

Universidad de Panamá
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

Trabajo de Graduación

***Lachesis acrochorda* (García, 1896), (Squamata, Viperidae): Evaluación de 2 efectos biomédicos de su veneno; lepidosis, morfometría y sexo.**

Trabajo presentado a la Escuela de Biología como requisito para obtener la Licenciatura en Biología con orientación en Biología Animal.

Por:

Katherine Karina Muñoz Arosemena

Reinaldo Xavier Pérez García

2019

Dedicatoria

A Dios.

Por darme vida y fortaleza.

A mis padres.

Félix Muñoz González y Aura Rosina Arosemena Arjona por su apoyo, cuidado y amor incondicional.

A mis hermanos y tía.

Keyla Arosemena y Félix Miguel Muñoz Arosemena por su amor, ánimos a mi persona y siempre estar para mí. Zoila Arosemena por creer en mí y darme todo el apoyo y el cariño para lograr mis metas.

A nuestros asesores.

Víctor Martínez Cortés, Abel Batista, y César Villareal por su paciencia, apoyo, dedicación y conocimientos compartidos.

A todas las personas.

Que me han apoyado a lo largo de mi carrera y han estado conmigo física o espiritualmente.

Los quiero a todos.

Katherine K. Muñoz A.

Dedicatoria

A Dios.

Por darme vida y la fuerza de seguir adelante.

A mis padres.

Leonidas Pérez Soriano y Gumerinda Del Carmen García Jaén por su apoyo incondicional, y ayudarme a tomar cada decisión de mi vida.

A mi hermano.

Ronaldo Leonel Pérez García por apoyarme en todas mis dificultades y siempre estar presente para contar con él.

A mi novia

Omayra Aimée Meléndez Peñalba por ser fuente de ayuda, apoyo y motivación incondicional.

A nuestros asesores.

Víctor Martínez Cortés, Abel Batista, y Cesar Villareal, por su apoyo y dedicación.

Gracias por todo.

Reinaldo X. Pérez.

Agradecimientos

A nuestro asesor Víctor Martínez Cortés por su ayuda y asesoramiento incondicional durante nuestro trabajo de graduación, por sus consejos, su confianza, y por su dedicación al apoyarnos.

A nuestro Co-asesor Abel Batista por su tiempo y apoyo a pesar de sus ocupaciones y por sus consejos para mejorar nuestro trabajo.

A nuestro Co-asesor Cesar Villareal, por su apoyo en nuestro trabajo de graduación.

Al doctor Rafael Otero por su ayuda constante durante el desarrollo de nuestra investigación y por sus muy valiosos consejos al enviarnos información útil.

Al doctor Mahmood Sasa por su ayuda al facilitarnos artículos útiles para nuestro trabajo.

Al profesor Carlos Ramos por su apoyo, tiempo y prestaciones.

A la profesora Ariadna Bethancourt por su ayuda, tiempo y consejos a la hora de preparar nuestras pruebas.

A la profesora Nivia Ríos por su ayuda y tiempo prestados para aconsejarnos en nuestras pruebas.

A la profesora Ana María Jiménez y el profesor Ricardo Pérez por sus invaluable consejos y ayuda.

A Marcelo Mack por su ayuda, consejos, y constante apoyo a la hora de realizar nuestra investigación.

A la profesora Martha Herrera por su importante ayuda y colaboración con materiales necesarios para llevar a cabo nuestra investigación.

Al profesor José Villareal por su ayuda a la hora de preparar nuestras soluciones.

A nuestros padres por su apoyo incontable e incondicional.

A nuestros compañeros y amigos Omayra Meléndez, Jorge Medina, Evelyn Del Rosario, Liza Douglas, Nellys Aparicio, Maribel Barría, Jairo Sánchez, Yitxy Vallester y Melciellyne Aguilar por sus consejos, correcciones, apoyo, tiempo dedicado y ayuda invaluable.

AL CEREO, por brindarnos los materiales y espacio necesarios para realizar nuestra investigación.

Índice general

Dedicatoria	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice general.....	vi
Índice de cuadros	ix
Índice de figuras	x
Resumen.....	xii
Introducción.....	2
Objetivos	9
Generales	9
Específicos.....	9
Antecedentes	10
Lepidosis/folidosis	10
Liofilización	10
Veneno de <i>Lachesis</i>	11
Hemorragia	11
Edema.....	13

Materiales y métodos	14
Sitio de muestreo	14
Serpientes	14
Sedación de las serpientes	14
Fotografías	16
Extracción de veneno.....	16
Liofilización	19
Conservación del veneno.....	20
Lepidosis / folidosis	20
Morfometría.....	21
Diluciones	22
Ratones.....	26
Actividad hemorrágica.....	26
Actividad edematizante	27
Resultados y discusión.....	28
Hemorragia	28
Edema.....	29
Lepidosis.....	33

Vista dorsal: <i>Lachesis acrochorda</i>	33
Vista lateral: cabeza de <i>Lachesis acrochorda</i>	34
Vista frontal: cabeza de <i>Lachesis acrochorda</i>	35
Vista ventral: <i>Lachesis acrochorda</i>	35
Lepidosis de ejemplares del CEREO contra ejemplares de Martínez Cortés 1981.	37
Morfometría.....	38
Conclusiones.....	40
Recomendaciones.....	41
Referencias	42
Anexos	56
Apéndice 1. Cuadros.....	56
Apéndice 2. Figuras.	60

Índice de cuadros

Apéndice 1. Cuadros.....	56
Cuadro 1. Hemorragia inducida por veneno de <i>Lachesis</i>	56
Cuadro 2. Edema inducido por veneno de <i>Lachesis</i>	56
Cuadro 3. Lepidosis y morfometría.	57
Cuadro 4. Lepidosis de ejemplares del CEREO contra ejemplares según Martínez C. 1981.	58
Cuadro 5. Variación de escamas en tres especies de <i>Lachesis</i>	59

Índice de figuras

Apéndice 2. Figuras.	60
Figura 1. Distribución general de <i>Lachesis</i> . Ripa (2001).	60
Figura 2. Distribución general de <i>Lachesis acrochorda</i> . Ripa (2001)	61
Figura 3. Distribución de <i>L. acrochorda</i> en Panamá. Ripa (2001).	62
Figura 4. Distribución de <i>Lachesis</i> en Panamá. Ray (2018).	63
Figura 5. Distribución de <i>L. acrochorda</i> en Panamá. Ray (2018)	64
Figura 6. Distribución general de <i>Lachesis stenophrys</i> . Ripa (2001).	65
Figura 7. Distribución de <i>L. stenophrys</i> en Panamá. Ripa (2001).	66
Figura 8. Distribución de <i>L. stenophrys</i> en Panamá. Ray (2018).	67
Figura 9. Distribución general de <i>Lachesis melanocephala</i> . Ripa (2001).	68
Figura 10. Distribución de <i>L. melanocephala</i> en Panamá. Ray (2018).	69
Figura 11. Hemorragia inducida por veneno de <i>Lachesis</i>	70
Figura 12. Hemorragia inducida por veneno de <i>Lachesis</i>	71
Figura 13. Edema inducido por veneno de <i>Lachesis</i>	72
Figura 14. Edema inducido por veneno de <i>Lachesis</i>	73
Figura 15. Forma para sostener con seguridad vipéridos.	74
Figura 16. Morfometría/lepidosis (caracterización de escamas).	74

Figura 17. Conteo de escamas: a una cabeza de la cabeza, al medio cuerpo, y a una cabeza de la cloaca.	75
Figura 18. Cola: escamación y comparaciones; macho (abajo), hembra (arriba).	75
Figura 19. Patrón común de manchas en <i>Lachesis acrochorda</i>	76
Figura 20. Vista dorsal: cabeza de <i>Lachesis acrochorda</i>	76
Figura 21. Vista lateral: cabeza de <i>Lachesis acrochorda</i>	77
Figura 22. Vista frontal: cabeza de <i>Lachesis acrochorda</i>	78
Figura 23. Vista ventral: cabeza de <i>Lachesis acrochorda</i>	78
Figura 24. Vista ventral completa de <i>Lachesis acrochorda</i>	79
Figura 25. Vista ventral: cola de <i>Lachesis acrochorda</i>	79

Resumen

Lachesis acrochorda es una víbora de gran tamaño que puede alcanzar hasta los 3 metros de longitud, y es la única víbora (Viperidae) ovípara en el nuevo mundo. En cuanto a la composición y efectos de los venenos de serpientes se han estudiado gran variedad de ellos, por lo que se tiene información sobre envenenamientos y como debe tratarse a los afectados; pero en el caso de *Lachesis* al ser muy difícil de ubicar y mantener en cautiverio no se han realizado suficientes estudios para obtener mejores conocimientos sobre el veneno ya que los envenenamientos por *Lachesis* son tratados con antivenenos polivalentes al igual que otras especies; aunque, existen diferencias en los efectos biomédicos inducidos por los envenenamientos causados por ejemplares de éste género, que ocupan distintos nichos ecológicos, las cuales producen veneno capaz de causar ya sea mayor o menor hemorragia, edema, mionecrosis, u otros efectos.

En este trabajo comparamos los efectos hemorrágico y edematizante inducidos por veneno de *Lachesis acrochorda*, mantenidas en el Centro para Investigaciones y Respuestas en Ofidiología (CEREO) de la Universidad de Panamá las cuales nacieron de ejemplares adultos provenientes de Viento Frío, en Chepo, provincia de Panamá; y fueron comparados con resultados de un estudio hecho con ejemplares que en 1981 fueron considerados como *Lachesis muta*, en la actualidad identificadas como *Lachesis stenophrys*, de Bocas del Toro; y *Lachesis acrochorda*, de Playa Chuzo, Panamá.

Por nuestros resultados confirmamos las diferencias inducidas por los venenos entre ejemplares en cautiverio de *Lachesis acrochorda* contra ejemplares silvestres de esta especie; y también con ejemplares de *Lachesis stenophrys*.

Además, revisamos la morfometría, lepidosis (conteo de escamas), y sexo de los siete ejemplares del CEREO para compararlo con ejemplares de *Lachesis stenophrys*, y *Lachesis melanocephala*, y estos mismos aspectos con referencias obtenidas de literatura para *Lachesis acrochorda* en los que obtuvimos datos que demuestran que nuestros ejemplares pertenecen a esta especie y las cuales tienen un patrón de manchas dorsales en la cabeza que son comunes y prevalentes.

Introducción

Las modificaciones al medio ambiente causadas por el humano producen alteraciones en la estructura y composición de los ecosistemas y la vegetación, lo que trae consigo cambios en las condiciones ambientales y los microhábitats (Saunders *et al.* 1991; Martínez Cortés, comunicación personal). La mayor amenaza para los ofidios son los impactos producidos por los humanos en estos ambientes, lo que afecta negativamente las interacciones en estas condiciones ambientales (Filippi y Luiselli, 2000). Estos sucesos favorecen la reducción de presas, y por ende las poblaciones de serpientes y otros animales; en algunos casos hasta extinciones (Prior y Weatherhead, 1996; Gibbons *et al.* 2000; Keller y Heske, 2000; Dickerson, 2001). Los requerimientos y disposición de recursos como hábitats y alimentos son aspectos determinantes para la reproducción y sobrevivencia de las especies (McAllister, 1995; Plummer 2002).

Lachesis acrochorda (García, 1896) está distribuida desde el Este de Panamá, al noroeste de América del Sur (Pacífico de Colombia y Noroeste de Ecuador), y ocupa ámbito altitudinal desde el nivel del mar hasta los 1600 msnm en bosques lluviosos (Köhler, 2003; 2008). Esta especie habita en Darién, Panamá y posiblemente la Comarca Guna Yala (Ray, 2018; Martínez Cortés, Com. personal). Figs. 1 - 5

Por su parte la distribución de *Lachesis stenophrys* Cope, 1876 abarca desde Nicaragua suroriental hasta Panamá centro, ocupando elevaciones desde el nivel del mar hasta los 1000 m. en bosque lluvioso. La localidad tipo es Sipurio, Costa Rica. En Panamá podemos encontrarla en las provincias de Bocas del Toro, Coclé, Colón, Panamá, Veraguas, y la Comarca Ngäbe Buglé (Ray, 2018). Figs. 1, 4, 6 - 8

Lachesis melanocephala Solórzano y Cerdas, 1986 está distribuida en el extremo suroriental de Costa Rica (Península de Osa y áreas adyacentes con bosque lluvioso), ocupa ámbito altitudinal desde el nivel del mar hasta los 500 m. en bosque lluvioso. La localidad tipo es 9 km al norte de Ciudad Neily, Puntarenas. También podemos encontrarla en el extremo oeste de la República de Panamá en la provincia de Chiriquí (Ray, 2018). Figs. 1, 4, 9-10.

En cuanto a *Lachesis muta*, que incluye las subespecies: *L. m. muta* (Linneo, 1766), y *L. m. rhombeata* (Wied-Neuwied, 1824). La subespecie nominal se distribuye en los bosques ecuatoriales de Brasil, Guyana, Venezuela, Trinidad y Tobago, Bolivia, Perú, y las laderas del Pacífico de Ecuador y Colombia (Campbell y Lamar, 1989). *Lachesis m. rhombeata* habita desde el bosque Atlántico del estado brasileño de Ceará (Borges-Nojosa y Lima-Verde, 1999) hasta el estado de Río de Janeiro.

Las *Lachesis* suelen alojarse dentro de madrigueras; y por sus actividades vitales en el sotobosque obtienen el agua en fuentes cercanas como lagunas, ríos, riachuelos, o incluso en reservorios temporales. Sin embargo, ocasionalmente también toman el agua acumulada entre las escamas quilladas de su piel. El tamaño de sus presas está relacionado directamente con su morfometría por lo que prefieren mamíferos medianos (roedores, marsupiales y pequeños primates). Contrario a la mayoría de los vipéridos los cuales son vivíparos, las *Lachesis* son ovíparas. Para proteger los huevos suelen enrollarse colocando su cuerpo sobre o alrededor de ellos. Usualmente usan madrigueras de mamíferos para la ovoposición por lo que se piensa que guarda relación con la termorregulación a la vez que los protege contra potenciales depredadores (Valencia *et al.* 2016).

Los venenos de vipéridos producen efectos locales y sistémicos que se caracterizan por provocar pronunciado efecto local constituido por dolor, edema, equimosis, flictenas hemorrágicas, y necrosis tisular; lo cual frecuentemente ocasiona secuelas como pérdida de tejido o amputación de la extremidad afectada (Picado, 1931; Kaiser y Michl, 1968; Rosenfeld, 1971; Jiménez-Porras *et al.* 1973).

Contrario a lo que sucede con las *Lachesis*, se ha considerado que las especies de *Bothrops* son de mayor importancia médica por la cantidad, y gravedad de accidentes que provocan (Vallejo-Freire, 1967; Jiménez y García, 1969).

El 95% del contenido seco del veneno de serpiente está formado por polipéptidos que incluyen enzimas, toxinas y pequeños péptidos capaces de modificar la fisiología de los animales envenenados (Karalliedde, 1995). Se han identificado más de 20 enzimas distintas, de las cuales, 12 se encuentran en la mayoría de los venenos y una de ellas (la hialuronidasa) es común a todos ellos; la función de esta enzima es facilitar la distribución del veneno por los distintos tejidos de la presa (Karalliedde, 1995).

Se ha valorado que el 25% de los individuos mordidos por serpientes venenosas no llegan a presentar un cuadro de intoxicación (Gutiérrez *et al.* 2007).

La mordedura seca se ha incluido como una manifestación clínica importante en la clasificación del envenenamiento por serpientes venenosas (Adukauskiénė *et al.* 2011). La incidencia de "mordeduras secas" varía con las especies de serpientes venenosas y de un lugar a otro y también, en cierta medida, los criterios y el criterio del clínico para diferenciar entre edema muy leve y ningún signo local (Naik, 2017).

Algunos investigadores han demostrado que el anti-veneno aún administrado inmediatamente después de la mordedura solo impide parcialmente los efectos locales

(Homma y Tu, 1970). La patogenia de este fenómeno ha sido atribuida a factores entre los que destacan el efecto miotóxico (Cameron y Tu, 1977) la acción hemorrágica (Bjarnason y Tu, 1978), y la actividad proteolítica (Kaiser y Michl, 1968).

A pesar de las diferencias en composición y dinámica de la actividad de los venenos, éstos han sido clasificados en función de las patologías que desarrollan en: neuro y hemotóxico. Ambos cuadros cursan con debilidad generalizada, dolor e inflamación local, mediada principalmente por metaloproteasas (Teixeira *et al.* 2005). El cuadro hemotóxico es producido por el veneno de casi todas las especies; excepto las de la subfamilia Hydrophiinae. Los mecanismos de acción están mediados por fosfolipasa A₂, metaloproteasas, lectinas, y desintegrinas que afecta tanto a las células sanguíneas, principalmente plaquetas y linfocitos (Du *et al.* 2006), como a los factores sanguíneos de la coagulación, produciendo graves alteraciones en la hemostasia. El estudio de las proteínas anticoagulantes de estos venenos ha contribuido al entendimiento de los mecanismos moleculares de la coagulación sanguínea y han aportado datos para desarrollar fármacos utilizados en el tratamiento de la diátesis trombótica (Kini, 2006). El cuadro neurotóxico es producido por el veneno de las especies de Elapidae mediante dos mecanismos de acción diferentes. El mecanismo presináptico producido por α -neurotoxinas, que producen bloqueo de los canales de K⁺ del botón terminal, o por β -neurotoxinas, que provocan el vaciado de las vesículas de acetilcolina; ambas provocan estimulación inicial, previa a la parálisis flácida de tipo irreversible. El mecanismo postsináptico se produce por el bloqueo irreversible del receptor nicotínico por la α - y κ -neurotoxinas, lo que produce parálisis flácida de rápida aparición que suele provocar la muerte. A diferencia del anterior, responde bien a la

administración de antivenenos (Tsetlin y Hucho, 2004) ya que actúan a nivel extracelular.

La falta de tratamiento en Hospitales y Centros de Salud para las mordeduras de *Lachesis* sigue siendo problema de salud en algunas regiones de América Central ya que en ocasiones se utilizan antivenenos para *Bothrops* y éstos no son adecuadamente eficaces para neutralizar las toxinas de *Lachesis* (Bard *et al.* 1994). Por lo tanto los pacientes mordidos por *L. m. muta* pueden morir o tener sangre incoagulable persistentemente después de ser tratados con sueros botrópicos/crotálicos (Jorge *et al.* 1997).

