

ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN PROTEICA DE LOS VENENOS DE *Bothrops asper*
DE LA RESERVA NATURAL DE LAS AVES EL PANGAN, BARBACOAS (NARIÑO),
EL TAMBO (CAUCA), DE LA COSTA PACÍFICA Y DEL CARIBE DE COSTA RICA Y
Bothrops cf. asper DEL VALLE DEL PATÍA (CAUCA).

DIANA LORENA MORA OBANDO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2010

ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN PROTEICA DE LOS VENENOS DE *Bothrops asper*
DE LA RESERVA NATURAL DE LAS AVES EL PANGAN, BARBACOAS (NARIÑO),
EL TAMBO (CAUCA), DE LA COSTA PACÍFICA Y DEL CARIBE DE COSTA RICA Y
Bothrops cf. asper DEL VALLE DEL PATÍA (CAUCA).

DIANA LORENA MORA OBANDO

Trabajo de grado presentado como
requisito parcial para optar al título de Biólogo

Directores:

M.Sc. RODRIGO PRIETO SÁNCHEZ

M.Sc. JIMMY GUERRERO VARGAS

Asesor externo:

PhD. MAHMOOD SASA MARÍN

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
PASTO-NARIÑO
2010

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado, son responsabilidades exclusivas del autor”.

Artículo 1º del acuerdo No. 32 de Octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

Nota de Aceptación:

Director

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, Octubre de 2010

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Vicerrectoría de Investigaciones, Relaciones Exteriores y Postgrados por la financiación del proyecto por medio de la Convocatoria Alberto Quijano Guerrero 2008 para Trabajos de Grado.

Al Centro de Investigaciones Biomédicas-Bioterio (CIBUC) y a los laboratorios de microscopía electrónica de la Universidad del Cauca, al instituto Clodomiro Picado y a los laboratorios especializados y de biotecnología de la Universidad de Nariño, por la prestación de servicios, las actividades realizadas bajo sus instalaciones y por brindarme un espacio para la investigación.

Al programa de Biología, por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y explorar nuevos campos de la biología. A la fundación ProAves de Colombia por otorgar el convenio de cooperación para la realización de proyectos en la Reserva Natural de las Aves el Pangán, y los favorables descuentos como estudiante investigador.

A la Dirección de Licencias, Permisos y Trámites Ambientales del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, por concederme los permisos de investigación, acceso a producto derivado y de exportación; especialmente a los Dr. Jenny Castro, Aleida Martínez y John Mármol, por su apoyo en el desarrollo de la investigación toxinológica en mi región.

A mis directores y asesor Jimmy Alexander Guerrero Vargas, Rodrigo Prieto Sánchez y Mahmood Sasa Marín, por su amistad, valiosa asesoría y por motivar mi espíritu de investigación a pesar de todas las adversidades.

Al M.D. Santiago Ayerbe, a la M.Sc. María del Pilar Rivas Pava de la Universidad del Cauca; a las M.Sc. Luz Estela Lagos Mora, Yaqueline Mena y Martha Sofía González de la Universidad de Nariño, al M.D Rafael Otero de la Universidad de Antioquia, por sus valiosos aportes y apoyo incondicional.

Al Grupo de Investigaciones Toxinológicas y Herpetológicas de la Universidad del Cauca (GIHT) por su apoyo en el desarrollo y ejecución del proyecto en pro de la investigación toxinológica al suroccidente de Colombia. Especialmente al M.Sc. José Beltrán Vidal por su colaboración.

A mis compañeros de campo José Ernesto Pérez Villota de la Universidad de Nariño y Edwin Royer Coral Plaza de la Universidad del Cauca por su colaboración y compañía; a Mauricio Sarmiento geógrafo de la Universidad Nacional por la elaboración de los mapas del manuscrito; a Leidy García Ortiz, Roberto García, Alexander Ortiz y Carlos por su colaboración, acompañamiento en campo y las diferentes actividades en la Reserva Natural de las Aves el Pangán.

A todo el cuerpo humano del Instituto Clodomiro Picado, por su apoyo y confianza, especialmente a los PhD. Mahmood Sasa, Alberto Alape y Marietta Flórez; a los cMSc. Marvin Madrigal, Aarón Gómez y Mariángela Vargas; a Lucía, Fabián Bonilla y Jazmín Arias por brindarme su amistad, apoyo, asesoría, acompañamiento durante la fase de laboratorio y por sus valiosos aportes.

