

**DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES TOXINOLÓGICAS DEL VENENO DE
UNA POBLACIÓN DE *Bothriechis schlegelii* (BERTHOLD, 1846) CON
DISTRIBUCIÓN EN EL VALLE ALTO DEL RÍO CAUCA**



JUAN CAMILO VIVEROS ESCOBAR

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS, NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
2023**

**DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES TOXINOLÓGICAS DEL VENENO DE
UNA POBLACIÓN DE *Bothriechis schlegelii* (BERTHOLD, 1846) CON
DISTRIBUCIÓN EN EL VALLE ALTO DEL RÍO CAUCA**

JUAN CAMILO VIVEROS ESCOBAR

Anteproyecto de Grado para optar al título de Biólogo

Directora

MAYRA ALEJANDRA VELASCO REYES M.Sc

Asesor: JIMMY ALEXANDER GUERRERO VARGAS PhD

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

POPAYÁN

2023

NOTA DE ACEPTACION

APROBADO

Lina María Preciado Rojo

PhD Lina María Preciado Rojo

Rosa Amalia Dueñas C.

PhD Rosa Amalia Dueñas Cuellar

Mayra Alejandra Velasco

MAYRA ALEJANDRA VELASCO REYES M.Sc

Directora del trabajo de Grado

Ciudad y fecha de sustentación: Popayán 07 de Junio de 2023

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad del Cauca, al Programa de Biología y el plantel de profesores, donde recibí la formación académica para culminar mi carrera.
- Al Grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas (GIHT) de la Universidad del Cauca por ayudar y contribuir en mi formación como investigador.
- Al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC), y a su personal por el apoyo y permitirme utilizar las instalaciones.
- A mi mamá Clara Inés Escobar, mi papá Marco Tulio Viveros, mi abuela Rosa Elena Ordoñez y mi hermana Catalina Viveros Escobar, por el apoyo brindando durante toda la carrera. A mi directora Mayra Alejandra Velasco Reyes, por los aportes, la colaboración, los consejos, el apoyo y el tiempo brindado durante toda esta investigación.
- A mi asesor Jimmy Alexander Guerrero Vargas, por los consejos, la experiencia y los aportes realizados a esta investigación.
- Al Doctor Santiago Ayerbe, por el apoyo, la experiencia y los consejos prestados durante la investigación.
- A Paula Andrea Ramírez y Mary Luz Bueno, por el apoyo, los consejos y buena ayuda brindadas durante la realización de esta investigación.
- A Juan Sebastián Loaiza y Andrés Julián Martínez, amigos incondicionales por el tiempo, la disposición y la ayuda brindada, en esta investigación.
- A Fernando Bonilla, Andrés Quiñones, Víctor García, Eliana Valdez, Fabian Cayapu, Andrés Olaya, Alejandra Polanco, por el apoyo durante toda la carrera.
- A mis compañeros de carrera por el apoyo durante mis estudios.

TABLA DE CONTENIDO	
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
JUSTIFICACIÓN	14
OBJETIVOS	19
Objetivo principal	19
Objetivos específicos	19
MARCO TEÓRICO	19
<i>Bothriechis schlegelii</i> (Berthold, 1846).....	19
Distribución geográfica de <i>Bothriechis schlegelii</i>	21
Proteómica del veneno de <i>B. schlegelii</i>	22
Actividades Biológicas	22
Actividad letal (DL₅₀)	23
Actividad Coagulante	23
Actividad hemorrágica	24
Actividad Miotóxica	25
Actividad edematizante	25
Causas y consecuencias de la variación de los venenos de serpientes	26
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Diseño Experimental	28
Serpientes	28
Obtención del veneno	28
Biomodelo	28
Actividades Biológicas	28
Determinación de la actividad letal dosis letal₅₀	28
Determinación de la actividad coagulante	29
Determinación de la actividad hemorrágica	29
Determinación de la actividad miotóxica	30
Determinación de la actividad edematizante	31
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
RESULTADOS	32

ACTIVIDAD LETAL.....	32
ACTIVIDAD COAGULANTE.....	36
ACTIVIDAD EDEMATIZANTE	38
ACTIVIDAD MIOTÓXICA	41
ACTIVIDAD HEMORRÁGICA	43
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXOS.....	56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cantidad de ratones vivos y muertos para cada dosis de veneno transcurridas 48 horas después de la inoculación del veneno. -----	32
Tabla 2. Signos reportados para cada concentración de veneno y su tiempo de aparición-----	33
Tabla 3. Valores de CK (U/L) en la sangre para cada uno de los grupos de ratones. -----	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espécimen de *Bothriechis schlegelii*. Por: J.C. Viveros E, 2021. Del Centro de Investigaciones Biomédicas- CIBUC-BIOTERIO-UNICAUCA. Popayán, Cauca. Colombia. -----20
- Figura 2. A.** Espécimen de *Bothriechis schlegelii* con morfo tipo de coloración críptica. **B.** Espécimen de *Bothriechis schlegelii* con morfo tipo de coloración en contrastante con el ambiente. Por: J.C. Viveros E, 2021. Del Centro de Investigaciones Biomédicas- CIBUC-BIOTERIO-UNICAUCA. Popayán, Cauca. Colombia. -----20
- Figura 3.** Puntos rojos determinan la distribución geográfica de la *Bothriechis schlegelii*. Por: Rivera-Correa, M, 2017. Sacado de Catalogo de Anfibios y Reptiles de Colombia, Volumen 3. -----21
- Figura 4.** En la parte izquierda, la caja de luz. A la derecha el montaje de los ratones, teniendo en cuenta la ubicación tanto de la regla, los ratones y el pantone (Jenkins et al., 2017). -----30
- Figura 5. A.** Distensión abdominal generada por el veneno de *B. schlegelii*. **B.** Cambio en el comportamiento del ratón. Por: J.C. Viveros E, 2022. Del Centro de Investigaciones Biomédicas- CIBUC-BIOTERIO-UNICAUCA. Popayán, Cauca. Colombia. -----35
- Figura 6.** Dosis letal 50 del veneno de *B. schlegelii* en ratones. Se usaron 6 dosis de veneno (60, 80, 120, 180, 240 y 300 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). El grafico representa la probabilidad de muerte para cada dosis-----36
- Figura 7.** Efecto coagulante del veneno de la especie *B. schlegelii*. Los valores representan la media \pm SD del tiempo en segundos transcurrido antes de la coagulación de la muestra, en diferentes dosis. El análisis estadístico realizado fue un ANOVA de una vía, seguido por la prueba de Tukey de comparación de grupos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. -----37

Figura 8. Dosis mínima coagulante del veneno de *B. schlegelii* en ratones. Se usaron 6 dosis de veneno (25, 50, 75, 100, 125 y 150 µg/µL). El grafico representa el promedio de la coagulación de las dosis en el plasma. -----38

Figura 9. Efecto edematizante generado por el veneno de la especie *B. schlegelii*. Los valores representan la media ± SD del % de edema en relación con las concentraciones evaluadas. El análisis estadístico realizado fue una prueba de Kruskal-Wallis, seguido por la prueba de Wilcoxon con ajuste a Bonferroni de comparación de grupos. **P*<0.05, ***P*<0.01, ***<0.001. -----39

Figura 10. Efecto edematizante generado por el veneno de la especie *B. schlegelii*. Los valores representan la media ± SD del % de edema con relación al tiempo. El análisis estadístico realizado fue una prueba de Kruskal-Wallis, seguido por la prueba de Wilcoxon con ajuste a Bonferroni de comparación de grupos. **P*<0.05, ***P*<0.01, ***<0.001. -----40

Figura 11. Actividad Edematizante del veneno de *Bothriechis schlegelii* observada en la formación del Edema en el Tiempo y teniendo en cuenta las Dosis-----40

Figura 12. Dosis mínima edematizante del veneno de *B. schlegelii* en ratones. Se usaron 4 dosis de veneno (0.625, 1.25, 2.5 y 5 µg/µL). El grafico representa el promedio de la formación del edema. -----41

Figura 13. Aumento en el daño muscular dependiendo de las dosis del veneno (PBS, 5, 10, 20 y 40 µg/µL), visto de izquierda a derecha. Por: J.C. Viveros E, 2022. Del Centro de Investigaciones Biomédicas- CIBUC-BIOTERIO-UNICAUCA. Popayán, Cauca. Colombia. -----42

Figura 14. Efecto miotóxico del veneno de la especie *B. schlegelii*. Los valores representan la media ± SD de los valores de creatinina kinasa U/L en la sangre de ratones. Se usaron 4 dosis de veneno (5, 10, 20 y 40 µg/µL). El análisis estadístico realizado fue un ANOVA de una vía, seguido por la prueba de Tukey de comparación de grupos. **P*<0.05, ***P*<0.01, ***<0.001. -----43

Figura 15. Dosis mínima hemorrágica del veneno de *B. schlegelii* en ratones. Se usaron 4 dosis de veneno (60, 80, 100 y 120 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). El grafico representa el promedio de las unidades hemorrágicas, con relación a la concentración. -----44

RESUMEN

Dentro del Departamento del Cauca, podemos encontrar serpientes del género *Bothriechis*, específicamente la especie *Bothriechis schlegelii*, para esta especie no se reportan síntomas graves en los casos de envenenamiento, y dentro de las características de su veneno se destaca una toxicidad moderada con manifestaciones de dolor localizado y la presencia de edema hemorrágico. Su distribución en Colombia va desde el noroccidente antioqueño hasta el sur de Nariño, y acorde con diferentes reportes, existen variaciones relacionadas a las actividades tóxicas en el envenenamiento por esta especie. De acuerdo con lo anterior y teniendo en cuenta que los venenos pueden sufrir variaciones intraespecíficas que influyen en el perfil proteómico de cada veneno, lo cual les confiere una pequeña ventaja competitiva a las especies, justificada no solo por los componentes intraespecíficos sino, por variaciones filogenéticas que surgen con el tiempo. Como consecuencia en este trabajo se reportan los diferentes efectos de las actividades toxinológicas; como lo son la actividad hemorrágica, miotóxica, edematizante, coagulante y letal, producida por el veneno de una población de *B. schlegelii* con distribución en el Vallé alto del río Cauca, y se concluye que la población de *B. schlegelii* presenta una variación en los efectos producidos por el veneno en comparación con otras poblaciones de la misma especie con diferentes distribuciones.

Palabras clave: Departamento del Cauca, *Bothriechis schlegelii*, actividades toxinológicas, variación.

INTRODUCCIÓN

En el mundo existen aproximadamente más de 3.000 especies de serpientes, de las cuales solo la sexta parte son venenosas. Para Colombia se han identificado 8 familias, 71 géneros y 272 especies, de las que solo 49 son venenosas (Rojas, 2017). Basados en los reportes de la Organización Mundial de la Salud, las mordeduras de serpientes se han catalogado como un problema de salud pública, el cual es desatendido en países tropicales y subtropicales, y generan 5.4 millones de casos, con aproximadamente 2.6 millones de envenenamientos y 125.345 muertes (Who, 2019).

Dentro del Departamento del Cauca, se encuentra como representante del género *Bothriechis*, específicamente la especie *Bothriechis schlegelii*, única en esta región, la cual se caracteriza fenotípicamente por tener un patrón de coloración bastante polimórfico, que no permite definir la presencia de especies crípticas. Adicionalmente, esta especie habita en diferentes ecosistemas como bosques húmedos, muy húmedos, selvas nubladas entre otros (Rivera-Correa, 2017). Las características del veneno de *B. schlegelii* están dadas por presentar una toxicidad moderada, por lo cual no se reportan síntomas graves en los casos de envenenamiento, a su vez entre los efectos más relevantes están, dolor localizado, edema hemorrágico y algunos estudios han encontrado que el veneno de esta serpiente tiene actividad principalmente miotóxica (Lomonte et al., 2008; Rivera-Correa, 2017).