Se han reportado diferencias cuantitativas en toxinas, enzimas, y variaciones sutiles en patrones electroforéticos con venenos de *L. muta* y *L. stenophrys* de Brasil, Colombia y Costa Rica, aunque el envenenamiento produjo perfil fisiopatológico cualitativamente similar (Otero *et al.* 1998). Esto puede contribuir a la mejor comprensión de la biología y ecología de las serpientes, los efectos biomédicos del veneno, y también servir como punto de partida para estudiar estructura-función y correlaciones de toxinas individuales.

Debido a la difícil captura y mantenimiento en cautiverio de *Lachesis*, pocos estudios han intentado investigar la fisiopatología del envenenamiento utilizando modelos animales (Damico *et al.* 2005 b). Trabajos recientes han demostrado que el veneno de *L. m. muta* posee componentes activos sobre la unión neuromuscular y las fibras musculares (Damico *et al.* 2005 a), y ejerce efectos tóxicos sobre cultivos celulares de riñón canino Madin-Darby (Damico *et al.* 2007).

Se han aislado algunos componentes como las metaloproteasas hemorrágicas (Estêvão-Costa *et al.* 2000), la enzima trombina (Magalhães *et al.* 2006), y las fosfolipasas A₂ (PLA₂) y algunas isoformas (Fuly *et al.* 2002; Damico *et al.* 2005b; 2006). En general, el veneno crudo de *Lachesis muta muta* posee niveles más potenciados para actividades procoagulantes, proteolíticas, y de PLA₂ en comparación con venenos en especies de *Bothrops* (Fuly *et al.* 1993).

Decidimos realizar este estudio debido a que en Panamá no se tienen conocimientos suficientes para las afecciones causadas al humano e incluso animales de granja por envenenamiento de serpientes. Además, que luego de leer varios artículos sobre envenenamientos en general por serpientes, nos hemos percatado que en su mayoría y más a la hora de tratar mordeduras por *Lachesis*, se utilizan antivenenos botrópicos y crotálicos; que obviamente no tendrán el efecto requerido debido a las diferencias que existen tanto inter como intraespecíficamente en cuanto a los componentes que conforman el veneno, e incluso en las cantidades de cada componente contenidas en el veneno. Debido a esto, damos como testimonio el porqué de tantos casos de defunciones por envenenamientos en las zonas en donde mayormente se dan este tipo de accidentes.

Según datos del Ministerio de Salud en 1998 se registraron 1132 casos; en 1999, 1425 casos; en el 2000 se notificaron 1798 casos, y en el 2001, 1583 casos. Las tasas de incidencia por 100,000 habitantes, respectivamente, fueron: 40.9, 50.7, 62.96 y 54.2 %. La tasa de mortalidad correspondió a 0.33, 0.61, 0.49, y 0.58 % para cada año respectivamente. Se describe que las provincias con mayores tasas de incidencia son Darién, Coclé, y Los Santos, pero la información de la provincia de Veraguas no refleja

la realidad. La afectación con mayor frecuencia ocurre en masculinos y durante la época lluviosa, mayo a noviembre (Barahona, 2003).

En Panamá los envenenamientos constituyen problema de salud pública relevante respecto de la región latinoamericana (Fan y Cardoso, 1995; Gutiérrez, 2017; Chippaux, 1998; 2017) debido a la similitud en aspectos geográficos y biológicos; se extrapola la información sobre la fisiopatología del envenenamiento, desconociendo algunos aspectos como las variaciones intraespecíficas. La información sobre el envenenamiento con *Lachesis* es poca por lo que se desconoce todas las variables como los requerimientos y disposición de recursos, el hábitat y el alimento, aspectos que determinan la reproducción y sobrevivencia de las especies (McAllister, 1995; Plummer, 2002).

La data epidemiológica reciente sugiere que Panamá tiene la tasa mas alta de mordedura por serpientes en Centroamérica (Gutiérrez, 2011).

Objetivos

Generales

- Investigar 2 efectos biomédicos: hemorragia y edema, inducidos por el veneno de *Lachesis acrochorda*
- Confirmar la lepidosis y morfometría y sexo en *Lachesis acrochorda*.

Específicos

- Evaluar efecto hemorrágico del veneno de *L. acrochorda* en ratones.
- Evaluar efecto edematizante del veneno de *L. acrochorda* en ratones.
- Comparar los efectos de nuestros ejemplares con los efectos inducidos por veneno de *L. muta* (actualmente *L. stenophrys* de Bocas del Toro y *L. acrochorda* de Playa Chuzo Panamá).
- Comparar lepidosis con otras especies de *Lachesis*.

Antecedentes

Lepidosis/folidosis

Patrón y disposición de escamas. Perteneciente al número, patrón, forma, posición y disposición de las escamas en reptiles (Wareham, 2005).

Liofilización

Es un proceso para conservación mediante sublimación utilizado con el fin de reducir las pérdidas de los componentes volátiles o termo-sensibles. Es el más noble proceso conocido, para conservación de productos biológicos porque aúna los dos métodos más fiables de conservación: congelación y deshidratación. Sin conservantes o productos químicos, es el proceso más adecuado para preservar células, enzimas, vacunas, virus, levaduras, sueros, derivados sanguíneos, algas; así como frutas, vegetales, carnes, peces, y alimentos en general. En este proceso de secado los productos obtenidos no se ven alterados en sus propiedades biológicas y se rehidratan fácilmente (Alvarado, 1979; Krokida *et al.* 1998; Alvarado, 1996; Ramírez 2006; Ramírez y Cañizares, 2003).

La liofilización no altera la estructura físico-química del material, pero permite su conservación indefinida sin cadena de frío, con menos del 15% de humedad y alta estabilidad microbiológica (Alvarado, 1996). Es ideal para conservar productos alimenticios, farmacéuticos y biológicos, que no deben calentarse aún a temperaturas moderadas (Geankoplis, 1998)

Jennings (1993) define la liofilización como el proceso de estabilización en el cual el material primero se congela y se concentra el solvente, comúnmente el agua, reduciéndolo mediante sublimación y desorción, a niveles que no sostendrán más el crecimiento biológico, o reacciones químicas. Consta de tres fases: sobrecongelación, desecación primaria, y desecación secundaria.

Los investigadores de INVAP² en el proyecto LIAL, 2001 definen la liofilización como una forma de desecado en frío, que sirve para conservar sin daño a los materiales biológicos. El producto se conserva con muy bajo peso y a temperatura ambiente, manteniendo estable todas sus propiedades al rehidratarse.

Veneno de *Lachesis*

Estudios experimentales con venenos de nuestras serpientes (Bolaños, 1972) indican que el veneno de *Lachesis* es uno de los menos potentes para el ratón blanco y que la producción de veneno por parte de esta serpiente no es de las mayores, a pesar de su gran tamaño; además se ha informado que el suero antiofídico costarricense tiene suficiente potencia para su conveniente neutralización (Bolaños y Cerdas, 1978).

Hemorragia

Las hemorragias, con sus distintas localizaciones y ámbitos de severidad, son causa relativamente frecuente de consulta, sobre todo urgente, en los Centros de Salud o Servicios de Urgencias. La causa más frecuente es, sin duda, los traumatismos físicos que generalmente producen hemorragias de escasa cuantía y fácilmente controlables. Sin embargo, es preciso conocer también, desde el punto de vista terapéutico, la actuación ante hemorragias capaces de comprometer hemodinámicamente al

paciente y, desde el punto de vista diagnóstico, los síntomas cardinales que nos deben orientar hacia un trastorno primario de la hemostasia (Sánchez *et al.* 2000).

La hemorragia es el trastorno caracterizado por la extravasación de sangre del lecho vascular. El sistema hemostático es el encargado de evitar esta pérdida hemática a través de precisas interacciones entre componentes de la pared vascular, plaquetas circulantes y proteínas plasmáticas. Sin embargo, cuando la enfermedad o el traumatismo son lo suficientemente graves o intensos como para lesionar arterias o venas se produce hemorragia, aun en presencia de una hemostasia normal (trastornos hemorrágicos secundarios). Con menor frecuencia, la existencia de trastornos hereditarios o adquiridos del propio sistema hemostático da lugar al desarrollo de hemorragias más o menos difusas, de forma espontánea o provocadas por traumatismos cuya importancia no siempre guarda relación con la intensidad de la hemorragia que sigue al golpe o lesión: trastornos hemorrágicos primarios (Sánchez *et al.* 2000).

Desde el punto de vista clínico, esta clasificación constituye excelente primera aproximación al estudio de las hemorragias porque, además de existir características clínicas propias de cada uno de los dos trastornos, con gran frecuencia su diagnóstico comporta actitud terapéutica distinta. En efecto, si bien el signo guía de cualquier trastorno, primario o secundario, es la hemorragia, ésta no siempre se produce como consecuencia de la misma noxa, ni en la misma localización ni con la misma intensidad (Sánchez *et al.* 2000).

La dosis mínima hemorrágica mínima (DHM) se definió como la menor cantidad de veneno que produce una lesión de 10 mm de diámetro 24 horas después de la administración intercutánea Kondo *et al.* 1960.

Edema

Es el incremento de líquidos en los intersticios. Tiene diversas causas, algunas originan trasudado causando edema generalizado por disminución de la presión oncótica (por ejemplo, síndrome nefrótico, cirrosis hepática) o aumento de la presión hidrostática (insuficiencia cardíaca), o favoreciendo el aldosteronismo secundario que causa la retención de sodio y agua. Otras causas del edema originan exudado por aumento en la permeabilidad del vaso sanguíneo a las proteínas (infección) u obstrucción en el sistema linfático (neoplasias) expresando edema localizado en la región afectada. Existen otras causas relacionadas con fármacos (calcio antagonista) con trastornos de distribución de la grasa subcutánea (lipedema), endocrinas (hipotiroidismo), y en algunos casos se desconoce el origen. El tratamiento depende del origen del edema (Flores-Villegas *et al.* 2014).

La "dosis mínima de edema" se definió como "la menor cantidad de veneno que produce un 130% de la relación edema" Yamakawa *et al.* 1976.

Materiales y métodos

Sitio de muestreo

Las serpientes son ejemplares de *Lachesis acrochorda*, las cuales están desde su nacimiento en el Centro para Investigaciones y Respuestas en Ofidiología (CEREO) de la Escuela de Biología en la Universidad de Panamá. Los padres de nuestros ejemplares provienen de Viento Frío, Chepo, Panamá. Realizamos el inventario en el Serpentario y la Cuarentena de los materiales que utilizamos y así conocer lo que nos haría falta para la realización del trabajo de investigación y nos permita obtener resultados aceptables.

Serpientes

Las serpientes fueron aisladas y mantenidas en cajas rotuladas así: L1, L2, hasta L7. Contamos con siete ejemplares a los cuales se les realizó su identificación mediante los respectivos métodos para este procedimiento (folidosis/lepidosis: conteo de escamas) para confirmar que es la especie en cuestión.

Sedación de las serpientes

Para llevar a cabo la lepidosis y extracciones de veneno se adormecieron los especímenes con CO₂ (El CO₂ pesa más que el O₂, de manera que se deposita en el fondo del recipiente). Procedimos a llenar un recipiente de 60 litros con CO₂ hasta saturar el recipiente (todos los tiempos los estimamos realizando pruebas con ejemplares de *Bothrops asper* de tamaño y peso similar al de los animales experimentales originales de *Lachesis acrochorda*), luego colocamos cada individuo

de uno en uno, y con cada ejemplar se volvía a llenar el tanque con CO₂. Esperamos ocho minutos hasta que la serpiente estuviese completamente sedada. En tanto transcurrían los ocho minutos de sedado se revisaba el animal para asegurarnos de que se encontraba en buen estado (observamos la respuesta del animal usualmente de 3 a 5 minutos, lo suficiente para lograr una buena sedación; algunos signos indicadores de exceso de CO₂ pueden ser que; la serpiente respire con la boca abierta y se congestiona la mucosa bucal por vasodilatación) todo esto fue necesario para evitar que las serpientes sufriesen cualquier trastorno debido al exceso de CO₂ y no permitir que estas muriesen en el proceso.

Se debe recordar que la temperatura a la que debe realizarse la anestesia será entorno a los 29°C, ya que influirá en la duración y profundidad de la anestesia, así como en la recuperación (las temperaturas bajas pueden ralentizar su recuperación), mientras las elevadas pueden acelerarlas, aunque tampoco se recomienda como método (Amador *et al.* 2008).

Los agentes utilizados como inhalatorios han cambiado a lo largo del tiempo. Se han dejado atrás algunos como el éter (irritante y explosivo), óxido nitroso (en combinación con el oxígeno y otro anestésico volátil) o el cloroformo. Hoy día, a excepción del halotano, todos los anestésicos volátiles son metil etil éter halogenados los cuales causan depresión respiratoria, hipoxia y otros efectos adversos como daño hepático y renal (Amador *et al.* 2008).

Fotografías

Decidimos tomar fotos de los ejemplares por regiones del cuerpo para facilitar el proceso de lepidosis/folidosis, y observar con mayor facilidad otros aspectos de las serpientes sin necesidad de correr riesgos innecesarios. El proceso de fotografía también nos ayudó a la hora de sexarlas.

Para tomar estas fotos utilizamos peceras de vidrio, donde colocamos a los ejemplares, y se procedió a tomar las fotografías tanto ventrales, como laterales, frontales, y dorsales; de tal manera que podamos observar cada una de las diferencias morfológicas en cada ejemplar y se comparó con otras especies del mismo género. Cuadros 4 - 5.

Extracción de veneno

Para no desperdiciar veneno se midió la distancia de extremo a extremo, de la boca y utilizar viales con el diámetro adecuado.

En las extracciones de veneno utilizamos recipientes de colecta de orina, los cuales fueron esterilizados junto a otros materiales como: tela de paracaídas, tela Tafetan, y pinzas; en Autoclave modelo STE-8-M. Todo esto, para evitar la contaminación del veneno a la hora de extraerlo a través de la tela, y también se evita que los animales contraigan cualquier tipo de parásito, bacteria, virus u hongo al realizar las extracciones.

A la hora de extraer veneno, teníamos en una mesa todos los instrumentos y soluciones a utilizar para luego proceder a tomar los animales por la cabeza con la

ayuda de un gancho herpetológico, el cual se coloca encima de la cabeza de la serpiente para luego proceder a tomarla con las manos colocando el dedo índice en el centro de la cabeza de la serpiente el cual evitará que esta pueda levantarse y morder, luego los dedos pulgar y corazón son colocados detrás de la comisura de la boca, lo cual evitará que la serpiente pueda retroceder y morder; y por último los dedos anular y meñique que se colocan en el cuello de la serpiente para que estos hagan un poco de presión y eviten que pueda moverse hacia adelante y hacia atrás. Todo esto, como se muestra en la figura 15. Al tener la serpiente ya sostenida correctamente por la cabeza, debido al gran tamaño de estas, una segunda persona se encargó de sostener el resto del cuerpo colocando una mano en el centro del cuerpo del animal y la otra mano sosteniendo la porción del cuerpo donde está ubicada la cloaca para evitar que los animales, al sentirse amenazados, defequen a manera de defensa o estrés. Y por último una tercera persona se hace cargo de sostener el recipiente donde se extraerá el veneno colocándolo en forma vertical y firme para evitar que, al morder la serpiente en la tela, debido a la fuerza y movimientos bruscos del animal, más la presión que ejerce el que sostiene la cabeza de la serpiente no vaya a colocar los dientes fuera del recipiente y expulse veneno fuera del mismo y evitar también el ser mordidos o salpicados con el veneno. Para esto también utilizamos pinzas con las cuales la persona que sostiene la cabeza también se encarga con su otra mano de contraer o mostrar los dientes de la serpiente para asegurarse de que ambos estén dentro del recipiente o en caso de terminada la extracción, contraídos dentro de la boca del animal.

En el primer ordeño realizado el día 18 de diciembre del 2018 decidimos llevarlo a cabo de dos formas; la primera fue anestesiando a los animales

La otra forma practicada fue sin anestesiarse a los animales, para luego de realizadas estas dos metodologías saber cuál es más eficaz a la hora de extraer veneno. Al finalizar la primera extracción nos percatamos que es mucho mejor que el animal esté despierto, ya que este inocula una mayor cantidad de veneno, solo hay que tener más cuidado ya que estos pueden reaccionar de manera inesperada.

La segunda extracción de veneno se realizó el día 8 de enero de 2019 y esta, como mencionamos antes fue realizada de la segunda manera, donde los animales no se sedaron (realizamos todos los pasos anteriormente mencionados, excepto el uso del CO₂ para anestesiarse) y efectivamente, se obtuvo una mayor cantidad de veneno. La tercera extracción la llevamos a cabo el 11 de junio de 2019 en donde obtuvimos la mayor cantidad de veneno.

Luego de realizar cada extracción se revisaron los animales antes de soltarlos para ver si tenían lesiones en la boca o el cuerpo luego de la manipulación y de darse el caso se le coloca yodo al 0,02% para desinfectar las heridas. Al terminar el proceso de extracción el que esté manipulando la cabeza de la serpiente toma el resto del cuerpo del animal y lo lleva a su respectiva caja donde debe esperar a que la serpiente se calme y relaje los músculos para así poder soltarla rápidamente y colocar la tapa de una manera segura.

El veneno puede ser colectado haciendo morder placas de Petri y por compresión manual suave de las glándulas de veneno (Gatti *et al.* 1999).

Liofilización

Para este proceso utilizamos Liofilizador LABCONCO (Lyph-Lock 4.5) donde mantuvimos la válvula de vacío de todas las boquillas en la posición Vent; antes de encender el equipo verificamos que el aceite de la bomba de vacío esté al nivel adecuado. Encendimos el equipo y observamos que la temperatura del condensador alcanzó entre -40°C a -52°C (15- 20 min). En ese momento, encendimos la bomba de vacío y esperamos que alcanzara los 500mB de presión, sacamos del congelador los venenos, y conectamos los frascos o ampollas en la boquilla requeridas y con los condensadores o acoples necesarios. Rotamos las válvulas de todas las boquillas requeridas para aplicar el vacío en la posición Vaccum. La presión de vacío descenderá a menos de 500 mB y se estabilizará. El veneno estará totalmente liofilizado entre 24-72 horas después; sin embargo, se revisó el proceso de la operación 2-3 veces al día. Si la fuente de energía falla en cualquier momento el equipo se apagará automáticamente y hay que volver a iniciar todo el proceso descrito, después de la limpieza del condensador. El veneno se colocó con sus respectivos envases dentro de los recipientes de vidrio con sellado hermético para este proceso, el cual consiste en deshidratar el veneno para su conservación congelándolo rápidamente y eliminando el hielo (agua) posteriormente mediante un ligero calentamiento al vacío que lo transforma en vapor si necesidad de pasar nuevamente por estado líquido. Todo esto es necesario para obtener el veneno en polvo y para que este no pierda su actividad biológica para llevar a cabo nuestras pruebas.