A mis padres y mis hermanas, a Andrés Mauricio Martínez, a mis amigos Sandra Urbano, Marvin Anganoy, Yuli Caicedo, Alejandro Cabrera y Ana María Bastidas, por sus consejos en los momentos más difíciles y por no dejarme desfallecer.

A Dios por brindarme la oportunidad de vivir, por ser mi fortaleza y permitirme cumplir con uno de mis mayores sueños.

DEDICATORIA

A mis padres Amanda Obando y Eduardo Mora, a mis hermanas María Fernanda y Johana Katherine Mora Obando por compartir cada una de mis alegrías y momentos difíciles.

CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	23
2. OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GENERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. ANTECEDENTES	28
3.1 ESTUDIOS DE VARIACIÓN PROTEICA	28
3.2 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y LETALIDAD DE LOS VENENOS	29
3.3 ESTUDIOS DE EPIDEMIOLOGÍA Y TRATAMIENTO DEL ACCIDENTE OFÍDICO	31
4. MARCO TEÓRICO	32
4.1 <i>Bothrops asper</i> (Garman 1884)	32
4.1.1 Posición Taxonómica	32
4.1.2 Distribución y Hábitat	32
4.1.2.1. Distribución de <i>B. asper</i> en el Departamento del Cauca	32
4.1.2.2. Distribución de <i>B. asper</i> en el Departamento de Nariño	34
4.1.3 Características Morfológicas y Hábitos Alimenticios	34
4.2 <i>Bothrops cf. asper</i>	35
4.2.1 Posición Taxonómica	35
4.2.2 Distribución y Hábitat	35

4.2.3 Características Morfológicas y Hábitos Alimenticios	35
4.3 EL VENENO DE LAS SERPIENTES	36
4.3.1 Variación Intraespecífica del Veneno	37
4.3.1.1 Veneno de <i>Bothrops asper</i>	38
4.3.1.1.1 Proteínas del Veneno de <i>B. asper</i>	38
4.3.1.1.2 Actividad Biológica del Veneno de <i>B. asper</i>	39
4.3.1.1.3 Dosis Letal 50 (DL50) del Veneno de <i>B. asper</i>	41
4.4 EL ACCIDENTE OFÍDICO	41
4.4.1 Accidente Bothrópico	42
4.4.2 Sueros Antiofídicos o Antivenenos	43
4.5 IMPORTANCIA DE LAS SERPIENTES	43
4.6 METODOS PARA EVALUAR LA VARIACIÓN PROTEICA	44
4.6.1 Electroforesis	44
4.6.1.1 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida	44
4.6.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	45
4.6.3 Inmunolectrotransferencia o Western Blotting	45
4.6.4 Métodos Inmunoenzimáticos: ELISA para cuantificación de anticuerpos	45
5. MATERIALES Y MÉTODOS	47
5.1 ÁREA DE ESTUDIO	47
5.1.1 Reserva Natural de las Aves el Pangan, Barbacoas, Nariño	47
5.1.2 Municipio de El Tambo, Cauca	48
5.1.3 Valle del Río Patía, Cauca	48
5.2 TRABAJO DE CAMPO	50
5.3 TRABAJO DE LABORATORIO	51

5.3.1 Tamaño de la Muestra	51
5.3.2 Extracción del Veneno	51
5.3.3 Caracterización Proteica del Veneno	53
5.3.3.1 Cuantificación de Proteínas por el Método de Biuret	53
5.3.3.2 Electroforesis en gel de Poliacrilamida	54
5.3.3.3 Cromatografía	56
5.3.3.4 Inmuno-electrotransferencia o Western Blotting	56
5.3.3.5 ELISA para Cuantificación de Anticuerpos	57
5.3.4 Actividades Biológicas	57
5.3.4.1 Dosis Letal 50 por El Método de Finney	57
5.3.4.2 Determinación de la Actividad Proteolítica	58
5.3.4.3 Determinación de la Actividad Hemorrágica	59
5.3.4.4 Determinación de la Actividad Coagulante	60
5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	60
5.5. CONVENIOS INSTITUCIONALES	60
5.6. PERMISOS AMBIENTALES	60
6. RESULTADOS	62
6.1 Caracterización Proteica del Veneno	62
6.1.1 Cuantificación de Proteínas	62
6.1.2 Comparación de Perfiles Electroforéticos	63
6.1.2.1 Variación Intraespecífica	63
6.1.2.1.1 Variación Ontogénica	68
6.1.2.1.2 Variación Intrapoblacional	68
6.1.2.1.3 Variación Interpoblacional	69