Como consecuencia a la amplia distribución de la serpiente *B. schlegelii* en zonas ambientales diferentes, se evidencio una variación en los componentes del veneno, por lo cual en este trabajo se reportan las actividades biológicas de edema, letalidad, hemorragia, coagulación y miotoxicidad de una población de la especie *B. schlegelii*, con distribución en el valle alto del rio Cauca, con el fin de contribuir al entendimiento de la biología del veneno.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los venenos de serpientes son mezclas únicas de péptidos y proteínas diseñados por selección natural para actuar sobre los sistemas vitales de la presa o la víctima, estos componentes proteicos y enzimáticos pueden variar en la composición de toxinas entre especies de serpientes (Amorim et al., 2018; Casewell et al., 2020; Gómez-Cardona et al., 2017). Varios estudios demuestran que los venenos entre serpientes de la misma especie varía dependiendo su distribución geográfica, variaciones climáticas, alimentación y variaciones ontogénicas relacionados con la dieta (Davies & Arbuckle, 2019; Jackson et al., 2019).

De acuerdo con lo anterior, se han demostrado diferencias en el veneno con relación a sus actividades tóxicas dentro de una misma especie de serpiente, justificadas no solo por componentes intraespecíficos (Pla et al., 2017; Tasoulis et al., 2020) sino, por variaciones filogenéticas que han venido surgiendo con el tiempo (Magro et al., 2001; Prezotto-Neto et al., 2016). Para la especie *B. schlegelii*, se identificaron cuatro nodos de diferenciación fenotípica del veneno a través de la filogenia de *Bothriechis*, ya que el veneno de la población registrada en Centroamérica varía en la composición de su veneno en comparación con la población de Suramérica, como consecuencia de condiciones ambientales y geográficas diferentes (Casewell et al., 2020; Jackson et al., 2019; Prezotto-Neto et al., 2016).

De esta forma y sabiendo que el veneno de las serpientes puede cambiar en su composición por una variedad de procesos evolutivos, surge la siguiente pregunta de investigación: ¿Que actividades biológicas de letalidad, edema, hemorragia, coagulación y mionecrosis presenta la especie *Bothriechis schlegelii* distribuida en el valle del río Cauca? Observándose diferencias en las Dosis halladas en este trabajo, comparadas con estudios previos.

JUSTIFICACIÓN

El veneno se define como la secreción conformada por una serie de compuestos bioactivos, constituido en gran cantidad por varias familias de proteínas y péptidos, y en menor proporción de compuestos orgánicos e inorgánicos (Munuera Mora, 2016). Estas proteínas pueden generar actividades de letalidad, hemorragia, miotoxicidad, dermonecrosis, efectos edematizantes, coagulantes y desfibrinación al organismo al que le inocula el veneno, provocando efectos locales o sistémicos (Gutierrez et al., 2015).

Diferentes estudios realizados con el veneno de la serpiente *B. schlegelii* reportan efectos locales como edema, mionecrosis, y efectos hemorrágicos donde su potencialidad depende posiblemente de la distribución geográfica y otros factores que contribuyen a la diversidad del veneno (Prezotto-Neto et al., 2016). Teniendo en cuenta que los venenos pueden sufrir variaciones intraespecífica como consecuencia de condiciones ambientales, edad y hábitos de alimentación que influyen en el perfil proteómico de cada veneno, esta variación puede permitir tener una pequeña ventaja competitiva (Menezes et al., 2006; Jackson et al., 2019). La variación de los venenos se puede ver desde dos puntos diferentes, el primero desde la posibilidad de la variación intraespecífica relacionada con el estado geográfico y/o sexual y en segundo lugar como marcadores individuales que provocan variabilidad relacionadas con influencias como la edad, los cambios en las estaciones, la alimentación, la producción de las glándulas y la maduración de los péptidos (Abdel-rahman et al., 2009; Davies & Arbuckle, 2019; Prezotto-Neto et al., 2016)

Considerando lo anterior, el resultado de la caracterización funcional del veneno de una población de la víbora de pestañas *B. schlegelii* con distribución en el valle alto del río Cauca, proporcionó información importante que estableció nuevos conocimientos de las actividades toxinológicas (letalidad, coagulante, edematizante,

miotóxica y hemorrágica) del veneno en esta especie y aportar información para futuros estudios.

ANTECEDENTES

La variación inter e intra específica de los venenos ha sido ampliamente estudiada, así como también la variación en las actividades biológicas generadas por el veneno, de ahí que varios estudios demuestran estas variaciones así:

Saad et al., 2012 realizaron un estudio en el que comparaba los venenos de la serpiente *Bothrops jararaca* en estado salvaje y en estado de cautiverio, teniendo en cuenta el lugar de origen, edad y género de los especímenes, siendo el objetivo de este estudio determinar la variación individual del veneno, mediante la caracterización bioquímica, enzimática y farmacológica. En este estudio, encontraron diferencias significativas en la actividad coagulante y hemorrágica, demostrando variación ontogénica en los venenos, dada por la expresión diferencial entre los venenos evaluados, generando cambios en la acción biológica del veneno haciendo que existan algunos compuestos en mayor cantidad, los cuales generan estos cambios. Finalmente, los datos obtenidos demuestran una variación interespecífica del veneno, lo cual aporta datos para mejorar el seguimiento de la eficacia de los antivenenos y también el control de los pools de veneno para la inmunización de los animales.

Munuera Mora, 2016 realizó un estudio para caracterizar proteómicamente venenos de serpientes con interés biomédico, donde se observó variación interespecífica e intraespecífica de forma geográfica. Para la variación interespecífica se compararon 4 serpientes de un mismo género; siendo estas *Naja haje*, *Naja annulifera*, *Naja nigricolis nigricincta*, *Naja melanoleuca melanoleuca*. Observando una clara diferencia en *N. haje* y *N. annulifera* con *N. nigricolis nigricincta* y *N. melanoleuca melanoleuca*, en las PLA₂ (Fosfolipasas A2) siendo mayores en las dos últimas, otra diferencia significativa es la mayor presencia de

SVMP (Metaloproteinasas de veneno de serpiente) en *N. annulifera*, *N. nigricolis nigricincta* y *N. melanoleuca melanoleuca*. Para la variación intra específica compararon venenos de *Naja haje* de dos países, con climas y condiciones ambientales diferentes como lo son Marruecos y Mali; al realizar los estudios se encontraron variaciones en el veneno, pero no tan significativas como al comparar venenos diferentes. Finalmente, estas diferencias presentes en los venenos se deben a las condiciones geográficas de cada país, aparte de estas diferencias se sabe que los ecosistemas no son iguales por ende las especies presentes ahí no son las mismas y las presas que sirven para estas serpientes varían en mayor o menor proporción.

Prezotto-Neto et al., 2016 realizaron la caracterización bioquímica y biológica de *Bothriechis schlegelii* de Colombia y Costa Rica. Las serpientes que utilizaron para este estudio fueron colectadas en Verachí (Antioquia) para el caso de Colombia (BsCo) y en el caso de Costa Rica (BsCR) colectados en la región caribe de este país, a su vez se utilizó un veneno de control de la especie *Bothrops jararaca*, provisto por el Instituto Butantan (Brasil). Al realizar las pruebas biológicas, iniciaron con la prueba de PLA₂ las cuales demostraron que tienen cifras parecidas teniendo a BsCo con 1273 U/mg y la BsCR de 1255 U/mg, para la actividad edematizante donde se encontró que la BsCR tiene más actividad edematizante que a comparación de la BsCo siendo la cantidad de 8 µg la que registra esta actividad en mayor proporción, para el caso de la BsCo la concentración que presenta mayor actividad es 2 µg, observándose más a 1 hora de inyectada la concentración. Para la actividad hemorrágica se determinó la dosis mínima hemorrágica encontrando que la dosis de BsCR es de 3.9 µg y la BsCo es de 14.2 µg, observando que la de Costa Rica es más hemorrágica que la de Colombia, por último, se determinó la dosis letal 50 registrando que para BsCR es de 5.60 mg/kg y para BsCo es de 9.24 mg/kg dando como resultado que la de Costa Rica es más letal a comparación con la de Colombia.

Pla et al., 2017 realizaron un estudio donde determinaron la proteómica y variabilidad en el veneno, teniendo en cuenta especies pertenecientes a el género *Bothriechis* (*B. aurifer*, *B. thalassinus*, *B. bicolor* de Guatemala, *B. marchi* de Honduras, *B. lateralis* y *B. schlegelii* recién nacidos de Costa Rica), encontrando diferencias significativas. Los componentes del veneno variaban según la especie determinando su actividad biológica, por ejemplo, en las especies *B. aurifer* y *B. thalassinus* están constituidos por un conjunto de toxinas que en ambos casos son similares dominado Metaloproteinasas (SVMP) (33-39%), Lectina Tipo C (CTL) (11-16%), Péptidos similares a la potenciación de la bradiquidina (BPP) (10-13%) y Proteína secretora rica en cisteína (CRISP) (5-10%) y se caracterizan por no contener PLA₂. El proteoma de *B. marchi* es similar a *B. aurifer* y *B. thalassinus* porque contiene en gran cantidad SVMP y BPP, pero contiene cantidades notorias de PLA₂, los venenos de *B. lateralis* y *B. schlegelii* contienen en gran medida serin proteasas. En el individuo de *B. schlegelii* fue el único que se encontró un inhibidor tipo Kazal y PLA₂, encontrando similitud entre los neonatos y no con sus respectivos adultos. Observando un cambio notorio de cuando pasan de neonato a adulto, por ejemplo, en *B. lateralis* paso de tener Serin proteasas a tener un veneno rico en SVMP, en el caso de *B. schlegelii* el cambio en el veneno depende de la edad de la serpiente llegando a tener un veneno rico en PLA₂. El patrón que se encontró en la variación de los venenos del género *Bothriechis* en un marco biogeográfico y filogenético, que sienta las bases para futuros estudios que permitan ver cuál fue el camino evolutivo que condujo a la variación de estos venenos.

Tasoulis et al., 2020 analizaron la variación intraespecífica e interespecífica del veneno de la serpiente *Oxyuranus scutellatus* (taipán costero), para ello se utilizaron venenos de 13 serpientes de 4 localidades diferentes, las cuales abarcan de norte a sur 2000 km, todos los especímenes utilizados eran adultos y se sabían su sexo; y sus venenos se compararon proteómicamente y funcionalmente. Dentro de este proyecto se realizó una comparación entre serpientes del mismo género. Arrojando como resultado que se denota una variación intra poblacional mayor a comparación

con la variación Inter poblacional, observada en las pruebas SDS-PAGE, actividad coagulante y actividad de PLA2. El alto nivel intra poblacional demostrado proporciona unas bases para evaluar las diferencias intraespecíficas de los venenos.

Montealegre-Sánchez et al., 2021 en este estudio realizaron la comparación del perfil proteómico y las actividades funcionales del veneno de tres especímenes de *Bothriechis schlegelii*. Los individuos fueron colectados en los municipios del Darién, Yotoco y Caicedonia en el departamento del Valle, siendo dos de ellos hembras y el restante un macho. Para el perfil proteómico realizaron pruebas de RP-HPLC y SDS-PAGE que permitieron observar que si existe una variación en las PLA2 encontrándose en un porcentaje de entre 25% y 35% y en menor proporción en el espécimen macho. Para las actividades funcionales se realizaron pruebas de letalidad, coagulación, desfibrinógeno, hemorragia y hemolisis indirecta; arrojando como resultados que ninguno de los tres individuos presenta acción hemorrágica ni desfibrinante, para la actividad letal se encontró que para el caso de las hembras tienen una DL₅₀ de 13.35 µg/g de ratón y 26.7 µg /g de ratón por el contrario el macho tiene una DL₅₀ de 3.9 µg/g de ratón siendo este último el más letal de los tres individuos, para la actividad coagulante las dos hembras presentan DMC parecidas reportadas en 63.69 µg y 67.54 ug y el macho presenta una DMC muchísimo mayor reportada en 275.90 µg, para el caso de la hemolisis indirecta las hembras presentan dosis reportadas en 2.67 ± 0.3 µg y 8.1 ± 0.2 µg y el macho esta reportada en 25.6 ± 0.2 µg. Este estudio presenta que los perfiles proteómicos nos muestran proteínas de bajo peso mayoritariamente mostrando variación en las actividades hemorrágicas y hemolíticas y a diferencia de otros estudios con esta especie no presento efectos hemorrágicos ni desfibrinantes.

OBJETIVOS

Objetivo principal

- Establecer las actividades toxinológicas del veneno de una población de *Bothriechis schlegelii* (Berthold, 1846) con distribución en el Valle alto del río Cauca.