Conservación del veneno

El veneno extraído fue colocado en congelador modelo EL-CH32010 a dos grados Celsius (°C) para mantener la cadena de frío y así evitar que el veneno pierda su actividad biológica, que como sabemos, el cambio en la temperatura deteriora los efectos y no conseguiremos los resultados esperados.

Al finalizar la liofilización del veneno, este debe extraerse de la máquina de forma segura utilizando guantes, bata, lentes y mascarilla para protegerse en caso de que el polvo se disperse en el aire. Además, esta actividad debe realizarse cerca de un extractor para que, de darse el caso de dispersión de veneno en el aire, este salga del lugar y no afecte a nadie.

En cuanto al veneno liofilizado, este también debe mantenerse en frío para evitar que este, como mencionamos anteriormente, pierda su actividad biológica.

Lepidosis / folidosis

Iniciamos la lepidosis de las siete serpientes luego de haberlas fotografiado y sedado. Con las fotografías observamos cuántas escamas ocupan la franja postocular ya sea tanto de ancho como en longitud, se observaron cuántas escamas ocupan la región interorbital de cada uno de los animales contando en línea recta desde la escama supraocular derecha hasta la izquierda, así como el número de escamas post, sub, pre y supraoculares. Se observaron cuántas escamas canthales tienen, realizamos el conteo tanto de las escamas infra como supralabiales y observamos las posiciones y con qué escamas hacen contacto las escamas mental y rostral, vimos las escamas loreales y cómo están ocupadas por la foseta loreal, revisamos y anotamos la cantidad

de escamas gulares, realizamos el conteo de las escamas ventrales y subcaudales donde en estas últimas, vimos si son divididas o completas, y se observó si la escama anal es dividida o completa. Luego, con el sedado, llevamos a cabo el conteo de escamas a una distancia de una cabeza de la cabeza, a medio cuerpo y a una cabeza de la cloaca; otros datos que decidimos tomar en cuenta fueron la longitud, grosor (cabeza y medio cuerpo), y longitud total de los animales. Fig. 16.

Para las escamas que deben revisarse a una cabeza de la cabeza, una cabeza de la cloaca y el conteo de escamas a medio cuerpo se realizaron de la manera habitual, la cual consiste en sostener a los animales por la cabeza y contar las escamas que ocupan estas zonas descritas, ya sea conteo en línea recta, zigzag o en uve (V). Fig. 17.

Se revisó el sexo de cada ejemplar basándonos en la morfología de la base de la cola, luego de examinar las fotografías, ya que el macho al poseer hemipenes en esta región se observa un engrosamiento particular. Fig. 18.

Morfometría

Para tomar los datos morfométricos de cada serpiente, se tomó cada ejemplar de la manera descrita con anterioridad al realizar las extracciones de veneno inmovilizando a las serpientes. Al tener asegurados a los animales procedimos a realizar las medidas morfométricas con un calíper o pie de rey, el cual colocábamos de comisura a comisura de la boca para medir el ancho de la cabeza y desde la escama rostral hasta donde se observa que termina la banda postocular; se midió el ancho del medio cuerpo y se tomaron, con una cinta métrica, la medidas de longitud del tronco que va

desde el final de la banda postocular hasta donde se encuentra la escama anal; y la longitud de la cola que va desde la primera escama subcaudal hasta la punta de la cola. Al final se midió la longitud total del cuerpo y el peso de cada uno de los ejemplares en una balanza SALTER Brecknell MS20 colocando una caja contenedora sobre la balanza para la cual se tomó su peso y se llevó a cero, para así luego colocar cada ejemplar de *Lachesis acrochorda* en la caja y tomar sus respectivos pesos (para esto se taró la balanza cada vez que se pesaba).

Diluciones

Como diluyente utilizamos buffer fosfatos a pH 7,2 el cual se prepara de la siguiente manera:

- Na_2HPO_4 (Fosfato ácido di sódico) 4,095 g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Fosfato ácido monosódico) 1,54 g
- NaCl 6,73 g
- H_2O destilada estéril 1,0 litro
- Ajustar el pH a 7,2 con ácido acético glacial o HCl 1N o NaOH 1N, según el caso.

Para las pruebas fueron necesarias las siguientes cantidades de veneno liofilizado:

Hemorragia: 1.25 μg , 2.5 μg , y 10 μg .

Edema: 5 μg , 10 μg , 20 μg , y 30 μg .

Cada una de estas cantidades de veneno las diluimos en 1 ml de solución de fosfatos preparada a pH 7.2.

Dado que son cantidades muy pequeñas para diluir decidimos preparar una solución madre para luego a partir de esta realizar diluciones seriadas para obtener las diluciones necesarias.

Para cada prueba se inoculó a cada ratón la siguiente cantidad de solución diluida:

Hemorragia: 0.1 ml

Edema: 0.03 ml

Para la preparación de la solución madre utilizamos 1 litro de solución de fosfatos y se le agregó 0.1 g de veneno liofilizado por lo que obtendremos una solución de 100 µg/ml y a partir de aquí prepararemos nuestras soluciones.

Para prepara 80 µg/ml tenemos que:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V \ 100 \ \mu\text{g/ml} = (80\mu\text{g/ml})(100\text{ml})$$

$$V = (80 \ \mu\text{g/ml})(100\text{ml})/100 \ \mu\text{g/ml}$$

V = 80 ml de solución madre y aforar hasta 100 ml

Para prepara 60 µg/ml tenemos que:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V \ 100 \ \mu\text{g/ml} = (60\mu\text{g/ml})(100\text{ml})$$

$$V = (60 \ \mu\text{g/ml})(100\text{ml})/100 \ \mu\text{g/ml}$$

V = 60 ml de solución madre y aforar hasta 100 ml

Para preparar 50 µg/ml tenemos que:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V \text{ 60 } \mu\text{g/ml} = (50\mu\text{g/ml})(100\text{ml})$$

$$V = (50 \mu\text{g/ml})(100\text{ml})/60 \mu\text{g/ml}$$

V = 83.3 ml de solución madre y aforar hasta 100 ml

Para preparar 40 $\mu\text{g/ml}$ tenemos que:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V \text{ 100 } \mu\text{g/ml} = (40 \mu\text{g/ml})(100\text{ml})$$

$$V = (40 \mu\text{g/ml})(100\text{ml})/100 \mu\text{g/ml}$$

V = 40 ml de solución madre y aforar hasta 100 ml

Para preparar 30 $\mu\text{g/ml}$ tenemos que:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V \text{ 40 } \mu\text{g/ml} = (30 \mu\text{g/ml})(100\text{ml})$$

$$V = (30 \mu\text{g/ml})(100\text{ml})/40 \mu\text{g/ml}$$

V = 75 ml de solución de 40 $\mu\text{g/ml}$ y aforar hasta 100 ml

Para preparar 20 $\mu\text{g/ml}$ tenemos que

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V \text{ 30 } \mu\text{g/ml} = (20 \mu\text{g/ml})(100\text{ml})$$

$$V = (20 \mu\text{g/ml})(100\text{ml})/30 \mu\text{g/ml}$$

V = 66.7 ml de solución de 30 $\mu\text{g/ml}$ y aforar hasta 100 ml

Para preparar 10 $\mu\text{g/ml}$ tenemos que:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V \ 20 \ \mu\text{g/ml} = (10 \ \mu\text{g/ml})(100\text{ml})$$

$$V = (10 \ \mu\text{g/ml})(100\text{ml})/20 \ \mu\text{g/ml}$$

V = 50 ml de solución de 20 $\mu\text{g/ml}$ y aforar hasta 100 ml

Para preparar 5 $\mu\text{g/ml}$ tenemos que:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V \ 10 \ \mu\text{g/ml} = (5 \ \mu\text{g/ml})(100\text{ml})$$

$$V = (5 \ \mu\text{g/ml})(100\text{ml})/10 \ \mu\text{g/ml}$$

V = 50 ml de solución de 10 $\mu\text{g/ml}$ y aforar hasta 100 ml

Para preparar 2.5 $\mu\text{g/ml}$ tenemos que:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V \ 5 \ \mu\text{g/ml} = (2.5 \ \mu\text{g/ml})(100\text{ml})$$

$$V = (2.5 \ \mu\text{g/ml})(100\text{ml})/5 \ \mu\text{g/ml}$$

V = 50 ml de solución de 5 $\mu\text{g/ml}$ y aforar hasta 100 ml

Para preparar 1.25 $\mu\text{g/ml}$ tenemos que:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

$$V \ 2.5 \ \mu\text{g/ml} = (1.25 \ \mu\text{g/ml})(100\text{ml})$$

$$V = (1.25 \ \mu\text{g/ml})(100\text{ml})/2.5 \ \mu\text{g/ml}$$

V = 50 ml de solución de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ y aforar hasta 100 ml.

Ratones

Los ratones con ámbito de peso entre 18 a 22 g. de la cepa Bal-C fueron obtenidos del Instituto Conmemorativo GORGAS de Estudios de la Salud (ICGES) y el CIIMET.

Para la actividad hemorrágica los ratones fueron sacrificados exponiéndolos a CO₂ durante cinco minutos en un recipiente de 25 litros; dos horas después de la inoculación de sus respectivas dosis de veneno y dosis control. Luego fueron disectados desde la columna vertebral para evitar dañar la mancha hemorrágica y posteriormente ser calcada en papel transparente para luego llevarla a papel milimetrado y calcular el área, de la cual utilizando la fórmula del área del círculo ($A=\pi r^2$, donde el diámetro es igual a la raíz cuadrada del radio multiplicado por dos) se obtiene el diámetro en milímetros el cual utilizamos para determinar cuándo se obtiene un área hemorrágica mínima.

En cuanto a la actividad edematizante, los ratones fueron sacrificados exponiéndolos a CO₂ durante 5 minutos en un recipiente de 25 litros y luego se midió el grosor tanto de la pata control como de la pata inoculada con solución venenosa y luego de esto se cortaron las patas a nivel de la rodilla para ser pesadas y mediante una regla de tres se obtiene el porcentaje de edema causado por una dosis de veneno. (Peso de la pata inoculada con veneno x 100) / Peso de la pata control – 100.

Actividad hemorrágica.

Fue determinada de acuerdo con la técnica de Kondo *et al.* 1960 modificada mediante el uso de ratones en lugar de conejos (Gutiérrez, *et al.* 1980); donde se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de veneno utilizando PBS (tampón fosfato

salino) como diluyente. Trabajamos con soluciones que contendrán 1,25; 2,5 y 10 μg de veneno diluido en 1 ml de solución de fosfatos a pH 7,2. Se rasuró el área ventral del ratón donde se va a inocular. De estas soluciones inoculamos intradérmicamente 0.1 ml a grupos de 3 ratones más el control inoculado con agua destilada. Luego de pasadas dos horas los ratones fueron sacrificados, pero utilizando dióxido de carbono en lugar de cloroformo, para proceder a remover la piel y medir el área hemorrágica, calcando esta área en papel milimetrado (Gutiérrez *et al.* 1980). La cantidad de veneno capaz de producir un área hemorrágica de 10 mm de diámetro en dos horas será considerada como la dosis hemorrágica mínima.

Actividad edematizante.

Medimos mediante la técnica de Yamakawa *et al.* 1976, donde preparamos soluciones con concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 y 100 μg de veneno diluido en 1 ml de solución de fosfatos llevadas a pH 7,2 con HCl 1N o NaOH 1N. Luego, a grupos de 8 ratones se les inculó en la planta del pie izquierdo de la extremidad posterior 0.03 ml de las distintas soluciones por ratón; mientras que en la planta del pie derecho de la extremidad posterior fue inoculada con 0.03 ml de agua destilada como control. Pasada 24 horas, cortamos, pesamos y medimos con Cáliper o calibrador el grosor tanto de la pata posterior izquierda (pata con solución venenosa) como el de la pata posterior derecha (pata control) y luego estimamos la magnitud del edema (como porcentaje del aumento del peso de la pata).

Resultados y discusión

Hemorragia

Obtuvimos desarrollo del área hemorrágica con diámetro de 6,02 mm para la dosis de 1,25 μg , mientras que en el estudio realizado por Martínez Cortés (1981) con *Lachesis muta* el resultado de *Lachesis* de Bocas del Toro fue de 12,5 mm de diámetro; y *Lachesis* de Playa Chuzo, Panamá 12,6 mm de diámetro; y se puede observar que, para estas dos últimas la dosis de 1,25 μg es la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) ya que sobrepasa los 10 mm de diámetro (Gutiérrez y Chaves, 1980) mas no así para nuestros ejemplares.

Para la dosis de 2,50 μg obtuvimos desarrollo del área hemorrágica con un diámetro de 9,06 mm lo cual es muy cercano a la Dosis Hemorrágica Mínima (Gutiérrez y Chaves, 1980); mientras que *Lachesis* de Bocas del Toro presentó en el estudio realizado por Martínez Cortés (1981) un diámetro de 16,9 mm y *Lachesis* de Playa Chuzo, Panamá presentó un diámetro de 12,9 mm.

Por último, nuestros ejemplares del CEREO sobrepasaron la Dosis Hemorrágica Mínima con la dosis de 10 μg donde obtuvimos el área con diámetro de 13,16 mm mientras que para *Lachesis* de Bocas del Toro se registraron 22,9 mm y *Lachesis* de Playa Chuzo, Panamá 20,4 mm. Cuadro 1 y fig. 11.

Como se observa en nuestro estudio, obtuvimos una DHM con la solución de 10 μg , la cual muestra que el veneno es ocho veces menos productor de hemorragia

que el veneno de *Lachesis stenophrys* de Bocas del Toro y *Lachesis acrochorda* de Playa Chuzo, Panamá ya que para estas últimas la DHM fue de 1.25 µg.

Edema

Obtuvimos para la dosis de 10 µg porcentaje de 1,29% lo que indica bajo aumento en el peso de la pata inoculada (posterior izquierda) con respecto a la pata control (posterior derecha), mientras que para *Lachesis* de Bocas del Toro con 5 µg registraron resultados de 21,0% y para *Lachesis* de Playa Chuzo, Panamá de 33,2% (Martínez Cortés, 1981), esta última alcanzando la Dosis Mínima Edematizante (DME) según Yamakawa *et al* 1976. En el caso del presente estudio, este resultado se puede deber a que según Lomonte *et al.* en 1993, las dosis bajas de 1 µg inducen edema inmediato, transitorio y sin hemorragia en la extremidad inyectada, en cambio dosis de 25 a 100 µg inducen edema similar en rapidez y magnitud al de dosis bajas, pero difiere en que se mantiene por 48 a 72 horas junto con marcada hemorragia. Debido a esto podemos deducir que la Dosis Mínima Edematizante (DME) difiere tanto interespecífica como intraespecíficamente pasadas 24 horas. Debido al bajo porcentaje del edema producido consideramos que, para nuestros ejemplares la dosis de 10 µg es muy baja para alcanzar la DME. Cuadro 2 y fig. 13.

En nuestros resultados luego de revisar las tabulaciones en la fig. 13 se puede observar que la línea que representa a *Lachesis acrochorda* de Playa Chuzo, Panamá y la que representa a los ejemplares del CEREO se comportan de forma similar, aunque difieran en la cantidad de microgramos por mililitro requeridos para

alcanzar la DME, ya que en el caso de *Lachesis stenophrys* de Bocas del Toro podemos ver que la DME para esta especie se alcanzó con 10 µg/ml, mientras que para *Lachesis acrochorda* de Playa Chuzo, Panamá se alcanzó la DME con 5µg/ml. En nuestro estudio la DME de *Lachesis acrochorda* del CEREO se alcanzó con una dosis mucho mayor lográndola a los 100 µg/ml, lo que es 20 veces mayor a la DME de *L. acrochorda* de Playa Chuzo, Panamá, y 10 veces mayor a la de *L. stenophrys* de Bocas del Toro. Cuadro 2 y fig. 13.

Los venenos de serpientes presentan variaciones en cuanto a su composición y estas variaciones son características entre especies del mismo género tal como ocurre entre serpientes de géneros diferentes (Chippaux *et al.* 1991). De hecho, el veneno de una serpiente puede estar sujeto a cambio ontogenético y por la localización, izquierda o derecha de las glándulas productoras de veneno (Gubenšek *et al.* 1974; Johnson *et al.* 1987).

Además, la severidad del envenenamiento puede variar debido a factores como el estado de salud de la serpiente y de la víctima; el tamaño y la última vez que se alimentó, el volumen inyectado, la profundidad y localización de la mordedura, el peso corporal de la víctima, el grosor de la piel y el pelo, la cantidad de grasa subcutánea, la edad, el tiempo que pasa entre la mordedura y el examen médico, así como el tipo de tratamiento instaurado (Córdoba, 1991; Michal y Eran, 1999; Hopper *et al.* 2001; Méndez y Riet-Correa, 1995 y Aroch y Harrus, 1999).

Hemos inferido que nuestros resultados pueden deberse al tipo de alimentos utilizados para alimentar las serpientes en cautividad contra lo que comen en

condiciones de vida silvestre (Otero Com. personal, 2019). La localización geográfica de las especies puede influir en los efectos farmacológicos de los venenos (variabilidad). Otros factores indicados como influyentes en la variabilidad de los efectos del veneno son la edad y el sexo (Menezes *et al.* 2006), ubicación geográfica (Durban *et al.* 2011; Jayanthi y Gowda, 1988; Minton y Weinstein, 1986), la dieta (Barlow *et al.* 2009; Creer *et al.* 2002; Daltry *et al.* 1996; Li *et al.* 2005 b), temporada (Gubenšek *et al.* 1974), y frecuencia de extracción del veneno (Willemse *et al.* 1979). Según Kerchove *et al.* 2004, después de la extracción del veneno, la glándula vacía requiere de 40-50 días para que vuelva a llenarse completamente; aunque, en general, para especies del género *Bothrops*, pueden ordeñarse mensualmente ya que son más fáciles de conseguir y sobreviven más fácilmente al ser alimentadas con ratones Swiss Webster criados en cautiverio; mientras que para *Crotalus* y *Lachesis* son ordeñadas cada tres meses debido a la dificultad de conseguirlas, y por su más difícil supervivencia en cautiverio (Otero com. personal, 2019). Nosotros nos vimos en la necesidad de realizar hasta cuatro extracciones en 5 meses y se agrupó el veneno, lo cual pudo causarles mucho estrés durante y posterior a la extracción (Willemse *et al.* 1979).

