simus crías (25-59cm)</i>	3	1.5	48.33
<i>Crotalus simus juveniles (60-119 cm)</i>	3	2.1	121.6
<i>Crotalus simus adultas (120-156 cm)</i>	3	4.5	836.89

De un ejemplar adulto se pueden extraer hasta 387 mg de veneno (peso seco). Aunque en promedio la cantidad que se les puede extraer es de 278.96 mg de veneno (peso seco). Mientras que de los ejemplares jóvenes el promedio es de

40.53 mg de veneno (peso seco) y en cuantos a las crías fue de 16.11 mg de veneno.

Determinación de la DL50 de veneno de *Crotalus simus*, inoculados por vía intraperitoneal (0.2 mL), en ratones albinos suizos cepa Balb/c.

El análisis de los datos obtenidos en la tabla 5, demuestra la posibilidad del cálculo de la dosis letal media del veneno de *Crotalus simus*, a través del empleo de ratones, ya que la inoculación por vía intraperitoneal de dosis escalonadas de veneno presenta resultados que guardan relación entre el progreso de estas y sus efectos. En la tabla 6 se observan los cálculos de la DL50 y en la figura 3 la gráfica correspondiente a dicha prueba.

Tabla 5. 0/4= N° de ratones muertos / N° de ratones inoculados.

Dosis de veneno en microgramos	Tiempo de observación				
	10 min	30 min	60 min	24 h	48 h
5	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
10	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
15	0/4	0/4	0/4	1/4	1/4
17	0/4	0/4	0/4	1/4	1/4
18	0/4	0/4	0/4	1/4	1/4
20	0/4	0/4	0/4	3/4	3/4
25	0/4	0/4	0/4	3/4	3/4
32	0/4	0/4	0/4	3/4	3/4
35	0/4	0/4	0/4	4/4	4/4
50	0/4	0/4	0/4	4/4	4/4

Tabla 6. Esta tabla Muestra las predicciones inversas obtenidas del modelo ajustado.

Porcentaje	ug/ratón	LC Inferior 95.0%	LC Superior 95.0%
		Límite Conf.	Límite Conf.
50.0	20.5138	17.3352	25.5278

(Donde el valor correspondiente a p=50% (DL50) es igual a 20.5138. También se muestran intervalos fiduciaros aproximados de confianza para las predicciones inversas).

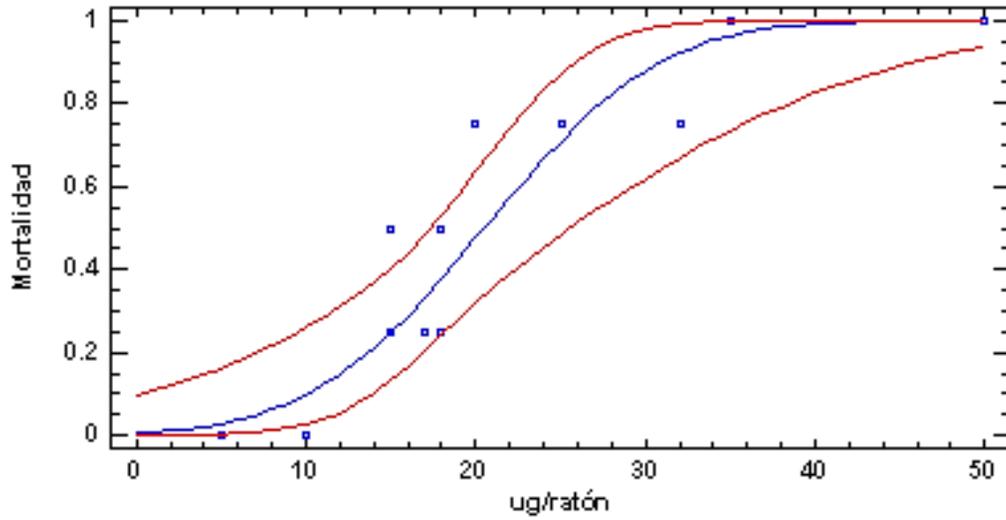


Figura 3. Diagrama de dispersión, curva de regresión y valores de pruebas estadísticas de los datos experimentales sobre la Actividad Letal del veneno (DL50).

