

Caracterización biológica y bioquímica del veneno de la víbora de pestaña *Bothriechis schlegelii* (Serpentes: Viperidae) de Santander-Colombia.

Jeisson Gómez Robles

Trabajo de investigación presentado como requisito para obtener el título de: Biólogo

Directora:

**Jessica Paola Rey-Suarez
PhD Ciencias Básicas Biomédicas**

Codirector:

**Hermínsul de Jesús Cano Calle
PhD en Química**

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2019

*Toda nuestra ciencia,
comparada con la realidad,
es primitiva e infantil...
y sin embargo es lo más preciado
que tenemos.*

Albert Einstein (1879-1955)

Agradecimientos

Este trabajo representa la conclusión de un largo proceso lleno de alegrías, experiencias enriquecedoras, retos y muy buenos momentos, pero también de tristezas y frustraciones. Durante todo este proceso tuve la fortuna de contar con el apoyo y acompañamiento de muchas personas, por lo que hoy tengo que agradecer de la manera más sincera y especial.

A mis queridos viejos, quienes han sido mi apoyo en todo momento y de manera incondicional y han sido la motivación más fuerte para superar todos los obstáculos, a mi querido hermano por estar siempre en las buenas y en las malas y a mi familia en general.

A mi directora Jessica Paola Rey-Suarez, por la confianza, la paciencia y dedicación durante la realización de este trabajo, por compartirme su conocimiento y pasión sobre el fascinante mundo de los venenos de las serpientes.

Al grupo de Ofidismo y Escorpionismo de la Universidad de Antioquia por abrirme sus puertas para la realización de este trabajo. En especial a la profe Vitelbina Núñez y Andrés Pereañez por permitirme vivir esta experiencia tan enriquecedora. De igual forma, a Yeisson Galvis, Lina Preciado y demás personas con las que compartí espacios en el laboratorio, por la colaboración, la buena energía y buen ambiente durante mi estadía.

A mi codirector Herminul de Jesús Cano-Calle, por la confianza, entrega y compromiso en este trabajo, por su disposición y buena energía en todo momento y por sus siempre valiosas contribuciones durante este proceso. A las químicas Lucía y Lyda por su colaboración y buena energía.

A la bióloga Laura Lizeth Lozano Suarez, por el apoyo en todo momento, por haber estado siempre a mi lado de manera incondicional y haber hecho de mi paso por la universidad una experiencia aún más especial y significativa.

A mis compañeros del grupo de Estudio en Anfibios y Reptiles (G.E.A.R.S.), especialmente a los biólogos Elson Ferley Meneses-Pelayo, Juan David Bayona-Serrano y Wilfredo Chinchilla-Lemus, por sus valiosos aportes y acompañamiento durante la realización de este trabajo. A Diego Lobo por su colaboración y acompañamiento en campo.

Al Instituto Nacional de Salud, en especial a Francisco Ruiz y Mónica Sarmiento por su gran colaboración y siempre buena disposición.

A todos mis compañeros de carrera, Juan Jose, Omar, Dairo, que siempre me apoyaron, no solo durante el desarrollo de mi tesis, también a lo largo de mi proceso de formación en la universidad. A doña Esmeralda, don Carlos, doña María, doña Arelis, don Robinson y don Adrián por su amabilidad durante las visitas de campo.

Contenido

	Pág.
Introducción	17
1. Objetivos	21
1.1 Objetivo General	21
1.2 Objetivos Específicos.....	21
2. Marco teórico	22
2.1 El envenenamiento ocasionado por serpientes	22
2.2 El veneno de las serpientes	24
2.3 <i>Bothriechis schlegelii</i> (Berthold 1846)	28
2.4 El estudio del veneno de <i>Bothriechis</i> (Peters, 1859)	29
3. Materiales y métodos	31
3.1 Obtención y procesado del veneno	31
3.2 Fraccionamiento cromatográfico por HPLC en fase reversa (RP).	32
3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	33
3.4 Actividades biológicas in-vitro	34
3.4.1 Actividad de fosfolipasas A ₂	34
3.4.1.1 Hemólisis indirecta.	34
3.4.1.2 Actividad de fosfolipasas A ₂ sobre el sustrato monodisperso 4-NOBA.....	35
3.4.2 Actividad proteolítica.....	35

3.4.2.1 Actividad proteolítica sobre Azocaseína.	35
3.4.2.2 Actividad proteolítica sobre BAPNA.	36
3.4.3 Actividad de L-amino ácido oxidasa.	36
3.4.4 Actividad Procoagulante.	36
3.4.5 Análisis estadístico.	37
4. Resultados.	37
4.1 Colecta de ejemplares de <i>B. schlegelii</i> y extracción de veneno.	37
4.2 Fraccionamiento cromatográfico de los venenos.	41
4.3 Fraccionamiento electroforético de los venenos.	44
4.4 Actividades biológicas.	46
5. Discusión.	49
6. Conclusiones.	60
Referencias Bibliográficas.	62

Lista de Figuras

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Comportamiento de la notificación de accidente ofídico por semana epidemiológica, Colombia, 2014 – 2017. Tomado de Rojas, (2017).....	23
<i>Figura 2.</i> Estrategias de laboratorio utilizadas para realizar análisis proteómicos de venenos de serpientes. A estrategia basada en gel, en la cual se realiza la separación de las proteínas por electroforesis bidimensional (2DE), tinsion y selección de las bandas electroforéticas para someterlas a digestión en gel y análisis de espectrometría de masas en tándem (MS/MS). B estrategia basada en cromatografía líquida (CL), se realiza la digestión del veneno completo para luego separar los péptidos por HPLC y finalmente análisis por espectrometría de masas MS/MS. C estrategia combinada “snake venomics”. Se separan los componentes del veneno por HPLC-RP y electroforesis SDS-PAGE. Se seleccionan las bandas proteicas del gel, se digieren y se someten a análisis MS/MS. Adaptado de Lomonte, (2017).	26
<i>Figura 3.</i> Evolución de las estrategias analíticas en la caracterización de venenos de serpientes mediante herramientas proteómicas. Adaptado de Lomonte & Calvete, (2017).....	27
<i>Figura 4.</i> (A) Mapa de Colombia en el que se muestra las zonas de las que se llegó a obtener muestras de veneno de <i>B. schlegelii</i> . Flecha naranja: Antioquia, flecha gris: Caldas y flecha negra: Santander. (B) mapa del departamento de Santander mostrando las tres localidades en las que se colectaron los especímenes de <i>B. schlegelii</i> . Naranja: Santa Bárbara, Rojo: San Vicente de Chucurí y Azul: El Carmen de Chucurí.....	39

- Figura 5.* Individuos colectados en Santander. A, B, C,y D. individuos colectados en Vda Esparta del municipio de Santa Bárbara – Santander. E. individuo colectado en la Vda Merida alta, municipio San Vicente de Chucurí – Santander. F. individuo colectado en la Vda La Bodega, municipio el Carmen de Chucurí – Santander. Fotos A y F: Elson Meneses – Pelayo. Fotos B, C, D y E: Jeisson Gómez Robles..... 41
- Figura 6.* Perfil cromatográfico de las proteínas del veneno de *B. schlegelii* de Santander por RP-HPLC usando el método ya descrito..... 42
- Figura 7.* Perfiles cromatográficos de las proteínas del veneno de los individuos de *B. schlegelii* colectados en Santander (ver tabla 1) por RP-HPLC usando el método ya descrito..... 42
- Figura 8.* (A) Perfil cromatográfico de las proteínas del veneno de *B. schlegelii* de Santander, Caldas y Antioquia por RP-HPLC usando el método ya descrito. (B) Región comprendida entre 60 – 80 minutos ampliada, en la cual se observaron las diferencias más importantes entre los cromatogramas..... 43
- Figura 9.* Perfil cromatográfico del veneno completo obtenido a partir de los individuos colectados en Santander (ver tabla 1). Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12 %. Valores en el Marcador de peso molecular (M) expresados en kDa. 44
- Figura 10.* Perfil electroforético de las fracciones obtenidas por HPLC-RP a partir del veneno de Santander en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. Valores en los marcadores de peso molecular (M) expresados en kDa. 45
- Figura 11.* Perfil electroforético del veneno completo de *B. schlegelii* de Santander (S), Antioquia (A), Caldas (C) y del veneno de *B. asper* (B.a). Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12 %. Valores en los marcadores de peso molecular (M) expresados en kDa. 45

Figura 12. Actividad de L-amino Acido oxidasa in-vitro. (A) Dosis respuesta a la actividad de L-amino acido oxidasa del veneno de *B. schlegelii* de Santander y (B) actividad L-amino acido oxidasa de 20 µg del veneno de *B. schlegelii* de las diferentes zonas y *B. asper*. 46

Figura 13. Actividad proteolítica in-vitro. (A) Dosis respuesta a la actividad proteolítica sobre azocaseina del veneno de *B. schlegelii* de Santander. (B) Dosis respuesta a la actividad proteolítica sobre BAPNA del veneno de *B. schlegelii* de Santander. (C) Actividad proteolítica sobre azocaseina de 20 µg del veneno de *B. schlegelii* de las diferentes zonas y *B. asper*. (D) actividad proteolítica sobre BAPNA de 20 µg del veneno de *B. schlegelii* de las diferentes zonas y *B. asper*. 47

Figura 14. Actividad de fosfolipasas A₂ in-vitro. (A) Actividad hemolítica tanto del veneno de *B. schlegelii* de diferentes zonas, como del veneno de *B. asper*. (B) Dosis respuesta a la actividad de fosfolipasas A₂ del veneno de *B. schlegelii* de Santander. (C) Actividad fosfolipasica A₂ de 20 µg del veneno de *B. schlegelii* de las diferentes zonas y *B. asper*. (Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre las muestras de *B. schlegelii* de diferentes zonas con la muestra de *B. asper*). 48

Figura 15. Tiempos de coagulación inducidos en plasma sanguíneo por diferentes dosis del veneno de *B. schlegelii* de Santander..... 48

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Información general de los especímenes de B. schlegelii</i> colectados en Santander durante la fase de campo.	38
Tabla 2. <i>Información de las cantidades de veneno obtenidas por individuo</i>	40

Lista de Símbolos y Abreviaturas

Abreviatura	Termino
ACN	Acetonitrilo
ANOVA	Análisis de varianza
BAPNA	N-benzoil-arginina-p-nitroanilida
cc	Centímetros cúbicos
CL	Cromatografía líquida
CRISP	Proteína secretora rica en cisteínas
DAD	Arreglo de diodos
g	Gramos
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
kDa	KiloDalton
LAAO	L-amino ácido oxidasa
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar

MS	Espectrometría de masas
mUA	Mili-Unidades de absorbancia
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetros
PBS	Buffer fosfato salino
PM	Peso molecular
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
RP	Fase reversa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SVMP	Metaloproteasa de veneno de serpientes
SVSP	Serin proteasa de veneno de serpientes
TFA	Ácido trifluoroacético
V	Voltios
Vda	Vereda
WHO	Organización mundial de la salud
2DE	Dos dimensiones
°C	Grados Celsius

Resumen

Título: Caracterización biológica y bioquímica del veneno de la víbora de pestaña *Bothriechis schlegelii* (Serpentes: Viperidae) de Santander-Colombia*.

AUTOR: JEISSON GÓMEZ ROBLES**

PALABRAS CLAVE: Veneno, *Bothriechis schlegelii*, Viperidae, Cromatografía líquida, SDS-PAGE.

DESCRIPCION:

Bothriechis es un género de serpientes neotropicales perteneciente a la familia Viperidae compuesto por 11 especies, distribuidas desde Centroamérica hasta el norte de Sudamérica. Se caracterizan por tener hábitos principalmente arbóreos. *Bothriechis schlegelii*, conocida en algunas Regiones de Santander como Mapanare o Sapa, es la única especie del género reportada en Colombia y representa una de las especies de relevancia clínica en el país. El veneno de esta especie en Colombia ha sido poco estudiado. En el presente trabajo se realizó la caracterización bioquímica y biológica del veneno de *B. schlegelii* de Santander mediante la utilización de técnicas como cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) y ensayos de actividades biológicas *In-vitro*. El veneno de *B. schlegelii* de Santander mostró un perfil cromatográfico constituido por 35 fracciones, dieciocho de estas no presentaron bandas electroforéticas superiores a 15 kDa. Las bandas electroforéticas correspondiente a estos venenos, se observaron principalmente distribuidas en un rango de 20-50 kDa. El veneno de *B. schlegelii* de Santander presenta unas características electroforéticas y cromatográficas similares a las observadas en otras especies de la familia viperidae del neotrópico. Este trabajo permitió ampliar el conocimiento toxinológico del veneno de serpientes y la información proporcionada contribuirá al mejoramiento en el diagnóstico y tratamiento de los casos clínicos ocasionados por esta especie en Colombia.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Biología. Directora: Jessica Paola Rey-Suarez PhD Ciencias Básicas Biomédicas Codirector: Herminul de Jesús Cano Calle PhD en Química

Abstract

TITLE: Biological and biochemical characterization of the eyelash viper *Bothriechis schlegelii* venom (Serpentes: Viperidae) of Santander-Colombia*.

AUTHOR: JEISSON GÓMEZ ROBLES**

KEYWORDS: Venom, *Bothriechis schlegelii*, Viperidae, Liquid chromatography, SDS-PAGE.

DESCRIPTION:

Bothriechis is a genus of Neotropical snakes belongs to the Viperidae family composed of 11 species, distributed from Central America to northern South America. They are characterized by having mainly arboreal habits. *Bothriechis schlegelii*, known in some regions of Santander as Mapanare or Sapa, is the only specie of the genus reported in Colombia and represents one of the species of clinical relevance in the country. The venom of Colombian species has been barely studied. In the present work, the biochemical and biological characterization of *B. schlegelii* venom from Santander was carried out using techniques such as reverse phase high resolution liquid chromatography (RP-HPLC), protein electrophoresis (SDS-PAGE), and biological activity tests In-vitro. The venom of *B. schlegelii* from Santander showed a chromatographic profile constituted by 35 fractions, eighteen of these did not present electrophoretic bands greater than 15 kDa. The electrophoretic bands corresponding to these venoms were mainly distributed in a range of 20-50 kDa. The venom of *B. schlegelii* from Santander presents electrophoretic and chromatographic characteristics similar to those observed in other species of the Neotropic viperidae family. This work allowed expand the toxinological knowledge of snake venom and provided information will contribute to the improvement in the diagnosis and treatment of clinical cases caused by this specie in Colombia.

* Thesis

** Faculty of basic sciences. Biology school. Directora: Jessica Paola Rey-Suarez PhD Ciencias Básicas Biomédicas
Codirector: Hermínsul de Jesús Cano Calle PhD en Química

Introducción

Las serpientes u ofidios, son reptiles escamados desprovistos de extremidades y con cuerpos de forma alargada. Existen 3738 especies de serpientes en el mundo, de las cuales aproximadamente 250 (6.7%) son consideradas venenosas y representan un riesgo para los humanos (Uetz & Hošek, 2018).

El veneno de las serpientes está compuesto principalmente por péptidos y proteínas cuya función es capturar y predigerir las presas (Gomes *et al.*, 2010). Sin embargo, en un encuentro fortuito con el hombre, estos venenos pueden llegar a ser usados como defensa cuando son inyectados intramuscularmente en una mordida, lo que se conoce como accidente ofídico u ofidiotoxicosis, considerado un serio problema de salud pública principalmente en países tropicales subdesarrollados (Harrison & Gutiérrez, 2016).