Además, teniendo en cuenta el alto costo energético para la síntesis de proteínas en la producción de venenos por las glándulas especializadas (McCue, 2006; Morgenstern y King, 2013; Lomonte *et al.* 2016) y su alta relevancia trófica, es razonable suponer que los componentes de veneno más abundantes deben jugar un papel importante en la toxicidad. Gracias a lo anteriormente expuesto podemos inferir que las diferencias en nuestros resultados pueden deberse al tipo de alimento

suministrado a los ejemplares, ya que desde su nacimiento solo son alimentados con ratas y ratones los cuales se alimentan con productos "peletizados" (formula todo en uno), mientras que los ejemplares en estado silvestre, según su tamaño, de mamíferos medianos como roedores (género *Proechimys*, *Sciurus*, *Coendou*), marsupiales, y pequeños primates. Sin embargo, otras presas inusuales como ranas y aves han sido reportadas por Carrillo de Espinoza (1970), y en el caso de un macho adulto restos de *Didelphis marsupialis* (Valencia *et al.* 2016). Además, podemos dar fe de que las *Lachesis* en estado silvestre se alimentan con mayor frecuencia mientras que nuestros ejemplares únicamente han sido alimentados aproximadamente una vez al mes. Nuestros resultados también pueden reflejar diferencia debido a que, en el estudio realizado por Martínez Cortés (1981), las serpientes fueron capturadas e inmediatamente se les extrajo el veneno en campo y fue colocado en un tanque con nitrógeno líquido para preservar la cadena de frío, mientras que en nuestro caso el veneno fue extraído y colocado en congelador hasta su posterior uso. También hacemos constar que el veneno utilizado por Martínez Cortés (1981) fue liofilizado terminada la extracción, mientras que nuestros venenos fueron almacenados temporalmente ya que hubo dificultades al momento de conseguir los materiales y ratones necesarios para realizar las pruebas.

Hay pequeñas variaciones en el patrón electroforético del veneno almacenado cuando se compara con el veneno fresco, independientemente de las condiciones de almacenamiento (Gené *et al.* 1985)

Lepidosis

Del estudio descriptivo de la lepidosis / folidosis podemos afirmar que los especímenes son, efectivamente, ejemplares de *L. acrochorda*. En el cuadro 3 se aprecian los datos, tanto la lepidosis como la morfometría de cada animal.

Vista dorsal: *Lachesis acrochorda*.

Cabeza

En la vista dorsal de la cabeza se observa el patrón de manchas bastante irregulares, aunque hay algunas que, en nuestros siete ejemplares siempre aparecen, pero en distintos tamaños, manteniendo el siguiente orden específico: En la región prefrontal se observan dos manchas negras que pueden ocupar entre dos a seis escamas las cuales tienen una separación de una escama la una de la otra. La región frontal presenta otras dos manchas negras que ocupan entre tres a cinco escamas y separadas por tres a cuatro escamas. Otras dos manchas aparecen en la región parietal, estas hacen contacto con las escamas supraoculares, estas manchas están separadas por siete a 11 escamas y ocupan entre tres a cuatro escamas. En el centro de la región parietal también encontramos otras dos manchas las cuales entre las manchas son las mejor definidas de la cabeza y abarcan entre dos a cuatro escamas con una separación de solo una escama la una de la otra y estas son las manchas que se encuentran en *Lachesis stenophrys*. Nuevamente en la Región parietal se observan otras dos manchas que entre sí están separadas por ocho a diez escamas y estas manchas abarcan entre tres a 12 escamas. Y finalmente en la región parietal, justo al final de esta, hay una única mancha grande

y en forma de uve (V), la cual abarca entre 18 a 25 escamas. Este patrón podemos observarlo en la fig. 19.

También podemos observar que las escamas supraoculares son solo una sobre cada ojo y de un tamaño de hasta tres veces las escamas corporales; estas son de forma oval y alargada separadas entre 12 a 13 escamas. Las escamas canthales son tres, presentes en los siete ejemplares y se observan en la fig. 21.

Tronco

En la lepidosis a nivel dorsal del tronco de nuestros ejemplares obtuvimos que, a distancia de una cabeza de la cabeza, un ámbito de escamas entre 37 a 39, a medio cuerpo entre 26 a 40 escamas, y un conteo final el cual se realizó a una cabeza de la cloaca donde obtuvimos un ámbito de escamas entre 17 a 26. Cuadro 3.

Vista lateral: cabeza de *Lachesis acrochorda*.

Para la vista lateral de la cabeza de nuestros ejemplares se observó que la banda postocular ocupa un ancho de hasta dos escamas por un largo de 18 escamas sin contar las escamas Postoculares, que en este caso son tres. Observamos nuevamente la única y alargada escama supraocular, dos escamas Infraoculares y dos escamas preoculares en donde la escama superior es más grande (posiblemente el doble) que la inferior y esta última entra en contacto con la foseta loreal. Las escamas supralabiales se observan claramente y son de tamaños variados, mientras que las infralabiales son de tamaños más uniforme. Y por último podemos ver que la escama prenasal es hasta tres veces mayor que la escama postnasal. Fig. 21.

Vista frontal: cabeza de *Lachesis acrochorda*.

En esta vista podemos ver que la escama frontal es grande, triangular y es tan larga como ancha. La escama frontal también está en contacto con las Internasales, ya que, las escamas prenasales no hacen contacto entre sí. También podemos observar la escama mental, la cual es triangular y tan ancha como larga, pero de un tamaño un poco más pequeña que la rostral. Y también como las primeras escamas infralabiales son muy alargadas y hacen contacto entre sí aislando a la escama mental de hacer contacto con otras escamas. Fig. 22.

Vista ventral: *Lachesis acrochorda*.

Cabeza

En esta vista tenemos la posibilidad de ver como las escamas infralabiales impiden el contacto de la escama mental con las escamas gulares las cuales son dos, de gran tamaño y alargadas (hasta seis veces las escamas del cuerpo).

Observamos la presencia de un surco gular, el cual inicia en la escama mental, pasa a través de las escamas gulares y se extiende tres o cuatro escamas más de largo.

Otro aspecto observable es que en la región de la cabeza se pueden incluir entre cuatro a cinco escamas ventrales. Fig. 23.

Tronco

Observamos que las escamas ventrales de cada ejemplar son escamas completas que abarcan todo el plano ventral, aunque hay veces en las que se encuentran escamas divididas. El total de escamas varía entre 217 a 223. Al final del tronco se

puede observar la escama anal completa, la cual separa el tronco de la cola. Fig. 24.

Cola

En vista ventral de la cola se pueden observar las escamas subcaudales las cuales varían de 36 a 42, estas son divididas y no ocupan toda la cola, ya que, al finalizar la cola empiezan a dividirse más y finaliza en una escama alargada con apariencia de aguijón, lo que es un rasgo en las serpientes *Lachesis* sp.

En la vista ventral también es posible identificar el sexo de los ejemplares. Los machos al poseer hemipenes presentan un engrosamiento que hace ver la parte anterior a la cloaca como la parte posterior engrosadas o similares entre sí, mientras que en las hembras la parte anterior se ve más ancha que la posterior. Fig. 25

Se encontraron diferencias en la lepidosis y patrón del color entre los tres nuevos taxa (Peters y Orejas-Miranda, 1970), pero no fue hasta que se describe a *L. muta melanocephala* como subespecie distinta de *L. stenophrys* (Solórzano y Cerdas, 1986), misma que se distingue del resto, entre otros rasgos, por el número inferior de escamas ventrales, las internasales y prenasales más pequeñas, la ausencia o menor cantidad de manchas en el dorso de la cabeza, y con crestas vertebrales más pronunciadas.

En *L. acrochorda*, el dorso de la cabeza está marcado con un patrón distintivo “arabesco”. De manera variable puede tener color dorsal del cuerpo más brillante, más contrastante que las de Mato Grosso, Brasil que tiende a amarillo en lugar de naranja, o cobrizo. Las escamas son a menudo muy rugosas, aparentemente más

que en *L. muta muta*. Sin embargo, estadísticamente estos rasgos no parecen reflejarse en todos los casos.

En nuestros ejemplares, la coloración no es un rasgo distintivo ya que, a pesar de ser incluso ejemplares nacidos de una misma madre, poseen coloraciones muy distintas entre sí las cuales varían de un chocolate oscuro a un naranja cobrizo y llegando inclusive a tonalidades de un amarillo claro.

En *L. melanocephala* es distintivamente visible el negro azabache en la parte dorsal de la cabeza, y la banda oscura postocular que va desde el hocico hasta la parte final de la cabeza incluyendo los ojos.

El conteo de escamas ventrales en *L. melanocephala* es mayor (209-222) que en *L. stenophrys* (101-209) Solórzano y Cerdas, 1986; siendo comparable *L. melanocephala* con *L. muta*, y la forma chocoana (Ripa, 1999; 2000). Otras diferencias de *L. melanocephala* incluyen hocico anteriormente acortado, cuya altura dorsal puede ser igual o superior a la frontal, posee escamas significativamente más pequeñas que las otras *Lachesis*; la piel en la que las escamas son quilladas sobresale notablemente, otorgándole apariencia trenzada y uniformemente manchada, especialmente en los machos (Ripa, 1994).

Lepidosis de ejemplares del CEREO contra ejemplares de Martínez Cortés 1981.

Hembras

Determinamos para nuestros 5 ejemplares del CEREO la cantidad de escamas interoculares las cuales están en ámbito entre 12 a 13 escamas, a medio cuerpo en ámbito entre 33 a 40 escamas, las subcaudales en ámbito entre 36 a 37 escamas,

y las ventrales en ámbito entre 217 a 223 escamas. Comparándolo con los resultados obtenidos por Martínez Cortés en 1981 podemos determinar que en el conteo de las escamas interoculares, al medio cuerpo, y las ventrales de nuestros ejemplares fue mayor; pero en las escamas subcaudales de nuestros ejemplares el conteo fue menor con respecto a los de Martínez Cortés (1981). Cuadro 4.

Machos

Determinamos para nuestros 2 ejemplares del CEREO la cantidad de escamas interoculares la cual fue de 12 escamas, a medio cuerpo en ámbito entre 26 a 37 escamas, las subcaudales en ámbito entre 39 a 42 escamas, y las ventrales en ámbito entre 218 a 221 escamas. Comparándolo con los resultados obtenidos por Martínez Cortés en 1981 podemos determinar que en el conteo de las escamas interoculares de nuestros ejemplares fue igual al de algunos de los ejemplares utilizados por Martínez Cortés, el conteo al medio cuerpo, las ventrales y, las escamas subcaudales de nuestros ejemplares estuvo dentro del ámbito para la especie en estudio. Cuadro 4.

Morfometría

Determinamos las medidas morfométricas de nuestros ejemplares los cuales tienen cinco años, y obtuvimos que, para el largo de la cabeza desde la escama rostral hasta el final de la comisura de la boca, hay un ámbito de medida entre 6 a 7 cm; para la longitud del troco los resultados van en un ámbito de 154 a 166 cm. y por último un ámbito de longitud de la cola que va entre 15 a 19 cm. Cuadro 3

Al finalizar las medidas realizamos una suma de longitudes por sección del cuerpo y el tamaño total de nuestros ejemplares fue entre 176 y 189.5 cm. También tomamos el peso de nuestros ejemplares como dato adicional, donde obtuvimos peso con ámbito entre 1.80 a 2.28 Kg. Cuadro 3

Conclusiones

Registramos como Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) 10 µg.

Nuestra DHM es ocho veces menos hemorrágica que la registrada para *L. acrochorda* y *L. stenophrys* por Martínez Cortés en 1981.

Registramos como Dosis Mínima Edematizante (DME) 100 µg.

Nuestra DME es 20 veces menos edematizante que la registrada para *L. acrochorda* por Martínez Cortés en 1981.

Nuestra DME es 10 veces menos edematizante que la registrada para *L. stenophrys* por Martínez Cortés en 1981.

Confirmamos mediante la lepidosis que la especie corresponde a *Lachesis acrochorda*.

Observamos la marcada diferencia en el patrón de manchas en la cabeza de tres especies de *Lachesis* presentes en Panamá.

Recomendaciones

- Aplicar genética molecular a los ejemplares del CEREO.
- Extraer veneno con menor frecuencia para evitar el estrés de los ejemplares y que haya más tiempo para la recuperación y formación de nuevo veneno.
- Realizar más estudios como mionecrosis, dosis letal 50 (DL₅₀) y dosis efectiva DE₅₀ para ampliar los conocimientos sobre efectos biomédicos que involucran el veneno de esta especie.
- Desarrollar estudios adicionales para establecer diferencias claras sobre el veneno de ejemplares en cautiverio contra ejemplares silvestres.
- Ejecutar el estudio con mayor cantidad de ejemplares, incluyendo de otras áreas geográficas.

Referencias

Adukauskienė, D., E. Varanauskienė, y A. Adukauskaitė. 2011. Venomous snakebites. *Med. Kaunas.* 47(8):461-467.

Alvarado, J. 1979. Ensayos de almacenamiento y estudio de un mecanismo de secado a temperaturas bajas en papa (*Solanum tuberosum*). Doctoral dissertation, tesis para optar por el título de Magister Scientifical. CESNA-INCAP. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 68pp. + anexos.

Alvarado, J. 1996. *Principios de Ingeniería Aplicados a Alimentos.* Ed. OEA. Ambato, EC. Quito, Ecuador. Pp. 420-453.

Amador, S. T., D. Redondo, y M. San Andrés. 2008. Anestesia en serpientes. *Pan. Act. Med.* 32(318):4-10.

Aroch, I., y S. Harrus. 1999. Retrospective study of the epidemiological, clinical, haematological and biochemical findings in 109 dogs poisoned by *Vipera xanthina palestinae*. *Vet. Rec.* 144(19):532-535.

Barahona, I. 2003. Epidemiología del envenenamiento ofídico en Panamá (conferencia). I Simposio Nacional de Toxinología. Pp. 16-18.

Bard, R., J. de Lima, R. Sa Neto, S. Oliveira, y M. Santos. 1994. Inefficacy of bothropic antivenom on the neutralization of the coagulant activity of *Lachesis muta muta* venom: case report and experimental evidence. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 36(1):77-81.

Barlow, A., C. E. Pook, R. A. Harrison, y W. Wüster. 2009. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. Proc. Biol. Sci. 276(1666):2443-2449. DOI: 10.1098/rspb.2009.0048

Bjarnason, J. B., y A. T. Tu. 1978. Hemorrhagic toxins from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin. Bioch. 17(16):3395-3404. DOI: 10.1021/bi00609a033

Bolaños, R. 1972. Toxicity of Costa Rican snake venoms for the white mouse. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 21:360-363.

Bolaños, R., y L. Cerdas. 1978. The production and control of anti-venoms sera. In 15th I.A.B.S. congress: Vaccination in the developing countries. La Guadeloupe. Develop. Standard. S. Karger, Basel. 41:109-116.

Borges-Nojosa, D. M., y J. S. Lima-Verde. 1999. *Lachesis muta rhombeata*. Geographic distribution. Herpetol. Rev. 30:235.

Cameron, D. L., y A. T. Tu. 1977. Characterization of myotoxin α from the venom of prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Biochemistry*, 16(11):2546-2553.

Campbell, J. A., y W. W. Lamar. 1989. The venomous reptiles of Latin America. Comstock, Ithaca, New York, U.S.A. 1-99 pp.

Chippaux, J. P. 1998. Snake bites: appraisal of the global situation. Bull. Who. 76:515-524.

Chippaux, J. P. 2017. Incidencia y mortalidad por mordedura de serpiente en las Américas. PLoS. Negl. Trop. Dis. 11(6):1-39. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005662

Chippaux, J. P., Williams, V., y White, J. 1991. Variabilidad del veneno de serpiente: métodos de estudio, resultados e interpretación. Toxicon. 29(11):1279-1303.

Córdoba, D. 1991. Toxicología 2ª Edición. Fac. Med. Univ. Antioquia, Medellín. Pp. 285-302.

Creer, S., W. H. Chou, A. Malhotra, y R. S. Thorpe. 2002. Offshore insular variation in the diet of the Taiwanese bamboo viper *Trimeresurus stejnegeri* (Schmidt). Zool. Sci. 19:907-913.

Daltry, J. C., W. Wüster, y R. S. Thorpe. 1996. Diet and snake venom evolution. Nature 379:537-540.

Damico, D. C., J. M. Nascimento, B. Lomonte, L. A. Ponce-Soto, P. P. Joazeiro, J. C. Novello, S. Marangoni, y C. B. Collares-Buzato. 2007. Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A (2) (LmTX-I) in cultured cells. Toxicon. 49(5):678–692.

Damico, D. C., L. G. Bueno, L. Rodrigues-Simioni, S. Marangoni, M. A. da Cruz-Hofling, y J. C. Novello. 2005 a. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. Toxicon. 46(2):222–229.

Damico, D. C., S. Lilla, G. de Nucci, L. A. Ponce-Soto, F. V. Winck, J. C. Novello, y **S. Marangoni.** 2005 b. Biochemical and enzymatic characterization of two basic Asp49 phospholipase A2 isoforms from *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom. *Bioch. Biophys. Acta* 1726(1):75–86.

De Espinoza, N. C. (1970). Contribucion al conocimiento de los reptiles del Peru:(Squamata, Crocodylia, Testudinata: Reptilia). Publicaciones del Museo de Historia Natural Javier Prado, serie A, Zoología. 22:1-64.

Dickerson, N. 2001. *Riparian habitat management for reptiles and amphibians on corps of engineer's projects.* (No. ERDC TN-EMRRP-S1-22). Army engineer waterways experiment station Vicksburg ms.