6. DISCUSIÓN

Los manuales de manejo de colecciones de animales se preocupan por emplear estándares profesionales enfocados en cría y manejo de animales. Para el caso de serpientes, dentro de los manuales de manejo se incluyen: diseño de hábitat, entorno ambiental, equipo y herramientas, transporte, entorno social, nutrición, cuidados veterinarios (plan profiláctico), reproducción, comportamiento, sueros antiofídicos, procedimientos de manejo y protocolos estandarizados (Mata, 2012; Flores, 2018). Además, deben buscar el bienestar animal como una prioridad, simulando las condiciones de un hábitat natural, previniendo enfermedades, así como manipulando de manera adecuada y segura los animales (Pérez et al., 2012). En el manual que se elaboró en este trabajo incluyen la mayoría de estos ítems a excepción de algunos (transporte, entorno social, reproducción y comportamiento) debido a que no están relacionados con el tema de estudio, sin embargo; coinciden los demás.

Flores, 2018, menciona que, al revisar la literatura, es posible evidenciar que la información para la prevención y tratamiento de accidentes ofídicos es más cuantiosa que la información sobre la biología y el cuidado de las especies de serpientes en Latino América. Según Galvis citado por Flores en 2018, encontrar guías de manejo y cuidado específicas es poco frecuente. Elaborar estos manuales de manejo y protocolos es necesario y Grego, en el 2021, explica que se deben buscar nuevas técnicas y un manejo eficiente para mejorar el bienestar de las serpientes, la calidad y cantidad de veneno producido, que todos los procedimientos llevados a cabo en un mantenimiento de serpientes deben estar debidamente documentados y programados. Por lo que es fundamental tener conocimiento sobre estos temas, pues en cautiverio muchas veces se deben realizar procedimientos biológicos y médicos que pueden poner en riesgo la vida de la persona y el animal. Brindar los conocimientos que complementen estos vacíos de información, aporta a la investigación científica, demostrando la importancia y necesidad de realizar este manual y protocolos de extracción y procesamiento de veneno en El Salvador.

Una característica a tomar en cuenta para el procesamiento de los venenos es que estos contienen alrededor de un 25% de sólidos totales, de los cuales entre un 70 – 90 % están constituidos por proteínas y polipéptidos de relativamente alto peso molecular. Es por lo que se considera que el proceso de liofilización es la mejor técnica para la obtención y preservación de muestras de venenos (Bolaños, 1984; Domínguez, 1996). En cuanto al rendimiento de veneno de la presente investigación si tomamos en cuenta desde las serpientes juveniles a las adultas tenemos un promedio de 159.74 mg de veneno por ordeño dando valores similares según lo reportado por Martínez en una tabla de datos sin publicar citado por Domínguez en

el 1996 con 169 mg por individuo, respecto a Freyvogel & Hofman en 1965, su promedio fue de 98 - 140 mg, lo cual también coincide con los resultados presentados, mientras que Domínguez en 1996 habla de rendimientos de 107.83 mg y Solano et al., en el 2018 de 54 mg, notándose que difieren significativamente, por otro lado; si se toman los valores solo de los especímenes adultos, el promedio de rendimiento de veneno es de 278.96 mg, un dato muchísimo mayor a los datos anteriormente reportados, pudiendo atribuirse a la gran talla de los individuos de esta investigación y tomando en cuenta lo descrito por Hormann et al., 2018; Castro et al., 2013; Mendoza et al., 2009; Malaga et al., 2000, donde mencionan que el veneno es un rasgo adaptativo y que pueden variar ampliamente entre poblaciones y regiones geográficas.

Con los resultados obtenidos respecto a las pruebas con animales experimentales de la dosis letal media (DL50), cabe resaltar que se utilizó veneno liofilizado solo de las serpientes adultas correspondiente a 3 individuos, que tienen una longitud entre 127.5 y 156.5 cm con un promedio de 143.8cm, cercanos al promedio de 150 cm que reporta Bolaños en 1972, y 122 cm de Domínguez en 1996, respecto a especímenes adultos con el fin de homogenizar la muestra. Ya que estudios realizados por Gutiérrez et al., 1991; Saravia et al., 2002; Calvete et al., 2010; Durban et al., 2017, demuestran la variación ontogenética del veneno de las especies de *Crotalus simus*, dando diferencias entre las actividades del veneno de adultos y neonatos, en el caso de los venenos adultos de C.s, la crotoxina está presente, en una concentración mucho menor a diferencia del veneno de los recién nacidos que está presente en altas cantidades. La crotoxina en este veneno se evidencia en los ensayos de letalidad en ratones, donde la muerte se asocia a una evidente parálisis respiratoria, la dosis necesaria para matar ratones es mayor en adultos que en el caso de los neonatos de esta especie.