Objetivos específicos

- Definir la DL₅₀ del veneno de *Bothriechis schlegelii* para una población con distribución en el Valle alto del río Cauca.
- Precisar la actividad hemorrágica, edematizante y coagulante del veneno de *Bothriechis schlegelii* para una población con distribución en el Valle alto del río Cauca.
- Determinar la actividad miotóxica del veneno de *Bothriechis schlegelii* para una población con distribución en el Valle alto del río Cauca.

MARCO TEÓRICO

***Bothriechis schlegelii* (Berthold, 1846)**

La serpientes *B. schlegelii* presenta una serie de características particulares que permiten su identificación como lo son las escamas superciliares alargadas (Figura 1), por lo que se le conoce por su nombre común “víbora de pestañas”, a su vez la variación en morfo tipos de su coloración, el color dorsal puede variar entre amarillo, naranja, verde oliva, café, rosado, plateado, gris oscuro o negro carbón, con variación en la intensidad igual que en sus diseños y pigmentación secundaria

(Figura 2). Con cabeza grande y esta diferenciada del cuello, presenta escamas quilladas, ojos grandes con pupilas elípticas y cabeza puntiaguda. Los especímenes de esta serpiente varían en tamaño, los cuales van de pequeños a moderados, las hembras adultas son de mayor longitud total y más robustas que los machos adultos, la cola es prensil y tiene una longitud equivalente de 13- 19% de la longitud total (Rivera-Correa, 2017).



Figura 1. Especímen de *Bothriechis schlegelii*. Por: J.C. Viveros E, 2021. Del Centro de Investigaciones Biomédicas- CIBUC-BIOTERIO-UNICAUCA. Popayán, Cauca. Colombia.



Figura 2. A. Especímen de *Bothriechis schlegelii* con morfo tipo de coloración críptica. **B.** Especímen de *Bothriechis schlegelii* con morfo tipo de coloración en contrastante con el ambiente. Por: J.C. Viveros E, 2021. Del Centro de

Investigaciones Biomédicas- CIBUC-BIOTERIO-UNICAUCA. Popayán, Cauca. Colombia.

Distribución geográfica de *Bothriechis schlegelii*

La especie *Bothriechis schlegelii* es la única dentro del género *Bothriechis* que habita en Suramérica, se encuentra distribuida desde el sur de México hasta Perú. En Colombia, su distribución va desde el nivel del mar hasta los 2.640 msnm, y se encuentra en 3 grandes zonas geográficas; Región Caribe, Litoral del Pacífico y Región Andina (incluyendo las 3 cordilleras) (Figura 3) (Rivera-Correa, 2017).

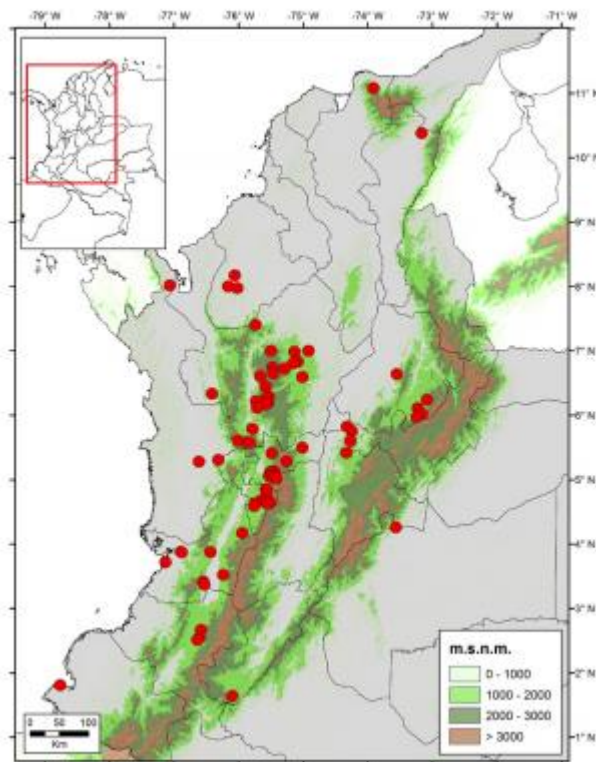


Figura 3. Puntos rojos determinan la distribución geográfica de la *Bothriechis schlegelii*. Por. Rivera-Correa, M, 2017. Sacado de Catalogo de Anfibios y Reptiles de Colombia, Volumen 3.

Proteómica del veneno de *B. schlegelii*

El veneno de las serpientes pertenecientes al género *Bothriechis* está compuesto por diferentes proteínas que varían dentro de la especie. Algunas de las proteínas que podemos encontrar en estos venenos son las fosfolipasas A₂ (PLA₂), Metaloproteinasas de veneno de serpientes (SVMP), Proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP), Proteína potenciadora de la bradiquinina (BPP), Proteínas tipo lectina (CTL). Las diferencias en la composición de los venenos, causan efectos diferentes como hemorragia, edema, mionecrosis (Pla et al., 2017). Al observarse una variación dentro de los venenos se encuentra que el veneno de *B. schlegelii* para individuos de Costa Rica; en estadio temprano (neonato) presenta en gran proporción SVSP las cuales están relacionadas con el efecto coagulante del veneno, y de PLA₂ que están relacionadas con actividad miotóxica (Pla et al., 2017; Lomonte et al., 2008). En estado adulto el veneno de la *B. schlegelii* es considerado un veneno miotóxico y citotóxico, debido a su gran cantidad de componentes de PLA₂ que actuando en conjunto con otras proteínas generan los efectos de mionecrosis, a su vez las SVMP las cuales están relacionadas con la hemorragia, existe presencia de serinproteasas en menor cantidad, por último encontramos otras proteínas en menor proporción que contribuyen a la acción de otras proteínas (Lomonte et al., 2008).

Actividades Biológicas

A nivel mundial se han hecho estudios de caracterización de las actividades tóxicas de los venenos de diferentes regiones (Roodt et al., 2005). La caracterización toxicológica básica de un veneno se debe de tener en cuenta a partir de los efectos tóxicos que son provocados por el veneno de serpientes. Dentro de las actividades

más conocidas podemos encontrar la actividad letal, hemorrágica, la actividad coagulante, la actividad miotóxica, la actividad miotóxica y la actividad edematizante (Gutierrez et al., 2015).

Actividad letal (DL₅₀)

Frecuentemente la actividad letal, es el efecto toxicológico más estudiado al momento de caracterizar un veneno, para ello se estima la Dosis Letal 50 (DL₅₀), que es el parámetro utilizado para medir la toxicidad de una sustancia. La DL₅₀, se refiere a la dosis que genera la muerte del 50% de la población de los animales tratados (Gutierrez et al., 2015). Para las serpientes de la familia Elapidae y algunas especies de la familia Viperidae, lo que genera la letalidad son las neurotoxinas que actúan sobre las uniones neuro-musculares, ya sea a nivel presináptico o postsináptico. Adicionalmente en algunas especies de la familia Viperidae, la letalidad es generada por la acción y la concentración de diferentes componentes del veneno tales como: las metaloproteinasas de venenos de serpientes, las fosfolipasas A₂, las serina proteasas, entre otros, los cuales producen alteraciones hemodinámicas y coagulopatías que pueden llevar a la muerte (Gutierrez et al., 2015).

Actividad Coagulante

Para el estudio de los componentes presentes en el veneno de las serpientes que afectan el sistema hemolítico se toman en cuenta los conocimientos de las características químicas y efectos biológicos de los venenos, así como también otra serie de propiedades bioquímicas, farmacológicas, inmunológicas y fisiológicas; dentro de estas cualidades encontramos la coagulación sanguínea, la cual es el

resultado de un largo proceso que desemboca en la transformación del fibrinógeno a fibrina mediante la acción de la trombina (Rodríguez et al., 2010)

Gran cantidad de venenos de la familia Viperidae contiene enzimas que generan efectos coagulantes cuando se incuban con plasma, estas enzimas cumplen un papel importante dentro de la fisiopatología de los envenenamientos, debido a que generan desfibrinogénación (White, 2005; Gutierrez et al., 2015).

Existen componentes que están relacionados con la actividad coagulante como lo pueden ser: las serinas proteasas que catalizan el fibrinógeno a fibrina (enzimas tipo trombina) que se encargan de activar la protrombina, metaloproteinasas dependientes de Zn^{2+} que de igual forma activan la protrombina, metaloproteinasas que se encargan de activar el factor X en la cascada de coagulación, y por último las serin proteasas que activan la cascada de coagulación en el factor V (Markland, 1998; Sartim et al., 2017).

Para determinar la actividad coagulante de un veneno se realiza una prueba donde se encuentra la Dosis Mínima Coagulante (DMC), la cual es la cantidad mínima de veneno que genera la coagulación del plasma en un lapso de tiempo de 60 segundos (Gutierrez et al., 2015).

Actividad hemorrágica

Uno de los efectos producidos por el veneno de las serpientes pertenecientes a la familia Viperidae es la hemorragia, la cual puede ser sistémica o local (Gutierrez et al., 2015). Este efecto se debe principalmente a la acción de las metaloproteinasas dependientes de Zn^{2+} , las cuales son capaces de hidrolizar componentes contenidos en la membrana basal que se encuentra en la pared de los vasos capilares, principalmente el colágeno tipo IV, el nidogén y la laminina. Por consecuente la hidrolisis de estas proteínas, especialmente el colágeno IV, crea un debilitamiento en la estabilidad mecánica de los capilares, a su vez ocurre que las

fuerzas biofísicas que se encuentran operando normalmente dentro de la circulación, causan que la pared debilitada del vaso se dilaten hasta que se rompe y crea una extravasación de la sangre (Fox & Serrano, 2005; Escalante et al., 2011; Gutiérrez et al., 2016).

Actividad Miotóxica

Muchos de los venenos de serpientes contienen toxinas que son capaces de generar necrosis en las fibras de los músculos, lo cual sirve para digerir mejor a la presa y causar un daño considerable en los músculos cuando ocurre un accidente ofídico (Gutierrez & Ownby, 2003). Algunas de estas son conocidas como miotoxinas de venenos de serpientes donde se encuentran: las fosfolipasas A₂ de bajo peso molecular y las citotoxinas que se encuentran en los venenos de algunas cobras. Estas citotoxinas, son capaces de desorganizar, mediante mecanismos no enzimáticos, la estructura de la membrana plasmática y por ende producir mionecrosis (Gutierrez et al., 1984; Fernandes et al., 2014). También se ha descrito que las metaloproteinasas inducen mionecrosis, aunque no directamente sobre las fibras musculares, sino como consecuencia de una isquemia producida por las acción de estas toxinas sobre la microvasculatura (Gutierrez et al., 2015). Las SVMP, pueden generar 2 tipos de mionecrosis: necrosis local, en el sitio de la mordedura de la serpiente, y mionecrosis sistémica, que tiene la capacidad de distribuirse a nivel sistémico y afectar las fibras musculares en sitios lejanos (Gutierrez & Ownby, 2003).

Actividad edematizante

Los venenos de serpientes generan un pronunciado edema en el sitio de la mordedura, este se genera debido a que el fluido del compartimiento vascular se

extravasa y se acumula en el compartimiento intersticial, este efecto puede llevar a dos consecuencias fisiopatológicas importantes; por un lado está la disminución de la volemia que contribuye a las alteraciones hemodinámicas que pueden conllevar a un choque cardiovascular, y por otro lado, se observa la acumulación de fluido en ciertos lugares que conlleva a un aumento de la presión intercompartmental (Gutierrez et al., 2015).

La respuesta inflamatoria se genera debido a la activación de sensores y mediadores químicos, que generan vasodilatación y aumentan la permeabilidad vascular (Mamede et al., 2020). Varios componentes del veneno son los encargados de este efecto, dentro de los más predominantes encontramos a las metaloproteinasas y las fosfolipasas A₂, estas moléculas actúan directamente sobre la microvasculatura, así como también sobre células residentes o células que conforman el infiltrado inflamatorio. El conjunto de acción de muchas sustancias provoca el edema, junto con otras alteraciones causadas por el envenenamiento ofídico, como es el dolor (Teixeira et al., 2003).

La actividad edematizante se expresa mediante la Dosis Mínima Edematizante (DME) la cual corresponde a la dosis de veneno que genera un crecimiento del 30% en el grosor de la pata pasada una hora después de inyectarse el veneno cuando es comparado con la pata inyectada con PBS (Buffer fosfato salino) (Rojas et al., 2005).