Du, X. Y., D. S. Sim, W. H. Lee, y **Y. Zhang.** 2006. Blood cells as targets of snake toxins. *Blood Cell. Mol. Dis.* 36(3):414-421. DOI: 10.1016/j.bcmd.2006.03.001

Durban, J., P. Juárez, Y. Angulo, B. Lomonte, M. Flores-Diaz, A. Alape-Girón, **M. Sasa, L. Sanz, J. M. Gutiérrez, J. Dopazo, A. Conesa,** y **J. J. Calvete.** 2011. Profiling the venom gland transcriptomes of Costa Rican snakes by 454 pyrosequencing. *BMC Genomics.* 12(1):259. DOI: 10.1186/1471-2164-12-259

Estêvão-Costa, M. I., C. R. Diniz, A. Magalhães, F. S. Markland, y **E. F. Sanchez.** 2000. Action of metalloproteinases mutalysin I and II on several components of the hemostatic and fibrinolytic systems. *Thromb. Res.* 99(4):363–376. DOI: 10.1016/S0049-3848(00)00259-0

Fan, H. W., y J. L. Cardoso. 1995. Clinical toxicology of snake bites in South America. In *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. Pp. 667-668. CRC Press. DOI: 10.1201/9780203719442-31

Filippi, E., y L. Luiselli. 2000. Status of the Italian snake fauna and assessment of conservation. *Biol. Cons.* 93(2):219-225. DOI: 10.1016/S0006-3207(99)00138-X

Flores-Villegas, B., I. Flores-Lazcano, y M. L. Lazcano-Mendoza. 2014. Edema. Enfoque clínico. *Med. Int. Méx.* 30(1):51-55.

Fuly, A. L., A. L. de Miranda, R. B. Zingali, y J. A. Guimarães. 2002. Purification and characterization of a phospholipase A₂ isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom. *Biochem. Pharmacol.* 63(9):1589–1597.

Fuly, A. L., I. M. Francischetti, R. B. Zingali, y C. R. Carlini. 1993. Partial purification and physicochemical properties of phospholipases A₂ from the venom of the Bushmaster snake (*Lachesis muta*). *Braz. J. Biol. Med. Res.* 26(5):459-463.

Gatti, E., N. Stanchi, D. Arias, C. Grisolia, y P. Martino. 1999. Estudio de la actividad antibiótica del veneno de serpiente *Bothrops* (Ophidia: Viperidae: Crotalinae). *Av. Cien. Vet.* 13(1):25-29.

Geankoplis, C. J. 1998. *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. 3ª ed. Compañía Editorial Continental. México. 1024pp.

Gené, J. A., B. Lomonte, J. M. Gutiérrez, y L. Cerdas. 1985. Cambios en el patrón electroforético del veneno de cascabel muda (*Lachesis muta stenophrys*) almacenado bajo diferentes condiciones. *Rev. Biol. Trop.* 33(1):63-65.

Gibbons, J. W., D. E. Scott, T. J. Ryan, K. A. Buhlmann, T. D. Tuberville, B. S. Metts, J. L. Greene, T. Mills, Y. Leiden, S. Poppy, y C. T. Winner. 2000. The global decline of reptiles, déjà vu amphibians: Reptile species are declining on a global scale. Six significant threats to reptile populations are habitat loss and degradation, introduced invasive species, environmental pollution, disease, unsustainable use, and global climate change. *Bioscience.* 50(8):653-666. DOI: 10.1641/0006-3568(2000)050%5B0653:TGDORD%5D2.0.CO;2

Gubenšek, F., D. Sket, V. Turk, y D. Lebez. 1974. Fractionation of *Vipera ammodytes* venom and seasonal variation of its composition. *Toxicon* 12(2):167-168. DOI: 10.1016/0041-0101(74)90241-4

Gutiérrez, J. M. 2011. Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: una vision integral de character regional. *Bol. Malariol Sal. Amb.* 51(1):207-223.

Gutiérrez, J. M. 2017. Clinical toxicology of snakebite in Central America. En *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. Pp. 645-665. CRC Press. DOI: 10.1201/9780203719442-30

Gutiérrez, J. M. y F. Chaves. 1980. Efecto proteolítico, hemorrágico, y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los géneros *Bothrops*, *Crotalus*, y *Lachesis*. *Toxicon*. 18(3):315-321. DOI: 10.1016/0041-0101(80)90011-2

Gutiérrez, J. M., F. Chaves, y R. Bolaños. 1980. Estudio comparativo de veneno de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Rev. Biol. Trop.* 28(2):341-351.

Gutiérrez, J. M., B. Lomonte, G. León, A. Rucavado, F. Chaves, y Y. Angulo. 2007. Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. *Curr. Pharm. Design.* 13(28):2935-2950. DOI: 10.2174/138161207782023784

Homma, M. y A. T. Tu. 1970. Antivenin for the treatment of local tissue damage due to envenomation by southeast asian snakes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19(5): 880-884.

Hopper K., C. Beck, y R. F. Slocombe. 2001. Megaesophagus in adult dog's secondary to australian tiger snake envenomation. *Aust. Vet. J.* 79(10):672-675.

Jayanthi, G. P., y T. V. Gowda. 1988. Geographical variation in India in the composition and lethal potency of Russell's viper (*Vipera russelli*) venom. *Toxicon* 26(3):257-264. DOI: 10.1016/0041-0101(88)90216-4

Jennings, T. A. 1993. Seminario de liofilización, Sociedad Internacional de Liofilización.

Jiménez, E., e I. García. 1969. Análisis de 86 casos de ofidismo en niños. Rev. Med. Hosp. Nal. Niños. 4:91.

Jiménez-Porras, J. M., M. A. Gómez-Leiva, J. A. Rodríguez-Barquero, S. A. Jr.

Minton, J. J. Graydon, y A. do Amaral. 1973. Reptile toxins. En *Biology data book*. 2:697-723. Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB). USA.

Johnson, E. K., K. V. Kardong, y C. L. Ownby. 1987. Observations on white and yellow venoms from an individual southern Pacific rattlesnake (*Crotalus viridis helleri*). *Toxicon* 25(11):1169-1180. DOI: 10.1016/0041-0101(87)90135-8

Jorge, M. T., I. S. Sano-Martins, S. C. Tomy, S. C. Castro, R. A. Ferrari, L. A. Ribeiro, y D. A. Warrell. 1997. Snakebite by the bushmaster (*Lachesis muta*) in Brazil: case report and review of the literature. *Toxicon*. 35(4):545-554.

Kaiser, E., y H. Michl. 1968. Chemistry and pharmacology of the venoms of *Bothrops* and *Lachesis*. *Venomous animals and their venoms: venomous vertebrates*. 2:307. DOI:10.1016/B978-0-12-138902-4.50019-2

Karalliedde, L. 1995. Animal toxins. *Brit. J. of Anaes.* 74(3):319-327. DOI: 10.1093/bja/74.3.319

Keller, L., y E. Heske. 2000. Habitat use by three species of snakes at the middle fork fish and wildlife area, Illinois. *J. Herpetol.* 34(4):558-564. DOI: 10.2307/1565271

Kerchove, C. M., S. M. Carneiro, R. P. Markus, y N. Yamanouye. 2004. Stimulation of the alpha-adrenoceptor triggers the venom production cycle in the venom gland of *Bothrops jararaca*. J. Exp. Biol. 207(3):411-416.

Kini, R. M. 2006. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. Biochem. J. 397(3):377-387. DOI: 10.1042/BJ20060302

Köhler, G. 2003. *Reptiles of Central America*. I Ed. Herpeton Verlag. 369pp.

Köhler, G. 2008. *Reptiles of Central America*. II Ed. Herpeton Verlag. 400pp.

Kondo, H., S. Kondo, I. Ibezawa, R. Murata, y A. Ohsaka. 1960. Studies of the quantitative method for the determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. Japan J. Med. Sci. Biol. 13:43-51.

Krokida, M. K., E. Tsami, y Z. B. Maroulis. 1998. Kinetics on color changes during drying of some fruits and vegetables. 16(3-5):667-685. DOI:10.1080/07373939808917429

Li, M., B. G. Fry, y R. M. Kini. 2005 b. Putting the brakes on snake venom evolution: the unique molecular evolutionary patterns of *Aipysurus eydouxii* (Marbled sea snake) phospholipase A₂ toxins. Mol. Biol. Evol. 22(4):934-941. DOI: 10.1093/molbev/msi077

Lomonte, B., P. Rey-Suarez, J. Fernández, M. Sasa, D. Pla, N. Vargas, M. Benard-Valle, L. Sanz, C. Correa-Netto, V. Núñez, A. Alape-Giron, A. Alagon, J. M. Gutiérrez, y J. J. Calvete. 2016. Venoms of *Micrurus* coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. *Toxicon*. 122:7-25. DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.09.008

Magalhães, H. P., A. Magalhães, L. Juliano, D. L. Nelson, y E. Rogana. 2006. Mechanism of action and determination of the best substrate for a thrombin-like enzyme from *Lachesis muta muta* venom by regression analysis of the kinetic parameters determined with peptidyl p-nitroanilide substrates. *Toxicon*. 47(4):453–458. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.01.001

Martínez Cortés, V. M. 1981. Aspectos herpetológicos y biomédicos de *Lachesis muta* (Linnaeus) y *Bothrops asper* (Garman) de Panamá. Tesis (Magister Scientiae). Universidad de Costa Rica. Sistema de Estudio de Postgrado. 83pp.

Mcallister, A. 1995. Wetland habitat use by the black rat snake, *Elape obsoleta*, in Eastern Ontario. *Can. Field-Nat.* Ottawa ON. 109(4):449-451.

McCue, M. D. 2006. Cost of producing venom in three North American pitviper species. *Copeia*. 2006(4):818-825. DOI: 10.1643/0045-8511(2006)6%5B818:COPVIT%5D2.0.CO;2

Méndez, M. C., y F. Riet-Correa. 1995. Snakebite in sheep. *Vet. and Hum. Toxic.* 37(1):62-63.

Menezes, M. C., M. F. Furtado, S. R. Travaglia-Cardoso, A. Camargo, y S. Serrano. 2006. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon* 47(3):304-312. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.11.007

Michal, M. T., y L. E. Eran. 1999. Suspected *Vipera palaestinae* envenomation in three cats. *Vet. and Hum. Toxic.* 41(3):145- 148.

Minton, S. A., y S. A. Weinstein. 1986. Geographic and ontogenic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Toxicon.* 24(1):71-80. DOI: 10.1016/0041-0101(86)90167-4

Morgenstern, D., y G. F. King. 2013. The venom optimization hypothesis revisited. *Toxicon.* 63:120-128. DOI: 10.1016/j.toxicon. 2012.11.022

Naik, B. S. 2017. “Dry bite” in venomous snakes: a review. *Toxicon.* 133:63-67

Otero, R., M. F. Furtado, C. Gonçalves, V. Núñez, M. E. García, R. G. Osorio, M. Romero, y J. M. Gutiérrez. 1998. Comparative study of the venoms of three subspecies of *Lachesis muta* (bushmaster) from Brazil, Colombia and Costa Rica. *Toxicon.* 36(12):2021–2027. DOI: 10.1016/S0041-0101(98)00089-0

Peters, J. A., y B. Orejas-Miranda. 1970. Catalogue of Neotropical Squamata: Part I. Snakes. U.S. Nat. Mus. Bull. 297pp. DOI: 10.5962/bhl.title.46653

Picado, C. 1931. Serpientes venenosas de Costa Rica. Sus venenos, *seroterapia antiofídica*. Imprenta Alsina: San José, Costa Rica. 241pp.

Plummer, M. 2002. Observation of hibernacula and overwintering ecology of Eastern Hog-nose Snakes (*Heterodon platichinos*). Herpetol. Rev. 33(2):89.

Prior, K., y P. Weatherhead. 1996. Habitat features of black rat snake hibernacula in Ontario. J. Herpetol. 30:211-218. DOI: 10.2307/1565512

Ramírez, J. S., y J. Cañizares. 2003. Deshidratación de la papa mediante liofilización atmosférica. Universidad Central Del Ecuador, Escuela de Ingeniería Química. Quito, Ecuador.

Ramírez-Navas, J. S. 2006. *Liofilización de alimentos*. Revista ReCiTeIA. Cali, Colombia. Pp. 1-3.

Ray, J. 2018. *Snakes of Panama, a field guide to all species*. Middletown, DE. 203pp.

Ripa, D. 1994. Reproduction of the Central American bushmaster (*Lachesis muta stenophrys*) and the black-headed bushmaster (*Lachesis muta melanocephala*) for the first time in captivity. Bull. Chic. Herpetol. Soc. 29(8):165-183.

Ripa, D. 1999. Keys to understanding the bushmaster (genus *Lachesis* Daudin, 1803). Bull. Chic. Herpetol. Soc. 34(3):45-92.

Ripa, D. 2000. *The Bushmasters (Genus Lachesis Daudin, 1803): Morphology in Evolution and Behavior*. I Ed. NC: Ecologica. 358pp.

Ripa, D. 2001. *The Bushmasters (Genus Lachesis Daudin, 1803): Morphology in Evolution and Behavior*. II Ed. Cape Fear Serpentarium. 358pp.

Rosenfeld, G. 1971. Symptomatology, pathology, and treatment of snakebites in South America. En *Venomous animals and their venoms: venomous vertebrates*. 2:354-384.

Sánchez, M., O. Miró Andreu, y B. Coll-Vinent Puig. 2000. Las Hemorragias. A Servei d'Urgencias. Hosp. Clinic. Barcelona. 36(6):203-210.

Saunders, D., R. Hobbs, y C. Margules. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Cons. Biol.* 5(1):18-32. DOI: 10.1111/j.1523-1739.1991.tb00384.x

Solórzano, A., y L. Cerdas. 1986. A new subspecies of the bushmasters, *Lachesis muta*; from southeastern Costa Rica. *J. Herpetology.* 20(3):463-466. DOI: 10.2307/1564518

Teixeira, C., C. M. Fernandes, J. P. Zuliani, y S. F. Zamuner. 2005. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Oswaldo Cruz.* 100:181-184. DOI: 10.1590/S0074-02762005000900031

Tsetlin, V. I., y F. Hucho. 2004. Snake and snail toxins action on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *FEBS Lett.* 557(1-3):9-13.

Valencia, J. H., K. Garzón-Tello, y M. E. Barragán-Paladines. 2016. *Serpientes venenosas del Ecuador: sistemática, taxonomía, historia natural, conservación, envenenamiento y aspectos antropológicos*. Fundación Herpetológica Gustavo Orcés; Universidad de Texas, Arlington; Fondo Ambiental Nacional. Quito, Ecuador. Pp. 531-551.

Vallejo-Freire, A. 1967. Informe sobre condiciones para la elaboración de sueros antiofídicos y programas correlativos en Costa Rica. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana. Washington.

Wareham, D. C. 2005. *Elsevier's dictionary of herpetological and related terminology*. I Ed. Elsevier. Pp. 115.

Willemse, G. T., J. Hattingh, R. M. Karlsson, S. Levy, y C. Parker. 1979. Changes in composition and protein concentration of puff adder (*Bitis arietans*) venom due to frequent milking. *Toxicon* 17(1):37-42. DOI: 10.1016/0041-0101(79)90253-8

Yamakawa, M., M. Nozaki, y Z. Hokama. 1976. Fractionation of Sakishima-Habu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic, and edema forming activities of the fractions. En *Animal, plant and microbial toxins*. Biochemistry. Plenum Press, New York. 1:97-109

Anexos

Apéndice 1. Cuadros

Cuadro 1. Hemorragia inducida por veneno de *Lachesis*.

Ejemplares	Dosis (μg)	\bar{x} mm	DME
<i>Lachesis muta.</i> Bocas del Toro	1,25	12,5	✓
	2,50	16,9	
	5	19,4	
	10	22,9	
<i>Lachesis muta.</i> Playa Chuzo, Panamá	1,25	10,6	✓
	2,50	12,9	
	5	18,1	
	10	20,4	
<i>Lachesis acrochorda.</i> Viento Frío, Panamá	1,25	6,02	✓
	2,50	9,06	
	10	13,16	

Cuadro 2. Edema inducido por veneno de *Lachesis*.

EJEMPLARES	DOSIS (μG)	\bar{x} (%)	DME
LACHESIS MUTA. BOCAS DEL TORO	5	21,0	✓
	10	33,2	
	20	37,2	
	30	40,3	
LACHESIS MUTA. PLAYA CHUZO, PANAMÁ	5	33,2	✓
	10	40,4	
	20	44,4	
	30	52,2	
LACHESIS ACROCHORDA. VIENTO FRÍO, PANAMÁ. NACIDAS EN EL CEREO.	10	1,29	✓
	20	7,45	
	30	9,32	
	40	10,91	
	50	15,58	
	60	20,45	
	80	25,28	
	100	31,87	

Cuadro 3. Lepidosis y morfometría.

E	S	Morfometría					Lepidosis (escamas)																		
		Longitud (cm)				P (kg)	M. C	U. C. Ca	U. C. Co	V	SC		E. R	E.M	E. CTH	E.Pr	E.SO	E.IF	E.PsO	E.IO	E.SL	E.IL	E.G	E.BPO	E. A
		Ca	Tr	Co	LT						N	Cd													
L1	M	7	161	19	187	2.18	26	38	17	218	42	D	L	M	2	2	1	2	3	12	9	15	2	18x2	C
L2	H	7	163	15	185	2.14	33	38	24	222	36	D	L	M	2	2	1	2	3	12	8	15	2	18x2	C
L3	M	7	158.5	19	184.5	2.08	37	38	26	221	39	D	L	M	2	2	1	2	3	12	10	16	2	18x2	C
L4	H	6.5	166	17	189.5	2.04	36	37	26	223	37	D	L	M	2	2	1	2	3	12	10	14	2	18x2	C
L5	H	7	164	17	188	1.99	38	38	26	222	36	D	L	M	2	2	1	2	3	13	9	15	2	18x2	C
L6	H	6	160	16	182	2.28	40	38	26	218	36	D	L	M	2	2	1	2	3	12	10	16	2	18x2	C
L7	H	7	154	15	176	1.80	37	39	25	217	36	D	L	M	2	2	1	2	3	13	10	16	2	18x2	C

E=Ejemplar. S=Sexo. P=Peso M=Macho. H=Hembra. Ca=Longitud de la cabeza. Tr=Longitud del cuerpo. Co=Longitud de la cola. LT=Longitud total. M. C=A medio cuerpo. U. C. Ca=A una Cabeza de la Cabeza. U. C. Co=A una Cabeza de la Cola. V=Ventrales. SC=Subcaudales (N=Cantidad Cd=Condición[D=Dividida]). E. R=Rostral (L=Separa las prenasales). E. M=Mental (M=No está en contacto con las gulares). E. CTH=Canthales. E. Pr=Preoculares. E. SO=Supraoculares. E. IF=Infraoculares. E. PsO=Postoculares. E. IO=Interoculares. E. SL=Supralabiales. E. IL=Infralabiales. E. G=Gulares. E. BPO=de la Banda Postocular. E. A=anal(C=Completa).

Cuadro 4. Lepidosis de ejemplares del CEREO contra ejemplares según Martínez C. 1981.