Se estima que a nivel mundial se producen alrededor de 2 millones de envenenamientos ocasionados por serpientes, por lo cual se han llevado a cabo importantes esfuerzos en el estudio y atención del problema a nivel regional y global en el ámbito científico. Esto ha permitido desarrollar una serie de metodologías de laboratorio relativamente sencillas y estrategias analíticas como la venómica, antivenómica y toxicovenómica, las cuales facilitan no solo el estudio de la proteómica de los venenos, el aislamiento y caracterización de las toxinas, mecanismos de acción y efectos, sino también información útil en el desarrollo y evaluación de los antivenenos (Gutiérrez, 2011).

Bothriechis es un género de serpientes neotropicales perteneciente a la familia Viperidae compuesto por 11 especies, distribuidas desde Centroamérica hasta el norte de Sudamérica. Se

caracterizan por tener hábitos principalmente arbóreos. *Bothriechis schlegelii*, conocida en algunas localidades de Santander como Mapanare o Sapa, es la única especie del género reportada para Colombia y representa una de las especies de relevancia clínica en el país, el veneno de esta especie en Colombia ha sido poco estudiado, por tal motivo este trabajo tiene como objetivo realizar una caracterización biológica y bioquímica del veneno de esta especie proveniente de Santander.

Descripción del problema

Debido a su relevancia médica, muchos de los venenos de las serpientes del género *Bothriechis*, han sido caracterizados para poblaciones y especies fuera de Colombia. (Lomonte *et al.*, 2008, 2012; Fernández *et al.*, 2010; Camacho *et al.*, 2014). En dichos estudios se evidencia una notable variación tanto en la composición como en la actividad y perfil tóxico entre los venenos de las especies de este género. (Lomonte *et al.*, 2012; Pla *et al.*, 2017). La abundancia de familias proteicas como las fosfolipasas A₂ (PLA₂) y las Metaloproteinasas (SVMPs) entre otras, hacen que estos venenos posean un diverso repertorio de actividades biológicas.

Efectos dermonecróticos, hemorrágicos, miotóxicos, entre otros, hacen que los venenos del género *Bothriechis* sean potencialmente letales para el hombre (Campbell & Lamar, 2004). Colombia solo cuenta con una especie de este género (*B. schlegelii*) la cual también se distribuye en otros países de Centro y Sur América (Uetz & Hošek, 2018). Lomonte *et al.* (2008) trabajaron en la caracterización del veneno de esta especie a partir de individuos costarricenses encontrando siete diferentes familias de proteínas, de las cuales las PLA₂ fueron predominantes (44%). Sin embargo, se observó que las actividades evocadas por los venenos de individuos de *B. schlegelii* de Costa Rica y de Colombia son diametralmente diferentes (Prezotto-Nieto, 2016). La causa de esta diferencia en las actividades podría verse reflejada en variaciones en la composición del veneno de las poblaciones colombianas. Aunque en Costa Rica se conoce bien el veneno de *B.*

schlegelii (Angulo *et al.*, 1997; Lomonte *et al.* 2008; Pla *et al.*, 2017), para Colombia son pocos los datos que se tienen del veneno de esta especie a pesar de su importancia médica (Otero-Patiño *et al.*, 1992b; 2002; Rodríguez-Vargas, 2012; Walteros *et al.*, 2014), lo que impide la realización de inferencias sobre las actividades biológicas que desencadena, así como la investigación de posibles compuestos de interés médico y farmacológico, el desarrollo de sueros antiofídicos específicos y tratamientos mucho más efectivos.

Justificación del proyecto

La variación en los venenos de serpientes se puede encontrar a diferentes niveles taxonomicos. Dentro de la misma especie estas variaciones pueden responder a factores como la edad, dieta, distribución geográfica, estación e incluso al sexo. Debido a esto, el envenenamiento por serpientes de la misma especie puede generar consecuencias clínicas distintas. *B. schlegelii* es una especie ampliamente distribuida la cual podría llegar a presentar una variación importante a nivel biológico y bioquímico del veneno y por ende en las características del envenenamiento a lo largo de las localidades en las que se encuentra.

Sin embargo, la vasta mayoría de datos e información que se tienen del veneno de esta especie se ha obtenido a partir de individuos centroamericanos, lo que deja un enorme vacío de conocimiento acerca del veneno de *B. schlegelii* de otras regiones, entre estas, Colombia. La realización de estudios sobre el veneno de esta especie en el país resulta necesaria para mitigar este bache de información y de esta forma vitalizar y fortalecer los esfuerzos en mejorar los tratamientos del envenenamiento ofídico.

Además, el estudio de los venenos de las serpientes, no solo arroja bases que permiten llegar a entender cómo estos han evolucionado, también traen consigo beneficios en pro de la investigación en el área de la salud para el desarrollo de herramientas y drogas de uso médico,

mejoramiento en la manufactura de antivenenos e incluso resultan con un gran potencial en temas de taxonomía (Calvete *et al.*, 2008).

Así mismo, el uso de toxinas como herramientas moleculares ha permitido revelar y clasificar diferentes procesos fisiológicos importantes que tienen que ver con aspectos de neurotransmisión, apoptosis, hemostasia, entre otras (Mackessy, 2010). Incluso algunas de estas toxinas han demostrado ser potenciales reemplazantes de fármacos y productos poco efectivos o que llevan consigo efectos adversos durante su uso, teniendo en ocasiones un rendimiento mayor a la de los fármacos (Craik, 2013).

El potencial anticancerígeno de muchas de las proteínas y péptidos presentes en los venenos, ponen a estos como una muy prometedora fuente para desarrollar alternativas de origen natural y mucho más económicas para el tratamiento de esta enfermedad (Roy, Chattopadhyay & Pal, 2015).

Ya sea para afrontar el problema de salud pública que hoy representa las mordeduras de serpientes, sobre todo en los trópicos, mediante el desarrollo de antivenenos y tratamientos más efectivos, para llevar a cabo investigaciones que nos ayuden a responder preguntas biológicas fundamentales o para brindar alternativas en el tratamiento de enfermedades que en la actualidad demandan especial atención, el estudio de los venenos resulta necesario, y más aún cuando a pesar de todo el potencial que en ellos hay, se tiene que la gran mayoría de venenos de fuentes animales se desconoce (Zhang, 2015).

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Realizar la caracterización biológica y bioquímica del veneno de la víbora de pestaña (*Bothriechis schlegelii*) de Santander – Colombia.

1.2 Objetivos Específicos

- Determinar el perfil cromatográfico y electroforético del veneno de *B. schlegelii* de Santander.
- Establecer diferencias individuales y geográficas entre especímenes de *B. schlegelii* de Santander y de diferentes zonas de Colombia.
- Caracterizar las actividades biológicas *In-vitro* del veneno de *B. schlegelii* de Santander y de diferentes zonas de Colombia.

2. Marco teórico

2.1 El envenenamiento ocasionado por serpientes

Las mordeduras por serpiente son un problema de salud pública desatendida en muchos países tropicales y subtropicales (WHO, 2018). Anualmente se producen alrededor de 5 millones de mordeduras de serpiente alrededor del mundo, de las cuales entre el 1.8 - 2.7 millones resultan en envenenamiento, desafortunadamente entre 81.410 – 137.880 en muertes y aproximadamente el triple de amputaciones y otras discapacidades permanentes (Harrison & Gutiérrez, 2016; WHO, 2018). La mayoría de los casos ocurren en África, Asia y Latinoamérica, afectando principalmente a personas de comunidades pobres en áreas rurales de países subdesarrollados con pocos recursos médicos y sistemas de salud débiles (Kasturiratne *et al.*, 2008; Lomonte, 2012; Harrison & Gutiérrez, 2016; WHO, 2018). En Latinoamérica, solo a nivel hospitalario, se presentan unos 70.000 casos por año, mientras que las tasas de decesos por cada 100.000 habitantes varían bastante entre diferentes países. No obstante, los datos sobre incidencia y mortalidad por envenenamientos de serpientes son por lo general incompletos lo que hace que sea imposible dimensionar la verdadera magnitud del problema (Gutiérrez, 2011). Las cifras que se evidencian en Latinoamérica, tanto de incidencia como de muertes, parecen ser mucho menores de las que realmente ocurrirían. Las muertes anuales estarían entre 540 – 2.298 que se estiman suceden en la región, mientras que los 70.000 casos que se reportan por año serían solo el límite inferior de los entre 80.329 – 129.084 casos que en realidad se presentarían en los países latinos (Kasturiratne *et*

al., 2008). Colombia no es ajena a este fenómeno y las cifras que se tienen no muestran el verdadero problema debido al subregistro que se presenta, sin embargo, el panorama se ha mejorado gracias a que el accidente ofídico es de notificación obligatoria desde el 2014 (Rodríguez-Vargas, 2012). En Colombia para el año 2017 se reportaron 4.978 casos, aumentando 6% respecto al número de casos reportados el año anterior (Rojas, 2017) (Figura 1). La ocurrencia de envenenamientos por serpientes en Colombia conserva algunas características con respecto al comportamiento que se da en Latinoamérica. Por ejemplo, *Bothrops* aparece como el género responsable de la gran mayoría de casos (Otero-Patiño *et al.*, 1992a; 1992b; 2002; Sarmiento, 2012; Rojas, 2017) y las personas más afectadas son habitantes de zonas rurales retiradas de centros poblados, con actividades relacionadas a trabajos del campo (Walteros *et al.*, 2014; Rojas, 2017).

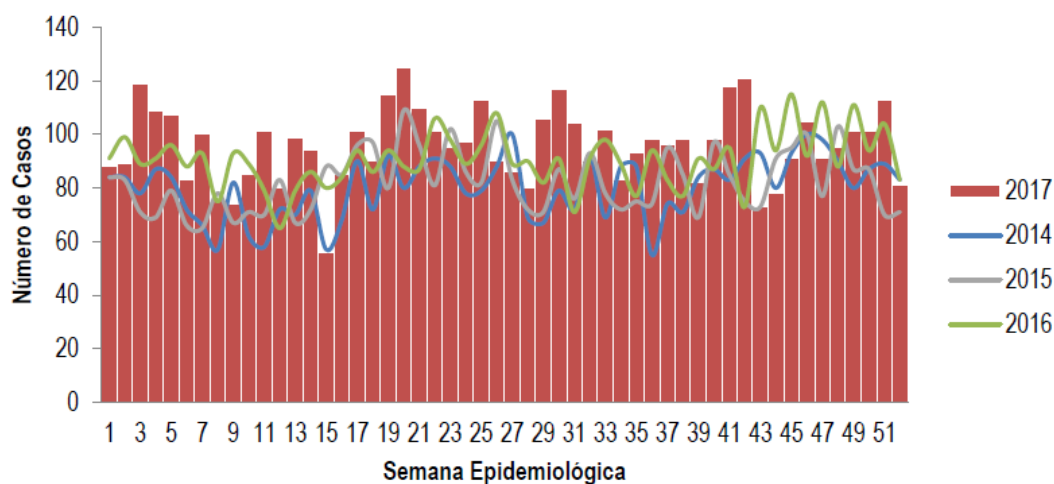


Figura 1. Comportamiento de la notificación de accidente ofídico por semana epidemiológica, Colombia, 2014 – 2017. Tomado de Rojas, (2017).

2.2 El veneno de las serpientes

El veneno de las serpientes es saliva altamente modificada como resultado de presiones selectivas a niveles tróficos en las especies, que les confiere a éstas una defensa efectiva contra posibles predadores y una herramienta para someter, matar y digerir a sus presas (Gomes *et al.*, 2010). El veneno es producido en un par de glándulas exocrinas especializadas y está compuesto por una miríada de péptidos y proteínas, algunas de las cuales se encuentran dotadas de actividades enzimáticas (Mackessy & Baxter, 2006; Fry, 2015). Estas proteínas tóxicas parecen haber surgido mediante un proceso en el cual algunos genes expresados normalmente en otros tejidos del cuerpo resultaron también siendo expresados en las glándulas orales (Hargreaves *et al.*, 2014, Reyes-Velazco *et al.*, 2014), ejemplo de esto son los genes del grupo de toxinas Fosfolipasas A₂ tipo II (II-PLA₂), expresadas selectivamente en vipéridos después de haber evolucionado de genes expresados específicamente en su hígado (Junqueira de Azevedo *et al.*, 2015). Por lo tanto, las proteínas y toxinas presentes en los venenos son reclutadas a partir de proteínas secretoras y corporales, algunas con roles bioquímicos preexistentes en uno o más procesos fisiológicos (Fry, 2015). Este proceso de reclutamiento progresivo de nuevas toxinas a partir de proteínas no tóxicas ha llevado a un alto grado de homogeneidad en los tipos de toxinas encontradas en diferentes familias de serpientes. La coaptación de estos compuestos reguladores y su reclutamiento como constituyentes del veneno (Fry, 2015), sumado a una posible limitada selección evolutiva, ha enmarcado la diversificación estructural, más no funcional, de estas proteínas tóxicas a un pequeño número de familias proteicas (Calvete *et al.*, 2007). Por ejemplo, algunas serpientes de la familia Elapidae (Mambas) y Viperidae (Serpientes de cascabel) pueden llegar a tener más de cincuenta tipos de péptidos y proteínas diferentes en sus venenos, los cuales solo llegan a representar de diez

a veinte familias proteicas (Perkins, Parker & Tomer, 1993; Perkins & Tomer, 1995; Sanz *et al.*, 2006).

La liberación del veneno se lleva a cabo por medio de un sistema altamente especializado conocido como aparato venenoso. Éste consta de las glándulas secretoras asociadas a un refinado mecanismo de músculos y ductos que desembocan en un par de dientes modificados que facilitan la inoculación del veneno en la presa (Jackson, 2003; Vonk *et al.*, 2008). El aparato venenoso, a pesar de tener la misma función (Producción e inoculación del veneno) y ubicación, presenta diferencias entre las familias de serpientes venenosas (Colubridae, Elapidae y Viperidae), que pueden relacionarse con el tamaño, la organización de estructuras asociadas como músculos o ligamentos, la cantidad de veneno producido e incluso la efectividad y rapidez en la inyección de este (Mackessy, 2010).

Gran parte del conocimiento que se tiene acerca de los venenos de serpientes se han obtenido gracias a las contribuciones realizadas por diferentes grupos de investigación de diversos países. Esto ha traído consigo el desarrollo y adaptación de una serie de metodologías de laboratorio relativamente sencillas (Figura 2) y estrategias de análisis como la venómica, antivenómica y toxicovenómica (Figura 3).