Causas y consecuencias de la variación de los venenos de serpientes

Ya que el veneno es un rasgo funcional ecológicamente significativo para las serpientes venenosas, su actividad y su composición coevoluciona dependiendo de la fisiología de las presas y en algunos casos con sus depredadores, aunque es poco probable que los humanos hayan intervenido en la evolución de su veneno, debido a que las mordeduras de las serpientes en humanos son exclusivamente en defensa (Casewell et al., 2020). El alto grado de variabilidad que se encuentra en

los componentes del veneno ha sido un factor importante para la integración de nichos ecológicos específicos por parte de las serpientes (Freitas-de-Sousa et al., 2020).

La variación del veneno existe en diferentes niveles filogenéticos y es una consecuencia de la historia evolutiva de linajes divergentes, así como también del despliegue ecológico de diferentes toxinas específicas (Amazonas et al., 2018). Un ejemplo de ello es la variación que existe entre venenos de elapidos y viperidos, algunas familias de toxinas aparecen en ciertas cantidades, pero en algunos casos se han convertido en componentes principales de un veneno en un linaje, que no está en el otro, como entre géneros de familias y especies dentro de esos géneros, por este motivo diferentes fabricantes de antivenenos han desarrollado antídotos para regiones específicas (Casewell et al., 2020). Estas variaciones en los componentes de los venenos han hecho que se note una diferencia en la eficacia que pueden tener los venenos en diferentes presas, muchas serpientes tienden a tener presas que son mamíferos, por lo cual el veneno es efectivo hacia ellos, por otro lado, hay serpientes que se alimentan de arácnidos, insectos, aves y lagartijas lo que provoca que el veneno sea más eficaz hacia este tipo de presas (Davies & Arbuckle, 2019).

Recientemente se ha empezado a evidenciar que existe una variación dentro de una misma especie, es decir, dentro de poblaciones, clases, edad y tamaño (Jackson et al., 2019). El veneno se ha estudiado a nivel molecular lo que determina que existe una variación a nivel regional que puede estar relacionado con diferencias ecológicas, la evolución neutral y puede trabajar en conjunto con la selección colectiva; esto genera otra predicción basada en los primeros principios evolutivos: para que un rasgo evolucione de manera rápida, se debe presentar una considerable diversidad hereditaria dentro de una misma población (Casewell et al., 2020).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño Experimental

Tipo de estudio experimental cuantitativo.

Serpientes

Se utilizaron 6 individuos colectados y donados de las cercanías de la ciudad de Popayán, los cuales son mantenidos en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC).

Obtención del veneno

Para la extracción del veneno, los animales fueron inmovilizados de forma manual procurando la introducción de los colmillos en tubos plásticos de 1.5 ml cubiertos con una película plástica transparente (parafilm). Posteriormente, se realizó la estimulación de las glándulas que contiene el veneno. Cada pool de veneno fue congelado con nitrógeno líquido, liofilizado y almacenado a -20°C. Seguidamente, al iniciar los experimentos los pools de veneno fueron resuspendidos en agua destilada y mezclados en un solo pool el cual se procedió a congelar con nitrógeno líquido, liofilizar y almacenar a -20°C hasta el momento de su uso.

Biomodelo

Se utilizaron ratones albinos suizos machos y hembras de la cepa ICR de la especie *Mus musculus* de entre 20-25 g comprados Laboratorio Intermedio de Investigación Preclínica y Bioterio de Murinos de la Universidad del Valle, los cuales fueron mantenidos y reproducidos en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC), en cajas de policarbonato, con agua y alimento ad libitum y ciclo de luz/oscuridad de 12 horas.

Actividades Biológicas

Determinación de la actividad letal dosis letal₅₀

Con el fin de determinar la letalidad del veneno fueron preparadas, con base a dosis de referencia, diferentes concentraciones del veneno de la serpiente *B. schlegelii*

(60, 80, 120, 180, 240 y 300 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Seguidamente, se organizaron grupos de 4 ratones a los cuales se les administró por vía intraperitoneal 0,2 mL de solución de las dosis establecidas. Transcurridas 24 horas, se tomó el registro del número de ratones muertos en cada dosis de veneno administrado y se observaron los síntomas producidos por el envenenamiento, se determinó la Dosis Letal 50% con sus respectivos intervalos de confianza del 95%. Los animales que sobrevivieron fueron eutanasiados con sobredosis de Ketamina (50mg/ml) y Xilacina (20mg/ml). (Instituto Clodomiro Picado, 2007).

Determinación de la actividad coagulante.

Para esta actividad fueron agregados 0.2 mL de plasma o solución de fibrinógeno de humano, a tubos de ensayo, los cuales se llevaron a incubación durante 3 minutos en baño de agua a 37 °C. Seguidamente, a cada tubo se le adicionó 0.1 mL de diferentes concentraciones de veneno disueltas en PBS (25, 50, 75, 100, 125 y 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), por triplicado para cada concentración dosis y fue utilizado como control negativo 0.1 mL de PBS, de igual forma, como control positivo fue utilizado 0.1 mL de solución de trombina, ambas agregadas a las soluciones de plasma incubadas. Para la determinación de la actividad coagulante se tomó el tiempo de coagulación mediante un cronómetro y se realizó una curva dosis-respuesta, con el fin de cuantificar la concentración de veneno que induce coagulación del plasma en 60 segundos (Instituto Clodomiro Picado, 2007).

Determinación de la actividad hemorrágica.

La determinación de la actividad hemorrágica se llevó a cabo mediante la metodología propuesta por Jenkins et al., 2017, donde grupos de 4 ratones adultos machos, fueron tratados con diferentes concentraciones del veneno de *B. schlegelii* (60, 80, 100 y 120 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), los ratones fueron inmovilizados por la región dorsal, y seguidamente se inyectaron 0,1 mL de solución de veneno por vía intradérmica, transcurridas 2 horas los ratones fueron eutanasiados por medio de sobredosis de Ketamina (50mg/mL) y Xilacina (20mg/mL). Seguidamente, se procedió a realizar un corte transversal en el dorso superior con el fin de exponer la piel y observar el

efecto hemorrágico producido por el veneno. Al terminar el procedimiento, todos los ratones fueron colocados sobre una hoja blanca de papel debidamente milimetrada junto con la tabla Pantone (Figura 4). Una vez terminado este procedimiento, se tomaron dos fotografías en una caja de luz de cada conjunto de ratones. Después de obtener todas las fotos, se pasaron a formato PDF y fueron ingresadas al programa Inkscape 0.91 para poder obtener los valores de R, G y B del Pantone, de esta manera se obtuvo el valor de la unidad hemorrágica teniendo en cuenta el área y la profundidad de la lesión, debido a la hemoglobina que es producida por la extravasación de la ruptura de la membrana basal y los vasos capilares (Jenkins et al., 2017).

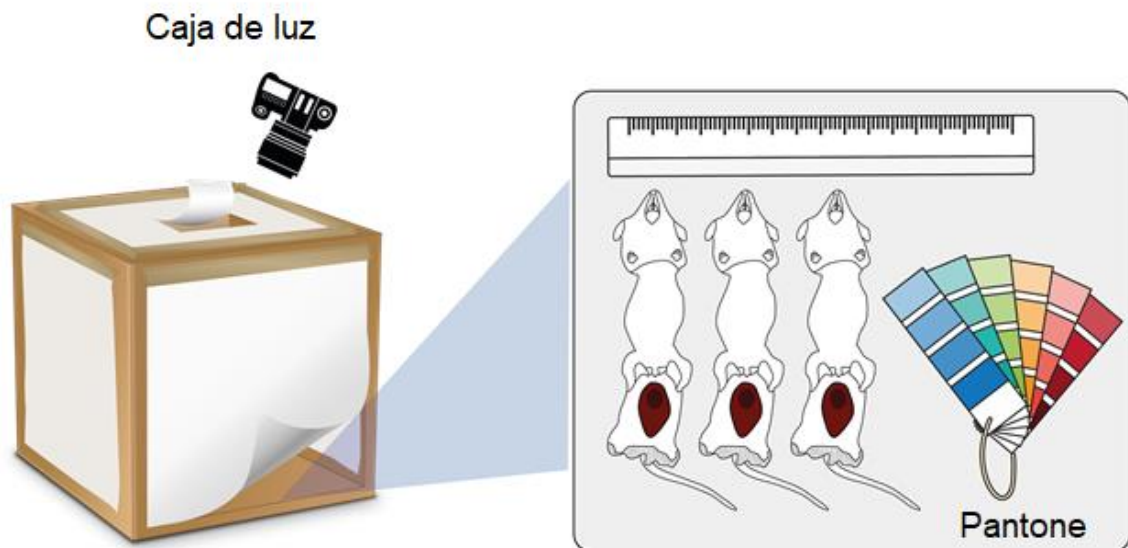


Figura 4. En la parte izquierda, la caja de luz. A la derecha el montaje de los ratones, teniendo en cuenta la ubicación tanto de la regla, los ratones y el pantone. Tomada de Jenkins et al., 2017.

Determinación de la actividad miotóxica.

Se prepararon soluciones con diferentes concentraciones del veneno (5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), utilizando PBS como diluyente, para este procedimiento se inyectaron

0.1 ml de cada solución, por vía intramuscular en el gastrocnemio, a grupos de 4 ratones, y fue inyectado 0.1 ml de PBS al grupo control utilizando la misma vía. Tres horas después de la inyección, los animales fueron anestesiados con Ketamina (50mg/mL) y Xilacina (20mg/mL) mediante inyección intraperitoneal, y se procedió a obtener una muestra de 25 μ L aproximadamente de sangre mediante punción cardíaca, utilizando un catéter de 21 mm, colectados en microtainers de tapa amarilla con gel separador polímero tixotrópico inerte y de esta forma determinar la actividad de creatinina quinasa del plasma (Instituto Clodomiro Picado, 2007). mediante espectrofotometría (LinaLab).

Determinación de la actividad edematizante.

Se prepararon diferentes concentraciones del veneno con base a concentraciones de referencia (Prezotto-Neto et al., 2016) (0.625, 1,25, 2,5 y 5 μ g/ μ L), que fueron diluidas utilizando PBS. Seguidamente fueron inyectados 50 μ L de cada solución, por vía subcutánea en la almohadilla plantar de la pata derecha a grupos de 4 ratones, la pata izquierda fue inyectada con 50 μ L de PBS en las mismas condiciones. El incremento en el grosor de la pata fue medido con un calibrador en la misma parte anatómica, donde fueron inyectadas las dosis una hora después. Posteriormente, para calcular la magnitud del edema este fue expresado en porcentaje de edema por aumento del grosor de la pata, teniendo en cuenta el siguiente calculo: $(\text{Grosor de la pata derecha} / \text{grosor de la pata izquierda}) \times 100] - 100$. Finalmente, se realizó una curva dosis-respuesta, y se determinó la dosis de veneno que induce un edema del 30%, que corresponde a la dosis edematizante mínima (Instituto Clodomiro Picado, 2007).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en cada fase experimental fueron corridos empleando el software R versión 4.2.3. Para el análisis de la dosis letal DL_{50} , este fue determinada utilizando una prueba de regresión de Probit. Las dosis mínimas coagulante, hemorrágica y edematizante, se calcularon mediante análisis de regresión lineal y

logarítmica teniendo como criterio el coeficiente de determinación R y R² más próximo a 1 o -1.

Adicionalmente, se realizó un análisis de comparación múltiple en donde se tuvo en cuenta la prueba de normalidad y homogeneidad de varianza ($p > 0.05$), con lo cual se procedió a realizar diferentes análisis de comparación de grupos. Así, para el análisis de miotoxicidad se utilizó una prueba de ANOVA seguido de un análisis de comparación múltiple de Tukey y para los análisis de edema se utilizó la prueba de Kruskal- Wallis seguido de un análisis de comparación de grupo de Wilcoxon con ajuste a Bonferroni. Los datos son expresados por la media y la desviación estándar.

RESULTADOS

ACTIVIDAD LETAL

La actividad letal del veneno de la especie *B. schlegelii* fue medida mediante la DL₅₀ teniendo en cuenta los datos de supervivencia de los ratones inyectados con el veneno (Tabla 1).

Tabla 1. Cantidad de ratones vivos y muertos para cada dosis de veneno transcurridas 48 horas después de la inoculación del veneno.