El dato calculado para la Dosis Letal 50% por la especie *Crotalus simus* fue de 20.51 ug/ratón, es significativamente diferente al reportado según Domínguez en 1996 en El Salvador, que fue de 9.5 ug/ratón en El Salvador, también Gutiérrez et al reporto una letalidad de 14.22 ug/ratón en el 1991, Bolaños 13.6 ug/ratón en 1972, Saravia 16 ug/ratón en el 2002 y Solano et al 10 ug/ratón en el 2018 para Costa Rica, la Letalidad para Guatemala corresponde a 10.72 ug/ratón según Valdés et al. en el 1994, 16 ug/ratón según Rojas et al en el 1987, Guevara en el 2000 reporta 22.7 ug/ratón y Saravia 18 ug/ratón en el 2002. Dado los resultados obtenidos respecto a la DL50 es notorio que tiene más similitud con los reportados para Guatemala en los últimos años.

Comparando esta investigación con estudios de los otros investigadores antes mencionados, algunos individuos de *Crotalus simus*, han sido mantenidos en

cautividad por mucho tiempo, incluso nacidos en cautividad y otros han sido tomados directamente de vida silvestre, lo cual justifica algunas variaciones en los resultados, ya que factores como el tiempo, donde los especímenes han pasado en cautiverio, las características ambientales, pueden influir en los grados de toxicidad del veneno de una misma especie, mostrando valores diferentes, como lo explica Díaz en 1987 y Guevara C en el 2000. Además, como se mencionó anteriormente la geografía y adaptación influye en estos organismos (Hormann et al., 2018; Castro et al., 2013; Mendoza et al., 2009; Málaga et al., 2000). Pese a estas diferencias se puede determinar que evolutivamente los individuos de Guatemala están más relacionados con los de El Salvador, que con los de Costa Rica.

7. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados del presente estudio y aportes de otros investigadores en torno a las diferentes temáticas abordadas, se concluye que:

- El manual elaborado en este estudio será de gran utilidad, ya que, el manejo de serpientes víboras de cascabel (*Crotalus simus*), constituye la base para los estudios con venenos, donde se permitirán realizar cada una de las actividades de una manera más eficaz y segura.
- Es necesario establecer protocolos de extracción y de procesamiento de veneno, ya que permitirá crear el primer banco de veneno en el país con muestras liofilizadas para ejecutar investigaciones encaminadas en el mundo de la venómica y proteómica.
- Se pudo determinar que respecto a los resultados de la Dosis Letal Media del veneno los individuos de *Crotalus simus* de Guatemala están más relacionados con los de El Salvador, que con los de Costa Rica.
- Es importante conocer la potencia letal de un veneno, acorde a los estadíos de *Crotalus simus*, para comparar la letalidad entre los venenos, y realizar una evaluación de la eficacia de un antiveneno para neutralizar la actividad letal (DL50).
- La única forma de atacar el accidente ofídico y contrarrestar sus efectos, es conocer los distintos venenos y sus mecanismos de acción, ya que nos permitirá entender los procesos fisiopatológicos que se producen ante su mordedura.
- Es necesario caracterizar los venenos de las diversas serpientes de El Salvador, para formular sueros antiofídicos específicos y organizar campañas de divulgación y adiestramiento en los diferentes niveles para el manejo de los accidentes ofídicos.

8. RECOMENDACIONES

Con la finalidad de que la información generada en el presente estudio sea aprovechada para futuras investigaciones, se recomienda:

- Retomar y dar continuidad a los estudios con venenos de las diferentes especies de serpientes venenosas de El Salvador, ya que generan datos útiles para distintas áreas del conocimiento tanto para áreas de clínica, farmacológica, biotecnológica, como su biología.
- Realizar estudios epidemiológicos constantes con un equipo multidisciplinario especializado en el área permitirá conocer datos reales de ofidismo e identificar las especies que más mordeduras causan, zonas prioritarias para trabajar en el mejoramiento de la distribución de sueros antiofídicos y una mejor atención en el sistema de salud.
- Implementar una estrategia de prevención y control de ofidismo en zonas de alta incidencia en El Salvador.
- Investigar la genética de poblaciones de serpientes de la región para conocer la efectividad de los antivenenos utilizados en El Salvador.
- Instaurar de manera permanente y fortalecer el serpentario para producir sueros antiofídicos en el país y dar continuidad a diversos proyectos enfocados en el grupo de los ofidios.x]

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez, M. (1984). Los Reptiles de Chiapas. Tercera Edición. Colección de Chiapas.

Ángel, M. (2017). Serpientes: Mitos y realidades. (223). Medellín, Colombia: Universidad CES.

Ashley, B y Burchfield, P. (1968). Maintenance of a snake colony for the purpose of venom extraction. *Toxicon* 5, 267-275.