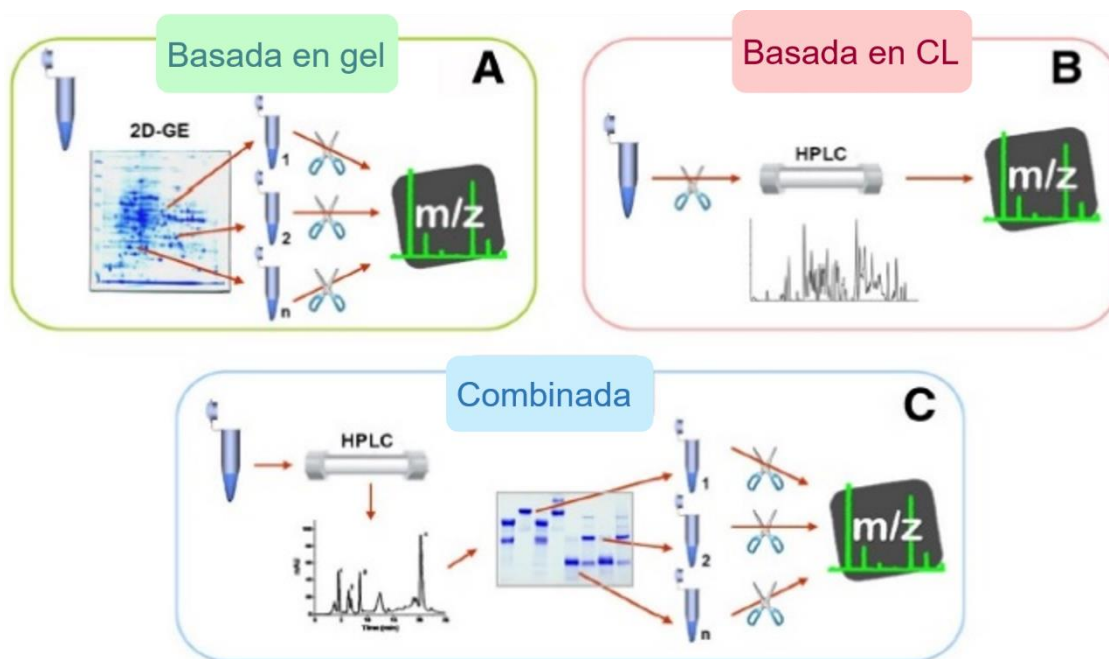


Figura 2. Estrategias de laboratorio utilizadas para realizar análisis proteómicos de venenos de serpientes. A estrategia basada en gel, en la cual se realiza la separación de las proteínas por electroforesis bidimensional (2DE), tinción y selección de las bandas electroforéticas para someterlas a digestión en gel y análisis de espectrometría de masas en tándem (MS/MS). B estrategia basada en cromatografía líquida (CL), se realiza la digestión del veneno completo para luego separar los péptidos por HPLC y finalmente análisis por espectrometría de masas MS/MS. C estrategia combinada “snake venomics”. Se separan los componentes del veneno por HPLC-RP y electroforesis SDS-PAGE. Se seleccionan las bandas proteicas del gel, se digieren y se someten a análisis MS/MS. Adaptado de Lomonte, (2017).

Si bien, en la composición de los venenos se pueden llegar a encontrar variaciones intraespecíficas. Las especies estrechamente relacionadas tienen venenos más similares entre sí, que con aquellas más distantemente relacionadas. Al igual como sucede con el aparato venenoso, las familias proteicas presentes en los venenos siguen por lo general tendencias filogenéticas. Así, los venenos de especies de serpiente de la familia Elapidae son más similares entre sí que con especies de la familia Viperidae. En los venenos de los elápidos se da una predominancia de toxinas pequeñas, principalmente toxinas de tres dedos (3FTx) y PLA₂, mientras que en los venenos de especies de vipéridos predominan toxinas enzimáticas de mayor peso molecular como

metaloproteasas de veneno de serpiente (SVMPs), Serinproteasas (SVSPs) y L-amino ácido oxidasas (LAAOs) (Mackessy, 2010). Sin embargo, estos patrones no siempre se dan. En un linaje evolutivamente bien definido como lo es el género *Crotalus* (Familia Viperidae), la composición del veneno no necesariamente responde a un patrón filogenético, llegando a encontrar venenos que generan daño a tejidos y son altamente hemorrágicos con predominancia de SVMPs (*C. atrox*, *C. molossus* y *C. ruber*) y, venenos altamente neurotóxicos y con ausencia de SVMPs (*C. tigris* y *C. durissus terrificus*) (Mackessy, 2008). En el caso de venenos de la familia Colubridae (Sensu lato), estos aparecen mucho más variables, conteniendo algunos componentes enzimáticos como SVMPs y Acetilcolinesterasas (Hill & Mackessy, 2000; Mackessy, 2002). En algunas especies se encuentran venenos con abundantes 3FTxs mientras en otras están ausentes (Mackessy, 2010).

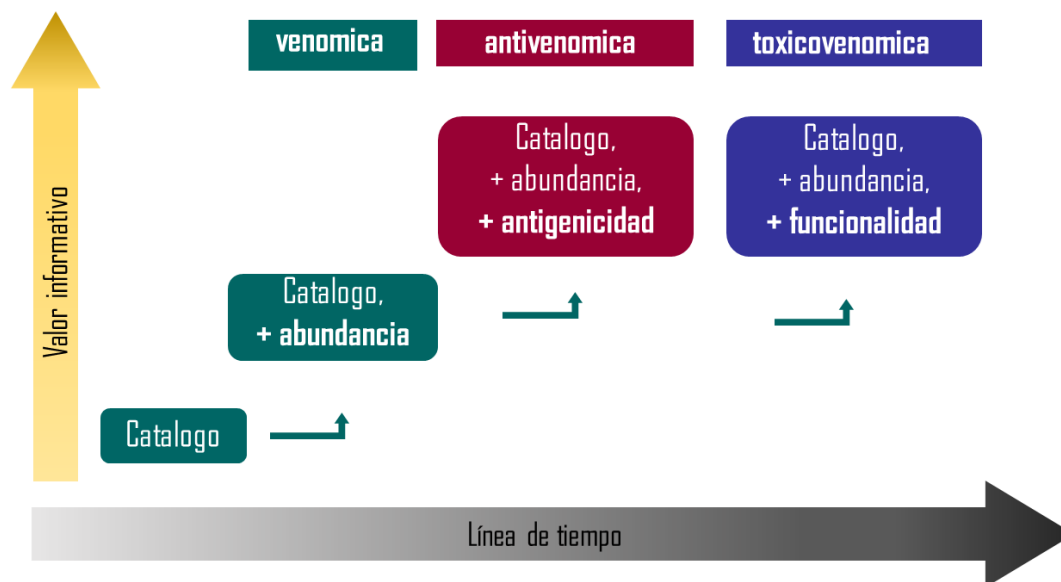


Figura 3. Evolución de las estrategias analíticas en la caracterización de venenos de serpientes mediante herramientas proteómicas. Adaptado de Lomonte & Calvete, (2017).

Conocer la complejidad y variabilidad de los componentes del veneno, aporta no sólo a continuar explorando a mayor detalle diferentes hipótesis evolutivas sobre la diversificación o conservación de las características de los venenos ligadas a fuerzas evolutivas y ecológicas y a conocer la gran diversidad entre diferentes taxa (Calvete, 2011), además, resulta fundamental a la hora de desarrollar y optimizar el tratamiento del accidente ofídico (Gutiérrez *et al.*, 2009) ya que todas estas variaciones tienen un impacto en términos clínicos y de desarrollo de antivenenos.

2.3 *Bothriechis schlegelii* (Berthold 1846)

Bothriechis (Peters, 1859) es un linaje constituido por 11 especies de serpientes neotropicales (Uetz & Hošek, 2018). Estas especies están adaptadas a hábitats arbóreos con cuerpos relativamente cortos (60-80 cm) y colas prensiles, son principalmente nocturnas y se alimentan de aves, pequeños roedores, lagartos, ranas y ocasionalmente murciélagos (Meza-Ramos, Almendáriz & Yáñez-Muñoz, 2010; Arteaga *et al.* 2013) con una aparente transición ontogénica de presas poiquilothermas hacia presas endotérmicas (Campbell & Lamar, 2004). *B. schlegelii* se describió a partir de individuos colectados durante la expedición nueva granada por Berthold (1846) y se define el municipio de Popayán del departamento del Cauca, Colombia, como la localidad tipo (Gómez & Buitrago-González, 2017). El nombre de *Bothriechis schlegelii* proviene de las palabras griegas *Bothrops* y *echis*, que significan “foso” y “víbora” respectivamente, haciendo referencia a la estructura de termo recepción ubicada en su región loreal (foseta termoreceptora) y en honor al zoólogo Alemán Hermann Schlegel (Arteaga *et al.* 2013). *B. schlegelii* es la especie más ampliamente distribuida del género, se encuentra desde Centroamérica hasta el Norte de Suramérica (Uetz & Hosek, 2014). Es la única especie del género distribuida en Colombia, desde

el nivel del mar hasta los 2640 m.s.n.m. habitando bosques húmedos tropical, subtropical y bosques montanos, presenta dos o tres escamas supraoculares proyectadas, por lo que se le conoce como víbora de pestañas, su coloración es variable, de amarillo a tonos verdes salpicadas de puntos negros (Campbell & Lamar, 2004). *B. schlegelii* aparece como una de las especies de importancia médica en Colombia (Otero-Patiño *et al.*, 1992b, 2002; Charry, 2006; Rodríguez-Vargas, 2012; Walteros *et al.*, 2014), sin embargo, el veneno de esta especie es poco conocido para poblaciones colombianas, lo que genera una cantidad limitada de datos sobre estos venenos y condiciona la posibilidad de entender y manejar mejor los casos clínicos ocasionados por esta especie.

2.4 El estudio del veneno de *Bothriechis* (Peters, 1859)

En el género *Bothriechis*, todas las especies presentan hábitats arbóreos y un rango de presas muy similar. Se ha reportado la composición del veneno de varias especies ya sea de forma independiente (Fernández *et al.*, 2010; Lomonte *et al.*, 2012) o en el mismo estudio (Lomonte *et al.*, 2008; Pla *et al.*, 2017) mostrando una notable variación entre el veneno de sus diferentes especies, tanto en composición como en actividades.

Lomonte *et al.* (2008) reportaron en el veneno de *B. lateralis* y *B. schlegelii* de Costa Rica, ocho y siete familias de proteínas en sus venenos respectivamente, la principal familia de proteínas en el veneno de *B. lateralis* fueron las Metaloproteinasas (SVMP), mientras que en *B. schlegelii* las Fosfolipasas (PLA₂), con el 55% y 44% del total de las proteínas del veneno respectivamente.

B. nigroviridis presenta siete diferentes familias de proteínas, siendo PLA₂ tipo crotoquinas (38%) y péptidos vasoactivos (37%) los más representativos en su proteoma del veneno. Tiene la

más alta letalidad entre las otras especies de *Bothriechis* ya estudiadas y su proteoma arroja una ausencia de SVMP (Fernández *et al.*, 2010).

Dentro del proteoma de *B. supraciliaris* se observó por primera vez para una especie del género, unos pequeños péptidos poliglicina similares a inhibidores de metaloproteinasas reportados para especies viperinas del viejo mundo. Además, *B. supraciliaris* presenta 11 familias proteicas en su veneno. Péptidos potenciadores de bradiquininas (22%), serinproteinasas (15%) y PLA₂ (13,4%) aparecen como los componentes principales en su veneno (Lomonte *et al.*, 2012).

En un estudio más reciente realizado por Pla *et al.* (2017) con especies de *Bothriechis* de Guatemala: *B. thalassinus*, *B. aurifer*, *B. bicolor*, y de Honduras: *B. marchi*, se encontró no solo gran divergencia entre los venenos de estas especies, también con los venenos ya reportados de otras especies del género. Además, encontró variación en los componentes del veneno de neonatos y adultos de *B. schlegelii* y *B. lateralis*.

Toda esta notable variación entre el veneno de las especies del género *Bothriechis* podría llegar a ser producto de diferentes respuestas al mismo propósito trófico (Lomonte *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2010; Prezotto-Nieto, 2016). Esto pone al género *Bothriechis* como un posible modelo, útil para explorar un poco más sobre los mecanismos que llevan a la diversificación de los venenos.

Además de la caracterización del proteoma del veneno de *B. schlegelii* para Costa Rica, se ha llegado a caracterizar las actividades de compuestos específicos como fosfolipasas miotóxicas (Angulo *et al.*, 1997) y una proteína similar a un inhibidor tipo kazal presentes solo en dos especies del género *Bothriechis*, que no es letal y solo se observó una inhibición parcial en la actividad de la tripsina (Fernández *et al.*, 2016).

En cuanto a las manifestaciones del veneno de *B. schlegelii*, éstas parecen tener marcadas diferencias entre individuos de Costa Rica y Colombia. Mientras para Costa Rica *B. schlegelii* experimentalmente mostró su veneno junto con el de *Bothrops asper* como los más hemorrágicos y mionecróticos (Bolaños, 1982), en Colombia los envenenamientos ocasionados por esta especie pueden con frecuencia resultar un poco más leves (Otero-Patiño *et al.*, 1992b; 2002).

Un trabajo en el que se comparó las actividades biológicas y bioquímicas entre los venenos de *B. schlegelii* de Costa Rica y Colombia, reportó que el veneno de los individuos de Costa Rica es más edemático y marcadamente más hemorrágico y letal que el de los individuos de Colombia (Prezotto-Nieto, 2016).

Acceder al perfil biológico y bioquímico del veneno de *B. schlegelii* para Colombia, no solo podría ampliar el panorama que se tiene sobre la diversidad en el veneno dentro del género, además se podría llegar a compuestos con cierta utilidad. Vargas-Muñoz *et al.* (2014) lograron aislar y caracterizar una enzima capaz de inhibir el crecimiento de bacterias como *Streptococcus aureus* y *Acinetobacter baumannii*, a partir del veneno de *B. schlegelii* de Colombia.

3. Materiales y métodos

3.1 Obtención y procesado del veneno

Se realizaron salidas de campo a diferentes localidades dentro del departamento de Santander, en la Vda Esparta del municipio de Santa Bárbara, la Vda Mérida alta del municipio de San Vicente

de Chucuri y la Vda La Bodega del municipio de El Carmen de Chucuri, las cuales se tenían como áreas de distribuciones confirmadas o potenciales para la especie de interés. El muestreo se realizó siguiendo el método de búsqueda libre y sin restricciones (Angulo *et al.*, 2006), bajo el permiso marco de colecta de especímenes otorgado a la Universidad Industrial de Santander por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA) mediante la resolución 0047 del 2015, al área de Bioquímica, en este caso con la química Stelia Carolina Méndez Sánchez del grupo de investigación en bioquímica y microbiología, como la investigadora amparada por el mismo. Una vez colectados los individuos, el veneno de cada uno de éstos se obtuvo por extracción manual y se guardó en crio viales esterilizados. Se liofilizaron y almacenaron a -20°C hasta su utilización. Para los diferentes ensayos que se realizaron, se preparó un pool con el veneno de los individuos colectados en Santander, y otros con el de individuos de Antioquia (Valle de Aburrá, Suroeste y Caldas) y Caldas (Salamina), los cuales fueron suministrados por el grupo de ofidismo y escorpionismo de la Universidad de Antioquia y el serpentario del instituto nacional de salud respectivamente.

3.2 Fraccionamiento cromatográfico por HPLC en fase reversa (RP).

Se utilizaron 2 mg de veneno de cada individuo de *B. schlegelii* colectados en Santander disueltos en 250 μl de agua con 0.1% de ácido Trifluoroacético (TFA, solución A). Con el fin de retirar el material insoluble se realizó una centrifugación 4500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Para separar las proteínas del veneno se utilizó un sistema Shimadzu 20A equipado con un detector DAD (215nm) y una columna para HPLC en fase reversa C18 (250 x 4.6 mm, 5 μm

tamaño de partícula), por la cual se pasó un flujo de 1 ml/min con un gradiente lineal de solución A y Acetonitrilo 99% (solución B). Las condiciones de elución fueron las siguientes: una elución por gradiente de 0 – 15% de B por 15 minutos, 15 – 45% de B por 60 minutos, 45 – 70% de B por 10 minutos y por último 70% de B por 5 minutos. Las fracciones se colectaron manualmente, fueron secadas en una centrifuga vacuum (Savant) y refrigeradas hasta ser utilizadas para su caracterización.

Adicionalmente, 2 mg de veneno del pool de Santander, Antioquia y Caldas, se procesaron y separaron en las mismas condiciones, con el fin de determinar el perfil cromatográfico.

3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Las separaciones electroforéticas se realizaron siguiendo el protocolo para electroforesis en gel de poliacrilamida del manual de métodos inmunológicos del Instituto Clodomiro Picado (Lomonte, 2007).

