

## INFLUENCIA DEL AYUNO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE VENENO EN *BOTHROPS ALTERNATUS* (OPHIDIA: VIPERIDAE: CROTALINAE)

F. FRANCINI\*  
F. O. PELUSO\*  
C. S. GRISOLIA\*

**RESUMEN:** el presente trabajo tiene por objeto dar a conocer los resultados referentes a la influencia del ayuno sobre la producción de veneno en *Bothrops alternatus* en cautiverio. A través del análisis de varianza y la prueba de significación de la diferencia entre dos medias por el método del error standard, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en muestras de 0 a 45 días y de 46 a 90 días de ayuno con respecto a la cantidad de veneno seco obtenido, un 42% mayor en la segunda muestra. Por otro lado, se halló correlación positiva de 0,4 entre la cantidad de días de ayuno y la cantidad de veneno seco extraída.

**PALABRAS CLAVE:** *Bothrops alternatus*, ayuno, producción veneno.

### INTRODUCCIÓN

Una de las finalidades del Laboratorio y Museo de Animales Venenosos de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, es la obtención de antígenos para la elaboración de sueros específicos. La extracción de veneno se realiza en forma periódica de acuerdo a las técnicas y necesidades de cada laboratorio productor<sup>2,4,5,8,12,15,20,23</sup>. En nuestro caso, debido a la exigua cantidad de ejemplares que ingresan anualmente al bioterio, aproximadamente 10 individuos por año para *Bothrops alternatus*, es fundamental maximizar la pro-

\* Laboratorio y Museo de Animales Venenosos  
Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata  
Calles 60 y 120 - 1900 - La Plata - Argentina.  
Recebido para publicação em 20.5.1991 e aceito em 9.10.1991

ducción reduciendo al mínimo la mortalidad de los animales. Una causa importante de ésta, es el stress que ocasiona la extracción de veneno, tanto mayor cuanto más frecuentemente sean sometidos los individuos a la misma. Por ello, hemos ensayado diferentes cronogramas de extracción con el fin de lograr la mayor cantidad de antígeno con el menor manipuleo posible de los ofidios. Se debe destacar que el ayuno previo a la extracción es otra variable que hemos investigado para lograr esa meta.

Si bien el manual de la OPS/OMS<sup>18</sup> informa que no existiría incidencia importante del ayuno en la cantidad de veneno obtenida, en otro trabajo<sup>11</sup> se estudió el efecto de la supresión de la alimentación sobre la cantidad de veneno en *Crotalus durissus terrificus* encontrándose incidencia positiva del ayuno sobre la producción. El presente trabajo tiene por objeto investigar si existe esta relación en *Bothrops alternatus*.

#### MATERIAL Y METODO

Se trabajó con lotes de 20 ejemplares de *B. alternatus* para cada extracción, de diferente sexo y edad, durante un período de 8 años (1982 a 1990).

Los adultos fueron alojados en forma individual en cajas de acrílico transparente de 50 x 50 x 18 cm, con tapa corrediza de alambre tejido, mientras que los viboreznos en cajas de madera de 30 x 30 x 15 cm, con tapa corrediza de vidrio y pared frontal de alambre tejido. Todas las cajas poseían una capa de viruta de madera de 3cm de alto, la cual era renovada cada 45 días y un recipiente plástico con agua en forma permanente. La alimentación consistió en ratones (*Mus musculus*) ofrecidos vivos una vez a la semana.

El bioterio se mantuvo en un rango de temperatura entre 20°C y 25°C con una humedad promedio del 70% e iluminado con luz natural.

Las extracciones de veneno se realizaron, en todas las oportunidades, en forma manual con masajeo glandular suave<sup>9</sup>.

Durante el tiempo de observación, fueron realizadas 13 extracciones, con períodos de ayuno entre 0 y 90 días. Con estos datos fue realizada una evaluación estadística consistente en:

1 — Estudio de la cantidad promedio de veneno obtenido, desvío standard del lote y clasificación del período de ayuno en dos intervalos de clase: X1 de 0 a 45 días y X2 de 46 a 90 días.

2 — A los efectos de comprobar diferencias entre los intervalos del punto 1, se realizó análisis de varianza según Ledesma<sup>14</sup> y Kohan y Carro<sup>13</sup>.