Asociación de Zoológicos y Acuarios (AZA). (2009). EASTERN INDIGO SNAKE (*Drymarchon couperi*) CARE MANUAL.

Bénard, M. Carbaja, A. López, E. Alagón, A. (2014). Biochemical characterization of the venom of the coral snake *Micrurus tener* and comparative biological activities in the mouse and a reptile model. *Toxicon*. 77, 6 – 15.

Bolaños, R y Savage, JM. (2009). A checklist of the Amphibian and Reptiles of Costa Rica: Additions and nomenclature revisions. *Zootaxa* 2005: 1-23.

Bolaños, R. (1972). Toxicity of Costa Rican Snake Venoms for the White Mouse. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. (21), N°.3. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. United States of America. pp. 360-363.

Bolaños, R. (1984). Tratamiento, Serpientes, Venenos y Ofidismo en Centroamérica. Editorial Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. pp. 114-118.

Brames, H. (2006). Aspects of Light and Reptile Immunity. *Iguana* 14 (1): 19 – 23.

Braz, H.B., M.M.T.D. Rocha & M.D.F. Furtado. (2012). Maintaining rear-fanged snakes for venom production: an evaluation of mortality and survival rates for *Philodryas olfersii* and *P. patagoniensis* in captivity. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 18:164-172.

Calvete, J. Sanz, L. Cid, P. De la Torre, P. Flores, M. Dos Santos M. Borges A, Angulo Y. Lomonte B. Alape A. Gutiérrez J. (2010). Snake Venomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Cotralus durissus* Complex Points to Neurotoxicity as an Adaptive Paedomorphic Trend along *Crotalus* Dispersal in South America. *Journal of Proteome Research*. 9, 528-544.

Campbell, J y Lamar, W. (1989). *The Venomous Reptiles of Latin America*. Publishing Associates, New York, 440 pp.

Campbell, J y Lamar, W. (2004). *The venomous reptiles of the western hemisphere*. Cornell University Press, Ithaca.

Campbell, J. (1998). *Amphibians and Reptiles of Northern Guatemala, The Yucatán, And Belize*. Vol 4. Of Animal Natural History Series. University of Oklahoma Press. USA.

Castro, E. Lomonte, B. Gutiérrez, M. Alagón, A. Gutiérrez, J. (2013). Intraspecies variation in the venom of the rattlesnake *Crotalus simus* from Mexico: Different expression of crotoxin results in highly variable toxicity in the venoms of three subspecies. *J. Proteom.* 87, 103–121.

Centro de Información y Asesoramiento Toxicológico (CIATOX). (2022). *Reporte de envenenamiento por mordedura de serpiente CIE10 (T63.0) 2017-2021*. Ministerio de Salud. San Salvador, El Salvador.

Costa, G. Giordano, G. (2014). *Encyclopedia of the neurological sciences (second edition)*. Elsevier. 227 pp.

Coto Monserrath, Vladlen Henríquez and Eli Greenbaum. In Press (2023). *Geographic Distribution: Bothriechis thalassinus (Merendon palm pit-viper)*. Herpetological Review.

Cowan, D.F. (1968). Diseases of captive reptiles. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 153:848-859.

Cowan, D.F. (1980). Adaptation, maladaptation and disease. 91-6 Pp. In: Murphy, J.B. & J.T. Collins (Eds.), *Reproductive biology and diseases in captive reptiles, SSAR contributions to Herpetology*.

De Palma, O. (2017). *Informe de Vigilancia epidemiológica de personas mordidas por serpiente venenosa en El Salvador, año 2016*. Ministerio de Salud. Dirección de Vigilancia Sanitaria. Unidad de Vigilancia de la Salud. San Salvador, El Salvador. C.A.

De Palma, O. Chicas, D. de Ventur, E. Torres, CR. (2013). *Lineamientos técnicos para la prevención y atención de las personas mordidas por serpiente El Salvador*. Ministerio de Salud. Viceministerio de Políticas de Salud. Dirección de Regulación y Legislación en Salud. Dirección Nacional de Hospitales. San Salvador, El Salvador. C.A.

DeNardo, D. (2006). Stress in captive reptiles. In: *Reptile Medicine and Surgery*. Elsevier Inc.

Domínguez, J. (1996). Caracterización del veneno de *Crotalus durissus durissus* (serpiente de cascabel Centroamericana) en El Salvador. Tesis para optar al título de Biólogo, Escuela de Biología, Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador.

Durban, J. Sanz, L. Silva, D. Neri-Castro, E. Alagón, A. Calvete, J. (2017). Integrated Venomics and Venom Gland Transcriptome Analysis of Juvenile and Adult Mexican Rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. tzabcan*, and *C. culminatus* Revealed miRNA-modulated Ontogenetic Shifts. *J. Proteome Res.* 16, 3370–3390.