Para determinar los perfiles electroforéticos de los pools de Santander, Antioquia y Caldas y de los venenos completos de cada individuo de Santander, se tomaron 20 µg de cada uno y se cargaron en geles de poliacrilamida al 15%. La separación se realizó a 110 V durante 150 minutos en una cámara electroforética Bio-Rad.

En el caso de las fracciones obtenidas por RP-HPLC, se tomaron 10 µl de cada una, se redujeron con β-Mercaptoetanol y se cargaron en los geles en las condiciones descritas anteriormente.

En todos los casos, una vez terminado el tiempo de corrida, los geles se sumergieron en solución fijadora (Metanol, ácido acético glacial y agua) durante 15 minutos con agitación suave.

Para la detección de las bandas, los geles se colocaron en azul de Coomassie R-250 durante una hora con agitación suave y luego de esto, se eliminó el exceso de colorante con una mezcla de Metanol, Etanol, Ácido acético y agua. Se utilizaron marcadores de peso molecular Kaleidoscopio Bio-Rad de 10 bandas con un rango de 10 - 250 kDa.

3.4 Actividades biológicas in-vitro

La evaluación de las actividades biológicas se llevó a cabo sobre el pool del veneno completo de Santander, Antioquia y Caldas. El veneno de *Bothrops asper* se utilizó como control.

3.4.1 Actividad de fosfolipasas A₂. La actividad fosfolipásica se evaluó por dos métodos: de manera indirecta, utilizando el método de formación de hemólisis sobre yema de huevo y actividad directa sobre el sustrato monodisperso 4-NOBA.

3.4.1.1 Hemólisis indirecta. Para medir la actividad hemolítica del veneno, se preparó agarosa para tres platos (25ml/plato) al 0.8% con PBS. Se calentó hasta quedar homogénea (Transparente), se dejó enfriar hasta 70° C, una vez que alcanzó un rango entre 48 – 52° C, se agregaron 250 µl de Cloruro de calcio (CaCl₂) a 0.01M, 300 µl de yema de huevo en PBS, y 300 µl de eritrocitos aislados (previamente lavados con PBS), en agitación constante y se vertió la mezcla en una placa para dejar gelificar. Una vez gelificado, se abrieron pozos y se agregó 10 µg de cada pool de veneno. Se dejó incubando en una cámara húmeda a 37° C durante 20 horas. Se midieron los halos hemolíticos una vez finalizada la incubación.

3.4.1.2 Actividad de fosfolipasas A_2 sobre el sustrato monodisperso 4-NOBA. Para medir la actividad de las fosfolipasas A_2 en los venenos, se preparó una mezcla conteniendo 200 μ l de solución tampón (Tris-HCl 10 mM, $CaCl_2$ 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0), 20 μ l de 4-NOBA (4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid, 1mg/mL) y 20 μ l (20 μ g) de cada pool de veneno diluido en el mismo buffer. La mezcla se incubó a 37° C durante 60 minutos en microplacas, posteriormente se determinó la absorbancia a 405 nm usando un lector de placas de ELISA. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. El veneno de *B. asper* y el sustrato sintético (4-NOBA) sin veneno se usaron como controles positivo y negativo, respectivamente. (Cho & Kézdy, 1991; Holzer & Mackessy, 1996).

3.4.2 Actividad proteolítica. La actividad proteolítica se evaluó por dos métodos: actividad proteolítica usando como sustrato azocaseína y actividad proteolítica sobre sustrato BAPNA.

3.4.2.1 Actividad proteolítica sobre Azocaseína. Para medir la actividad proteolítica sobre azocaseína se siguió el protocolo adaptado de Wang *et al.*, (2004). Se preparó una solución del veneno en un amortiguador que contiene Tris-HCl 25 mM, NaCl 0.15 M y $CaCl_2$ 5 mM a un pH de 7.4. Se agregaron 20 μ l de solución del veneno (1 μ g/ μ l) a 100 μ l de solución de azocaseína en tubos Eppendorf y se incubaron durante 90 minutos a 37° C. Se agregaron 200 μ l de solución de ácido tricloroacético al 5% a cada tubo, se mezclaron y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos. Se tomó 100 μ l del sobrenadante y se depositaron en hoyos de placas de ELISA junto con 100 μ l de solución de NaOH a 0.5 M. finalmente se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de ELISA. Las pruebas se hicieron por triplicado y una muestra con sustrato, pero sin veneno se incluyó como control negativo.

3.4.2.2 Actividad proteolítica sobre BAPNA. Para esta prueba se siguió la metodología propuesta por Erlanger *et al.*, (1961) adaptada para micro platos. Se utilizó una mezcla conteniendo 200 µl de solución de sustrato DL-BAPNA (N α -BENZOIL-DL-ARGININA ρ -NITROANILIDA) a 10 M disuelto en Dimetilsulfoxido (DMSO), 50 µl de amortiguador (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ a 10 mM, NaCl a 100 mM, pH 8.0) y 10 µl de agua (Control) o del veneno para un volumen final de 260 µl que se depositó en hoyos de placas de ELISA. Se incubó durante 40 minutos a 37° C y se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector de placas de ELISA. El ensayo se realizó por triplicado.

3.4.3 Actividad de L-amino ácido oxidasa. La actividad enzimática se determinó por adición de 10 µg de veneno (en 10µL de agua) a 90 µL de buffer que contiene 250 µM de L-Leucina, 2 mM de o-fenilendiamina, y 0.8 U/ml de peroxidasa, en 50 mM Tris, pH 7.5. Los ensayos se montaron por triplicado en pozos de microplatos. Se incubó por 60 min a 37 °C. La reacción se detuvo adicionando 50 µL de H₂SO₄ 2M y la absorbancia se registró a 492nm.

3.4.4 Actividad Procoagulante. A 200 µl de plasma humano citratado, se le adicionaron diferentes concentraciones de veneno desde 3,125 µg hasta 50 µg en 50µl de PBS pH 7.2. Como control positivo se utilizó veneno de *B. asper* y PBS como control negativo. Se registró el tiempo (segundos) que tardó el plasma en coagular a 37° C, con cada una de las dosis hasta un máximo de 5 minutos de observación (1.800 segundos). Todas las pruebas se realizaron por triplicado (Theakson & Reid, 1983; Gené *et al.*, 1989).

3.4.5 Análisis estadístico. Para determinar las diferencias en las actividades de Fosfolipasas A₂, Proteolíticas y de L-amino ácido oxidasa entre los venenos de *B. schlegelii* de diferentes zonas (Santander, Antioquia y Caldas) y con el veneno de *B. asper*, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, con un nivel de significancia de $p < 0,05$. Una vez que se realizó el análisis de varianza, si los venenos presentaron comportamientos distintos, se determinó entre que venenos específicos hubo diferencias, mediante una prueba de comparaciones múltiples (Test de Bonferroni).

4. Resultados

4.1 Colecta de ejemplares de *B. schlegelii* y extracción de veneno

En las salidas de campo que se llevaron a cabo durante los meses de Junio del 2017 – Febrero del 2018, se obtuvieron muestras de venenos de seis individuos, cinco hembras y un macho. Cuatro de éstos pertenecientes a la vereda Esparta, municipio de Santa Bárbara, un individuo de la vereda La Bodega, del municipio El Carmen de Chucurí y otro de la vereda Marida alta, del municipio San Vicente de Chucurí (Figura 4). Teniendo en cuenta el tamaño que pueden alcanzar los adultos de la especie, se consideró el individuo N°3 en estado juvenil (Tabla 1).

Tabla 1.

Información general de los especímenes de B. schlegelii colectados en Santander durante la fase de campo.

Individuo	Localidad		Sexo	Estado ontogenico	Longitud total (mm)
	Vereda	Municipio			
Individuo # 1	Esparta	Santa Bárbara	Hembra	Adulto	600
Individuo # 2	Esparta	Santa Bárbara	Hembra	Adulto	630
Individuo # 3	Esparta	Santa Bárbara	Hembra	Juvenil	420
Individuo # 4	Esparta	Santa Bárbara	Hembra	Adulto	710
Individuo # 5	Mérida alta	San Vicente de Chucurí	Macho	Adulto	510
Individuo # 6	La Bodega	El Carmen de Chucurí	Hembra	Adulto	890

Se observaron algunas diferencias en los patrones de coloración entre los individuos colectados, siendo marcada entre los especímenes de diferentes localidades. Así, los individuos encontrados en el municipio de Santa Bárbara (Ver Tabla 1) se caracterizaron por presentar un color base verde claro que se va tornando en tono agua marina hacia la región ventral, con una serie de manchas intercaladas de color oscuro a lo largo de la región dorsal que se tornan verdes hacia la región dorso – lateral. La parte superior de la cabeza presenta escamas salpicadas de color verde y negro de patrón irregular y ausencia de banda post-ocular, ojos de color rojo. Las escamas labiales y de la región ventral de la cabeza presentan un agua marina con manchas negras y verdes (Figura 5A, B y D). Para esta localidad, este patrón de coloración fue poco variable a excepción del individuo No 3 (Tabla 1), el cual presentó un patrón de coloración en general más oscuro y con manchas de un color amarillo verdoso distribuidas a lo largo de ambos costados y en las escamas labiales (Figura 5C).

El individuo encontrado en el municipio de San Vicente de Chucurí presenta un color verde lima opaco con manchas dorsales de color negro, manchas del mismo color de las dorsales pero más pequeñas que se distribuyen por ambos flancos a lo largo de todo el animal. Ojos del mismo tono verde del cuerpo y presencia de una banda post-ocular de color oscura, vientre verde lima con pequeños puntos negros (Figura 5E). El individuo perteneciente al municipio del Carmen de Chucurí presentó color verde lima con algunas regiones amarillosas, manchas negras bien definidas presentes a lo largo de la región dorsal y casi ausentes en los laterales. Presencia de banda post-ocular del mismo tono de las manchas dorsales y ojo de color café ocre (Figura 5F).

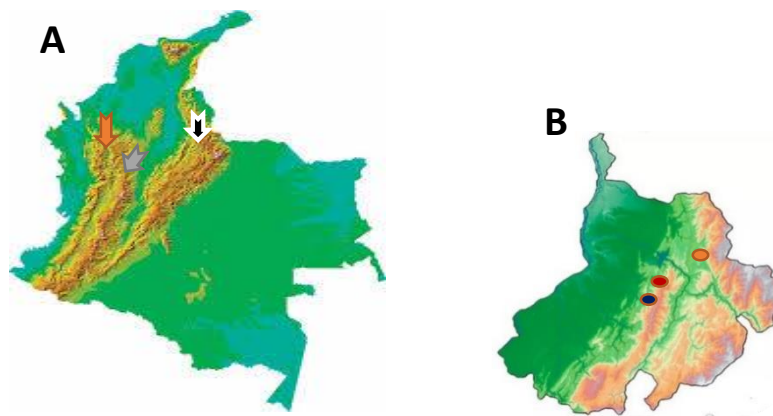


Figura 4. (A) Mapa de Colombia en el que se muestra las zonas de las que se llegó a obtener muestras de veneno de *B. schlegelii*. Flecha naranja: Antioquia, flecha gris: Caldas y flecha negra: Santander. (B) mapa del departamento de Santander mostrando las tres localidades en las que se colectaron los especímenes de *B. schlegelii*. Naranja: Santa Bárbara, Rojo: San Vicente de Chucurí y Azul: El Carmen de Chucurí.

Mediante extracción manual de los individuos de Santander se obtuvo 2.77 mL de veneno total, que después de ser liofilizado representaron 258.9 mg de veneno liofilizado. La cantidad de veneno en las extracciones por individuo fue variada y el rango de contenido seco osciló entre 122 – 156 mg/mL de veneno (Ver tabla 2).

Los venenos extraídos de los diferentes individuos no presentaron diferencias cualitativas importantes. Todos se observaron como un líquido viscoso de color amarillo, una vez liofilizados los venenos secos mantuvieron la coloración observada en estado líquido.

Tabla 2.

Información de las cantidades de veneno obtenidas por individuo

Individuo	Volumen total de veneno (mL)	No de ordeños	Total liofilizado (mg)	Concentracion (mg/mL)
Individuo #1	0,042	1	6,33	150,7
Individuo #2	0,304	2	47,46	155,9
Individuo #3	0,092	1	14,42	155,4
Individuo #4	0,137	1	17,16	125
Individuo #5	0,126	2	19,54	154,5
Individuo #6	1,26	3	154,06	122

Adicionalmente el veneno de ejemplares provenientes de Antioquia y Caldas fue suministrado por el Programa de Ofidismo y Escorpionismo de la Universidad de Antioquia y el serpentario del Instituto Nacional de Salud, respectivamente.



Figura 5. Individuos colectados en Santander. A, B, C, y D. individuos colectados en Vda Esparta del municipio de Santa Bárbara – Santander. E. individuo colectado en la Vda Merida alta, municipio San Vicente de Chucurí – Santander. F. individuo colectado en la Vda La Bodega, municipio el Carmen de Chucurí – Santander. Fotos A y F: Elson Meneses – Pelayo. Fotos B, C, D y E: Jeisson Gómez Robles.

4.2 Fraccionamiento cromatográfico de los venenos

Se obtuvo el perfil cromatográfico del pool Santander (conformado por los venenos de los individuos colectados en este departamento), se observaron 35 picos como se observa en la figura 6. Donde se destacan las fracciones 13, 24 y 25 debido a su abundancia, siendo la fracción 24 mayoritaria.

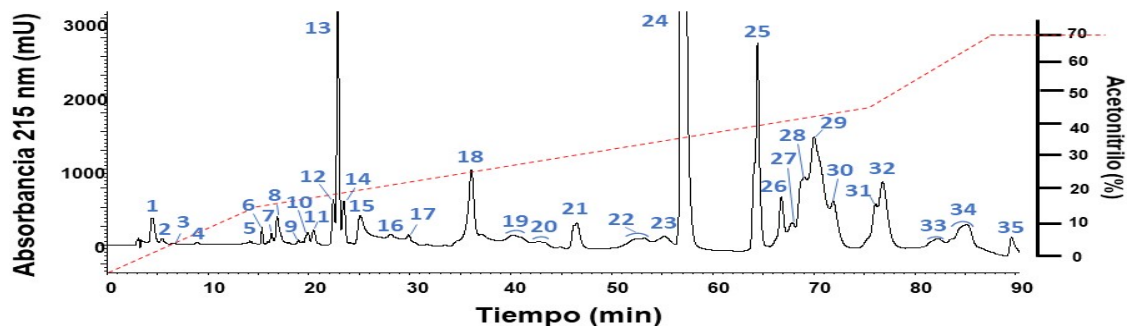


Figura 6. Perfil cromatográfico de las proteínas del veneno de *B. schlegelii* de Santander por RP-HPLC usando el método ya descrito.

De igual manera, se obtuvieron los perfiles cromatográficos individuales de los seis ejemplares colectados en Santander (Figura 7), fue evidente la similitud entre ellos en la región inicial y media del cromatograma, así como algunos cambios puntuales principalmente entre los picos que aparecen entre los 60 y 80 minutos. Se observó un pico exclusivo en el individuo 3, que eluyó a los 45.5 minutos, que a su vez resultó ser el pico más representativo en este cromatograma (Figura 7 (flecha negra)).