CONCENTRACIÓN DE VENENO (µg/µL)	RATONES VIVOS	RATONES MUERTOS
60	4	0
80	4	0
120	4	0
180	4	0
240	2	2
300	2	2

Para establecer este valor se realizó una prueba de regresión de Probit y se reportaron en este trabajo una DL_{50} de 276,52 μg (Figura 6), para reportar la dosis en $\mu\text{g/g}$ se dividió por el peso de los ratones los cuales se encontraban en una media de 25 g y se reportó una dosis de 11,0608 $\mu\text{g/g}$. También, durante el tiempo de supervivencia de los animales, fueron observados diferentes signos de envenenamiento presentados desde la menor concentración hasta la mayor (Tabla 2) (Figura 5A-5B).

Tabla 2. Signos reportados para cada concentración de veneno y su tiempo de aparición.

CONCENTRACIÓN DE VENENO ($\mu\text{G}/\mu\text{L}$)	SIGNO	TIEMPO DE APARICIÓN
60	Piloerección, cambios comportamentales. 24 horas después de la inyección los signos habían desaparecido. No hubo muertes	2 horas
80	Piloerección, Temblores en el cuerpo y la boca, Distensión abdominal, cambios comportamentales. 24 horas después de la inyección los signos habían desaparecido. No hubo muertes	1 hora

120	Piloerección, Temblores en el cuerpo y la boca, Distensión abdominal, cambios comportamentales. 24 horas después de la inyección los signos habían desaparecido. No hubo muertes	Media hora
180	Piloerección, Temblores en el cuerpo y la boca, Distensión abdominal, cambios comportamentales. 24 horas después de la inyección los signos habían desaparecido. No hubo muertes	Media hora
240	Piloerección, Temblores en el cuerpo y la boca, Distensión abdominal, cambios comportamentales. 24 horas después de la inyección hubo dos muertes	Inmediatamente
300	Piloerección, Temblores en el cuerpo y la boca, Distensión abdominal, cambios	Inmediatamente

comportamentales. 24
horas después de la
inyección hubo dos
muertes

Al momento de la laparotomía se observa hemorragia en todos los grupos estudiados transcurridas 48 horas; para el caso de los ratones que murieron en las dosis de 240 y 300 μg a las 24 horas se observó una hemorragia más marcada en la parte del abdomen y la caja torácica con presencia de formación coágulos de sangre.



Figura 5. A. Distensión abdominal generada por el veneno de *B. schlegelii*. **B.** Cambio en el comportamiento del ratón. Por: J.C. Viveros E, 2022. Del Centro de Investigaciones Biomédicas- CIBUC-BIOTERIO-UNICAUCA. Popayán, Cauca. Colombia.

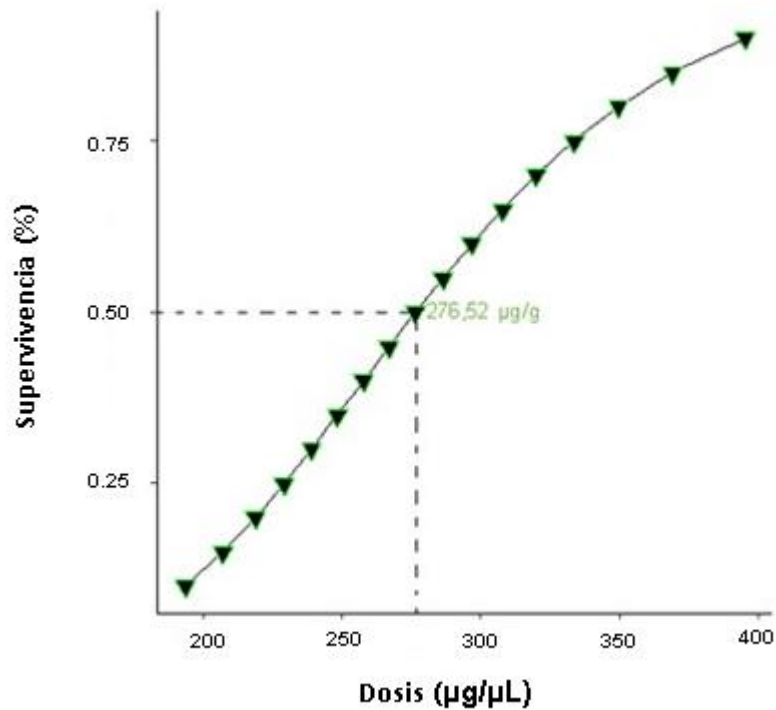


Figura 6. Dosis letal 50 del veneno de *B. schlegelii* en ratones. Se usaron 6 dosis de veneno (60, 80, 120, 180, 240 y 300 µg/µL). El gráfico representa la probabilidad de muerte para cada dosis.

ACTIVIDAD COAGULANTE

Para la evaluación de la actividad coagulante del veneno, se observó una tendencia en la que, a medida que iba aumentando la dosis del veneno el tiempo que se demoraba en coagular el plasma era menor, así en la dosis de 25µg (124.67 ± 11.23 s) y 50µg (63.33 ± 15.50 s), se observó una diferencia significativa en comparación con las dosis de 75µg (24.33 ± 2.52 s), 100µg (27 ± 1 s), 125µg (24.33 ± 1.52 s) y 150µg (20.67 ± 3.05 s), a su vez estas concentraciones no presentaron diferencias significativas con el grupo de control + (18.33 ± 2.08 s), lo que sugiere un efecto coagulante por parte del veneno de la especie *B. schlegelii* (Figura 7).

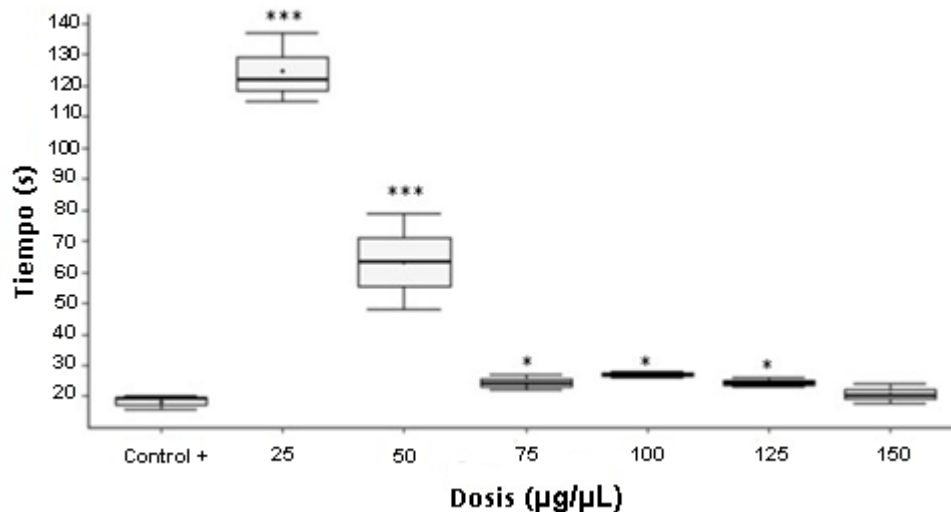


Figura 7. Efecto coagulante del veneno de la especie *B. schlegelii*. Los valores representan la media \pm SD del tiempo en segundos transcurrido antes de la coagulación de la muestra, en diferentes dosis. El análisis estadístico realizado fue un ANOVA de una vía, seguido por la prueba de Tukey de comparación de grupos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Para determinar la dosis mínima coagulante (DMC) se procedió a hacer un análisis de regresión logarítmica teniendo en cuenta los promedios de los tiempos obtenidos en la prueba (Figura 8), dando como resultado una DMC valor de 59,82 µg.

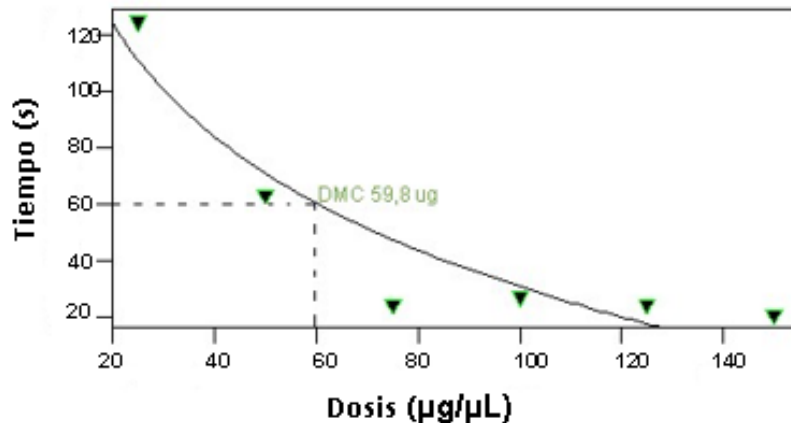


Figura 8. Dosis mínima coagulante del veneno de *B. schlegelii* en ratones. Se usaron 6 dosis de veneno (25, 50, 75, 100, 125 y 150 µg/µL). El gráfico representa el promedio de la coagulación de las dosis en el plasma.

ACTIVIDAD EDEMATIZANTE

Para la actividad de formación de edema, se notó un claro aumento en el tamaño de la almohadilla plantar. En los primeros minutos evaluados (30 y 60min) se observó la formación de edema en todas las concentraciones utilizadas, pero fue más notorio en las concentraciones más altas. En las concentraciones de 0.625µg/µL (0.099 ± 0.016 %), 1.25µg/µL (0.10 ± 0.016 %), 2.5µg/µL (0.114 ± 0.02 %) y 5µg/µL (0.117 ± 0.02 %), se observó una diferencia significativa en el porcentaje de edema cuando fueron comparadas con la solución de PBS (0.08 ± 0.008 %) (Figura 9). Para los tiempos de 120min (0.097 ± 0.024 cm), 180min (0.10 ± 0.023 cm) y 240min (0.098 ± 0.020 cm) se observó un aumento considerable en el grosor de la almohadilla plantar, siendo los valores obtenidos de edema en estas horas los mayores en toda la prueba, para los tiempos de 300min (0.089 ± 0.014 cm) y 360min (0.084 ± 0.012 cm) el edema empezó a disminuir y a nivelarse con los valores del control negativo y a los 420min el edema había desaparecido y se encontraba al nivel de los valores del control negativo, por lo anterior se decidió parar la prueba

en 8 horas y no realizarlo hasta las 12 horas (Figura 10). Se observa una propensión en los datos donde desde el principio las concentraciones (0.625, 1.25, 2.5 y 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) crean un edema y conforme el tiempo (3 h, 4h, 5h) avanza el edema va disminuyendo (Figura 11).