Dutertre, S. y Lewis, R. (2010). Use of venom peptides to probe ion channel structure and function. *Journal of Biological Chemistry.* 285, 13315 – 13320.

Flores, D. (2018). Propuesta de mejoras al Plan de Manejo de Serpientes del Zoológico de Cali. Universidad de Icesi, Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Ciencias Biológicas, Santiago de Cali, Colombia.

Fontanillas, JC. Garcia, C y Gaspar, I. (2000). Los Reptiles. *Biología, comportamiento y patología.* Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, p. 160.

Giannotti, K. Sesso, A. Grego K. Fernandes W. Cardoso R. Camargo, Carneiro S. (2013). Viperid venom glands with defective venom production. Morphological study. *Toxicon* 70: 32-43.

Gómez, A. (2015). Hematología y bioquímica plasmática de la serpiente *Crotalus simus* (Serpentes: Viperidae), en condiciones de cautiverio. Universidad de Costa Rica, Sistema de Estudios de Posgrados, Programa de Posgrados en Microbiología, Parasitología y Química Clínica.

Green, H. (1997). Snakes the evolution of Mystery in Nature: Diet and feeding. Berkeley Los Angeles London: University of California Press. pp. 51-68.

Grego, K. F., Vieira, S. E. M., Vidueiros, J. P., Serapicos, E. de O., Barbarini, C. C., Silveira, G. P. M. da ., Rodrigues, F. de S., et al.. (2021). Maintenance of venomous snakes in captivity for venom production at Butantan Institute from 1908 to the present: a scoping history. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 27(J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis, 2021 27). Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP/UNESP).. Retrieved from <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0068>

Guevara, C. (2000). Caracterización toxicológica del veneno de la serpiente de cascabel (*Crotalus durissus durissus* Linnaeus, 1758, Viperidae) y evaluación de la potencia neutralizante de los sueros antiofídicos disponibles en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, Guatemala.

Gutiérrez, J. Dos Santos, M. Furtado, M. Rojas, G. (1991). Biochemical and Pharmacological Similarities Between The Venoms of Newborn *Crotalus durissus durissus* and Adult *Crotalus durissus terrificus* Rattlesnakes. *Toxicon*, Vol. (29), N°10. Pergamon Press plc. Great Britain. Pp. 1273-1277.

Gutiérrez, JM y León, G. (2009). Snake Antivenoms Technological, clinical and public health issues. Pp. 393-421. En: *Animal toxins: State of the art perspectives in health and biotechnology*. Eds: de Lima, M.E., Pimenta, A.M.C., Martin-Euclaire, M.F., Zingalli, R.B. Editora UFMG Belo Horizonte, Brasil.

Gutiérrez, JM y Lomonte, B. (2003). Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina: Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes In: Costa Cardoso, J.L., de SiqueiraFrança, F.O., Wen, F.H. Sant'AnaMálaque, C.M. & Haddad, V., Eds.), Sarvier Editora, São Paulo, Brasil. pp. 310-323.

Gutiérrez, JM. (2002). Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Revista Biológica Tropical*; 50(2): 377-94.

Gutiérrez, JM. Castillo, L. Díaz, M. Masís, J. Alape, A. (2020). Epidemiology of snakebites in El Salvador (2014-2019). *Toxicon* 186 (2020) 26-28.

Gutiérrez, JM. León, G. Burnouf, T. (2011). Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. *Biologicals*. DOI: 10.1016/j.biologicals.02.005.

Gutiérrez, JM. León, G. Valverde, J. Rojas, G. Lomonte, B. (2000). Comparative study on the ability of IgG and Fab sheep antivenoms to neutralize local hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. *Toxicon* 38: 233-244.

Gutiérrez, JM. Rojas, G. Aymerich, R. (1996). El envenenamiento ofídico: Fisiología y tratamiento. Publicaciones de la Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, Instituto Clodomiro Picado. 22 pp.

Gutiérrez, JM. Rojas, G. Lomonte, B. Gené, JA. Cerdas, L. (1986). Comparative study of edema-forming activity of Costa Rican snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. *Comparative Biochemistry and Physiology* 85C, 171-175.

Harrison, R. Cook, D. Renjifo, C. Casewell, N. Currier, R. Wagstaff, S. (2011). Research strategies to improve snake bite treatment: challenges and progress. *Journal of Proteomics*. 74, 1768 – 1780.