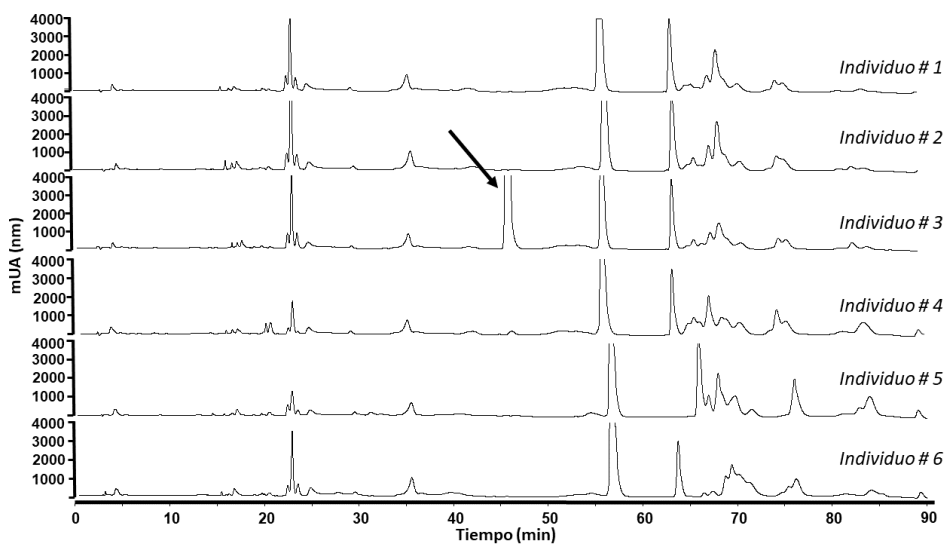


Figura 7. Perfiles cromatográficos de las proteínas del veneno de los individuos de *B. schlegelii* colectados en Santander (ver tabla 1) por RP-HPLC usando el método ya descrito.

Al comparar los perfiles cromatográficos de los pools Antioquia, Santander y Caldas, se observaron nuevamente variaciones en la región comprendida entre 55 y 90 minutos. Cuyos cambios estuvieron relacionados con el número de picos y la intensidad de los mismos, como se muestra en la figura 8B.

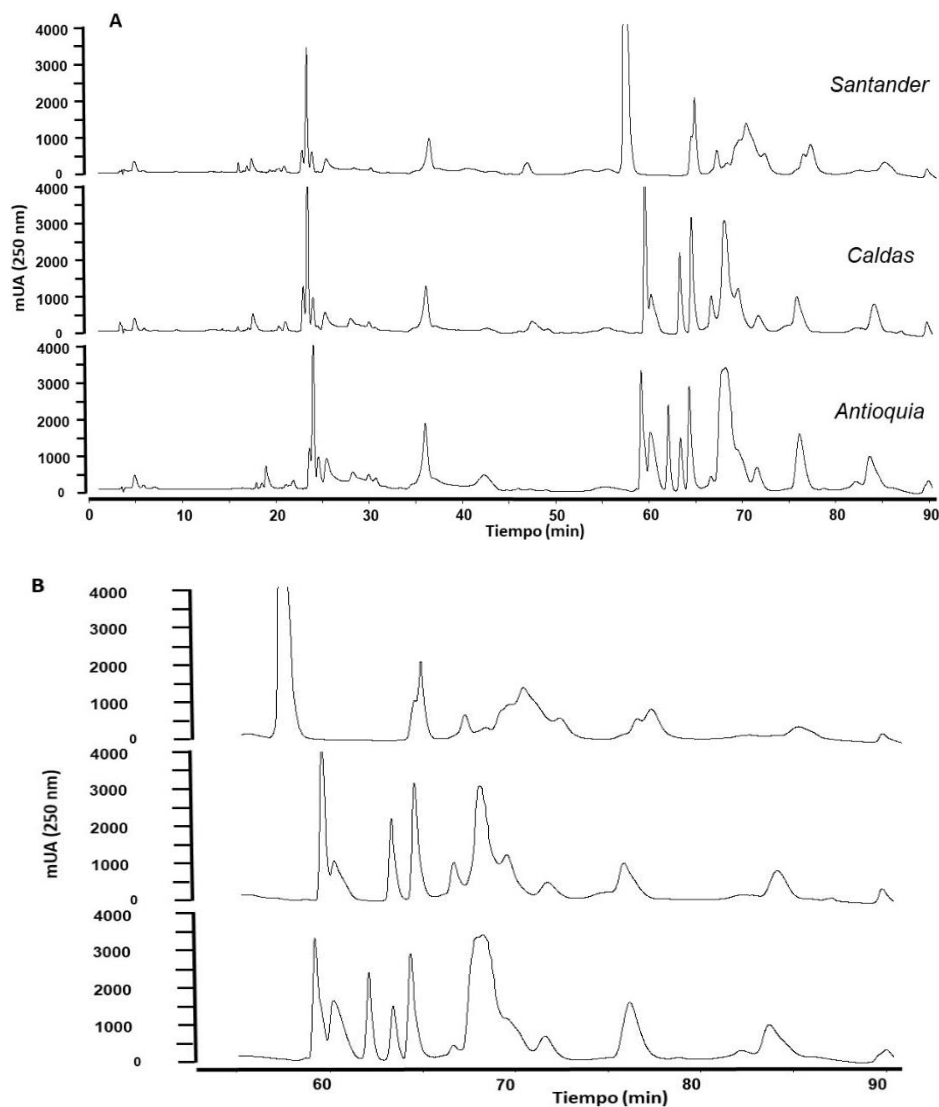


Figura 8. (A) Perfil cromatográfico de las proteínas del veneno de *B. schlegelii* de Santander, Caldas y Antioquia por RP-HPLC usando el método ya descrito. (B) Región comprendida entre 60 – 80 minutos ampliada, en la cual se observaron las diferencias más importantes entre los cromatogramas.

4.3 Fraccionamiento electroforético de los venenos

Los perfiles electroforéticos de los venenos de los individuos colectados en Santander mostraron patrones similares, con tres regiones claramente distinguibles en las que se distribuyeron las bandas, una región principal que va de 20 – 37 kDa en la que se agruparon la mayoría de las bandas, una segunda región entre 50 – 75 kDa y una banda de aproximadamente 150 kDa presente en el veneno de todos los individuos (Figura 9).

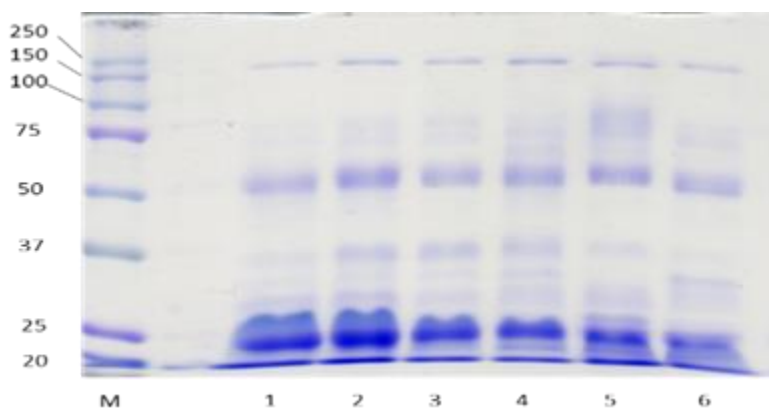


Figura 9. Perfil cromatográfico del veneno completo obtenido a partir de los individuos colectados en Santander (ver tabla 1). Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12 %. Valores en el Marcador de peso molecular (M) expresados en kDa.

Las fracciones obtenidas por HPLC en fase reversa fueron separadas en geles de acrilamida al 15%. Dieciocho de éstas no mostraron ninguna banda electroforética, por lo que solo se presentan los geles de las fracciones 19 – 35. Las bandas observadas se distribuyeron entre 12 – 250 kDa, mostrando la gran mayoría de estas entre 25 – 50 kDa (Figura 10).

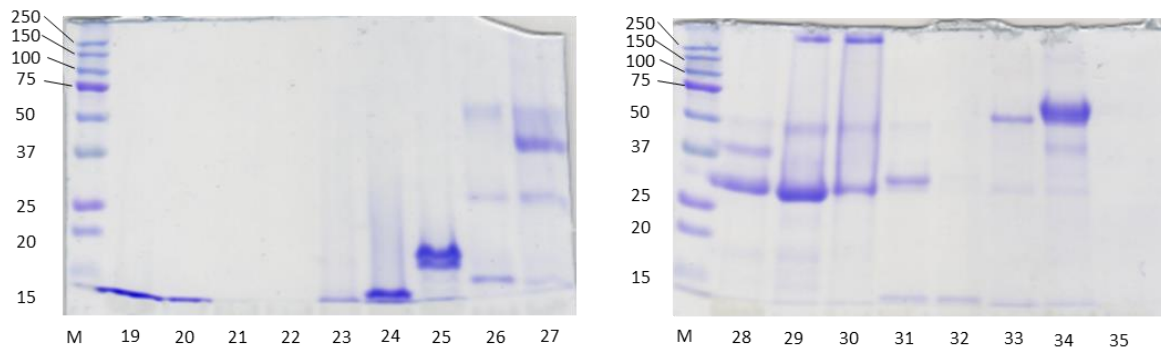


Figura 10. Perfil electroforético de las fracciones obtenidas por HPLC-RP a partir del veneno de Santander en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. Valores en los marcadores de peso molecular (M) expresados en kDa.

La comparación electroforética de los venenos de Antioquia y Caldas mostró un patrón similar al veneno de Santander, con las mismas tres regiones principales, diferenciándose solo en algunas pocas bandas y en la intensidad que presentaban en otras de las bandas presentes en la región que va de 20 – 37 kDa. El veneno completo de *B. asper* utilizado como comparación presentó un perfil electroforético con las mismas tres regiones, pero con la mayoría de las bandas concentradas en la región entre 15 – 25 kDa (Figura 11).

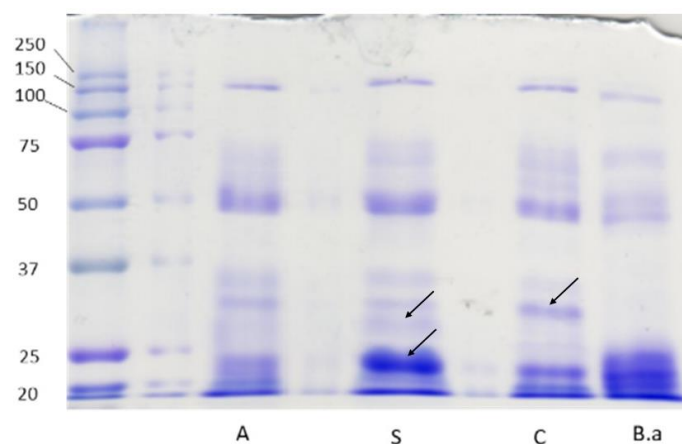


Figura 11. Perfil electroforético del veneno completo de *B. schlegelii* de Santander (S), Antioquia (A), Caldas (C) y del veneno de *B. asper* (B.a). Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12 %. Valores en los marcadores de peso molecular (M) expresados en kDa.

4.4 Actividades biológicas

Se observó que el veneno de *B. schlegelii* de Santander presentó actividad L-amino ácido oxidasa, proteolítica (sobre azocaseína y BAPNA), fosfolipasa A₂ (por los métodos NOBA y hemolítica indirecta) y coagulante dependiente de la dosis de veneno empleada (Figura 12A, 13A y B, y 14B), siendo en todos los casos significativamente menor que la desencadenada por el veneno de *B. asper*.

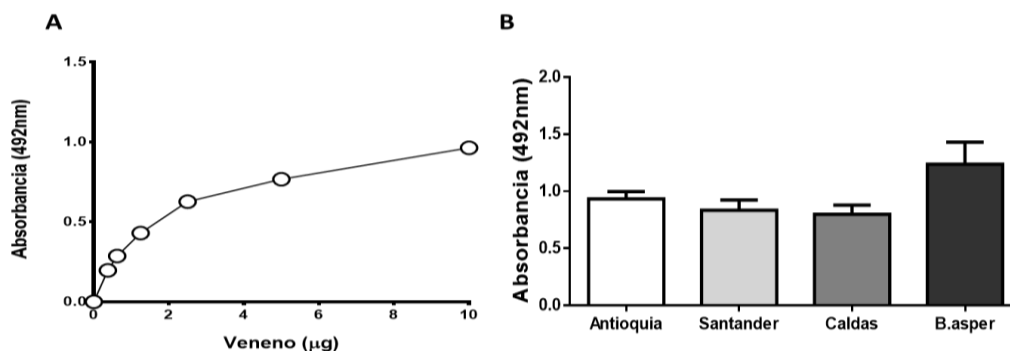


Figura 12. Actividad de L-amino Acido oxidasa in-vitro. (A) Dosis respuesta a la actividad de L-amino ácido oxidasa del veneno de *B. schlegelii* de Santander y (B) actividad L-amino ácido oxidasa de 20 µg del veneno de *B. schlegelii* de las diferentes zonas y *B. asper*.

Para las actividades LAAO y Fosfolipasa A₂, no se observaron diferencias entre las tres zonas geográficas (Santander, Antioquia y Caldas) (Figura 12B y Figura 14C), en contraste, la actividad proteolítica sobre los sustratos Azocaseína y BAPNA mostraron algunas diferencias, sobre azocaseína el veneno de Caldas fue significativamente mayor que las otras zonas, mientras que sobre el sustrato BAPNA presentó mayor actividad el veneno de Antioquia (Figura 13C y D). La mayor actividad hemolítica entre los venenos de *B. schlegelii* fue la inducida por el veneno de Santander, mientras que el veneno de caldas mostró la actividad más baja (Figura 14A).

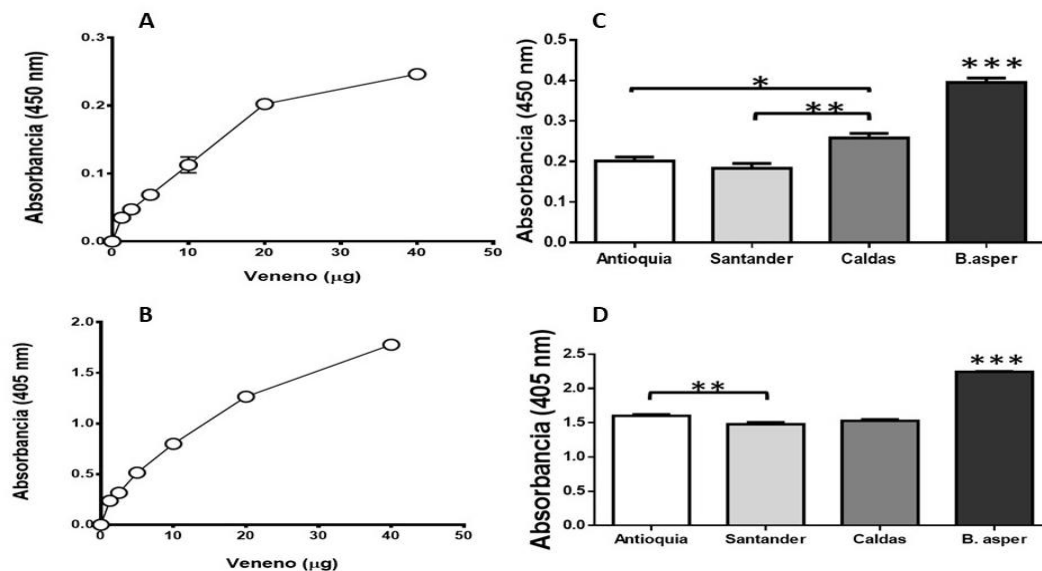


Figura 13. Actividad proteolítica in-vitro. (A) Dosis respuesta a la actividad proteolítica sobre azocaseína del veneno de *B. schlegelii* de Santander. (B) Dosis respuesta a la actividad proteolítica sobre BAPNA del veneno de *B. schlegelii* de Santander. (C) Actividad proteolítica sobre azocaseína de 20 µg del veneno de *B. schlegelii* de las diferentes zonas y *B. asper*. (D) actividad proteolítica sobre BAPNA de 20 µg del veneno de *B. schlegelii* de las diferentes zonas y *B. asper*.