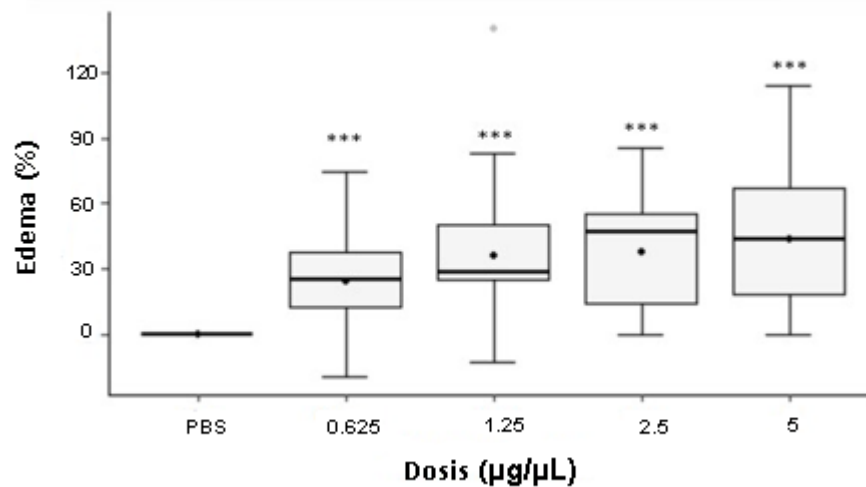


Figura 9. Efecto edematizante generado por el veneno de la especie *B. schlegelii*. Los valores representan la media \pm SD del % de edema en relación con las dosis evaluadas. El análisis estadístico realizado fue una prueba de Kruskal-Wallis, seguido por la prueba de Wilcoxon con ajuste a Bonferroni de comparación de grupos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

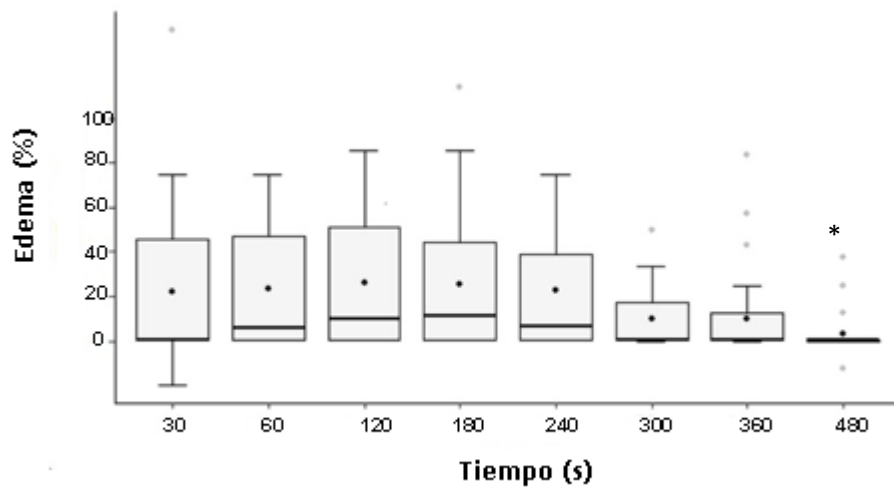


Figura 10. Efecto edematizante generado por el veneno de la especie *B. schlegelii*. Los valores representan la media \pm SD del % de edema con relación al tiempo. El análisis estadístico realizado fue una prueba de Kruskal-Wallis, seguido por la prueba de Wilcoxon con ajuste a Bonferroni de comparación de grupos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

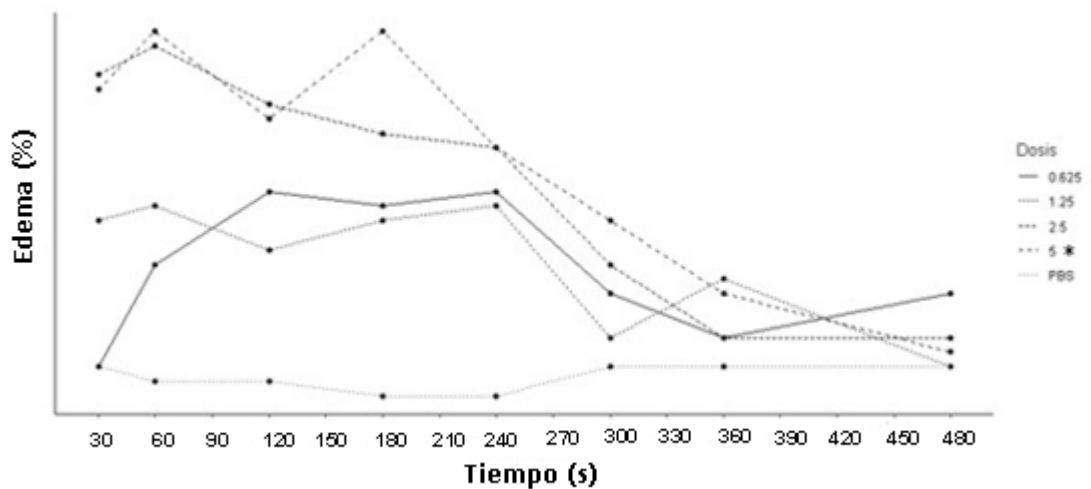


Figura 11. Actividad Edematizante del veneno de *Bothriechis schlegelii* observada en la formación del Edema en el Tiempo y teniendo en cuenta las Dosis.

Para determinar la dosis mínima edematizante se procedió a hacer un análisis de regresión logarítmica teniendo en cuenta los promedios de edema de las dosis en el tiempo de 2 horas (Figura 12) dando como resultado un valor de 0,81 μg .

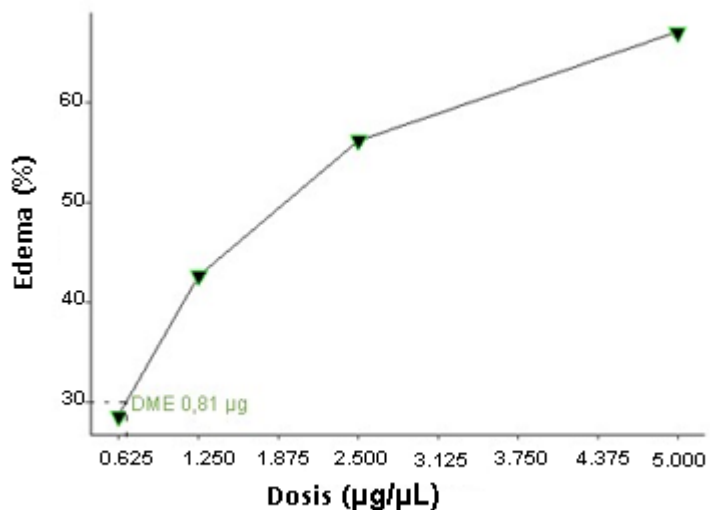


Figura 12. Dosis mínima edematizante del veneno de *B. schlegelii* en ratones. Se usaron 4 dosis de veneno (0.625, 1.25, 2.5 y 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). El gráfico representa el promedio de la formación del edema.

ACTIVIDAD MIOTÓXICA

Los valores de CK obtenidos dieron como resultado una variación muy notoria entre dosis, pero dentro de una misma dosis no se encontraron variaciones en los datos (Tabla 2). Se obtuvieron valores de un grupo control PBS (433.75 ± 18.28 U/L) y se compararon con los valores obtenidos para cada concentración; 5 μg (1051.25 ± 51.98 U/L), 10 μg (370.5 ± 23.74 U/L), 20 μg (871.75 ± 11.92 U/L) y 40 μg (677.75 ± 15.28 U/L), se encontraron diferencias significativas en los valores de PBS y las demás concentraciones (Figura 14).

Tabla 3. Valores de CK (U/L) en la sangre para cada uno de los grupos de ratones.

	PBS	5 µg	10 µg	20 µg	40 µg
1	447 U/L	1127 U/L	396 U/L	887 U/L	691 U/L
2	450 U/L	1040 U/L	340 U/L	860 U/L	660 U/L
3	427 U/L	1010 U/L	366 U/L	875 U/L	670 U/L
4	411 U/L	1028 U/L	380 U/L	865 U/L	690 U/L

Al encontrarse estos valores así de dispersos y muy variables entre grupos y sin un comportamiento de los datos claros no se pudo hallar la dosis mínima miotóxica. A su vez, al momento de realizar la disección se observó que el veneno generó una mionecrosis en el sitio donde se realizó la inyección y conforme la concentración de veneno aumentaba, el daño también lo hacía (Figura 13).



Figura 13. Aumento en el daño muscular dependiendo de las dosis del veneno (PBS, 5, 10, 20 y 40 µg), visto de izquierda a derecha. Por: J.C. Viveros E, 2022. Del Centro de Investigaciones Biomédicas- CIBUC-BIOTERIO-UNICAUCA. Popayán, Cauca. Colombia.

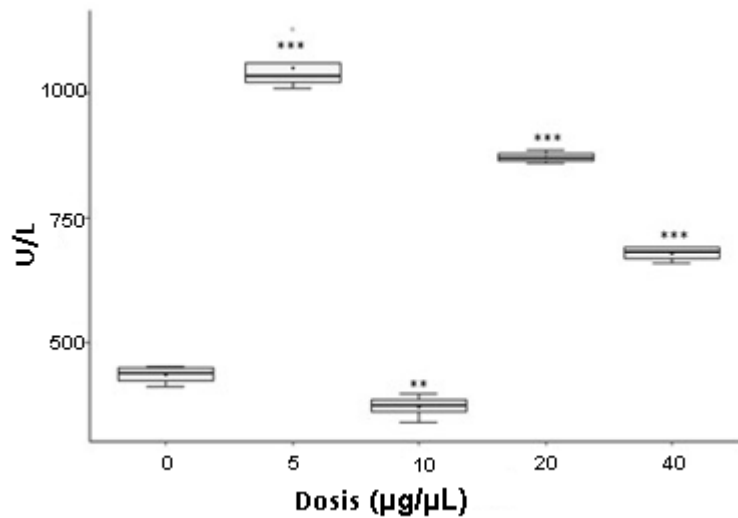


Figura 14. Efecto miotóxico del veneno de la especie *B. schlegelii*. Los valores representan la media \pm SD de los valores de creatinina kinasa U/L en la sangre de ratones. Se usaron 4 dosis de veneno (5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). El análisis estadístico realizado fue un ANOVA de una vía, seguido por la prueba de Tukey de comparación de grupos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** < 0.001 .

ACTIVIDAD HEMORRÁGICA

Para la evaluación de la actividad hemorrágica, en este trabajo se empleó una metodología que tuvo en cuenta el área de la hemorragia y la intensidad de la coloración, con el fin de hallar la dosis mínima hemorrágica (DMH) determinada por las unidades hemorrágicas; después de transcurrido un tiempo después de la inyección, se observó que el abdomen de los ratones presentaba una lesión en el tejido, lo cual mostraba presencia de hemorragia. La DMH se calculó mediante una línea de tendencia, en este caso lineal, de los promedios de las unidades hemorrágicas $\text{UH}=50$, y se reporta en $11.90 \mu\text{g}/\text{g}$ (Figura 15).

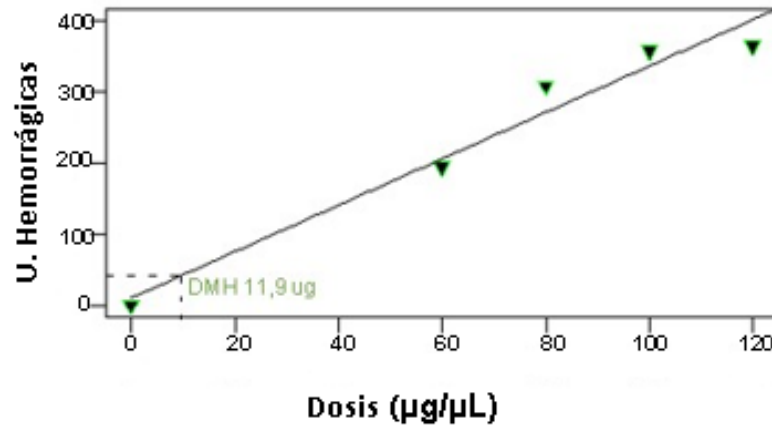


Figura 15. Dosis mínima hemorrágica del veneno de *B. schlegelii* en ratones. Se usaron 4 dosis de veneno (60, 80, 100 y 120 µg/µL). El gráfico representa el promedio de las unidades hemorrágicas, con relación a la concentración.

DISCUSIÓN

En este trabajo se reportan los diferentes efectos de las actividades toxinológicas; como lo son la actividad hemorrágica, miotóxica, edematizante, coagulante y letal, producida por el veneno de una población de *B. schlegelii* con distribución en el departamento del Cauca.

La letalidad del veneno es la acción en conjunto de los componentes que conforman el veneno (Instituto Clodomiro Picado, 2007). La DL₅₀ reportada para este estudio es de 11,0608 µg/g, siendo variable en comparación con otros estudios realizados con la especie *Bothriechis schlegelii*, pero de diferente distribución. Gutiérrez & Chaves, 1980, presentan en su estudio una dosis de 34 µg/g siendo altamente letal y siendo muy diferente a la reportada en este trabajo. A su vez la dosis letal (7,5 µg/g) presentada por Kuch et al., 1996 demuestra una DL₅₀ menor a la hallada en este trabajo demostrando una letalidad mucho mayor. Al realizar una comparación con estudios recientes como el de Prezotto-Neto et al., 2016 se observa una diferencia importante entre las poblaciones de Costa Rica (5,6 µg/g) y la del norte

de Colombia (9,24 µg/g), pero presentando efectos y dosis similares siendo poblaciones geográficamente diferentes. Por otro lado, Montealegre-Sánchez et al., 2021 reporta tres dosis (13,35 µg/g, 26,7 µg/g, 8,43 µg/g) de diferentes poblaciones de *B. schlegelii* y se observa una diferencia considerable entre las dosis reportadas. De esta forma, la letalidad del veneno muestra una relación con los daños necróticos y hemorrágicos, pero sin poder relacionar las demás actividades nombradas con la letalidad del veneno.