Ejemplares	Ámbito				
	C	E.IO	M.C	E.SC	V
Hembras					
Gamboa: Colón	1	11	37	49	209
Bocas del Toro	2	11	35	47	203
Quepos (I.C.P.)	3	10-11	38-39	44-51	214-216
Limón (I.C.P.)	7	10-11	34-39	46-52	200-207
CEREO (Viento Frío, Panamá)	5	12-13	33-40	36-37	217-223
Machos	C	E.IO	M.C	E.SC	V
Gamboa: Colón	4	10-11	36-37	42-52	206-211
Bocas del Toro	1	12	35	52	200
Quepos (I.C.P.)	1	11	38	52	216
Limón (I.C.P.)	7	11-12	34-35	42-51	202-206
Un macho de Playa Chuzo, Panamá	1	12	35	53	226
CEREO (Viento Frío, Panamá)	2	12	26-37	39-42	218-221

C = Cantidad de ejemplares. **E. IO** = Escamas interoculares. **M. C** = Escamas a medio cuerpo.

E. SC = Escamas subcaudales. **V** = Escamas ventrales.

Cuadro 5. Variación de escamas en tres especies de *Lachesis*.

Escamas	<i>Lachesis acrochorda</i>		<i>Lachesis stenophrys</i>	<i>Lachesis melanocephala</i>
	Conteo	Teóricas		
Ventrales	217-223	211-226	191-209	209-222
Subcaudales	36-42	35-53	35-49	35-54
A medio cuerpo	26-40	31-36	33-38	36-40
A una cabeza de la cabeza	37-39	----	----	----
A una cabeza de la cloaca	17-26	----	----	----
Supralabiales	8-10	9-10	7-9	7-9
Infralabiales	14-16	14-17	12-15	13-15
Rostral	Tan alta como ancha, grande y triangular	Triangular, grande, tan alta como ancha	Triangular, tan grande como ancha. Mayor entre los prenasales reducidos y más ancha en la parte anterior de la cabeza.	Como en <i>L. stenophrys</i>
Prenasales	Agrandada	Agrandada, protuberante, triangular, se asemeja a la de <i>L. muta</i>	Reducida, plana, redondeada, con la cara dorsal debajo o nivelada con el plano del área prefrontal.	Reducida, plana, redondeada, con la cara dorsal nivelada o elevada sobre el plano del área prefrontal
Internasales	Reducidas, más pequeñas que las canthales	Como en <i>L. melanocephala</i>	Reducida, tal vez tan pequeña como las canthales e indistinguible entre las prefrontales.	Reducida, pero nunca tan pequeño como en <i>L. stenophrys</i>
Canthales	Tres, distintas entre sí.	Tres, aplanadas y distintas. Similares a la de la forma de la cuenca del Amazonas y a <i>L. melanocephala</i>	Tres, rara vez dos. Ovalado, aplanado y más pequeño que en <i>L. muta</i> , a menudo difícil de distinguir entre las numerosas escamas prefrontales pequeñas, con tal vez el mismo tamaño.	Tres, rara vez dos. Ovaladas, aplanadas, distintas, más grandes que en <i>L. stenophrys</i> , mantienen su identidad entre los prefrontales.
Postnasales	Única	Única o dividida	Usualmente única	Usualmente única
Preoculares	Dos. Superior tres veces más grande que la inferior.	Dos o tres. De longitud intermedia entre <i>L. muta</i> y <i>L. stenophrys</i> .	Dos o tres. Longitud intermedia entre <i>L. melanocephala</i> y <i>L. muta</i> .	Dos o tres. Más corta que en otras especies. Proporcional a la longitud de las escamas de la región anterior de la cabeza.
Supraoculares	Una. Más elevada que la región frontal y parietales	Generalmente elevada por encima de las frontales	No elevada o débilmente elevada por encima de la frontal	No elevada o débilmente elevada por encima de la frontal
Infraoculares	2	----	----	----
Postoculares	3	----	----	----
Interoculares	12-13	----	----	----
Mental	No está en contacto con las escamas gulares	----	----	----
Gulares	2	----	----	----
Anal	Completa	----	----	----
Escamas de la Banda postocular	18 escamas de largo por dos de ancho	----	Generalmente nueve escamas de largo por tres de ancho	Generalmente 11 escamas de largo por tres de ancho. Aunque debido a su coloración dorsal de la cabeza es difícil diferenciar esta banda.

Cuadro tomado de: "The Bushmasters Morphology in Evolution and Behavior. Ripa, 2001" y actualizado con nuestros resultados.

Figura 1. Distribución general de *Lachesis*. Ripa (2001).



L. acrochorda ■

L. stenophrys ■

L. melanocephala ■

Parque nacional ▲

Cerros ▲


Figura 2. Distribución general de *Lachesis acrochorda*. Ripa (2001)




Parques nacionales ▲ Cerros ▲

Figura 3. Distribución de *L. acrohorda* en Panamá. Ripa (2001).



Parques nacionales 

Cerros 

Aeropuertos 

Figura 4. Distribución de *Lachesis* en Panamá. Ray (2018).

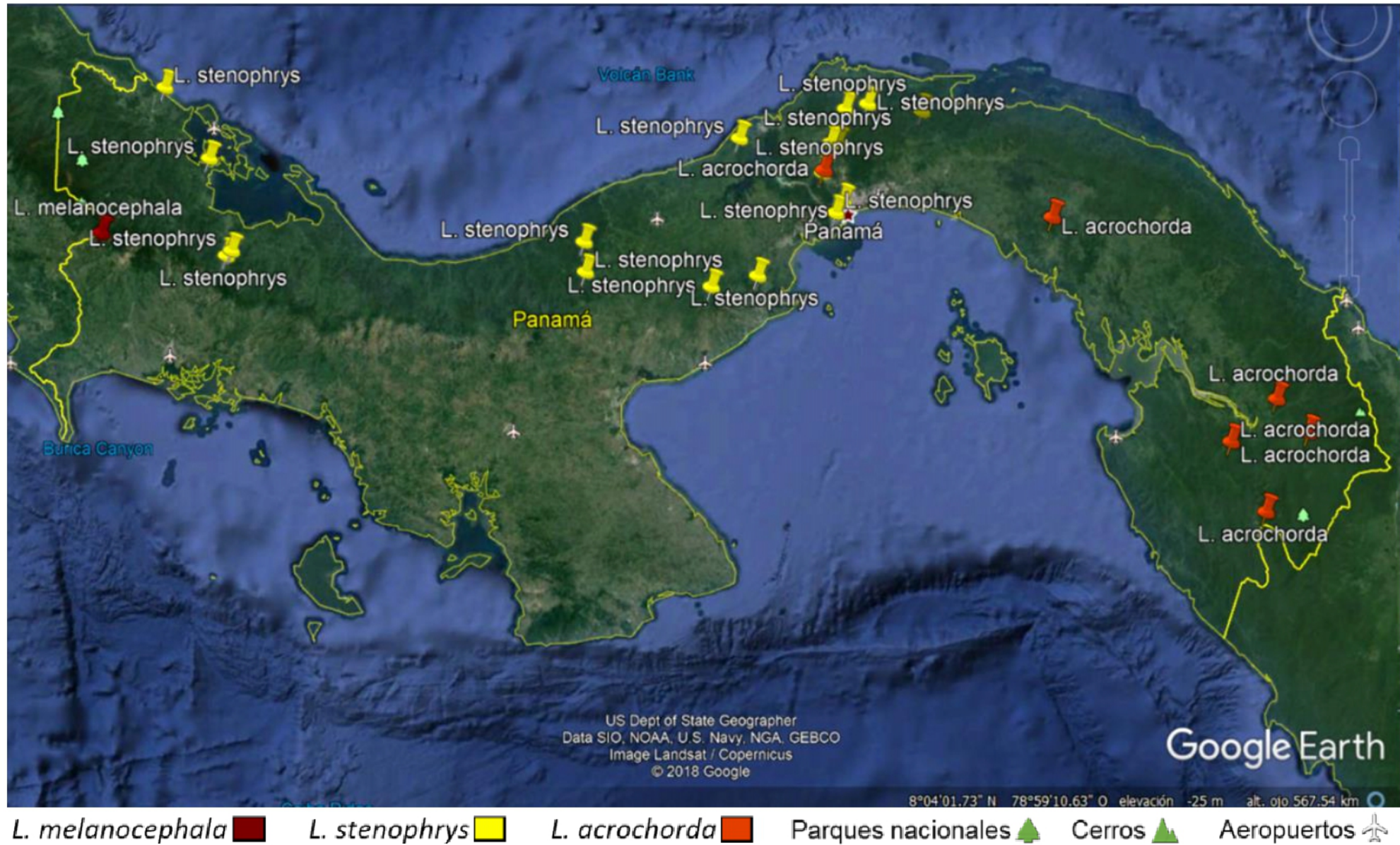
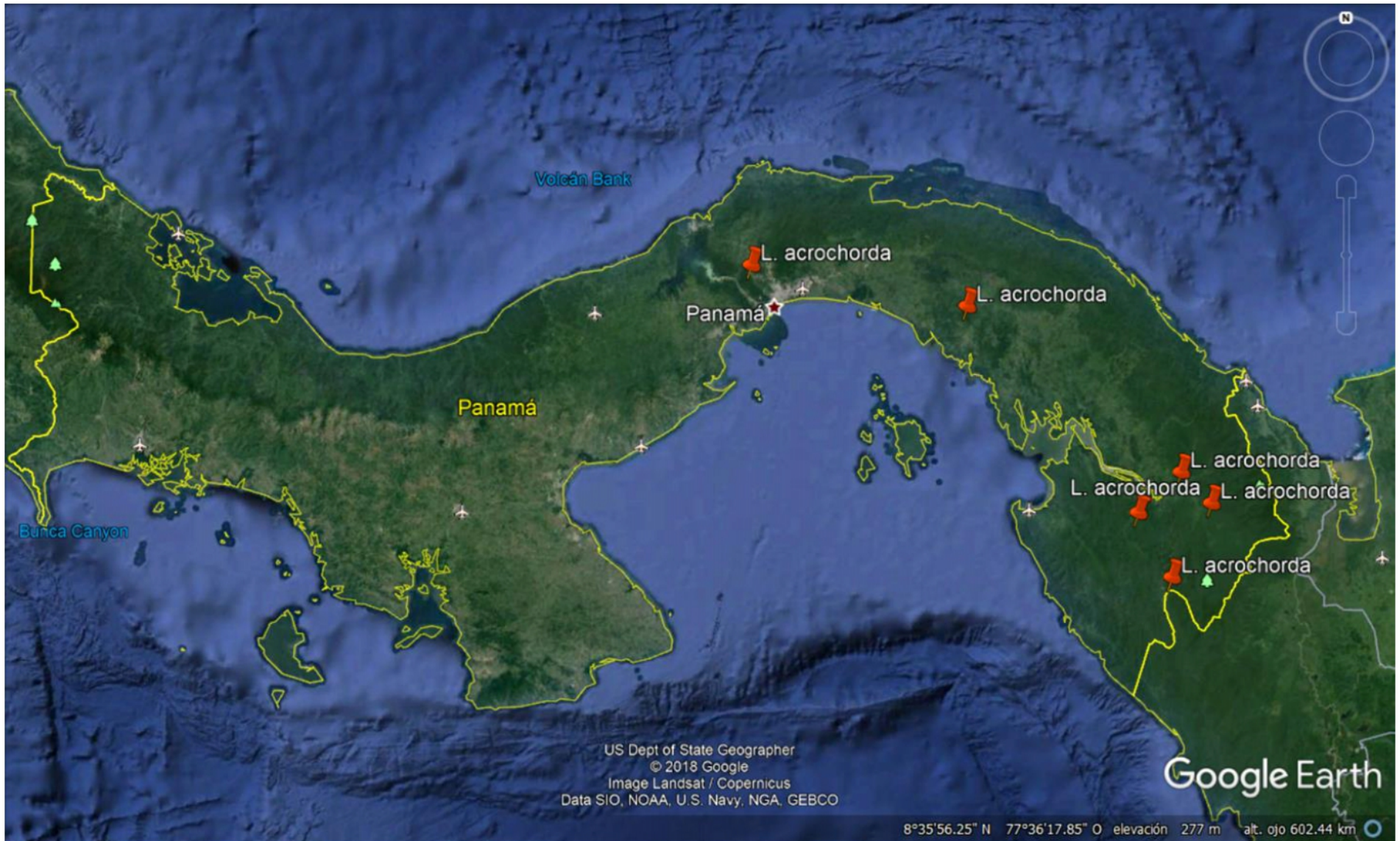


Figura 5. Distribución de *L. acrochorda* en Panamá. Ray (2018)



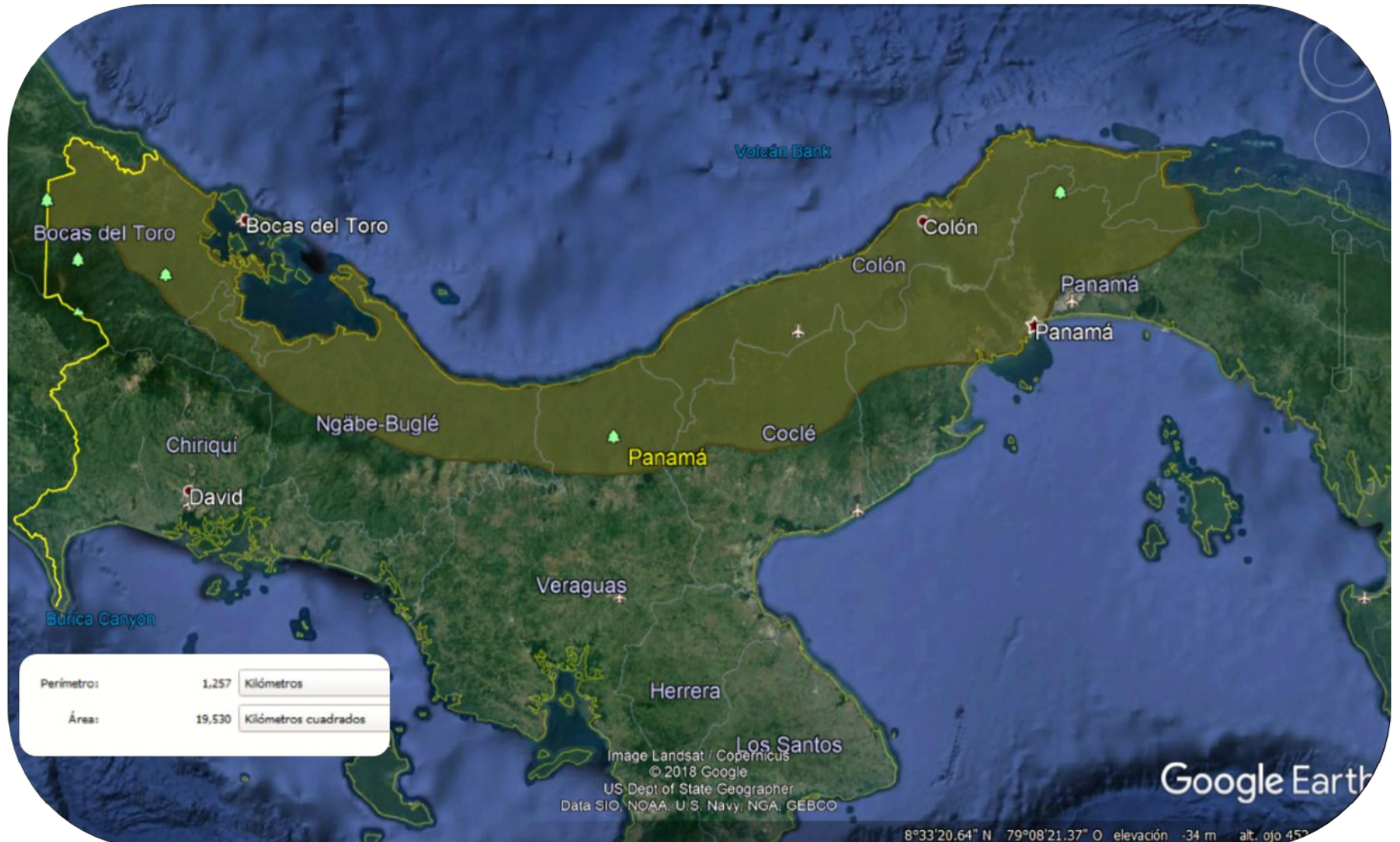
Parques nacionales ▲ Cerros ▲ Aeropuertos ✈


Figura 6. Distribución general de *Lachesis stenophrys*. Ripa (2001).




Parques nacionales ▲ Cerros ▲

Figura 7. Distribución de *L. stenophrys* en Panamá. Ripa (2001).



Parques nacionales 

Cerros 




Aeropuertos 

Figura 8. Distribución de *L. stenophrys* en Panamá. Ray (2018).



Parques nacionales 

Cerros 

Aeropuertos 

Figura 9. Distribución general de *Lachesis melanocephala*. Ripa (2001).



Figura 10. Distribución de *L. melanocephala* en Panamá. Ray (2018).



Parques nacionales ▲

Cerros ▲

Aeropuertos ✈

Figura 11. Hemorragia inducida por veneno de *Lachesis*.