Se obtuvieron los tiempos de coagulación en el plasma sanguíneo inducidos por el veneno de *B. schlegelii* a cuatro concentraciones diferentes. La concentración máxima evaluada fue de 80 µg en la cual se observó el menor tiempo de coagulación (50 segundos). Por otro lado, a la concentración mínima evaluada (10 µg) no se logró ver formación de coagulo hasta un tiempo máximo de observación de 5 minutos (300 segundos) (Figura 15).

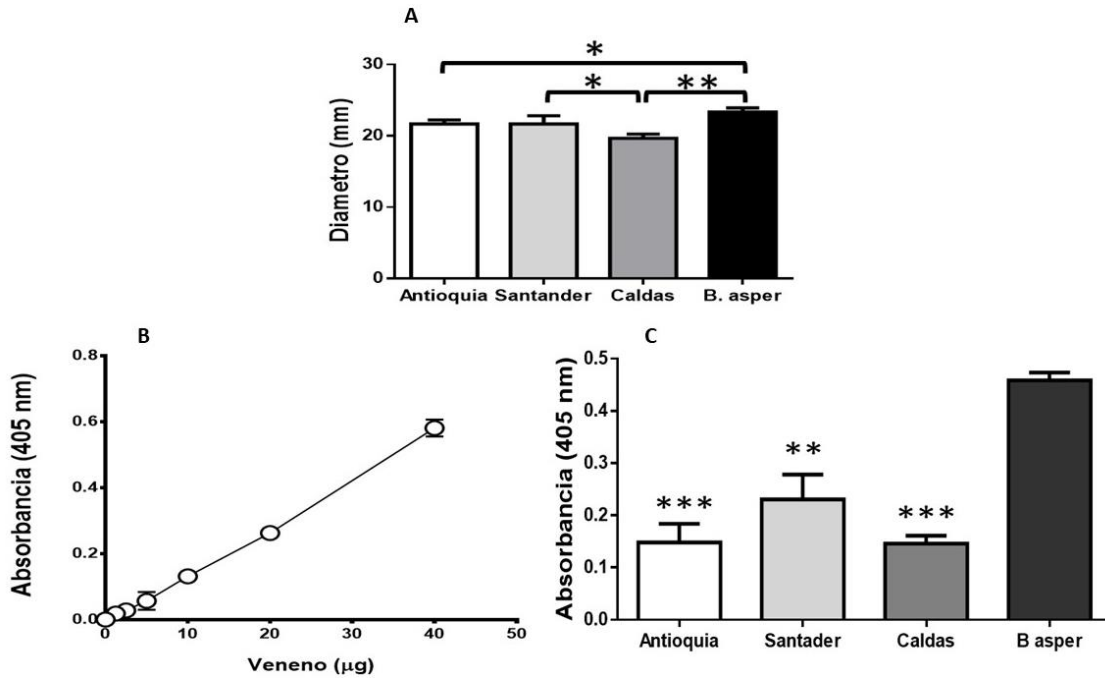


Figura 14. Actividad de fosfolipasas A₂ in-vitro. (A) Actividad hemolítica tanto del veneno de *B. schlegelii* de diferentes zonas, como del veneno de *B. asper*. (B) Dosis respuesta a la actividad de fosfolipasas A₂ del veneno de *B. schlegelii* de Santander. (C) Actividad fosfolipasica A₂ de 20 µg del veneno de *B. schlegelii* de las diferentes zonas y *B. asper*. (Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre las muestras de *B. schlegelii* de diferentes zonas con la muestra de *B. asper*).

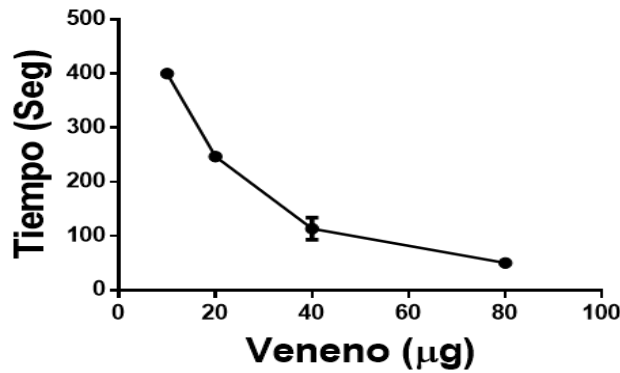


Figura 15. Tiempos de coagulación inducidos en plasma sanguíneo por diferentes dosis del veneno de *B. schlegelii* de Santander.

5. Discusión

B. schlegelii presenta a lo largo de su distribución natural diferentes patrones de coloración. Campbell & Lamar, (2004) describen fases de color de fondo típicos para la especie que van desde verde, verde oliva, hasta verde grisáceos salpicados de colores oscuros, los cuales concuerdan con los patrones de coloración observados en los individuos colectados para este trabajo (Figura 5). Sin embargo, estos difieren de los descritos para el departamento del Valle del Cauca (Colombia) y sus regiones circundantes los cuales presentan tonos marrones, gris oscuro o azulados (Campbell & Lamar, 2004).

Las coloraciones registradas en este estudio (Figura 4; Tabla 1) coinciden con la amplia variedad en la coloración que presenta *B. schlegelii* para Colombia (Gómez, 2014). Y las diferencias encontradas entre los individuos de Santa Bárbara (Figura 4A-D) y de San Vicente y El Carmen (Figura 4E, F) podrían estar relacionadas con las diferencias altitudinales entre las localidades, ya que para Colombia, se ha observado que los individuos de tierras altas presentan patrones de coloración más oscuros que los de tierras bajas (Daniel, 1949).

Los volúmenes de veneno que se obtuvieron durante los ordeños pueden estar relacionadas con el tamaño de la serpiente, llegando a obtener mayor volumen de los individuos más grandes. Así mismo, la relación entre el volumen y la masa de los venenos fue proporcional, a mayor volumen, mayor masa (Tabla 2). Estas observaciones coinciden con las ya reportadas en varias subespecies de *Crotalus oreganus* por Glenn & Straight, (1982); Mackessy, (1988) y (2003),

donde encontraron que el rendimiento en volumen de veneno incrementa exponencialmente con el tamaño de la serpiente y la relación entre el volumen del veneno y la masa del mismo es lineal.

De igual forma, la cantidad de veneno que se obtuvo de cada individuo entre los ordeños fue variable. Similar a lo observado en *Crotalus atrox*, donde la producción de veneno en cada extracción varía a través del tiempo (Minton, 1957). Resultados similares fueron observados en *Agkistrodon contortrix mokeson* y *Crotalus horridus horridus* (Minton, 1953) y *Pseudonaja textilis* (Williams & White, 1992).

El rendimiento del veneno seco por unidad de volumen entre los individuos fue similar exceptuando lo observado en los individuos número cuatro y seis (Tabla 2) que produjeron mayor cantidad. La razón de esto podría radicar en que estos dos individuos son los de mayor tamaño (Tabla 1).

Los factores que determinan la cantidad y la concentración del veneno liberado por las serpientes, y como esto puede llegar a variar, no solo entre individuos, sino también en un mismo individuo a lo largo del tiempo no son claros. Sin embargo, Kochva, (1960) en su trabajo realizado con la especie de víbora *Vipera palestinae*, encuentra que las serpientes pueden liberar cantidades variables del veneno disponible en sus glándulas y descarta procesos como la ecdisis, gravidez o ingesta de alimentos como factores que puedan llegar a influir en el rendimiento del veneno.

El fraccionamiento del veneno por HPLC representa una primera aproximación a la complejidad que éste presenta. Cada uno de los picos reflejados en el cromatograma de una muestra de veneno equivale al patrón de elución de uno o varios compuestos similares de carácter proteico presente en el veneno.

Los perfiles cromatográficos aquí presentados se obtuvieron siguiendo parte del enfoque conocido como venómica de serpientes propuesto por Calvete *et al.*, (2007). Este enfoque permite

conservar los gradientes y formas en los cromatogramas, por lo que es posible llegar a comparar dos o más cromatogramas con los mismos gradientes, incluso si tienen diferentes tiempos, con el fin de tener un acercamiento cualitativo de cuan diferentes pueden llegar a ser.

La cantidad de picos observados en el cromatograma del pool de Santander (Figura 6), refleja una diversidad similar a los previamente reportados para otras especies de la familia viperidae y a los reportados para la especie *B. schlegelii* de Costa Rica, tanto para individuos adultos (Lomonte *et al.*, 2008) como para juveniles (Pla *et al.*, 2017). Sin embargo, a pesar de mostrar una cantidad de picos similar, los patrones de elución de los mismos observados en los cromatogramas difieren. Contrario a esto, los patrones de elusión del cromatograma del pool de Santander (Figura 6) son similares a los reportados por Niño-Perez, (2018) para venenos de *B. schlegelii* de dos localidades de la región pacífica colombiana. Lo que indicaría la existencia de una diferencia marcada en la composición de los venenos de *B. schlegelii* de Colombia y Costa Rica, y esto a su vez encaja con las diferencias en las actividades enzimáticas desencadenadas por los venenos de ejemplares provenientes de Costa Rica y Colombia (Prezotto-Neto *et al.*, 2016).

Con el fin de explorar la existencia de diferencias cualitativas en los venenos aquí estudiados, se realizó una comparación entre los perfiles cromatográficos de los individuos colectados en Santander (Tabla 1) y entre un pool de éstos y el de muestras de dos zonas diferentes a Santander (Ver metodología). En ambos casos, las diferencias que se llegaron a observar correspondientes a la intensidad de algunos picos y a la presencia y ausencia de otros pocos, se encontraron principalmente en la última región de los cromatogramas, comprendida entre el minuto 55 – 90 (Figura 7 y 8).

Al comparar los cromatogramas de las muestras de venenos de Santander (Figura 7) (Tabla 1), éstas diferencias fueron casi nulas entre los individuos 1, 2 y 4 provenientes de la misma

localidad (Santa Bárbara), quienes mostraron 35 picos, mientras que dichas diferencias resultaron más evidentes al comparar los cromatogramas de los individuos 5 y 6, con 33 y 36 picos cada uno (San Vicente y El Carmen de chucuri, respectivamente), con los de los individuos de Santa Bárbara, los cuales se encuentran separados por el cañón del chicamocha. A su vez, ésta variación entre los perfiles fue más notoria al comparar el pool de Santander con venenos de individuos de otras dos zonas de Colombia (Figura 8). Esto concuerda no solo con los trabajos anteriormente realizados en otras especies de viperidos, en las cuales se ha encontrado variación en las características de veneno de individuos de la misma especie con diferentes distribuciones geográficas (Aguilar et al., 2007; Núñez *et al.*, 2009; Calvete *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2013), además, parece encajar con lo reportado por Calvete *et al.*, (2011) donde asegura que la variación en los venenos es más notoria entre poblaciones distantes.

A diferencia de la última región de los cromatogramas (minuto 55 – 90) en la que se evidencio la existencia de algunas diferencias, la primera región (40 minutos aproximadamente) se mostró bastante conservada. Esta variación reducida en las proteínas que eluyen en la primera parte del cromatograma también se pueden observar al comparar los perfiles cromatográficos de *B. schlegelii* de la región pacifica de Colombia (Niño-Pérez, 2008), de *B. asper* de panamá (Vélez *et al.*, 2017), de *B. atrox* de Perú, Ecuador y Brasil (Núñez *et al.*, 2009), así como en muestras de veneno de individuos de diferentes edades de *L. stenophrys* (Madrigal *et al.*, 2012) y en muestras de venenos de individuos de diferente sexo y estado ontogénico de *C. viridis viridis* (Saviola *et al.*, 2015). Con lo cual podríamos especular que las proteínas que eluyen en la sección inicial del cromatograma son generalmente conservadas entre especímenes de la misma especie, pudiendo descartar variaciones intraespecíficas en esta región proteica.

La razón detrás de estas observaciones podría radicar en el hecho de que en la primera región de los cromatogramas de venenos de viperidos eluyen principalmente pequeñas proteínas, pertenecientes a algunas familias proteicas con funciones reguladoras (mantenimiento) o que representan pequeñas cantidades en el total del veneno, como es el caso de los péptidos potenciadores de bradikinina (BPPs), péptidos natriureticos tipo C (CNP) y factores de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) que se encontraron en la primera región cromatográfica en los venenos de *B. schlegelii* de Costa Rica (Lomonte *et al.*, 2008; Pla *et al.*, 2017). Consecuentemente, estas proteínas en menor proporción y con funciones conservadas, tienen poca participación en las dinámicas evolutivas Depredador – Presa, lo que resulta en pocas o nulas presiones de selección (Vonk *et al.*, 2013). Contrario a esto, la última mitad de los cromatogramas presenta proteínas, que pertenecen a familias proteicas como las PLA₂, SVMPs, SVSPs, LAAOs, entre otras, que tienen mayor relevancia en el envenenamiento de las presas y una mayor representatividad (mayor abundancia) en el total del veneno, por lo que exhiben una mayor variación (Casewell *et al.*, 2014).

Adicionalmente, la aparición de un pico exclusivo en el cromatograma perteneciente al individuo número 3 (Figura 7 (Flecha negra)), podría estar indicando un posible cambio a nivel ontogénico en la composición del veneno, ya que dicho cromatograma pertenece al único individuo juvenil colectado en este estudio (Ver Tabla 1). La ocurrencia de variación ontogénica en los venenos de serpiente es un fenómeno bien documentado desde hace más de 70 años (Gutierrez, Chavez & Bolaños, 1980; Furtado *et al.*, 1991; Chippaux, Williams & White, 1991). Estudios previos han reportado la existencia de variación en la composición de los venenos a nivel ontogénico de *B. schlegelii* y *B. laticaralis* de Costa Rica (Pla *et al.*, 2017). Además, este fenómeno ha sido también reportado para varias especies de la familia viperidae del nuevo mundo, por

ejemplo Alape-Giron *et al*, (2008) encuentran un cambio entre los venenos de neonatos y adultos de *B. asper* de Costa Rica. Madrigal *et al*, (2012) reportan diferentes composiciones en los venenos de neonatos, juveniles y adultos de *Lachesis stenophrys* y Saviola *et al*, (2015) reportan un cambio ontogénico en el veneno de *C. viridis viridis* marcado por un decrecimiento en el contenido relativo de SVMPs y el aumento de pequeñas miotoxinas básicas y serinoproteinasas. De acuerdo al tiempo de elución, el pico exclusivo encontrado en el veneno del individuo número 3 (Figura 7 (Flecha negra)), corresponde al pico número 21 observado en el cromatograma del pool de Santander (Figura 6), el cual presenta una intensidad mucho menor a la del cromatograma del individuo número 3, ya que el veneno de este último representa solo una pequeña fracción del pool total de Santander.

A pesar de que se llegó a observar diferencias entre los cromatogramas, existen trabajos previos en los que se puede observar pequeñas diferencias entre perfiles cromatográficos de diferentes individuos de la misma especie, sin que dichas cambios lleguen a representar una diferencia significativa en la composición y efectos tóxicos de los venenos (Calvete *et al.*, 2011; Vélez *et al.*, 2017). Por esta razón, resulta necesario complementar estos resultados con análisis de espectrometría de masa para poder aclarar cuan significativas resultan ser estas diferencias en los proteomas de cada uno de los venenos y por ende en sus posibles actividades.

Los patrones electroforéticos tanto de los individuos de Santander (Figura 9) como los de las diferentes zonas (Figura 11) fueron en general bastante similares, mostrando las mismas tres regiones principales en las que migraron las proteínas. En la primera región comprendida entre 15-37 kDa se observan bandas que podrían corresponder a proteínas de familias como PLA₂, CRISPs, Lectinas tipo C, SVMPs tipo I, en la segunda región que va desde 50-75 kDa se encuentran principalmente bandas que podrían estar asociadas a SVMPs tipo III, 5'-nucleotidasas y

hialuronidasas, en la última región se observa una banda de aproximadamente 150 kDa que podría tratarse de una fosfodiesterasa (Mackessy, 2010).