Henríquez, V. (2010). Informe de Campo de Estudios de Herpetofauna Realizados en Parque Nacional Montecristo y Área Natural Cerro El Pital. Informe de Consultoría para el Fondo de Cooperación de Ecosistemas Críticos (CEPF).

SalvaNATURA Programa de Ciencias para la Conservación, San Salvador, El Salvador.

Henríquez, V. (2013). Distribución Real, Potencial y Características Principales de las Serpientes Venenosas en El Salvador. Bioma. ISSN 2307-0560.

Herrera, N. Henríquez, V. Greenbaum, E. (2007). New Country and Department records for Amphibians and Reptiles from El Salvador. Hepetological Review, 38(2), 2007, 222-226 p.

Hofmann, E. Rautsaw, R. Strickland, J. Holding, M. Hogan, M. Mason, A. Rokyta, D. Parkinson, C. (2018). Comparative venom-gland transcriptomics and venom proteomics of four Sidewinder Rattlesnake (*Crotalus cerastes*) lineages reveal little differential expression despite individual variation. Scientific Reports. (2018) 8:15534. DOI:10.1038/s41598-018-33943-5.

Incio, R. Incio, L. Zavaleta, A. Salas, M. Gutiérrez, JM. (1993). Toxicidad y neutralización de venenos ofídicos peruanos de los géneros Bothrops y Lachesis (Serpentes): Viperidae. Rev. Biol. Trop. 41(3):351-357. 1993.

Instituto Clodomiro Picado (ICP). (2007). Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos. Manual de métodos de laboratorio. Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología. Costa Rica.

Instituto Clodomiro Picado (ICP). (2009). El envenenamiento por mordedura de serpiente en Centro América, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica: Consultado el: 04 de septiembre de 2018.

King, G. (2011). Venoms as a plataforma for human drugs: traslating toxins into therapeutics. Expert Opinion on Biological Therapy. 11, 1469 – 1484.

Köhler, G. Vesel, M y Greenbaum, E. (2006). The Amphibians and Reptiles of El Salvador. Krieger Publishing Company, Melbourne, FL. 238 p.

Lee, J. (1996). The Amphibians and Reptiles of The Yucatan Peninsula. Cornel University Press. USA.

Lomonte, B. Fernández, J. Sanz, L. Angulo, Y. Sasa, M. Gutiérrez, JM. Calvete, J. (2014). Venomous snakes of Costa Rica: Biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomomics. Journal of Proteomics. 105, 323 – 339.

Lomonte, B. Gené, JA. Gutiérrez, JM. Cerdas, L. (1983). Estudio comparativo de los venenos de serpiente cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. Toxicon. 21(3), 379-384.

- Lomonte, B. Tarkowski, A. Hanson, LA. (1993). Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation* 17, 93-105.
- Mackessy, SP. (2010). Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. Capítulo 1: The Field of Reptile Toxicology, pp. 3-19. CRC Press.
- Mackessy, SP. Williams, K. Ashton, KG. (2003). Ontogenetic Variation in Venom Composition and Diet of *Crotalus sorenganus concolor*: A case of Venom Paedomorphosis. *Copeia*.769-782.
- Mader, DR. (2006). Reptile Medicine and Surgery. 2nd Ed. St. Louis, Missouri, Saunders Co. Elsevier. EUA, p. 1264.
- Malaga, O. Pantigoso, C. Morante, Y. Heredia, V. Cardenas, J. Yarleque, A. (2000). Variaciones en la Composición Proteica, Actividades Enzimáticas y Biológicas del Veneno de la Serpiente (Viperidae) en relación con la Edad. Vol. (7) o. 2 p: 161 170.
- Manual de Procedimientos del Serpentario. (2015). Sistema de Gestión de la Calidad. Instituto Clodomiro Picado. Procedimiento PE-SE-01 y PE-SE-02.
- Martínez, G. Rucavado, A. Lazcano, D. Gutiérrez, J. Borja, M. Lomonte, B. Garza, Y. Zugasti, A. (2013). Comparison of venom composition and biological activities of the subspecies *Crotalus lepidus lepidus*, *Crotalus lepidus klauberi* and *Crotalus lepidus morulus* from Mexico. *Toxicon*. 71, 84 – 95.
- Mata, A. (2012). Manual de procedimientos para el manejo de serpientes en cautiverio en el serpentario Patrulla Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, México.
- Mattison, C. (1982). The Care of Reptiles and Amphibians in Captivity. London, Blandford Press. UK, 304.
- Mebs, D. (2002). Venomous and Poisonous Animals. A Handbook for Biologists, Toxicologists and Toxinologists, Physicians and Pharmacists, Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart.
- Mendoza, J. Vivas, D. Inga, R. Arbaiza, E. Rodríguez, E. Yarlequé, A. (2009). Patrones electroforéticos de los venenos de serpientes peruanas de los géneros y *Bothrops* y *Lachesis*. *Rev Soc Quim Perú*. 75 (2) 2009.
- Miller, RE. (1999). Quarantine: A necessity for zoo and aquarium animals. In: Fowler ME & Miller RE (Eds.). Zoo & Wild Animal Medicine. Current therapy 4. W.B. Saunders Co. USA, pp. 13 – 17.