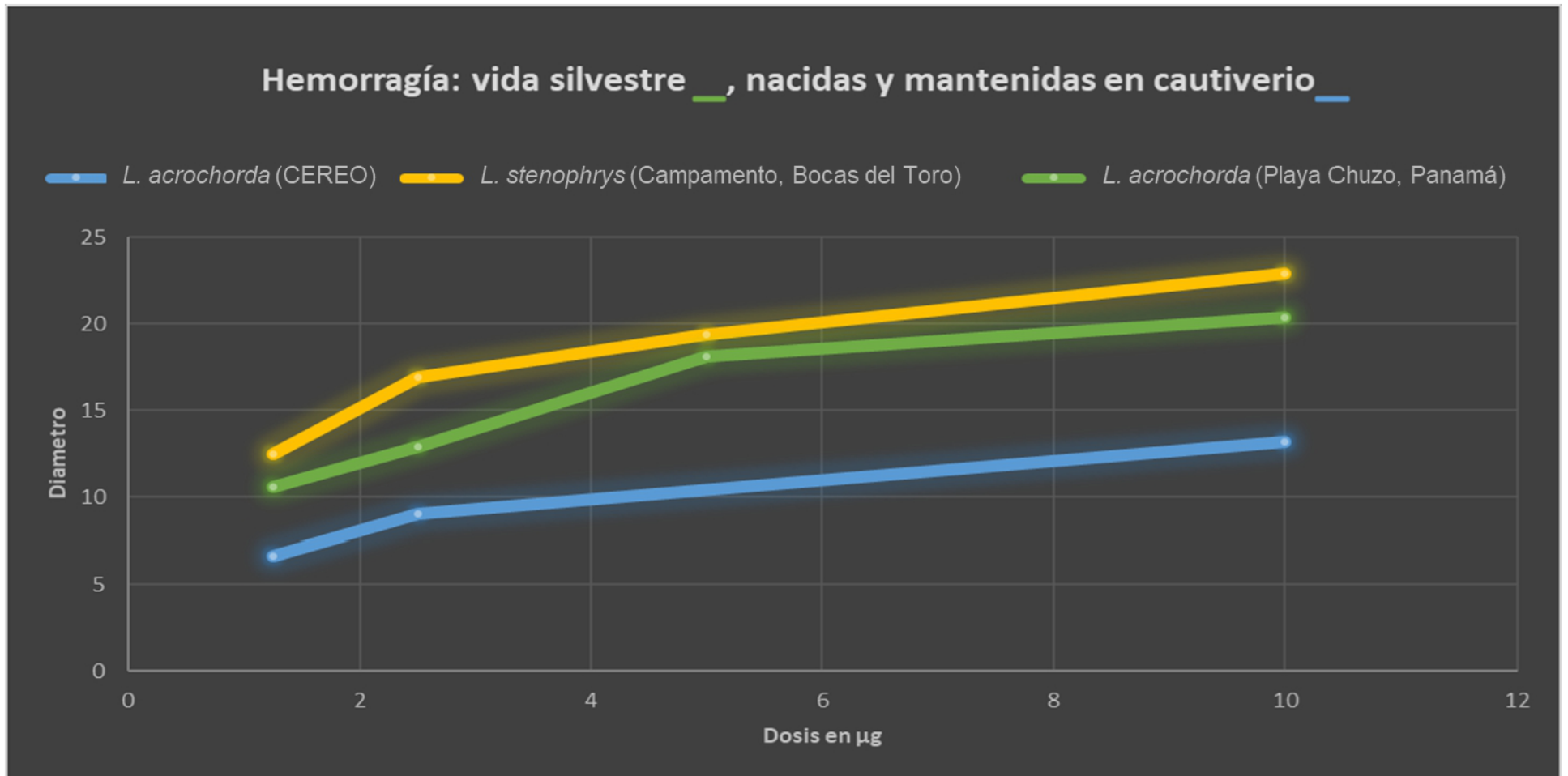


Figura 12. Hemorragia inducida por veneno de *Lachesis*.

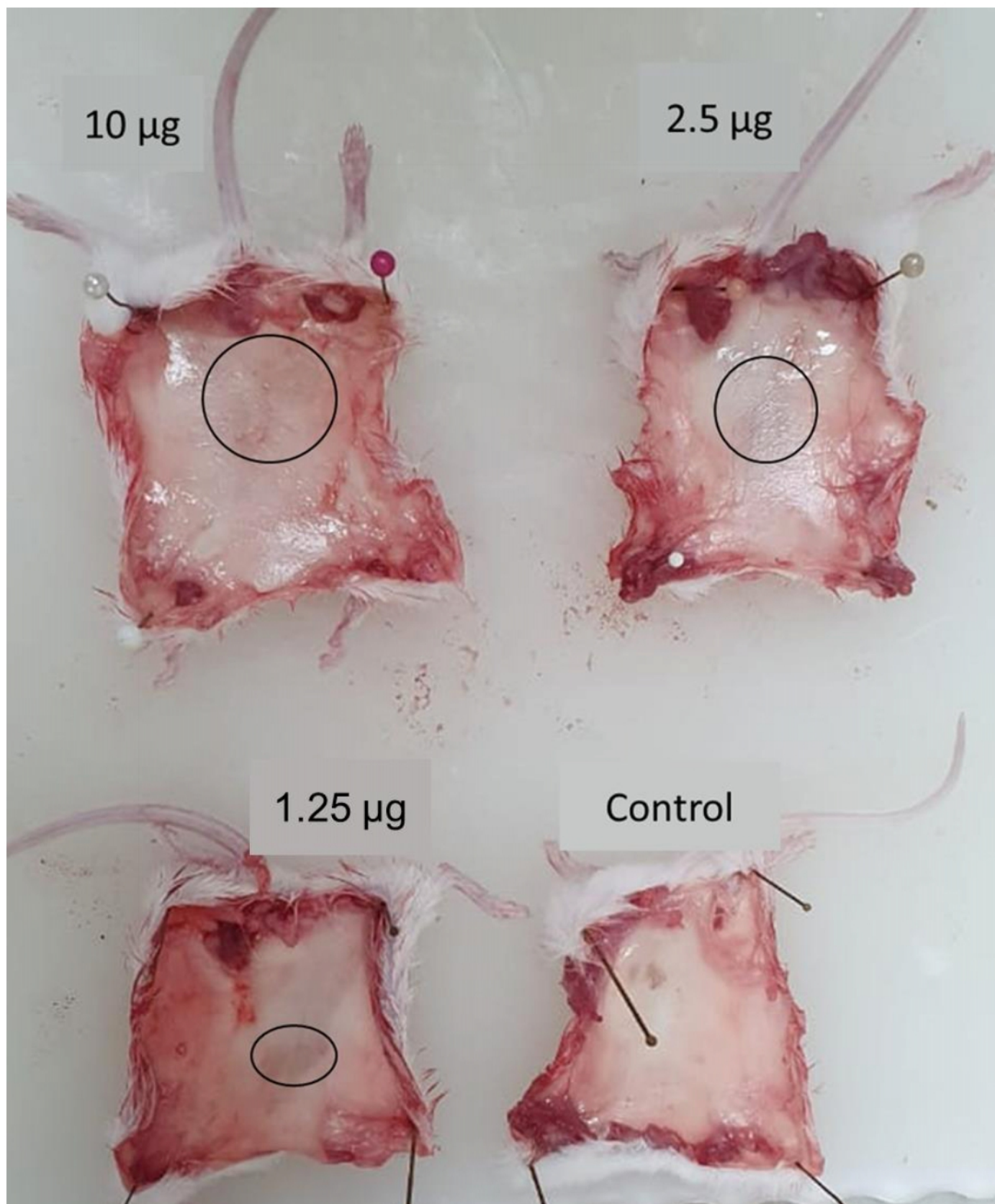


Figura 13. Edema inducido por veneno de *Lachesis*.

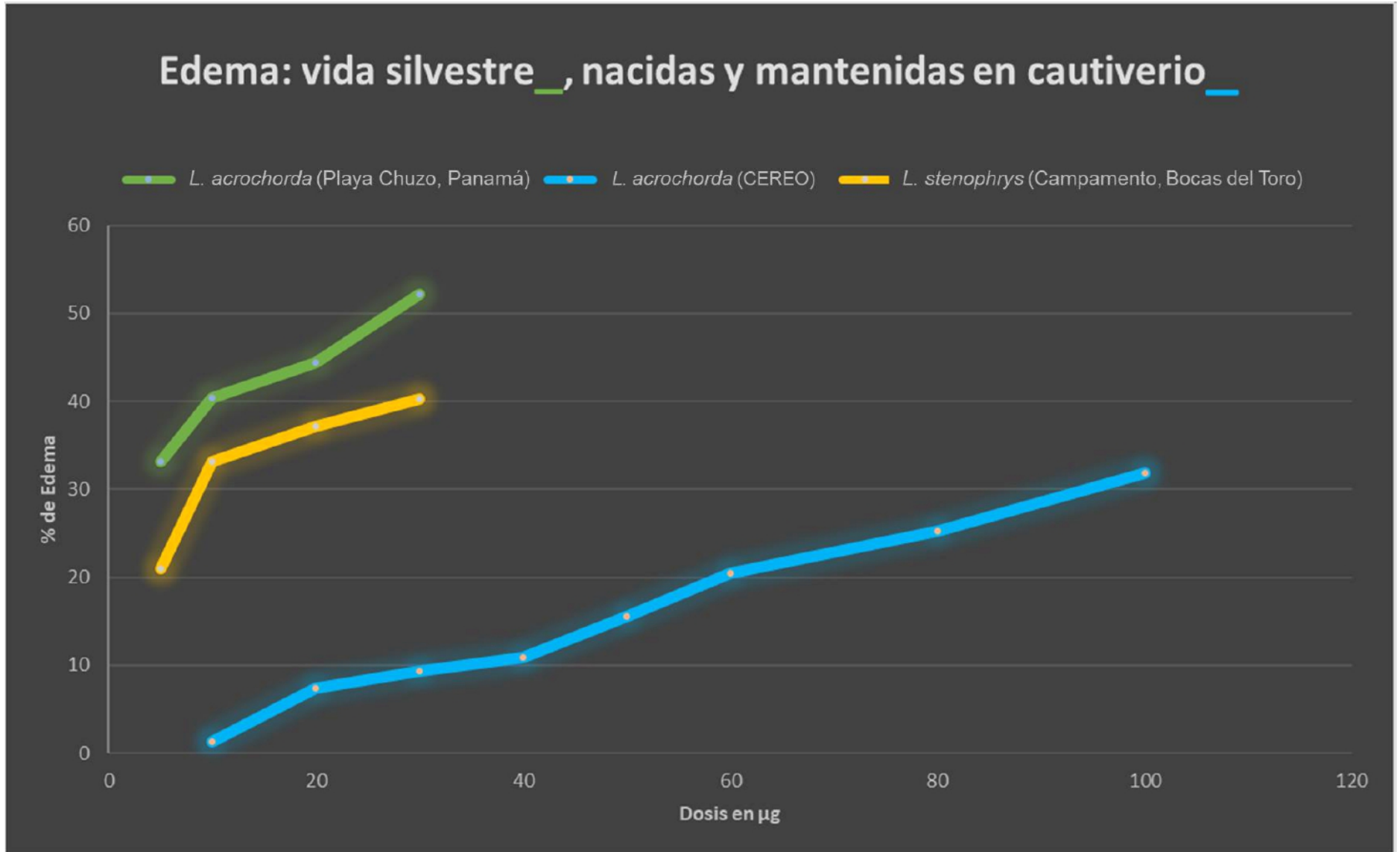


Figura 14. Edema inducido por veneno de *Lachesis*.



Figura 15. Forma para sostener con seguridad vipéridos.



Figura 16. Morfometría/lepidosis (caracterización de escamas).



Figura 17. Conteo de escamas: a una cabeza de la cabeza, al medio cuerpo, y a una cabeza de la cloaca.

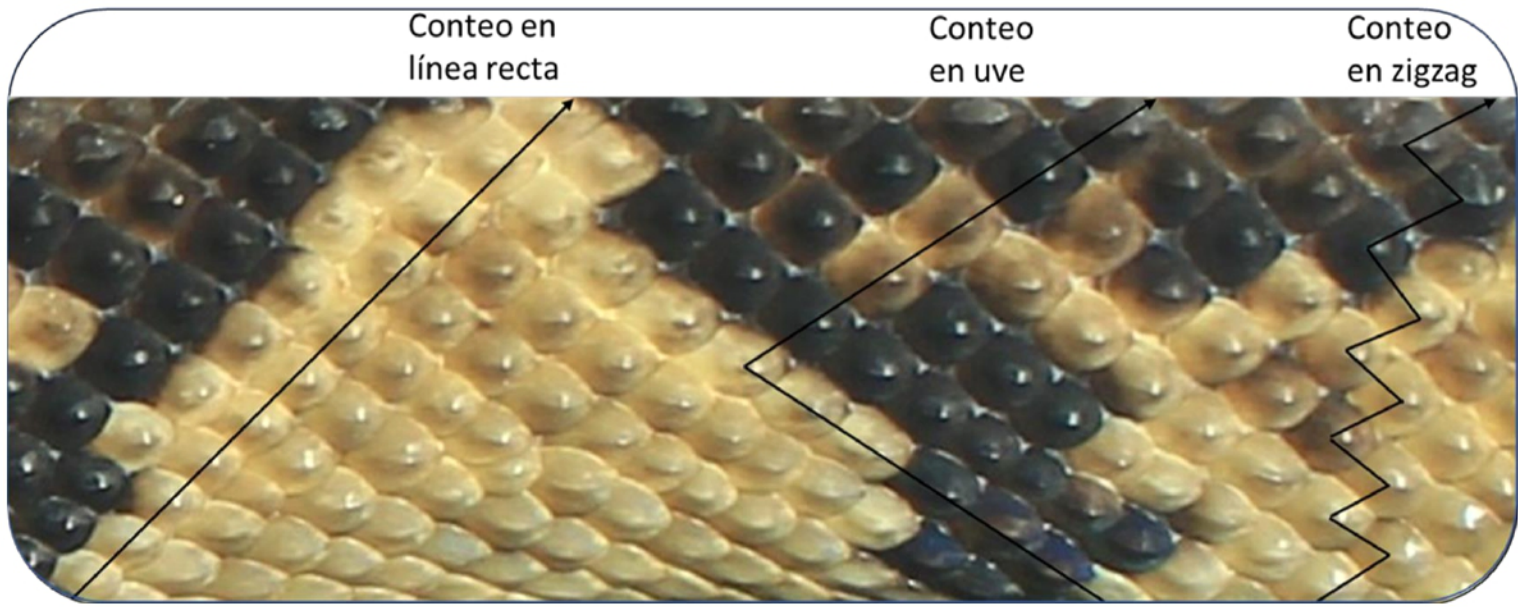


Figura 18. Cola: escamación y comparaciones; macho (abajo), hembra (arriba).

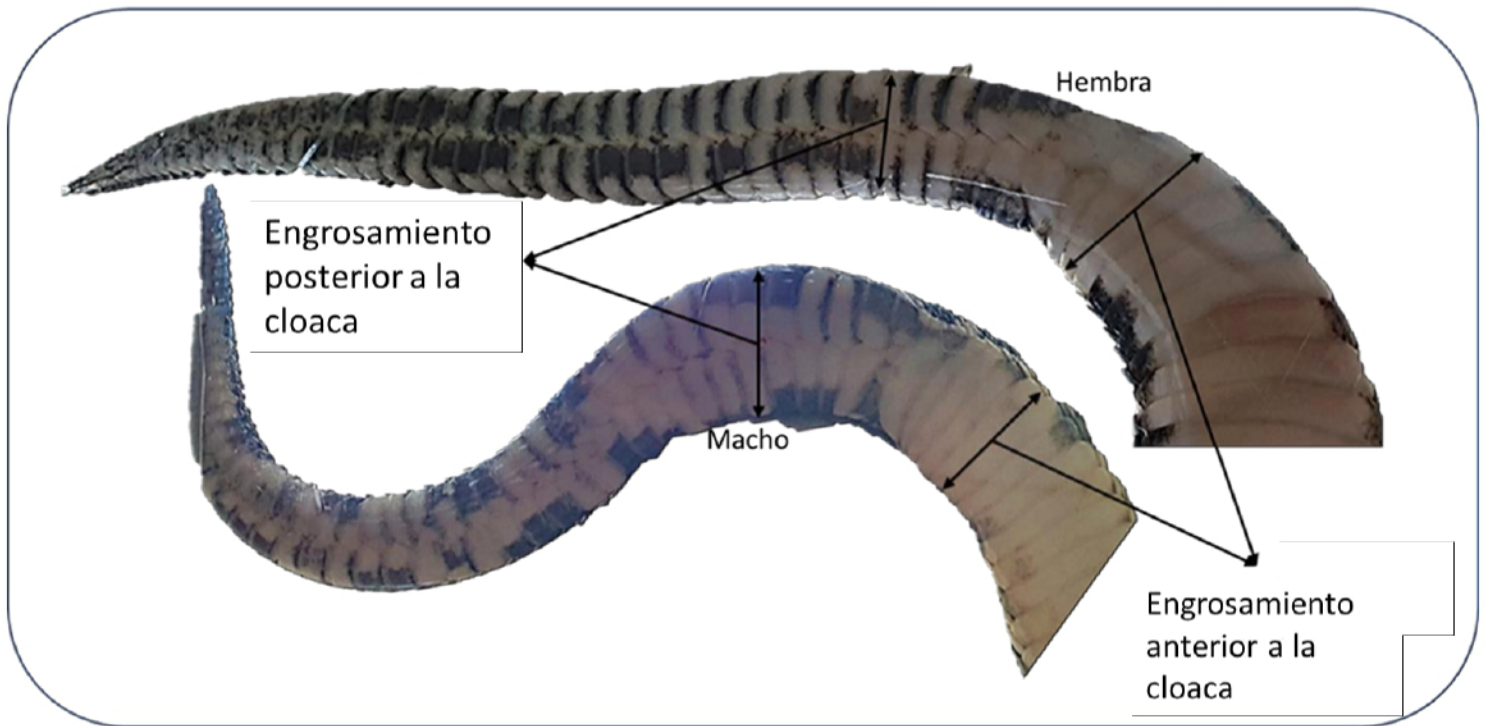


Figura 19. Patrón común de manchas en *Lachesis acrochorda*.

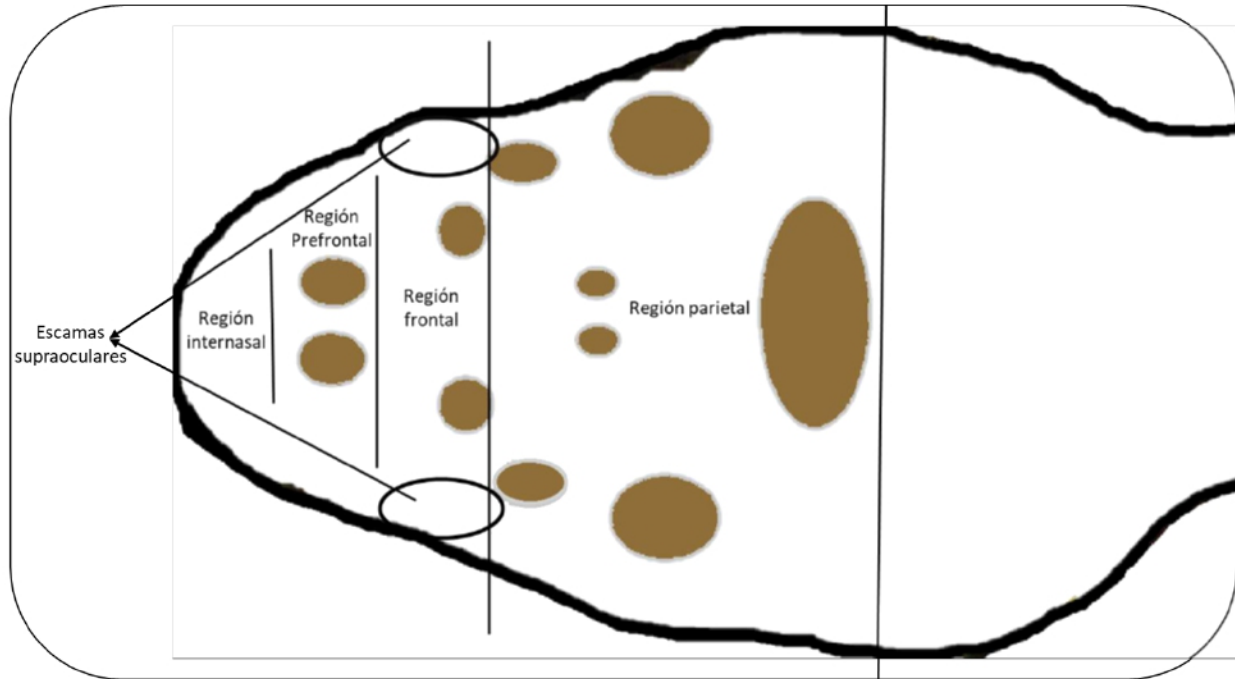


Figura 20. Vista dorsal: cabeza de *Lachesis acrochorda*.