Sin embargo, fue posible observar algunas diferencias entre los perfiles (Figuras 9 y 11 (Flechas negras)), las cuales probablemente estén relacionadas con las diferencias encontradas entre los perfiles cromatográficos de los mismos venenos (Figura 7 y 8).

Las rangos en los que se observaron en los geles, las proteínas tanto de los venenos completos de *B. schlegelii* como las del veneno de *B. asper* (Figura 9 y 11), son similares a los observados en venenos de otras especies americanas de la familia viperidae como *L. stenophrys* (Madrigal *et al.*, 2012), *C. viridis viridis* (Saviola *et al.*, 2015), *Porthidium lansbergii lansbergii* (Jimenez-Charris *et al.*, 2015) y *B. asper* de panamá (Vélez *et al.*, 2017). Esto, se debe a que, si bien la composición de los venenos entre especies de la familia o incluso dentro de la misma especie puede llegar a variar, estas diferencias están enmarcadas dentro de un set limitado de familias proteicas, conservando así propiedades bioquímicas muy similares (Mackessy, 2010).

Al realizar la separación de las fracciones obtenidas por HPLC (Figura 6), las primeras 18 fracciones no mostraron banda electroforética. De acuerdo a trabajos previos realizados con el veneno de *B. schlegelii* (Lomonte *et al.*, 2008; Niño-Pérez, 2018) y lo reportado por Lomonte & Calvete, (2017), esto se debe a que en esta región del cromatograma eluyen los péptidos potenciadores de bradikinina e inhibidores tipo Kazal

Teniendo en cuenta el análisis proteómico realizado con el veneno de *B. schlegelii* de Costa Rica (Lomonte *et al.*, 2008), donde se observan los tiempos de retención en la que eluyeron las fracciones, así como la masa molecular observada por electroforesis, se podría hacer una aproximación sobre la familia de proteína a la cual pertenece cada pico obtenido en el veneno de Santander. En este sentido, las fracciones 19, 20, 23-27 y 29-34 presentaron bandas con pesos

moleculares en un rango entre 15-20 kDa, que pueden corresponder con proteínas pertenecientes a la familia de las PLA₂.

De igual forma, las fracciones 26 y 27 mostraron bandas electroforéticas con peso molecular aproximado de 25 kDa y 50 kDa que podrían pertenecer a una proteína secretora rica en cisteínas (CRISP) y una LAAO o Metaloproteinasa tipo III (SVMP-PIII), respectivamente. En las fracciones 27 y 28 se observó una banda entre los 37 y 50 kDa que podría tratarse de serinoproteinasas (SVSP). Además, en la fracción 28 también se encontró una banda sobre los 25 kDa que podría llegar a ser igualmente una SVSP tipo I y otra banda de aproximadamente 50 kDa posiblemente de una SVMP-PIII, no podría descartarse que se trate de una forma dimérica de esta misma proteína. Las fracciones 29-31, 33 y 34 mostraron sus principales bandas electroforéticas en un rango de 25-50 kDa las cuales pueden llegar a ser SVSPs, CRISPs, LAAOs y SVMPs-PIII.

La composición de los venenos puede presentar variación de tipo intraespecífico, que puede estar relacionada a factores, genéticos, estacionales, de dieta, sexo y distribución geográfica (Chippaux, Williams & White, 1991; Moura-da-silva *et al.*, 2003; Zelanis *et al.*, 2010; Prezotto-Neto *et al.*, 2016). Esta variabilidad en los venenos puede conllevar a cambios en las características clínicas de los envenenamientos, por lo que envenenamientos de poblaciones específicas pueden llegar a requerir tratamientos diferentes (Gutiérrez *et al.*, 2009). *B. schlegelii* es una especie que presenta una amplia distribución en Latinoamérica (Campbell & Lamar, 2004) y en Colombia, se puede encontrar en varias regiones geográficas y en un amplio rango altitudinal (Gómez, 2014).

El estudio de las variaciones intraespecíficas de los venenos de especies con amplia distribución y de relevancia médica resulta importante, tanto en el reconocimiento de cuadros clínicos divergentes, como en la selección de mezclas de venenos adecuadas para la producción de antivenenos (Gutiérrez, 2011).

Al realizar las pruebas de actividad de L-aminoácido oxidasa, proteolítica, fosfolipasa A₂ y procoagulante para el veneno de Santander, se observó que todas éstas son dependientes de la dosis de veneno empleada (Figura 12A, 13A y B y 14B). Estas observaciones podrían estar indicando que la actividad de las proteínas asociadas a estos ensayos (LAAOs, PLA₂, SVMPs y SVSPs) depende de la cantidad de veneno que llega a ser liberado por la serpiente.

Esta respuesta dosis dependiente de algunas actividades se ha reportado en diferentes estudios con venenos de la familia Viperidae, en el caso de *Porthidium nasutum*, *P. ophryomegas* y *Cerrophidion godmani* se observó en la actividad de las fosfolipasas A₂ sobre 4-NOBA y la actividad proteolítica sobre azocaseína (Lomonte *et al.*, 2012). Este mismo comportamiento fue observado en *P. lansbergii lansbergii* (Jimenez-Charris *et al.*, 2015), y *Bothrocophias campbelli* (Salazar-Valenzuela *et al.*, 2014). Para el veneno de *B. schlegelii*, Prezotto-Neto *et al.*, (2016) reportaron que la actividad de PLA₂ responde a la dosis de veneno empleada.

En los venenos provenientes de diferentes zonas del país (Antioquia, Caldas y Santander) se observaron algunos cambios en las actividades enzimáticas, estadísticamente significativos. Aunque, en el caso de las L-aminoácido oxidasa, el veneno de *B. asper* mostró ligeramente mayor actividad que las muestras de veneno de *B. schlegelii*, sin ser significativas estadísticamente (Figura 12B).

Esto quizás se deba al hecho de que la presencia de LAAOs en los venenos de estas dos especies es similar. Para el caso de *B. schlegelii*, Lomonte *et al.*, (2008) reportan alrededor de un 8% de LAAOs en el total del veneno, mientras que Alape-Giron *et al.*, (2008) encuentran alrededor de un 9% de LAAOs en el veneno de *B. asper*. Sin embargo, estas observaciones contrastan con lo observado por Kuch *et al.*, (1996), quienes encuentran que los venenos de *B. schlegelii* de Ecuador presentan mayor actividad LAAO que los de *B. asper*. La presencia de LAAOs en los

venenos de serpientes está relacionada con la inducción de apoptosis y daño celular que puede llegar a contribuir con el daño a nivel local (Mackessy, 2010), lo cual es común observar en los cuadros de envenenamientos provocados tanto por *B. schlegelii* como por *B. asper* (Otero *et al.*, 1992b; 2002; Otero, 2009).

En cuanto a la actividad proteolítica sobre azocaseína, el veneno de Santander mostró la menor actividad, entre las tres zonas (Figura 13C), mientras que para la actividad proteolítica sobre BAPNA, las diferencias fueron menos marcadas, siendo el veneno de Antioquia el de mayor actividad (Figura 13D). Estos resultados nos estarían señalando que posiblemente el veneno de Caldas pueda ser un poco más hemorrágico que el de Antioquia y Santander. Estudios previos habían reportado la presencia de actividad proteolítica in-vitro y actividad hemorrágica in-vivo en venenos de *B. schlegelii* de Costa Rica y Colombia (Prezoto-Neto *et al.*, 2016), sin embargo estas observaciones contrastan con lo reportado por Kuch *et al.*, (1996), quienes demostraron la ausencia actividad hemorrágica inducida por el veneno de *B. schlegelii* de Ecuador.

Por otro lado, aunque no hubo diferencias significativas entre las muestras para la actividad de fosfolipasa A₂ sobre sustrato 4-NOBA, Santander mostró mayor actividad, seguida por Antioquia y Caldas, esta última presentó la menor actividad (Figura 14C). De igual forma se observaron las actividades de PLA₂ mediante hemólisis indirecta con diferencias significativas entre Santander, como la muestra de veneno con mayor actividad y Caldas, como la de menor actividad (Figura 14A). La actividad de las PLA₂ ya ha sido descrita y asociada a mionecrosis en los venenos de *B. schlegelii* de costa Rica (Lomonte *et al.*, 2008; Lomonte *et al.*, 2012).

De acuerdo a las actividades in-vitro aquí evaluadas, el veneno de Santander podría causar mayor necrosis y menor hemorragia que las otras zonas. En contraste, el veneno de Caldas podría ser más hemorrágico y con menor actividad mionecrotica. El veneno de Antioquia muestra

características enzimáticas similares a las del veneno Caldas. Cabe destacar que estas son solo aproximaciones experimentales y tendría que hacerse una segunda fase que incluya un modelo experimental in-vivo. La discrepancia entre el efecto hemorrágico y necrótico (actividad proteolítica y fosfolipásica) de algunos venenos, ha sido observada hace muchos años. Gutiérrez & Chávez, (1979) mediante pruebas in-vitro, reportan que el veneno de *B. schlegelii* presenta alta actividad mionecrotica y una baja actividad hemorrágica. Tu *et al*, (1969) muestran que el veneno de *Daboia russelli siamensis* tiene una fuerte actividad mionecrotica pero una baja a actividad hemorrágica y que *Bitis gabonica* y *B. nasicornis* tienen venenos altamente hemorrágicos pero con poca acción mionecrotica.

Aunque se observó un patrón de elución diferente entre el cromatograma de los venenos del pool de Santander aquí observado (Figura 6) y el reportado para la especie en Costa Rica (Lomonte *et al.*, 2008), el comportamiento enzimático del veneno de *B. schlegelii* de Santander indicaría un contenido importante de PLA₂ y un bajo contenido de SVSPs y SVMPs asociadas con las actividades proteolíticas y hemorrágicas en los venenos, lo que concuerda con el perfil proteico del veneno de *B. schlegelii* de Costa Rica reportado por Lomonte *et al*, (2008) con un alto contenido de PLA₂ (43.8%) y bajos contenidos de SVSPs y SVMPs (5.8% y 17.7%, respectivamente). Esto a su vez explicaría lo observado por Prezotto-Neto *et al*, (2016), quienes reportan la actividad PLA₂ como la única actividad similar entre los venenos de *B. schlegelii* de Colombia y Costa Rica.

Las diversas actividades enzimáticas desencadenadas por PLA₂, SVMPs, SVSPs, LAAOs, entre otras, ya sea in-vitro o in-vivo, llegan a actuar de forma combinada en los venenos, provocando un cuadro de envenenamiento general y complejo. Que en *B. schlegelii* está caracterizado por dolor, edema, hemorragia y necrosis en el área de la mordida y rara vez con

complicaciones sistémicas (Otero *et al.*, 1992b; 2002). En este sentido, fue evidente una mayor actividad enzimática desencadenada por el veneno de *B. asper*, que las provocadas por *B. schlegelii* (Figuras 12B, 13C y D y 14A y C), siendo concordante con las observaciones clínicas de los casos de envenenamientos ocasionados por ambas especies, en los que con frecuencia los síntomas de envenenamientos por *B. asper* resultan más agudos que los de *B. schlegelii* (Otero *et al.*, 2002; Otero, 2009).

6. Conclusiones

- Con el desarrollo de la caracterización biológica y bioquímica del veneno de *B. schlegelii* de tres localidades del departamento de Santander, se amplió el conocimiento toxinológico de las especies de víboras de importancia clínica en Colombia.
- Se evidenció variación intraespecífica del tipo geográfica y ontogénica al comparar los perfiles cromatográficos y electroforéticos de los venenos incluidos en este estudio. Señalando por un lado la posible existencia de cambios en la composición del veneno entre diferentes estados de desarrollo de los individuos, por otro lado, a nivel geográfico los cambios en los venenos podrían ser el resultado del aislamiento geográfico y la adaptación a condiciones de hábitats específicos.
- Se pudo establecer que el veneno de *B. schlegelii* de Santander presenta unas características electroforéticas y cromatográficas similares a las observadas en los venenos de otros viperidos del neo-tropico. El veneno contiene algunos péptidos de bajo peso

molecular y una alta polaridad en la primera parte del cromatograma, los cuales están altamente conservados, tanto en el veneno de Santander como en los de otras zonas del país. Además, se encuentra compuesto en su mayoría por proteínas de mediano y alto peso molecular más hidrofóbicas, observadas en la última mitad del cromatograma.

- Los ensayos enzimáticos evidenciaron la existencia de disparidad entre las actividades de venenos de diferentes zonas. El veneno de *B. schlegelii* de Santander podría llegar a ser principalmente miotóxico, mientras que los venenos de Caldas y Antioquia más hemorrágicos. Estas diferencias sugieren la posibilidad de que las manifestaciones clínicas evocadas por el veneno de esta especie cambien entre poblaciones. Sin embargo, estas observaciones deben ser corroborados mediante ensayos de actividades in-vivo.

Referencias Bibliográficas

- Aguilar, I., Guerrero, B., Salazar, A. M., Giron, M. E., Pérez, J. C., Sánchez, E. E., & Rodríguez-Acosta, A. (2007). Individual venom variability in the South American rattlesnake *Crotalus durissus cumanensis*. *Toxicon*, 50(2), 214-224.
- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Diaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., & Calvete, J. J. (2008). Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *Journal of proteome research*, 7(8), 3556-3571.
- Angulo, A., Rueda-Almonacid, J. V., Rodríguez-Mahecha, J. V., & La Marca, E. (2006). Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la región tropical andina. *Conservación Internacional*.
- Angulo, Y., Chaves, E., Alape, A., Rucavado, A., Gutiérrez, J. M., & Lomonte, B. (1997). Isolation and Characterization of a Myotoxic Phospholipase A2 from the Venom of the Arboreal Snake *Bothriechis (Bothrops) schlegelii* from Costa Rica. *Archives of biochemistry and biophysics*, 339(2), 260-266.
- Arteaga-Navarro, A. F., Bustamante, M. R., & Guayasamin, J. M. (2013). The Amphibians and Reptiles of Mindo. *Life in the Cloudforest. Serie de Publicaciones Científicas, Publicacion*, (1).
- Berthold, A. A. (1846). Uber verschiedene neue oder seltene Reptilien, aus Neu-Granada und Crustaceen aus China. *Abhandlungen der Koniglichen Gesellschaft der Wissenschaften zu Gottingen (Physi-calischen Classe)*, 3, pls1-3.
- Bolaños, R. (1982). Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Primera parte. Aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 3(2), 165-184.
- Calvete, J. J. (2011). Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert review of proteomics*, 8(6), 739-758.