3 — Evaluación de la diferencia entre las medias del punto 1 a partir de la prueba de significación entre dos medias por el método del error standard según Ledesma<sup>14</sup>.

4 — Aplicación del estadístico de Correlación (R) con motivo de analizar el grado de interdependencia entre las variables días de ayuno/cantidad de veneno seco obtenido, según Bancroft<sup>1</sup>. Luego se evaluó la significación del valor de R calculando los límites del intervalo de confianza de R, según Ledesma<sup>14</sup>.

#### RESULTADOS

Los valores hallados para cada muestra están representados en la tabla I.

1 — En el análisis de varianza obtuvimos para  $F \approx (0,05)$  un valor  $F_{1,2}$  de 22,8. Por ser este valor encontrado para la diferencia entre X1 y X2 con respecto a la cantidad de veneno seco obtenido mayor que el valor de tabla de F (3,84) para

$n = 225$ , la diferencia entre  $X_1$  y  $X_2$  es entonces estadísticamente significativa. Cabe destacar que la muestra  $X_2$  arrojó un valor promedio de veneno seco, un 42% mayor que la muestra  $X_1$ .

2 — En el análisis de los datos de las muestras, realizamos la prueba de significación de la diferencia entre dos medias. La suma de los errores standard de cada muestra (6,6 y 12,5 respectivamente para  $X_1$  y  $X_2$ ) es menor a la diferencia entre las medias (35,73), por lo tanto la diferencia es significativa.

3 — Para obtener el grado de interdependencia entre las variables días de ayuno/cantidad de veneno seco obtenido en mg, se empleó el índice de Correlación ( $R$ ), hallándose un valor positivo de 0,4. Luego se calcularon los límites del intervalo de confianza de  $R$  para la probabilidad de 0,05. Los valores encontrados fueron 0,27 y 0,53 por lo que nuestro valor de  $R$  es de significación estadística.

## DISCUSION

La producción de veneno para la elaboración de sueros específicos está superditada al mantenimiento de un lote de ofidios en forma permanente. Es obvio que, en un serpentario donde la tasa de ingreso anual de ejemplares es baja, debe procurarse ampliar la supervivencia de los mismos. Uno de los factores que aumentan la mortalidad en cautiverio, es el stress causado por el manejo en la extracción de veneno, por lo tanto resulta importante minimizar el contacto con los animales. Por otro lado, de este modo, disminuyen los riesgos del operador.

La comprobación que el ayuno previo a la extracción influye en forma significativa sobre la producción de veneno, permite una planificación precisa ya ensayada para otros ofidios<sup>11</sup>. Dicha planificación consiste en un cronograma en el cual los ejemplares son sometidos a tres meses de ayuno previo a la extracción seguidos de tres meses de alimentación normal luego de la extracción<sup>10</sup>. Este sistema permite dos extracciones por año. Como ha sido indicado por otros autores<sup>6,17,24</sup> períodos mayores de 90 días de ayuno podrían poner en peligro la vida del animal, por eso, si bien la cantidad de veneno obtenido aumenta, como ha sido observado en *Crotalus durissus terrificus*<sup>11</sup>, no fueron tomados períodos que sobrepasen ese lapso.

Esto lleva a que, si se van a espaciar las extracciones, las mismas deben proporcionar cantidades de veneno que justifiquen la implementación de este cronograma. El promedio de 118 mg por víbora obtenido para *Bothrops alternatus* ( $X_2$ ) sometidas a extracciones semestrales, sumado a la baja mortalidad del lote (50% de los ejemplares ingresados cada año contra aproximadamente 80% para  $X_1$ ), nos permite afirmar que el sistema justifica su implementación. Es interesante comparar lo expresado anteriormente con lo referido por Belluomini<sup>2,3</sup> para una colonia de *B. alternatus* sometida a extracciones quincenales y bajo estimulación eléctrica, con un rendimiento de 74 mg de veneno seco por víbora y una mortalidad del 86,7% para el primer año. Por otro lado, es importante destacar que nuestro valor de supervivencia es mayor al referido por Cowan<sup>7</sup> quién consigna un porcentaje de mortalidad del 80% para los ejemplares durante los dos primeros años de cautiverio, cuando en nuestro caso tal porcentaje sólo alcanza el 65% para el mismo período de tiempo<sup>19</sup>. Así, mientras que para el 80% de los individuos sometidos a ayunos de 0 — 45 días, sólo fueron realizadas de 1 a 1,5 extracciones promedio antes de su muerte, en ejemplares con ayunos de 46 — 90 días hemos logrado un promedio de 10 a 12 extracciones, llegando algunos individuos a lograr períodos de permanencia útil en cautividad de hasta 13 años.