Ministerio de Salud (MINSAL). (2012). Lista de morbilidad por causas específicas por sexo. Sistema de morbi-mortalidad, OPS/OMS El Salvador. Consultado el: 04 de septiembre de 2019. Disponible en <http://simmow.salud.gob.sv/csexo.php>

Morán, E. (2013). Anfibios y Reptiles del Área Natural Protegida Parque Walter Thilo Deininger, municipio de La Libertad, departamento de La Libertad, El Salvador. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Escuela de Biología, San Salvador. 29 pp.

Morán, Emanuel S., Vladlen Henríquez, Eli Greenbaum, José Gabriel Cerén López and Ana María Rivera. (2015). Geographic Distribution: *Sibon dimidiatus* (slender snail sucker). Herpetological Review 46 (4): 576

Murphy, J y Armstrong, B. (1978). Maintenance of rattlesnake in captivity. University of Kansas, Lawrence, Kansas 66045, U.S.A.

Murphy, J. Hernderson, R (1997). Tales of Giant Snakes: A Historical Natural History of Anacondas and Pythons. Malabar Florida. Krieger Publishing Company.

Nielsen, TP. Jacobsen, MW. Wang T. (2011). Satiety and eating patterns in two species of constricting snakes. Physiology & Behavior 102(1): 110-114.

Organización Mundial para la Salud (OMS). (2015). Antídotos contra mordeduras de serpientes. Nota descriptiva N^a 337. Consultado el: 04 de septiembre de 2020. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/es/>

Otero, R. Gutiérrez, JM. Núñez, V. Robles, A. Estrada, R. Segura, E. Toro, MF. García, ME. DÍA, EC. Gómez, G. Castañeda, J. Moreno, ME. (1996). A randomized double-blind clinical trial of two antivenom in patients bitten by *Bothrops atrox* (in Colombia). Trans of the Royal Soc of Trop Med and Hyg. 90: 696-700.

Otero, R. Osório, RG. Valderrama, R. Giraldo, CA. (1992). Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Choco (Colombia). Toxicon. 30: 611- 620.

Pérez, A. Pérez, E. Pallarés, N. Llecha, C. Nogales, A. (2012). Ética y Bienestar Animal de los Animales en los Parques Zoológicos. España. p. 240.

Raiti, P. (2012). Serpientes. Capítulo 20. En: Meredith A y Redrobe S (Eds.). Manual de Animales Exóticos. Ediciones S. España, pp. 343 – 366.

Rojas, G. Gutiérrez, J. José, A. Gómez, M. Cerdas, L. (1987). Neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas de cuatro venenos de serpientes de Guatemala y Honduras por el antiveneno polivalente producido en Costa Rica. Revista de Biología Tropical, 35(1):59.73.

Rossi, J. (2005). General Husbandry and Management. En Reptile Medicine and Surgery Second Edition (2.a ed., pp. 38-54). Philadelphia: Saunders Elsevier.

Saravia, P. Rojas, E. Arce, V. Guevara, C. López, C. Chaves, E. et al. (2002). Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: pathophysiological and therapeutic implications. Rev Biol Trop 2002;50:337–46.

Serpentario Uniamazonia (SU). (2009). Protocolo para la extracción de veneno. Universidad de la Amazonia. Colombia. OD-A-APS-07-01.

Solórzano, A. (2004). Serpientes de Costa Rica (Snakes of Costa. Rica). Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), Santo. Domingo, Heredia.

Valdés, A. Chuy, S. Lara, O. Torres, P. Escobedo, C. Ibarra, G. (1994). Venenos y serpientes venenosas y ofidismo en Guatemala. Revista Científica, Vol (9), N°1 (1994). Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, Universidad San Carlos de Guatemala.

Varela, N. López, AL. Parra, E. Gómez, JC. (2014). Manual de Bioseguridad para el Manejo de Fauna Silvestre, exótica y no convencional. Asociación de Veterinarios de Vida Silvestre, Sociedad de Mejoras de Pereira. Bogotá, p. 82.