6.1.3 Comparación de Perfiles Cromatográficos	71
6.1.3.1 Variación Interpoblacional	71
6.1.4 Proteínas Reconocidas por Antiveneno	79
6.1.5 Cuantificación de Anticuerpos	82
6.2 Actividad Biológica y Enzimática	84
6.2.1 Dosis Letal 50	84
6.2.2 Actividad Proteolítica	84
6.2.3 Actividad Hemorrágica	85
6.2.4 Actividad Coagulante	87
7. DISCUSIÓN	89
7.1 El Veneno	89
7.2 Variación Intraespecífica	90
7.2.1 Variación Intrapoblacional	93
7.2. 2 Variación Interpoblacional	93
7.3 Actividades Biológicas y Enzimáticas	94
7.3.1 Letalidad de las Poblaciones	95
7.3.2 Actividad Proteolítica	97
7.3.3 Actividad Hemorrágica	99
7.3.4 Actividad Coagulante	100
7.4 Inmunoreactividad e Inmunoensayos	100
7.5 Variación Geográfica de los Venenos	102
7.6 Consideraciones Taxonómicas	104
8. CONCLUSIONES	105
9. RECOMENDACIONES	107

10. BIBLIOGRAFÍA	108
11. ANEXOS	124

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1. <i>Bothrops asper</i> . Mapa físico de América Central y Norte de Sur América que muestra la distribución geográfica de <i>B. asper</i> (círculos cerrados) (Modificado de Alape <i>et al.</i> 2008). Recuadro inferior derecho: Ejemplar juvenil de la Reserva Natural de las Aves El Pangán, Barbacoas, Nariño, Colombia. Fotografía: Mora, D. 2006.	33
Figura 2. Distribución geográfica de la población de <i>B. asper</i> en el Departamento del Cauca. Izquierda: Cuencas hidrográficas del Departamento del Cauca con escala del rango altitudinal (msnm). Demarcación azul: Cuenca en la que se distribuye la población. Modificado de Ayerbe y Latorre (2009). Derecha: <i>Bothrops asper</i> (N° CIBUC-Se-000 004), 130 cm LT. Cortesía CIBUC®, Popayán. Fotografía: Mora, D. 2008.	34
Figura 3. Distribución geográfica de la población de <i>Bothrops asper</i> de Barbacoas, Nariño. Izquierda: Cuencas hidrográficas del Departamento de Nariño. Modificado de Salazar (1996). Demarcación amarilla: Cuencas en las que se distribuye la población. Derecha: <i>Bothrops asper Bothrops asper</i> (N° CIBUC-Se-000 193), hembra de 38 cm LT. Cortesía Reserva Natural de las Aves el Pangán®, Nariño Fotografía: Mora, D. 2009.	35
Figura 4. Distribución geográfica de la población de <i>Bothrops cf. asper</i> del Valle del Patía, Cauca. Izquierda: Cuencas hidrográficas del Departamento del Cauca con escala del rango altitudinal (msnm). Demarcación amarilla: Cuenca en la que se distribuye la población. Modificado de Ayerbe y Latorre (2009). Derecha: <i>Bothrops cf. asper</i> (N° CIBUC-Se-000 064), 160 cm LT. Cortesía CIBUC®, Popayán. Fotografía: Mora, D. 2008.	37
Figura 5. Veneno de <i>Bothrops asper</i> . Cortesía CIBUC®, Popayán. Fotografía: Mora, D. 2008.	39
Figura 6. (A) Edema en pierna izquierda encontrados en un accidente bothrópico moderado (Araújo 2003). (B) Flictenas a lo largo del miembro afectado. Cortesía Hospital Universitario San José, Popayán (Ayerbe 2008).	44
Figura 7. Reserva Natural de las Aves El Pangán, Municipio Barbacoas, Departamento Nariño (Fuente: este estudio).	46
Figura 8. Municipio El Tambo, Departamento Cauca (Fuente: este estudio).	47
Figura 9. Valle del Río Patía, Cauca- Nariño (Fuente: este estudio).	48
Figura 10. Hábitats de la Reserva Natural de las Aves el Pangán donde se efectuaron las búsquedas. (A, B) Zonas abiertas o claros. (C) Plataneras. (D) Bordes de bosque. Fotografía: Mora, D. 2009.	49
Figura 11. Microhábitats de la Reserva Natural de las Aves el Pangán. (A) Troncos. (B, C) Cabañas o estaciones abandonadas. (D) Cuevas. (C) Hojarasca. (F) Orillas de las quebradas. Fotografía: Mora, D. 2009.	50
Figura 12. Extracción de veneno de adultos de <i>Bothrops asper</i> . Técnica de inmovilización y recepción en embudo y tubo eppendorf. Cortesía CIBUC®, Popayán. Fotografía: Mora, D. 2008.	51