FRANCINI, F., PELUSO, F. O., GRISOLIA, C.S. Influencia del ayuno sobre la producción de veneno en *Bothrops alternatus* (Ophidia: Viperidae: Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan*, v. 53, n. 2, p. 205-210, 1991

Con respecto a la composición, Sobol et al.<sup>22</sup> informan que sucesivas extracciones podrían disminuir la producción de proteínas y su actividad enzimática en el veneno. Así mismo, la regeneración de los componentes farmacológicos tras sucesivas extracciones, no es simultánea y algunas fracciones pueden tardar hasta 45 días después de las mismas<sup>21</sup>. Por lo tanto, el espaciado en los períodos entre extracciones facilita la presencia de todos los componentes químicos normalmente presentes.

Los resultados obtenidos son recomendados para ser volcados en un laboratorio productor si se quieren tomar iniciativas para maximizar la cantidad de antígeno colectado por extracción.

## CONCLUSIONES

Intervalos de ayuno previos a la extracción de 46 a 90 días, arrojaron un valor de 118,03 mg de veneno seco promedio por ejemplar, valor un 42% mayor que para intervalos de 0 a 45 días (82,3 mg). Esta diferencia es de significación estadística.

La interdependencia de las variables días de ayuno/mg de veneno seco obtenido, fue analizada a través del índice de Correlación dando un valor positivo de 0,4, lo cual indica una correlación real significativa.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. N.O. Stanchi y al Lic. G. Schinella la lectura crítica del manuscrito así como sus valiosos comentarios.

**ABSTRACT:** the present work was carried out in order to investigate the influence of starvation period on venom production in snakes (*Bothrops alternatus*) under captivity conditions. Samples was divided in two groups of starvation, 0 - 45 days and 46 - 90 days. Different statistical methods shows that venom production of group 46 - 90 days was 42% higher than 0 - 45 days ( $P \propto 0.05$ ).

**KEYWORDS:** *Bothrops alternatus*, starvation, venom production.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BANCROFT, M. *Introducción a la bioestadística*. EUDEBA, 1965. 246p.
2. BELLUOMINI, H.E. Venom production of snakes in captivity. *Mem. Inst. Butantan*, v. 32, p. 79-88, 1965.
3. EXTRACTION and quantities of venom obtained from some Brazilian snakes. *Col. Trab. Inst. Butantan*, v. 12, 1968/69.
4. BIASI, P. De, BELLUOMINI, H.E., FERNANDES, W. Quantidades de veneno obtidas na extração de serpentes *Bothrops pradoi* (Hoge, 1948) (Serpentes-Viperidae-Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan*, v. 40/41, p. 155-166, 1976/77.
5. BIASI P. De, BELLUOMINI, H.E., HOGE, R.A., PUORTO, G. Uso do gás carbônico na extração de veneno de serpentes. *Mem. Inst. Butantan*, v. 40/41, p. 167-172, 1976/77.
6. COLLETTE, B.E. & CURRY, O.H. Mycotic keratitis in reticulated Phyton. *J. Amer. vet. med. Ass.*, v. 173, n. 9, p. 1117-1118, 1978.
7. COWAN, D. Diseases of captive reptiles. *J. Amer. vet. med. Ass.*, v. 153, n. 7, p. 848-859, 1968.