Varela, N. Ukumar, B. Rodr, C. (2014). Guía para el Manejo y Cuidado de Ofidios Colombianos en Cautiverio. Mem. Conf. Interna Med. Aprovech. Fauna Silv. Exót.

Vásquez, CA. Avendaño, CH. (2009). Manual para la identificación, prevención y tratamiento de mordeduras de serpientes venenosas en Centro América. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Organización Mundial de la Salud (OMS). Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS). Museo de Historia Natural (USAC). Volumen (I): Guatemala.

Vreugdenhil, D. Machado, M. Linares, J. Henríquez, V. (2011). Líneas Estratégicas para la Racionalización del Sistemas de las Áreas Naturales Protegidas de El Salvador, WICE, San Salvador.

Wellehan, JF and Gunkel, CI. (2004). Emergent diseases in reptiles. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine 13(3): 160-1774.

Williams, D. Gutiérrez, J. Calvete, J. Wüster, W. Ratanabanangkon, K. Paiva, O. Brown, N. Casewell, N. Harrison, R. Rowley, P. O´shea, M. Jensen, S. Winkel, K. Warrell, D. (2011). Ending the drought: New strategies for improving the flow of affordable, effective antivenoms in Asia and Africa. Journal of Proteomics. 74. 1735 – 1767.

World Health Organization (WHO), (2017). WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. World Health Organization, Geneva.

World Health Organization (WHO), (2019). Snakebite Envenoming. A Strategy for Prevention and Control. World Health Organization, Geneva.

Zambrano, AM. (2012). Accidente ofídico como evento de interés en salud pública en Colombia: aportes al diseño de estrategias de gestión. Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de: Magíster en Administración. Facultad de Ciencias Económicas, Universidad Nacional de Colombia. Santa fe de Bogotá, D.C. Colombia.

10. ANEXOS

Anexo 1: Preparación de solución amortiguadora de fosfatos ajustado a pH 7.2:

Reactivos	Gramos
NaCl	0.086 g
KCl	0.22 g
NaNO ₄	0.116 g
KNO ₄	0.02 g
Agua destilada	100 ml

Anexo 2: Tabla para recolectar datos de la dosis letal media (DL50) en ratones experimentales.

LABORATORIO DE EXPERIMENTACION ANIMAL
CENTRO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO EN SALUD
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

ACTIVIDAD ANTIOFIDICA
PRUEBA DE DL 50 DEL VENENO EN RATONES DE LABORATORIO

DESCRIPCION GENERAL

TIPO DE PRUEBA: DETERMINACIÓN: _____ NEUTRALIZACIÓN: _____

SUSTANCIA DE ENSAYO: _____ VIA DE ADMINISTRACION: _____ CONCENTRACION O DOSIS: _____

GRUPO: CONTROL _____ PATRON _____ TRATAMIENTO _____ No DE ANIMALES: _____ SEXO: _____ ESPECIE: _____ CEPA: _____

Tiempo de observación post inoculación del veneno	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6
10 min						
30 min						
60 min						
24 h						
48 h						

X = Muerto

0 = Vivo

RESPONSABLE DE LA PRUEBA: _____

FECHA: ___/___/___ OBSERVACION: _____

Anexo 3: Tabla de datos de ejemplares colectados en los diferentes sitios del país.

N°	Individuo	Talla (cm)	Sexo	Sitio de Colecta
1	<i>Crotalus simus</i> (Pipa Kawe)	52	Cría	Quezaltepeque, San Salvador
2	<i>Crotalus simus</i> (Tuty)	58	Cría	Quezaltepeque, San Salvador
3	<i>Crotalus simus</i> (Macha)	59	Cría	Quezaltepeque, San Salvador
4	<i>Crotalus simus</i> (Cari)	85.6	Pendiente	Quezaltepeque, San Salvador
5	<i>Crotalus simus</i> (Tequila)	87.8	No definido	Zaragoza, La Libertad
6	<i>Crotalus simus</i> (Croti)	94.5	Macho	Fuerza Aérea Ilopango, San Salvador
7	<i>Crotalus simus</i> (René)	127.5	Hembra	Cojutepeque, Cuscatlán
8	<i>Crotalus simus</i> (Quesadilla)	147.4	Macho	San Pedro Perulapán, Cuscatlán
9	<i>Crotalus simus</i> (Manda)	156.5	Hembra	Tapalhuaca, La Paz

Anexo 4: Ubicación de gancho en L en la serpiente luego de la entubación.



Anexo 5: Sujeción de cabeza en el embudo para la extracción de veneno.



Anexo 6: Técnica de manipulación correcta para la extracción de veneno.



Anexo 7: Desinfección de colmillos en serpiente víbora de cascabel.