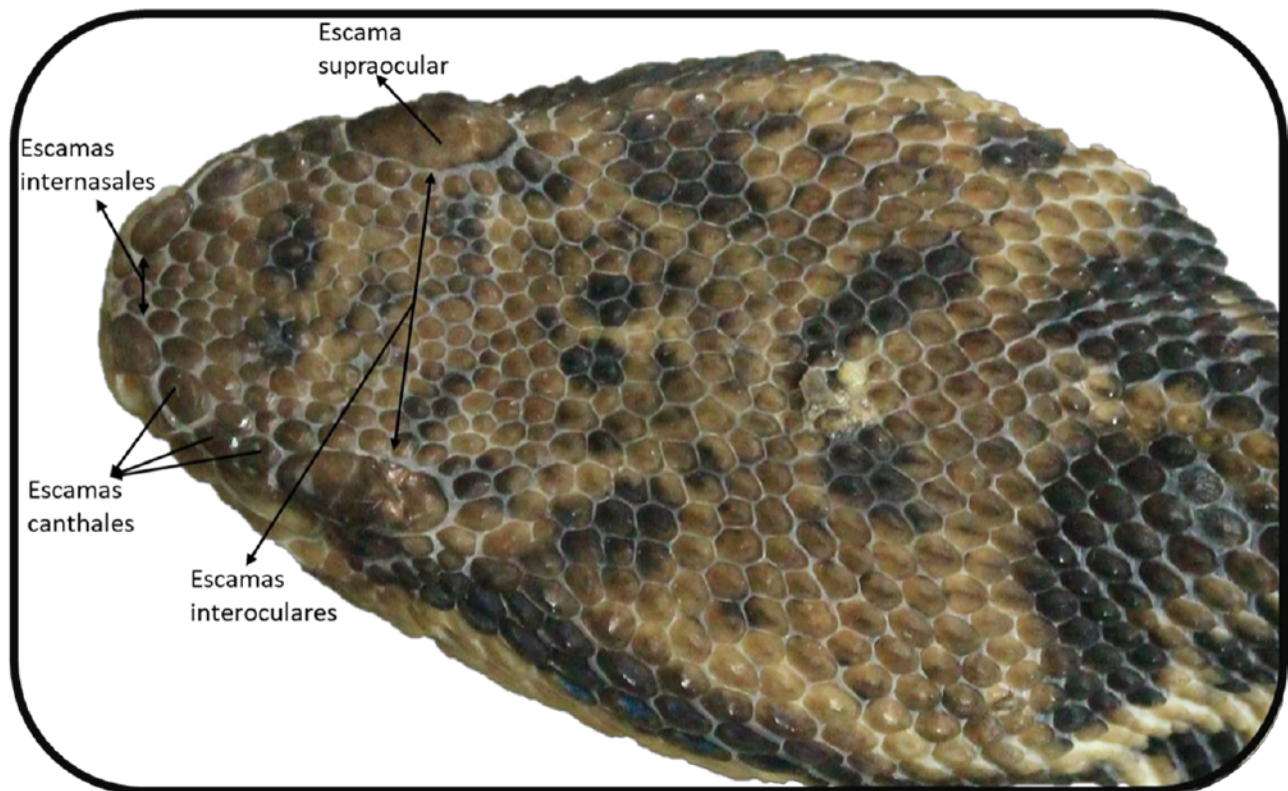


Figura 21. Vista lateral: cabeza de *Lachesis acrochorda*.

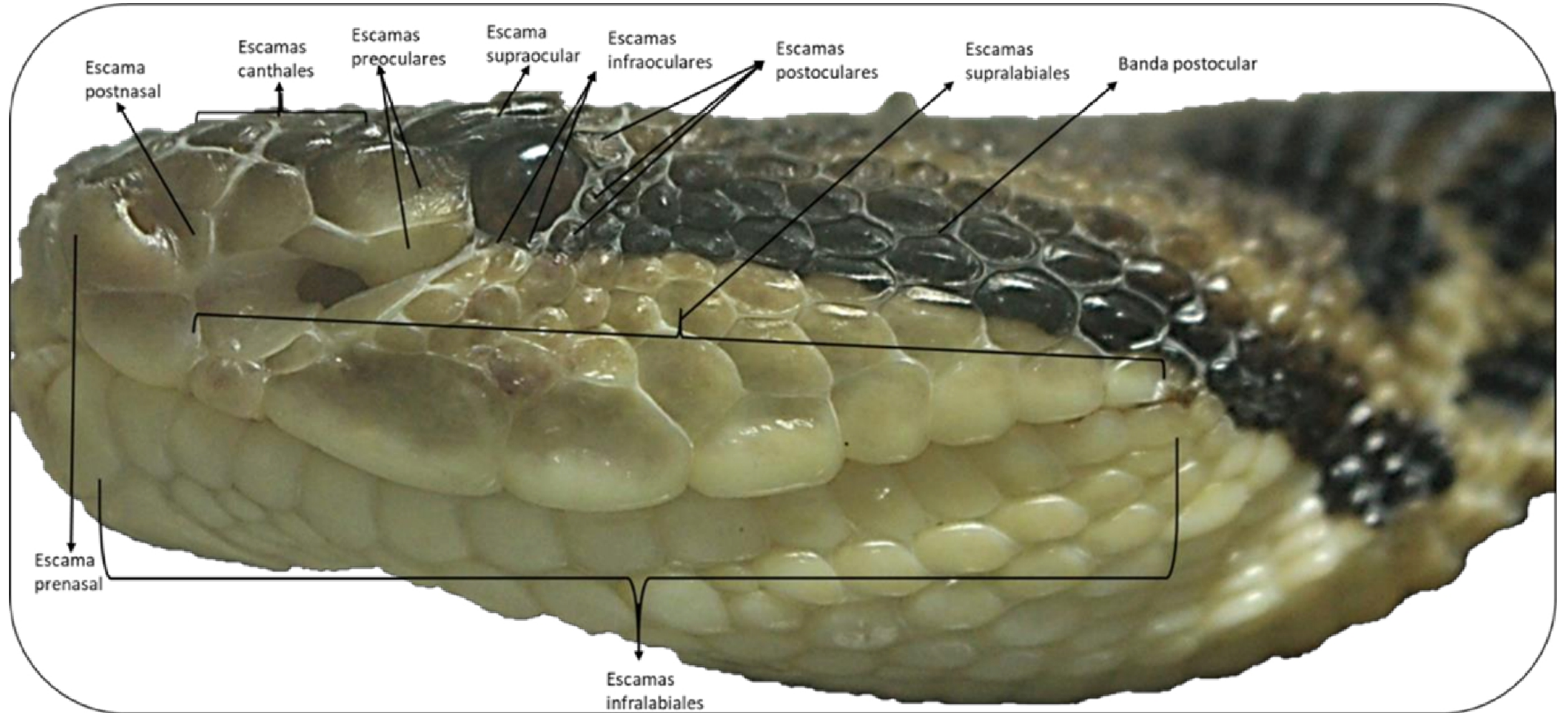


Figura 22. Vista frontal: cabeza de *Lachesis acrochorda*.

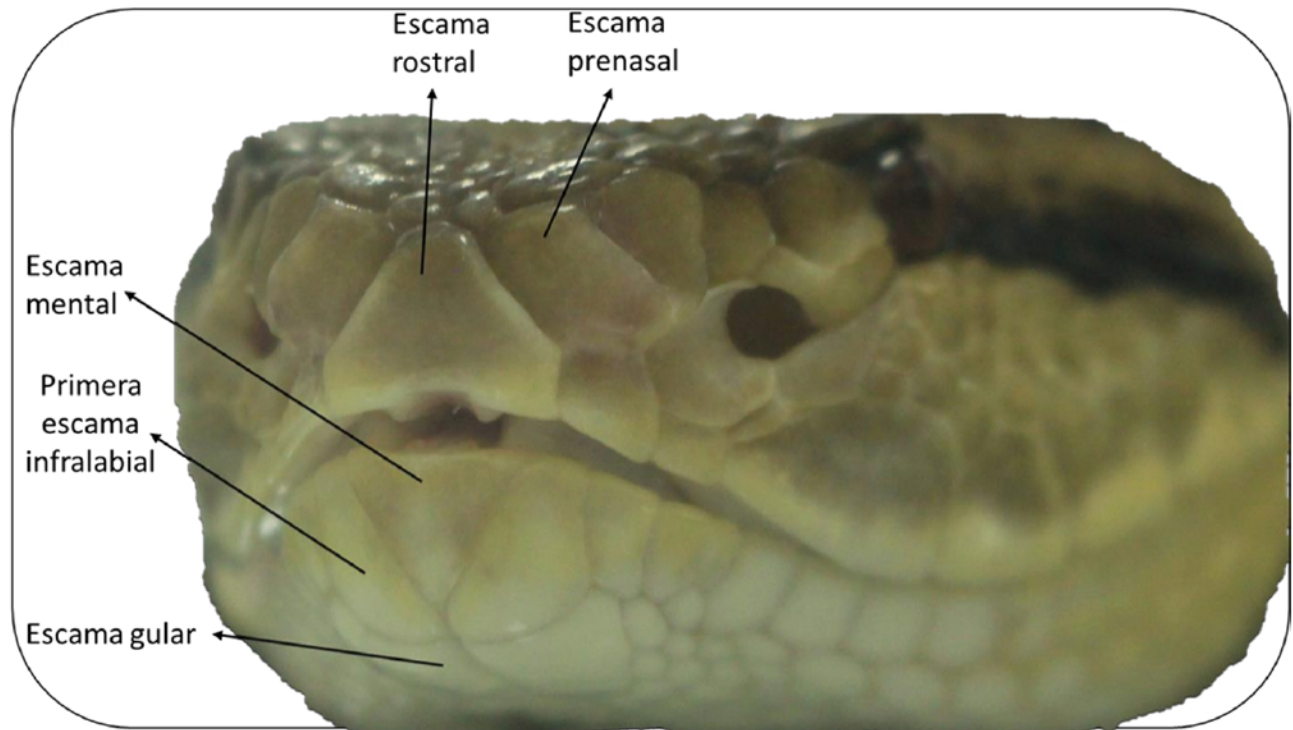


Figura 23. Vista ventral: cabeza de *Lachesis acrochorda*.

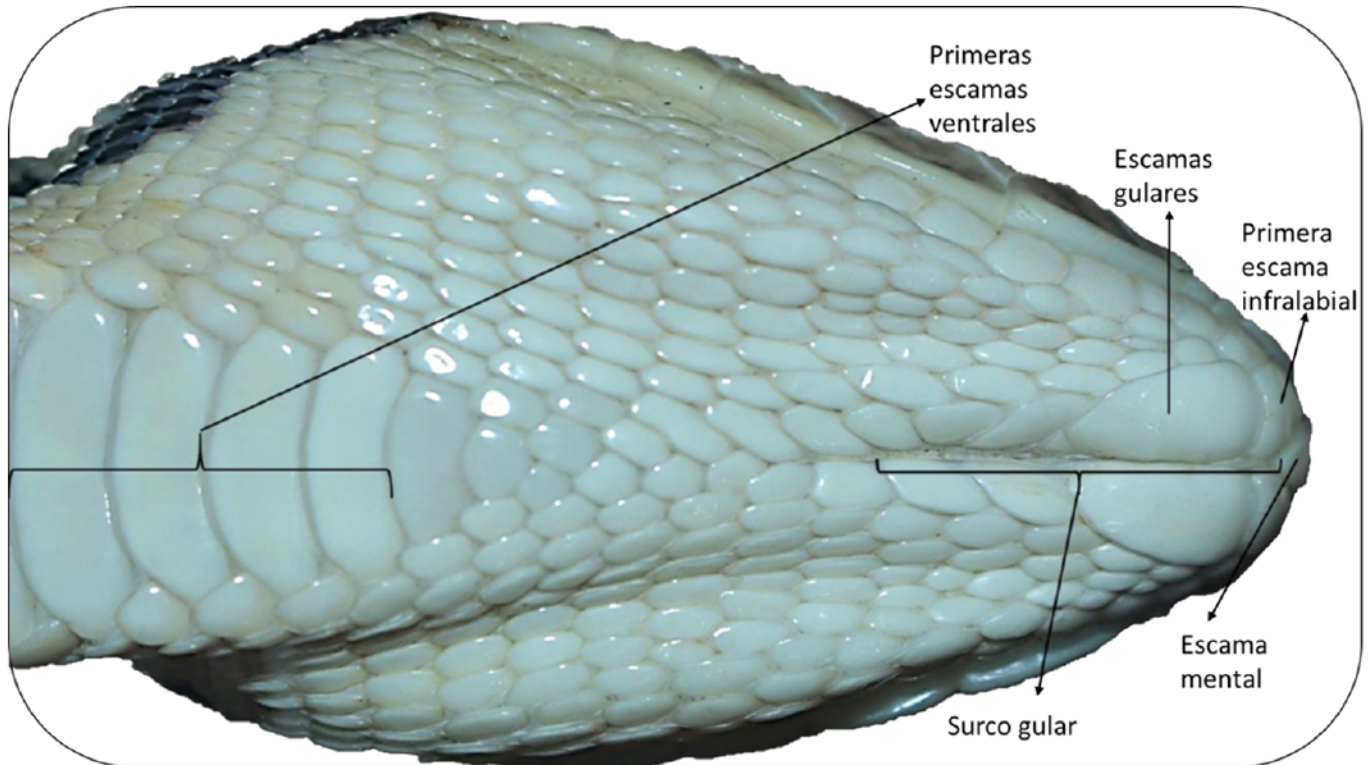


Figura 24. Vista ventral completa de *Lachesis acrochorda*.

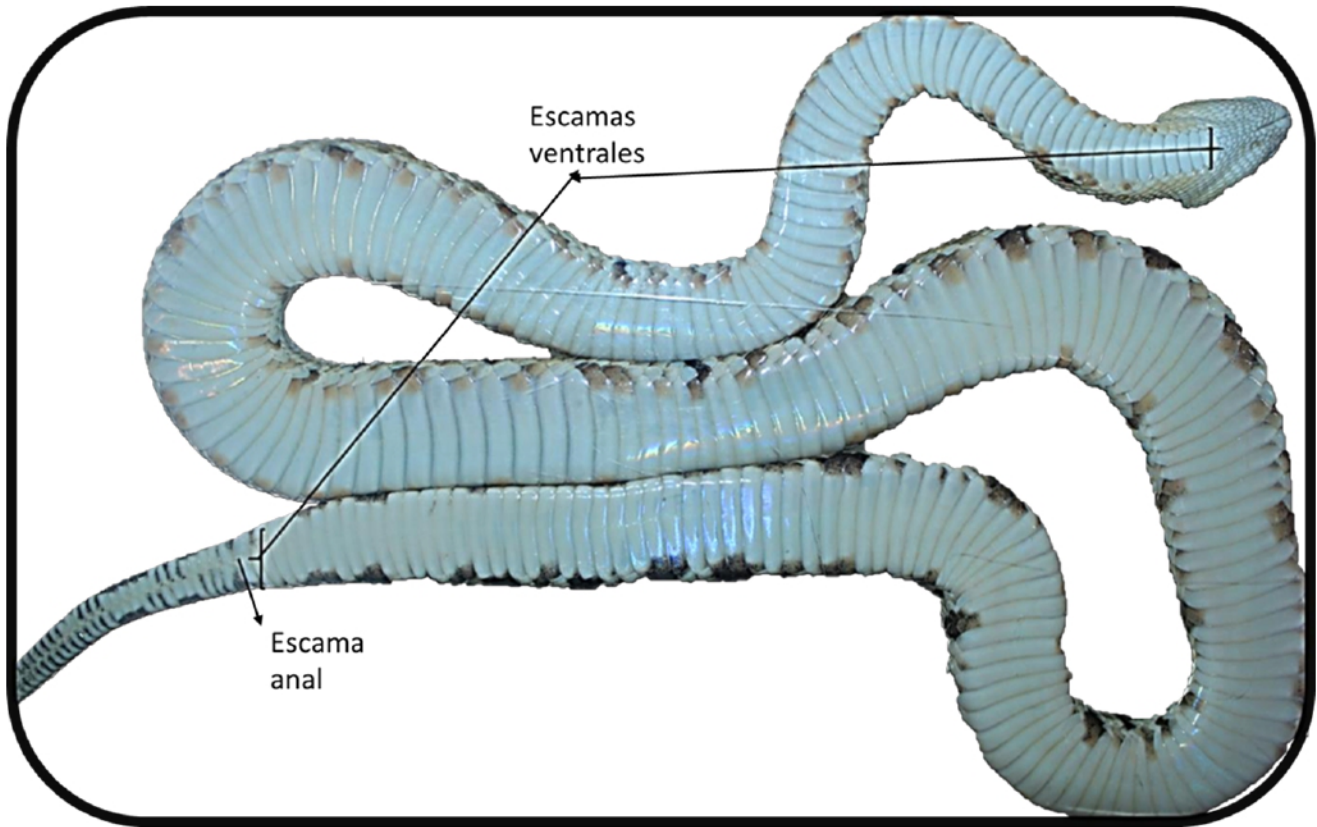


Figura 25. Vista ventral: cola de *Lachesis acrochorda*.