- Figura 13. Extracción de veneno de neonatos de *B. asper*. *Bothrops asper* (N° CIBUC – Se 000 193); hembra de 38 cm LT. Ejemplar de la Reserva Natural de las Aves el Pangán, Corregimiento Junín, Municipio Barbacoas, Nariño. Cortesía CIBUC © Fotografía: Mora, D. 2009. 51
- Figura 14. Curva de calibración para cuantificación de proteínas de *B. asper* de El Tambo Cauca y *B. cf. asper* del Valle del Patía, Cauca. Seroalbúmina Bobina (BSA). La curva de calibración se modificó para cantidades pequeñas de reactivo y de veneno, por ser un método desnaturalizante. 53
- Figura 15. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida de veneno de adultos y neonatos de las poblaciones de *B. asper* y *B. cf. asper* del suroccidente de Colombia y *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica. Margen superior del gel: veneno de adultos de *B. asper* de El Tambo, Cauca (BaT1-4); adultos de *B. cf. asper* del Valle del Patía (BaP5-8); *pool* de veneno de adultos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica (PCR13); neonato de *B. asper* de El Tambo (BaT10); juvenil de *B. cf. asper* del Valle del Patía (BaP9), neonatos de *B. asper* de Barbacoas, Nariño (BaN11-12); *pool* de veneno de neonatos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica (PCR15). Numeración al interior de la imagen: bandas proteicas. Margen izquierdo: marcador de masa molecular Page Ruler SM0671 (MW) en kDa. Las proteínas fueron separadas en gel en gradiente (10-15%) bajo condiciones de reducción y teñidos con azul de coomassie. 64
- Figura 16. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida de veneno de adultos y neonatos de las poblaciones de *B. asper* y *B. cf. asper* del suroccidente de Colombia, *B. asper* de la Costa Pacífica y del Caribe de Costa Rica. Margen superior del gel: A. veneno de adultos de *B. asper* de El Tambo, Cauca (BaT1-4); adultos de *B. cf. asper* del Valle del Patía (BaP5-8); *pool* de veneno de adultos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica (PCR13); neonato de *B. asper* de El Tambo (BaT10); juvenil de *B. cf. asper* del Valle del Patía (BaP9), neonatos de *B. asper* de Barbacoas, Nariño (BaN11-12); *pool* de veneno de neonatos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica (PCR15). B. *Pool* de veneno de adultos del Caribe de Costa Rica (CCR14) y *pool* de neonatos (CCR16). Numeración al interior de la imagen: bandas proteicas. Margen izquierdo marcador de masa molecular Page Ruler SM0671 (MW) en kDa. Las proteínas fueron separadas en un gel al 12% bajo condiciones de reducción y teñidos con azul de coomassie. 65
- Figura 17. Fenograma de similitud, construido en el programa NTSYS pc. 2.1, a partir de datos binarios extraídos de los perfiles electroforéticos. Numeración al margen derecho del fenograma: muestras de veneno de los ejemplares. Adultos (BaT1-4) y neonato (BaT10) de *B. asper* de El Tambo, Cauca; adultos (BaP5-8) y juvenil (BaP9) de *B. cf. asper* del Valle del Patía, Cauca; neonatos de *B. asper* de Barbacoas, Nariño (BaN11-12); *pool* de veneno de adultos (PCR13) y *pool* de veneno de neonatos (PCR15) de *B. asper* de de la Costa Pacífica de Costa Rica; *pool* de veneno de adultos (CCR14) y *pool* de neonatos (CCR16) del Caribe de Costa Rica. Los números romanos (I y II) y las letras (a-f) al interior del fenograma muestran los grupos y subgrupos formados. El valor r, corresponde al coeficiente de correlación cofenética y expresa el grado de distorsión entre la matriz original y la matriz cofenética obtenida a partir de los valores del fenograma. El Coeficiente de Jaccard en una escala 70

de 0.10 a 1, donde los valores más cercanos a 1, tienden a expresar el grado de similitud máxima.