Otra actividad importante evaluada es la coagulante, la cual se estimó en plasma de humano citratado y se determinó una DMC de 59.82 ± 5.9 µg. Esta medida concuerda con las dosis reportadas ($63,69 \pm 0,02$, $67,54 \pm 0,09$, $275,90 \pm 0,06$) para tres individuos de esta especie, siendo esta dosis cercana a dos de las reportadas para *B. schlegelii* del departamento del Valle (Montealegre-Sánchez et al., 2021). Asimismo, estudios anteriores donde se tuvo en cuenta varias especies del género *Bothriechis*, sugiere que la DMC reportada en este trabajo, presenta un efecto coagulante menor que la población de *B. schlegelii* (13 µg/mL) de Costa Rica, pero un mayor efecto que la especie *B. nigroviridis* (79 ± 6 µg/mL) (Fernández et al., 2010; Lomonte et al., 2012). Los efectos coagulantes se pueden atribuir en un veneno a las PLA₂ y a las SVMP encargadas de activar un efecto en la cascada de coagulación y mostrar un efecto procoagulante, la posible acción de las PLA₂, presentando un efecto postsináptico en el músculo, encontrado en el proteoma de *B. nigroviridis* y *B. schlegelii* explica los efectos producidos por el veneno de *B. schlegelii* en el Departamento del Cauca encontrados en este trabajo (Montealegre-Sánchez et al., 2021; Rodríguez et al., 2010; Youngman et al., 2022).

Por otro lado, un efecto importante de las serpientes del género *Bothriechis* es su actividad edematizante, la cual constituye una de las principales manifestaciones locales. El efecto edematizante se puede atribuir a manifestaciones hemorrágicas ya reportadas (Lomonte et al., 2012; Montealegre-Sánchez et al., 2021), esto se debe a que como respuesta fisiológica de defensa ocurre un proceso inflamatorio, caracterizado por dolor, hinchazón, entre otros; los sensores químicos

desencadenan estos efectos y originan vasodilatación y aumentan la permeabilidad vascular, generando que se extravase la sangre al tejido generando el edema (Mamede et al., 2020). En este trabajo evaluamos la actividad de formación de edema en la pata del ratón a diferentes tiempos y concentración, observando que, en todas las concentraciones utilizadas se formó edema, llegando a una formación máxima de edema (0,15 cm) a las 4 horas a una concentración de 2,5 ug/ μ L, seguido de una disminución continua en el tiempo del proceso inflamatorio y desapareciendo a las 8 horas. Adicionalmente, fue calculada la DME tomando, el tiempo donde se presentará un edema del 30% (2 horas) teniendo en cuenta los valores de todas las concentraciones; la DME hallada fue de $0,81 \pm 0,63 \mu\text{g/g}$. No obstante, en otros estudios se evidencia el efecto edematizante que genera el veneno de diferentes poblaciones de Costa Rica y Colombia de *B. schlegelii* en dosis de 0.5, 1, 2, 4 y 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en ratones, donde se observa edema, pero conforme avanzaba el tiempo esta acción disminuye hasta desaparecer (Prezotto-Neto et al., 2016); a su vez, el estudio realizado con varios individuos de la especie *B. schlegelii* en el departamento del Valle del Cauca, presenta formación de edema media hora después de ocurrida la inyección de veneno y va disminuyendo conforme avanza el tiempo hasta desaparecer (Montealegre-Sánchez et al., 2021). Por otra parte, la DME encontrada en este trabajo, presenta una menor actividad al comparar esta dosis con otras dosis reportadas para poblaciones de esta especie reportada en el mismo género para la especie *B. nigroviridis* (8 μg) (Fernández et al., 2010)

Para la evaluación de miotoxicidad del veneno se tuvo en cuenta los valores de CK (creatina quinasa) plasmática (Mamede et al., 2020). En este estudio los valores de CK comparados entre grupos no presentaron un claro comportamiento dosis-respuesta de los datos, también es consistente con lo reportado por Lomonte et al., 2012, el cual reporta una clara inclinación de dispersión en los datos evaluados de la especie *B. supraciliaris* y *B. schlegelii*. Consecuentemente, estudios realizados con el género Bothrops, también han demostrado un efecto igual al reportado en este estudio, con la gran diferencia de haber utilizado solo una concentración y

evaluar los valores de CK en el tiempo, obteniendo como resultados un comportamiento de los datos parecido de aumento y disminución de los valores evaluados (Mora-obando et al., 2013). De manera general y de acuerdo a otros estudios la especie *B. schlegelii* en su proteoma presenta una alta cantidad de PLA₂ y un bajo porcentaje de SVMP; mostrando un alto efecto miotóxico y hemorrágico (Lomonte et al., 2012). Según Gutiérrez & Chaves, 1980 los individuos de *B. schlegelii* muestran un efecto altamente mionecrótico específicamente necrosis de tipo miolítico. Aunque las SVMP, PLA₂ o SVSP tienen un efecto mionecrótico, estas toxinas pueden afectar los valores de CK aumentándolos o alterándolos debido a la acción hemorrágica, que afecta los valores y no permite que se pueda hallar una DMM (Escalante et al., 2011; Mora-obando et al., 2013; Serrano & Maroun, 2005; Gutierrez & Ownby, 2003).

Los resultados dejan ver un claro efecto hemorrágico presentado en todas las dosis testeadas lo cual, es consistente con los reportes clínicos del accidente ofídico de la especie *B. schlegelii* (Lomonte et al., 2008). Su efecto puede estar asociado al daño en el tejido local y a posibles alteraciones hemodinámicas, que se relacionan al efecto de los compuestos proteicos presentes en el veneno de estas serpientes como lo son: las metaloproteinasas dependientes de zinc (SVMP) y las serinproteasas (SVSP), las cuales han sido reportadas en la proteómica de una población de *B. schlegelii* de Costa Rica (Escalante et al., 2011; Gutiérrez et al., 2016; Pla et al., 2017). De acuerdo con los resultados de este trabajo, se reporta una DMH de $11,9 \pm 2,7$ µg/g de veneno, la cual es mayor a la dosis (1.7 µg) que se reporta en un primer estudio por Gutiérrez & Chaves, 1980 realizado en Costa Rica. Otro estudio llevado a cabo por Kuch et al., 1996 demostró que el veneno de la especie *B. schlegelii* del Ecuador no indujo ningún efecto hemorrágico. Por otro lado, nuestro estudio demuestra que la población del departamento del Cauca posee una dosis hemorrágica mayor a la reportada para una población de Costa Rica (3,9 µg) y muy parecida a la dosis de la población de Colombia (14,2 µg), con distribución en el departamento de Antioquia (Prezotto-Neto et al., 2016). Un estudio

realizado en el Valle del Cauca por Montealegre-Sánchez et al., 2021 reporta que ninguno de los venenos de los individuos presentó un efecto hemorrágico. Se debe tener en cuenta que la DMH en estos trabajos se define como aquella dosis capaz de provocar un área de lesión de 10 mm, mientras que en esta investigación se empleó la técnica descrita por Jenkins et al., 2017, donde se evalúa tanto el área como la intensidad de la lesión, asociadas en una medida de intensidad de unidad hemorrágica (HaU), lo cual puede justificar, en parte, la diferencia encontrada con otros trabajos.

Por último, podemos atribuir las diferencias presentadas dentro de los individuos de la misma especie a variaciones interespecíficas entre poblaciones, clases, edad y tamaño de los individuos, que se da debido a que el veneno es un rasgo ecológico que evoluciona de manera dinámica, existen componentes ecológicos que afectan a las serpientes como lo son el clima, la geografía, así como también la alimentación y el sexo, interfieren con la composición del veneno y los efectos generados por la acción de componentes (Casewell et al., 2020; Jackson et al., 2019; Montealegre-Sánchez et al., 2021). Estas características son notorias al compararse con los estudios realizados en Costa Rica, Antioquia y Valle del Cauca donde se evidenciaron diferencias en los efectos del veneno de *B. schlegelii* siendo el veneno de la población del Cauca más hemorrágico, más coagulante y menos letal que las otras poblaciones. Esto indica que a pesar de que los venenos ejercen la misma actividad funcional, las toxinas responsables varían significativamente en su bioquímica.

CONCLUSIONES

- Se determinó la DL_{50} del veneno de *Bothriechis schlegelii* dando como resultado 11,0608 $\mu\text{g/g}$ siendo la mayor dosis reportada y la población con menor letalidad hallada para esta especie.
- Se hallaron la dosis hemorrágica, edematizante y coagulante dando como resultado $11,9 \pm 2,7 \mu\text{g}$, $0,81 \pm 0,63 \mu\text{g/g}$ y $58.92 \pm 5.9 \mu\text{g}$ respectivamente.

- Se obtuvieron los valores de CK en la sangre, pero debido a dispersión de los datos entre concentraciones, no se halló una DMM, se analizaron los datos y se observó la relación entre ellos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-rahman, M. A., Omran, M. A., Abdel-nabi, I. M., Ueda, H., & Mcvean, A. (2009). Intraspecific variation in the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* venom collected from different biotopes. *Toxicon*, 53(3), 349–359. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.007>
- Amazonas, D. R., Portes-Junior, J. A., Nishiyama-Jr, M. Y., Nicolau, C. A., Chalkidis, H. M., Mourão, R. H. V., Grazziotin, F. G., Rokyta, D. R., Gibbs, H. L., Valente, R. H., Junqueira-de-Azevedo, I. L. M., & Moura-da-Silva, A. M. (2018). Molecular mechanisms underlying intraspecific variation in snake venom. *Journal of Proteomics*, 181(January), 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.03.032>
- Amorim, F. G., Costa, T. R., Baiwir, D., De Pauw, E., Quinton, L., & Sampaio, S. V. (2018). Proteopeptidomic, functional and immunoreactivity characterization of *Bothrops moojeni* snake venom: Influence of snake gender on venom composition. *Toxins*, 10(5), 1–18. <https://doi.org/10.3390/toxins10050177>
- Casewell, N. R., Jackson, T. N. W., Laustsen, A. H., & Sunagar, K. (2020). Causes and Consequences of Snake Venom Variation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.05.006>
- Davies, E. L., & Arbuckle, K. (2019). Coevolution of snake venom toxic activities and diet: Evidence that ecological generalism favours toxicological diversity. *Toxins*, 11(12), 1–14. <https://doi.org/10.3390/toxins11120711>
- Escalante, T., Rucavado, A., Fox, J. W., María, J., Picado, I. C., Microbiología, F. De, Rica, U. D. C., & Rica, C. (2011). Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Journal of*

- Proteomics*, 74(9), 1781–1794. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.03.026>
- Fernandes, C. A. H., Borges, R. J., Lomonte, B., & Fontes, M. R. M. (2014). A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A2-like proteins from viperid snake venoms. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1844(12), 2265–2276. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.09.015>
- Fernández, J., Lomonte, B., Sanz, L., Angulo, Y., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2010). Snake venomomics of *Bothriechis nigroviridis* reveals extreme variability among palm pitviper venoms: Different evolutionary solutions for the same trophic purpose. *Journal of Proteome Research*, 9(8), 4234–4241. <https://doi.org/10.1021/pr100545d>
- Fox, J. W., & Serrano, S. M. T. (2005). *Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases*. 45, 969–985. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.012>
- Freitas-de-Sousa, L. A., Nachtigall, P. G., Portes-Junior, J. A., Holding, M. L., Nystrom, G. S., Ellsworth, S. A., Guimarães, N. C., Tioyama, E., Ortiz, F., Silva, B. R., Kunz, T. S., Junqueira-de-Azevedo, I. L. M., Grazziotin, F. G., Rokyta, D. R., & Moura-da-Silva, A. M. (2020). Size Matters: An Evaluation of the Molecular Basis of Ontogenetic Modifications in the Composition of *Bothrops jararacussu* Snake Venom. *Toxins*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/toxins12120791>
- Gómez-Cardona, J. P., Gómez-Cabal, C., & Gómez-Cabal, M. L. (2017). SUEROS ANTIOFÍDICOS EN COLOMBIA: ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN, ABASTECIMIENTO Y RECOMENDACIONES PARA EL MEJORAMIENTO DE LA RED DE PRODUCCIÓN. *Biosalud*, 16(2), 96–116. <https://doi.org/10.17151/biosa.2017.16.2.9>
- Gutiérrez, J., & Chaves, F. (1980). Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los géneros *Bothrops*,