FRANCINI, F., PELUSO, F.O., GRISOLIA, C.S. Influencia del ayuno sobre la producción de veneno en *Bothrops alternatus* (Ophidia: Viperidae: Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan*, v. 53, n. 2, p. 205-210, 1991

8. DEORAS, P.J. Probable significance of venom yield record studies. *Mem. Inst. Butantan*, v. 33, n. 3, p. 767-774, 1966.
9. DI TADA, I.E. & DOUCET, M.E. *Informe técnico sobre mantenimiento de serpientes y producción de venenos*. Trab. apres. no 2do. Congreso Latinoamericano de Toxicología, Santa Fe, Argentina, 1973.
10. GRISOLIA, C.S., PELUSO, F.O., STANCHI, N.O. Informe sobre la actividad del Laboratorio y Museo de Animales Venenosos de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata. *Rev. argent. Prod. Anim.*, v. 6, n. 7/8, p. 517-519, 1986.
11. GRISOLIA, C.S., STANCHI, N.O., PELUSO, F.O. Relación entre el período de ayuno y cantidad de veneno extraido de ofidios en cautiverio. *Rev. argent. Prod. Anim.*, v. 6, n. 7/8, p. 513-516, 1986.
12. KOCHVA, E. A quantitative study of venom secretion by *Vipera palaestinae*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 9, p. 381-390, 1960.
13. KOHAN, N.C. & CARRO, J.M. *Estadística aplicada*. 5. ed. EUDEBA, 1972. 368p.
14. LEDESMA, D.A. *Estadística médica*. 2. ed. EUDEBA, 1980. 602p.
15. LEINZ, F.F., JANEIRO-CINQUINI, T., ISHIZUKA, M.M. Carbon dioxide as an auxiliary in the venom extraction of *Bothrops jararaca* snakes (Viperidae-Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan*, v. 52, n. 1, p. 17-23, 1990.
16. LELOUP, P. Essais de rationalisation dans le maintien d'un serpentarium à but industriel. *Acta trop.* v. 30, n. 4, p. 281-311, 1973.
17. VARIOUS aspects of venomous snake breeding on large scale. *Acta zool. pathol. Antwerp.*, v. 78, p. 177-198, 1984.
18. OPS/OMS. *Manual de procedimientos, producción y pruebas de control en la preparación de suero Diftérico, tetánico, Botulínico, Antivenenoso y de la gangrena gaseosa*. 1977.
19. PELUSO, F.O., FRANCINI, F., GRISOLIA, C.S., STANCHI, N.O. Análisis de la supervivencia de *Bothrops alternatus* (Ophidia: Viperidae: Crotalinae) en cautiverio. *ACOVEZ*, v. 13, n. 4, p. 27-29, 1989.
20. ROLIM-ROSA, R., BELLUOMINI, H.E., SILES-VILLAROEL, M., IIZUKA, H. Efeitos sobre a toxicidade da mistura de venenos e a sobrevida de exemplares de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus*, submetidos às extrações manual e elétrica. *Mem. Inst. Butantan*, v. 44/45, p. 245-251, 1980/81.
21. SCHENBERG, S., PEREIRA LIMA, F.A., NOGUEIRA-SCHIRIPA, L.N., NAGAMORI, A. Unparalleled regeneration of snake venom components in successive milkings. *Toxicon*, v. 8, n. 2, p. 156, 1970. (abstract)
22. SOBOL-BROWN, R., BDOLAH, A., KOCHVA, E., BROWN, M.B. Secretion of enzymes in the venom glands of *Vipera palaestinae* (Viperidae-Ophidia). *Toxicon*, v. 8, n. 2, p. 156, 1970 (abstract)
23. VIEIRA, E.G.J., ROLIM-ROSA, R., IIZUKA, H., FURTADO, M.F.D., FERNANDES, W. Influências sazonais e do processo de extração sobre a produção, toxicidade de veneno e sobrevida de *Bothrops jararaca* (Wied, 1824). *Mem. Inst. Butantan*, v. 50, n. 1, p. 29-35, 1988.
24. WALLACH, J.D. Environmental and nutritional diseases of captive reptiles. *J. Amer. vet. med. Ass.*, v. 159, n. 11, p. 1631-1633, 1971.

FRANCINI, F., PELUSO, F. O., GRISOLIA, C.S. Influencia del ayuno sobre la producción de veneno en *Bothrops alternatus* (Ophidia: Viperidae: Crotalinae). *Mem. Inst. Butantan*, v. 53, n. 2, p. 205-210, 1991

TABLA I

*BOTHROPS ALTERNATUS*. Cantidad de veneno seco producido en valor promedio para cada intervalo de clase

Período Ayuno (en días)	Núm. datos	Promedio Ven. Seco (mg)	Desvío Standard	Error Standard
XI: 0-45	124	82,3	37	6,6
X2: 46-90	101	118,03	63	12,5
total	225	95,4	55,6	