- Calvete, J. J., Escolano, J., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., & Sanz, L. (2008). Snake venomomics of Central American species from the *Atropoides* and *Bothriechis* genera.
- Calvete, J. J., Juárez, P., & Sanz, L. (2007). Snake venomomics. Strategy and applications. *Journal of Mass Spectrometry*, 42(11), 1405-1414.
- Calvete, J. J., Sanz, L., Pérez, A., Borges, A., Vargas, A. M., Lomonte, B., ... & Furtado, M. F. D. (2011). Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *Journal of proteomics*, 74(4), 510-527.
- Camacho, E., Villalobos, E., Sanz, L., Pérez, A., Escalante, T., Lomonte, B., & Rucavado, A. (2014). Understanding structural and functional aspects of PII snake venom metalloproteinases: Characterization of BlatH1, a hemorrhagic dimeric enzyme from the venom of *Bothriechis lateralis*. *Biochimie*, 101, 145-155.
- Campbell, J. A. (2004). The venomous reptiles of the western hemisphere (No. 597.96165 C3).
- Casewell, N. R., Wagstaff, S. C., Wüster, W., Cook, D. A., Bolton, F. M., King, S. I., ... & Harrison, R. A. (2014). Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(25), 9205-9210.
- Charry, H. (2006). Epidemiología del accidente ofídico en Colombia. In *Memorias del primer simposio de Toxicología Clínica "Cesar Gómez Vallejo"*. Laboratorios Probiol Ltda. Facultad de medicina Fundación Universitaria San Martín. Bogotá.
- Chippaux, J. P., Williams, V., & White, J. (1991). Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 29(11), 1279-1303.
- Cho, W., & Kézdy, F. J. (1991). Chromogenic substrates and assay of phospholipases A2. In *Methods in enzymology* (Vol. 197, pp. 75-79). Academic Press.
- Craik, D. J., & Schroeder, C. I. (2013). Peptides from mamba venom as pain killers. *Angewandte Chemie International*, 52(11), 3071-3073.

- Daniel, H. (1949). Las serpientes en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 10(36), 301-333.
- Dias, G. S., Kitano, E. S., Pagotto, A. H., Santanna, S. S., Rocha, M. M., Zelanis, A., & Serrano, S. M. (2013). Individual variability in the venom proteome of juvenile *Bothrops jararaca* specimens. *Journal of proteome research*, 12(10), 4585-4598.
- Erlanger, B. F., Kokowsky, N., & Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 95(2), 271-278.
- Fernández, J., Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., Sanz, L., & Lomonte, B. (2016). Characterization of a novel snake venom component: Kazal-type inhibitor-like protein from the arboreal pitviper *Bothriechis schlegelii*. *Biochimie*, 125, 83-90.
- 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.
- Fry, B. (Ed.). (2015). *Venomous reptiles and their toxins: evolution, pathophysiology and biodiscovery*. Oxford University Press.
- Furtado, M. F., Maruyama, M., Kamiguti, A. S., & Antonio, L. C. (1991). Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. *Toxicon*, 29(2), 219-226.
- Gené, J., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J., & Cerdas, L. (1989). Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 27(8), 841-848.
- Glenn, J. L., & Straight, R. C. (1982). The rattlesnakes and their venom yield and lethal toxicity. *Rattlesnake Venoms: Their Actions and Treatment*, 3-119.
- Gomes, A., Bhattacharjee, P., Mishra, R., Biswas, A. K., Dasgupta, S. C., & Giri, B. (2010). Anticancer potential of animal venoms and toxins.
- Gómez, C., & Buitrago-González, W. (2017). *Bothriechis schlegelii*. *Anfibios y Reptiles*, 1.

- Gutiérrez, J. M. (2011). Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. *Boletín de malariología y salud ambiental*, 51(1), 1-16.
- Gutiérrez, J. M., Chaves, F., & Bolaños, R. (1980). Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. *Revista de Biología Tropical*, 28(2), 341-351.
- Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., León, G., Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., & Calvete, J. J. (2009). Snake venomomics and antivenomics: proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *Journal of proteomics*, 72(2), 165-182.
- 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.
- Hargreaves, A. D., Swain, M. T., Hegarty, M. J., Logan, D. W., & Mulley, J. F. (2014). Restriction and recruitment—gene duplication and the origin and evolution of snake venom toxins. *Genome biology and evolution*, 6(8), 2088-2095.
- Harrison, R. A., & Gutiérrez, J. M. (2016). Priority actions and progress to substantially and sustainably reduce the mortality, morbidity and socioeconomic burden of tropical snakebite. *Toxins*, 8(12), 351.
- Hill, R. E., & Mackessy, S. P. (2000). Characterization of venom (Duvernoy's secretion) from twelve species of colubrid snakes and partial sequence of four venom proteins. *Toxicon*, 38(12), 1663-1687.
- Holzer, M., & Mackessy, S. P. (1996). An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. *Toxicon*, 34(10), 1149-1155.
- Jackson, K. (2003). The evolution of venom-delivery systems in snakes. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 137(3), 337-354.
- Jiménez-Charris, E., Montealegre-Sanchez, L., Solano-Redondo, L., Mora-Obando, D., Camacho, E., Castro-Herrera, F., ... & Lomonte, B. (2015). Proteomic and functional analyses of the

- venom of *Porthidium lansbergii lansbergii* (Lansberg's hognose viper) from the Atlantic Department of Colombia. *Journal of proteomics*, 114, 287-299.
- Junqueira-de-Azevedo, I. L., Bastos, C. M. V., Ho, P. L., Luna, M. S., Yamanouye, N., & Casewell, N. R. (2015). Venom-related transcripts from *Bothrops jararaca* tissues provide novel molecular insights into the production and evolution of snake venom. *Molecular biology and evolution*, 32(3), 754-766.
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A. R., de Silva, N., Gunawardena, N. K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., ... & de Silva, H. J. (2008). The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS medicine*, 5(11), e218.
- Kochva, E. (1960). A quantitative study of venom secretion by *Vipera palaestinae*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 9(4), 381-390.
- 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.
- Lomonte, B. (2007). Manual de métodos inmunológicos. Costa Rica: Universidad de Costa Rica, Instituto Clodomiro Picado.
- Lomonte, B. (2012). Snake venoms: from research to treatment. *Acta Médica Costarricense*, 54(2), 86-96.
- Lomonte, B., & Calvete, J. J. (2017). Strategies in 'snake venomics' aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 23(1), 26.
- Lomonte, B., Escolano, J., Fernández, J., Sanz, L., Angulo, Y., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2008). Snake venomics and antivenomics of the arboreal neotropical pitvipers *Bothriechis lateralis* and *Bothriechis schlegelii*. *Journal of proteome research*, 7(6), 2445-2457.
- Lomonte, B., Rey-Suárez, P., Tsai, W. C., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2012a). Snake venomics of the pit vipers *Porthidium nasutum*, *Porthidium ophryomegas*,

- and *Cerrophidion godmani* from Costa Rica: toxicological and taxonomical insights. *Journal of proteomics*, 75(5), 1675-1689.
- Lomonte, B., Tsai, W. C., Bonilla, F., Solórzano, A., Solano, G., Angulo, Y., & Calvete, J. J. (2012b). Snake venomomics and toxicological profiling of the arboreal pitviper *Bothriechis supraciliaris* from Costa Rica. *Toxicon*, 59(5), 592-599.
- Mackessy, S. P. (1988). Venom ontogeny in the Pacific rattlesnakes *Crotalus viridis helleri* and *C. v. oreganus*. *Copeia*, 92-101.
- Mackessy, S. P. (2002). Biochemistry and pharmacology of colubrid snake venoms. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 21, 43–83.
- Mackessy, S. P. (2008). SP: Venom composition in rattlesnakes: trends and biological significance. In the Biology of Rattlesnakes Edited by. In *Loma Linda University Press, Loma Linda*.
- Mackessy, S. P. (2010). Handbook of venoms and toxins of reptiles. *CRC press*.
- Mackessy, S. P., & Baxter, L. M. (2006). Bioweapons synthesis and storage: the venom gland of front-fanged snakes. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 245(3-4), 147-159.
- Mackessy, S. P., Williams, K., & Ashton, K. G. (2003). Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*: a case of venom paedomorphosis?. *Copeia*, 2003(4), 769-782.
- Madrigal, M., Sanz, L., Flores-Díaz, M., Sasa, M., Núñez, V., Alape-Girón, A., & Calvete, J. J. (2012). Snake venomomics across genus *Lachesis*. Ontogenetic changes in the venom composition of *Lachesis stenophrys* and comparative proteomics of the venoms of adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis acrochorda*. *Journal of proteomics*, 77, 280-297.
- Meza-Ramos, P., Almendáriz, A., & Yáñez-Muñoz, M. (2010). Datos sobre la dieta de *Bothriechis schlegelii* (Berthold, 1846) (Serpentes-Viperidae) en el Occidente del Ecuador.

- Minton, S. A. (1953). Variation in venom samples from copperheads (*Agkistrodon contortrix mokeson*) and timber rattlesnakes (*Crotalus horridus horridus*). *Copeia*, 1953(4), 212-215.
- Minton, S. A. (1957). Variation in yield and toxicity of venom from a rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Copeia*, 1957(4), 265-268.
- Moura-da-Silva, A. M., Della-Casa, M. S., David, A. S., Assakura, M. T., Butera, D., Lebrun, I., ... & Fox, J. W. (2003). Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. *Archives of biochemistry and biophysics*, 409(2), 395-401.
- Niño Pérez, R. (2018). Análisis comparativo del contenido proteico de venenos de serpientes de la familia Viperidae de diferentes regiones de Colombia mediante el empleo de cromatografía líquida y electroforesis (*Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá*).
- Núñez, V., Cid, P., Sanz, L., De La Torre, P., Angulo, Y., Lomonte, B., ... & Calvete, J. J. (2009). Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. *Journal of proteomics*, 73(1), 57-78.
- Otero-Patiño, R. (2009). Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. *Toxicon*, 54(7), 998-1011.
- Otero-Patiño, R., Gutiérrez, J., Mesa, M. B., Duque, E., Rodríguez, O., Arango, J. L., & Caro, E. (2002). Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon*, 40(8), 1107-1114.
- Otero-Patiño, R., Osorio, R. G., Valderrama, R., & Giraldo, C. A. (1992a). Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Chocó (Colombia). *Toxicon*, 30(5-6), 611-620.
- Otero-Patiño, R., Tobón, G. S., Gómez, L. F., Osorio, R., Valderrama, R., & Hoyos, D. (1992b). Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo de 1989-febrero de 1990) *Acta Méd Colomb*, 17, 229-249.

- Perkins, J. R., & Tomer, K. B. (1995). Characterization of the Lower- Molecular- Mass Fraction of Venoms from *Dendroaspis Jamesoni* Kaimosae and *Micrurus Fulvius* Using Capillary-Electrophoresis Electrospray Mass Spectrometry. *The FEBS Journal*, 233(3), 815-827.
- Perkins, J. R., Parker, C. E., & Tomer, K. B. (1993). The characterization of snake venoms using capillary electrophoresis in conjunction with electrospray mass spectrometry: Black Mambas. *Electrophoresis*, 14(1), 458-468.
- Peters, W. (1859). Über die von Hrn. Dr. Hoffmann in Costa Rica gesammelten und an das Königl. Zoologische Museum gesandten Schlangen. Monatsber. Königl. Preuss. Akad. Wiss. Berlin 1859: 275-278
- Pla, D., Sanz, L., Sasa, M., Acevedo, M. E., Dwyer, Q., Durban, J., & Calvete, J. J. (2017). Proteomic analysis of venom variability and ontogeny across the arboreal palm-pitvipers (genus *Bothriechis*). *Journal of proteomics*, 152, 1-12.
- Prezotto-Neto, J. P., Kimura, L. F., Alves, A. F., Gutiérrez, J. M., Otero, R., Suárez, A. M., & 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.
- Reyes-Velasco, J., Card, D. C., Andrew, A. L., Shaney, K. J., Adams, R. H., Schield, D. R., & Castoe, T. A. (2014). Expression of venom gene homologs in diverse python tissues suggests a new model for the evolution of snake venom. *Molecular biology and evolution*, 32(1), 173-183.
- Rodríguez-Vargas, A. L. (2012). Comportamiento general de los accidentes provocados por animales venenosos en Colombia, 2006-2010. *Revista de Salud Pública*, 14, 1005-1013.
- Rojas, A. (2017). Accidente ofídico Colombia, 2017. *Ministerio De Salud*, 1-16.
- Roy, S., Chattopadhyay, S., & Pal, T. K. (2015). Medicinal value of animal venom for treatment of Cancer in Humans-A Review. *World Scientific News*, 22, 128-144.
- Salazar-Valenzuela, D., Mora-Obando, D., Fernández, M. L., Loaiza-Lange, A., Gibbs, H. L., & Lomonte, B. (2014). Proteomic and toxicological profiling of the venom of *Bothrocophias campbelli*, a pitviper species from Ecuador and Colombia. *Toxicon*, 90, 15-25.

- Sanz, L., Gibbs, H. L., Mackessy, S. P., & Calvete, J. J. (2006). Venom proteomes of closely related *Sistrurus rattlesnakes* with divergent diets. *Journal of Proteome Research*, 5(9), 2098-2112.
- Sarmiento Acuña, K. (2012). Aspectos biomédicos del accidente ofídico. *Universitas Medica*, 53(1).
- Saviola, A. J., Pla, D., Sanz, L., Castoe, T. A., Calvete, J. J., & Mackessy, S. P. (2015). Comparative venomomics of the Prairie Rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) from Colorado: Identification of a novel pattern of ontogenetic changes in venom composition and assessment of the immunoreactivity of the commercial antivenom CroFab®. *Journal of proteomics*, 121, 28-43.
- Tasoulis, T., & Isbister, G. (2017). A review and database of snake venom proteomes. *Toxins*, 9(9), 290.
- Theakston, R. D. G., & Reid, H. A. (1983). Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the world health organization*, 61(6), 949.
- Tu, A. T., & Homma, M. (1970). Toxicologic study of snake venoms from Costa Rica. *Toxicology and applied pharmacology*, 16(1), 73-78.
- Tu, A. T., Homma, M., & Hong, B. S. (1969). Hemorrhagic, myonecrotic, thrombotic and proteolytic activities of viper venoms. *Toxicon*, 6(3), 175-178.
- Uetz, P. & Hošek, J. (eds.). (2015). The Reptile Database, <http://www.reptile-database.org>, accessed December 20, 2018
- Vargas Munoz, L. J., Estrada-Gomez, S., Nunez, V., Sanz, L., & Calvete, J. J. (2014). Characterization and cDNA sequence of *Bothriechis schlegelii*-amino acid oxidase with antibacterial activity. *International journal of biological macromolecules*, 69, 200-7.
- Vélez, S. M., Salazar, M., de Patiño, H. A., Gómez, L., Rodríguez, A., Correa, D., ... & Gutiérrez, J. M. (2017). Geographical variability of the venoms of four populations of *Bothrops asper* from Panama: Toxicological analysis and neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 132, 55-61.

- Vonk, F. J., Admiraal, J. F., Jackson, K., Reshef, R., de Bakker, M. A., Vanderschoot, K., ... & Mirtschin, P. J. (2008). Evolutionary origin and development of snake fangs. *Nature*, 454(7204), 630.
- Vonk, F. J., Casewell, N. R., Henkel, C. V., Heimberg, A. M., Jansen, H. J., McCleary, R. J., ... & Wüster, W. (2013). The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(51), 20651-20656.
- Walteros, D., Paredes, A., & León, L. J. (2014). Protocolo de Vigilancia en Salud Pública: Accidente Ofídico. *Bogotá: Ministerios de Salud y Protección Social-Instituto Nacional de Salud, Grupo de Enfermedades Transmisibles Equipo de Zoonosis*.
- Wang, W. J., Shih, C. H., & Huang, T. F. (2004). A novel PI class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochemical and biophysical research communications*, 324(1), 224-230.
- WHO (2018). Mordeduras de serpientes venenosas. World Health Organization, Información en línea: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming> (Consultado: 2018, 17 de agosto).
- Williams, V., & White, J. (1992). Variation in the composition of the venom from a single specimen of *Pseudonaja textilis* (common brown snake) over one year. *Toxicon*, 30(2), 202-206.
- Zelanis, A., Tashima, A. K., Rocha, M. M., Furtado, M. F., Camargo, A. C., Ho, P. L., & Serrano, S. M. (2010). Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. *Journal of proteome research*, 9(5), 2278-2291.
- Zhang, Y. (2015). Why do we study animal toxins? *Zoological research*, 36(4), 183.