- Crotalus y Lachesis. *Toxicon*, 18(3), 315–321. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(80\)90011-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(80)90011-2)
- Gutiérrez, J. M., Escalante, T., Rucavado, A., & Herrera, C. (2016). Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: A journey of discovery and understanding. *Toxins*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/toxins8040093>
- Gutierrez, Jose Maria, & Ownby, C. L. (2003). Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A 2 : insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, 42, 915–931. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.005>
- Gutierrez, José Maria, Ownby, C. L., & Odell, G. V. (1984). *ISOLATION OF A MYOTOXIN FROM BOTHROPS ASPER VENOM : PARTIAL CHARACTERIZATION AND ACTION ON SKELETAL MUSCLE*. 1, 115–128.
- Gutierrez, Jose Maria, Rucavado, A., Solano, G., Lomonte, B., Herrera, M., Segura, Á., Villalta, M., Vargas, M., Escalante, T., & León, G. (2015). Métodos para el estudio de actividades tóxicas de venenos de serpientes. In *Estrategias y avances en el estudio de toxinas de interes para la biomedicina* (p. 258).
- Instituto Clodomiro Picado, I. (2007). *Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos Manual de métodos* (p. 28). Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
- Jackson, T. N. W., Jouanne, H., & Vidal, N. (2019). Snake Venom in Context: Neglected Clades and Concepts. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7(September), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00332>
- Jenkins, T. P., Sánchez, A., Segura, Ä., Vargas, M., Herrera, M., Stewart, T. K., León, G., & Guitierrez, J. M. (2017). *An improved technique for the assessment of venom-induced haemorrhage in a murine model*. 139, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.005>

- Kuch, U., Mebs, D., Gutiérrez, J. M., & Freire, A. (1996). Biochemical and biological characterization of Ecuadorian pitviper venoms (genera *Bothriechis*, *bothriopsis*, *bothrops* and *Lachesis*). *Toxicon*, *34*(6), 714–717. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00016-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00016-5)
- Lomonte, B., Escolano, J., Fernández, J., Sanz, L., Angulo, Y., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2008). Snake venomomics and antivenomics of the arboreal neotropical pitvipers *Bothriechis lateralis* and *Bothriechis schlegelii*. *Journal of Proteome Research*, *7*(6), 2445–2457. <https://doi.org/10.1021/pr8000139>
- Lomonte, B., Tsai, W. C., Bonilla, F., Solórzano, A., Solano, G., Angulo, Y., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2012). Snake venomomics and toxicological profiling of the arboreal pitviper *Bothriechis supraciliaris* from Costa Rica. *Toxicon*, *59*(5), 592–599. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.01.005>
- Magro, A. J., Da Silva, R. J., Ramos, P. R. R., Cherubini, A. L., & Hatayde, M. R. (2001). Intraspecific variation in the venom electrophoretic profile of recently captured *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) snakes. *J. Venom. Anim [Online]*, *7*, 276–301.
- Mamede, C. C. N., de Sousa Simamoto, B. B., da Cunha Pereira, D. F., de Oliveira Costa, J., Ribeiro, M. S. M., & de Oliveira, F. (2020). Edema, hyperalgesia and myonecrosis induced by Brazilian bothropic venoms: overview of the last decade. *Toxicon*, *187*(April), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.08.016>
- Markland, F. S. (1998). *SNAKE VENOMS AND THE HEMOSTATIC SYSTEM*. *36*(12).
- Menezes, M. C., Furtado, M. F., Travaglia-cardoso, S. R., Camargo, A. C. M., & Serrano, S. M. T. (2006). Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *47*, 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.11.007>

- Montealegre-Sánchez, L., Montoya-Gómez, A., & Jiménez-Charris, E. (2021). Individual variations in the protein profiles and functional activities of the eyelash palm pit-viper (*Bothriechis schlegelii*) venom from the Colombian southwest region. *Acta Tropica*, 223(August).
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106113>
- Mora-obando, D., Guerrero-vargas, J. A., Prieto-sánchez, R., Beltrán, J., Rucavado, A., Sasa, M., Gutiérrez, J. M., Ayerbe, S., & Lomonte, B. (2013). Proteomic and functional profiling of the venom of *Bothrops ayerbei* from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with *Bothrops asper* venom. *Journal of Proteomics*. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.11.005>
- Munuera Mora, J. J. (2016). *Caracterización proteómica de venenos de serpientes de interés biomédico*.
- Pla, D., Sanz, L., Sasa, M., Acevedo, M. E., Dwyer, Q., Durban, J., Pérez, A., Rodríguez, Y., Lomonte, B., & Calvete, J. J. (2017). Proteomic analysis of venom variability and ontogeny across the arboreal palm-pitvipers (genus *Bothriechis*). *Journal of Proteomics*, 152, 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.10.006>
- Prezotto-Neto, J. P., Kimura, L. F., Alves, A. F., Gutiérrez, J. M., Otero, R., Suárez, A. M., Santoro, M. L., & Barbaro, K. C. (2016). Biochemical and biological characterization of *Bothriechis schlegelii* snake venoms from Colombia and Costa Rica. *Experimental Biology and Medicine*, 241(18), 2075–2085.
<https://doi.org/10.1177/1535370216660214>
- Rivera-Correa, M. (2017). *Catálogo de Anfibios y Reptiles de Colombia*. 3.
- Rodríguez, E., Cahuana, G., Sandoval, G. A., Yarlequé, M., & Yarlequé, A. (2010). EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA *Bothrops bilineatus* “LORO MACHACO.” *Rev Soc Quím Perú*, 76(762).
<http://www.redalyc.org/pdf/3719/371937617003.pdf>

- Rojas, E., Quesada, L., Arce, V., Lomonte, B., & Rojas, G. (2005). *Neutralization of four Peruvian Bothrops sp. snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú and Costa Rica : preclinical assessment*. 93, 85–95.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.09.008>
- Roodt, A. R. De, Estévez-ramírez, J., Paniagua-solís, J. F., Litwin, S., Carvajal-, A., Dolab, J. A., Robles-ortiz, L. E., & Alagón, A. (2005). *Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México*. 141(1), 13–21.
- Saad, E., Barros, L. C., Biscola, N., Pimenta, D. C., Barraviera, S. R. C. S., Barraviera, B., & Ferreira, R. S. (2012). Intraspecific Variation of Biological Activities in Venoms from Wild and Captive Bothrops jararaca. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 75(16–17), 1081–1090. <https://doi.org/10.1080/15287394.2012.697839>
- Sartim, M. A., Cezarette, G. N., Jacob-Ferreira, A. L., Frantz, F. G., Faccioli, L. H., & Sampaio, S. V. (2017). Disseminated intravascular coagulation caused by moojenactivase, a procoagulant snake venom metalloprotease. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 1077–1086.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.146>
- Serrano, S. M. T., & Maroun, R. C. (2005). Snake venom serine proteinases: Sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*, 45(8), 1115–1132. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.020>
- Tasoulis, T., Silva, A., Veerati, P. C., Baker, M., Hodgson, W. C., Dunstan, N., & Isbister, K. (2020). Intra-Specific Venom Variation in the Australian Coastal Taipan *Oxyuranus scutellatus*. *Toxins*, 16.
- Teixeira, C. F. P., Zamunér, S. R., Zuliani, J. P., Fernandes, C. M., Cruz-Hofling, M. A., Fernandes, I., Chaves, F., & Gutierrez, J. M. (2003). *NEUTROPHILS DO NOT CONTRIBUTE TO LOCAL TISSUE DAMAGE , BUT PLAY A KEY ROLE IN SKELETAL MUSCLE REGENERATION , IN MICE INJECTED WITH BOTHROPS ASPER SANKE VENOM*. October, 449–459.

White, J. (2005). *Snake venoms and coagulopathy*. 45, 951–967.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.030>

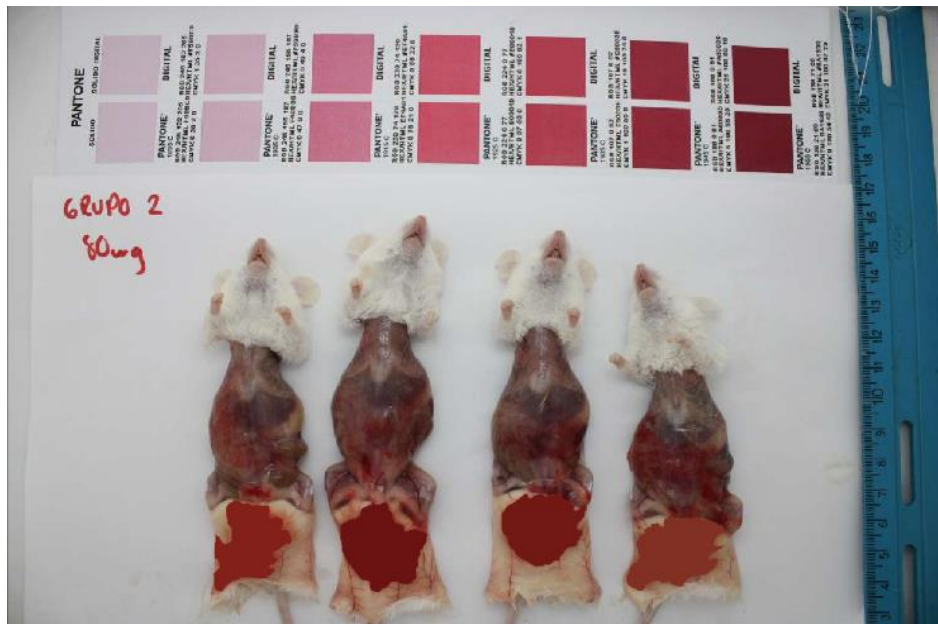
Who. (2019). *Neglected Tropical Diseases*.

http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/

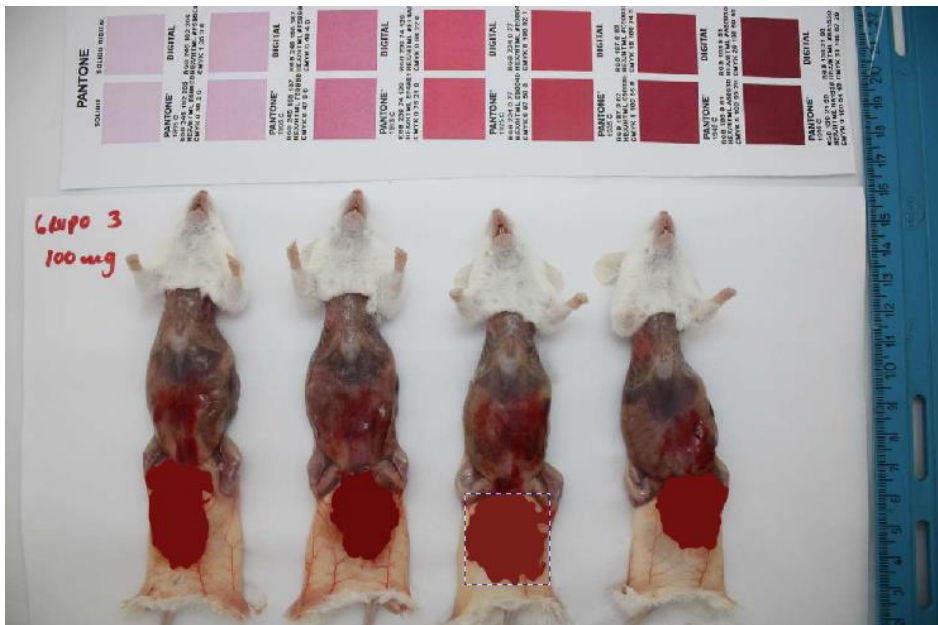
Youngman, N. J., Peng, Y. H., Harris, R. J., Jones, L., Llinas, J., Haworth, M.,

Gillett, A., & Fry, B. G. (2022). Differential coagulotoxic and neurotoxic venom activity from species of the arboreal viperid snake genus *Bothriechis* (palm-pitvipers). *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 256(March), 109326.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109326>



- Análisis en el programa Inkscape para la prueba hemorrágica (100 µg)



- Análisis en el programa Inkscape para la prueba hemorrágica (120 µg)