Figura 18. Perfil cromatográfico de proteínas por HPLC, fase reversa. *Pool* de venenos de especímenes adultos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica. Un miligramo de proteínas de veneno total fueron aplicados a una columna RP10 C18, bajo las siguientes condiciones de cromatográficas: (5% B) por 10 min, 5-10% B por 20 minutos, 10-20% B por 45 min, 20- 45% B por 80 min, 45-70% B por 20 minutos y 70% B por 10 min. 71

Figura 19. Perfil cromatográfico de proteínas por HPLC, fase reversa. *Pool* de venenos de especímenes adultos de *B. asper* de El Tambo, Cauca. Un miligramo de proteínas de veneno total fueron aplicados a una columna RP10 C18, bajo las siguientes condiciones de cromatográficas: (5% B) por 10 min, 5-10% B por 20 minutos, 10-20% B por 45 min, 20- 45% B por 80 min, 45-70% B por 20 minutos y 70% B por 10 min. 72

Figura 20. Perfil cromatográfico de proteínas por HPLC, fase reversa. *Pool* de venenos de especímenes adultos de *B. cf. asper* del Valle del Patía. Un miligramo de proteínas de veneno total fueron aplicados a una columna RP10 C18, bajo las siguientes condiciones de cromatográficas: (5% B) por 10 min, 5-10% B por 20 minutos, 10-20% B por 45 min, 20- 45% B por 80 min, 45-70% B por 20 minutos y 70% B por 10 min. 73

Figura 21. Comparación de cromatogramas obtenidos por RP-HPLC, fase reversa de un *pool* de venenos de especímenes adultos de *B. cf. asper* y *B. asper* del suroccidente de Colombia y de la Costa Pacífica de Costa Rica. A. Verde: *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica y azul: *B. asper* de El Tambo, Cauca. B. Verde: *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica y azul: *B. cf. asper* del Valle del Patía, Cauca. C. Azul: *B. asper* de El Tambo, Cauca y verde: *B. cf. asper* del Valle del Patía, Cauca. 74

Figura 22. Perfil cromatográfico de proteínas por HPLC, fase reversa de un *pool* de venenos de especímenes neonatos de *B. asper* de la Reserva Natural de las Aves el Pangán, Barbacoas, Nariño. Un miligramo de proteínas de veneno total fueron aplicados a una licrosfera de RP10 C18, bajo las siguientes condiciones de cromatográficas: (5% B) por 10 min, 5-10% B por 20 minutos, 10-20% B por 45 min, 20- 45% B por 80 min, 45-70% B por 20 minutos y 70% B por 10 min. 76

Figura 23. Comparación de cromatogramas obtenidos por separación de proteínas por HPLC, fase reversa de un *pool* de venenos de especímenes neonatos de Barbacoas, Nariño versus adultos de *B. asper* de El Tambo, Cauca y de la Costa Pacífica de Costa Rica. A. Verde: *B. asper* neonatos de Barbacoas Nariño y azul: *B. asper* adultos de El Tambo, Cauca. B. Verde: *B. asper* adultos de la Costa Pacífica de Costa Rica y azul: *B. asper* neonatos de Barbacoas, Nariño. 77

Figura 24. Controles de Inmunoelctrotransferencia. *Pool* de veneno de adultos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica (PCR) y *B. asper* de El Tambo, Cauca (CIBUC-000 020) (BaT4). A. Control con suero normal equino (SNE). B. Control con suero anticoral, producido por el Instituto Clodomiro Picado (Costa Rica). Marcadores de masa molecular en kDa, sobre las márgenes izquierda y derecha (MW). Las proteínas fueron separadas en gel de poliacrilamida (12 %) bajo condiciones de reducción. 78

- Figura 25. Análisis de Inmunoelctrotransferencia de veneno de *B. asper* y *B. cf. asper* del suroccidente de Colombia y *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica, que muestra la inmunoreactividad del antiveneno mono-específico anti-*B. asper* Pacífico (Costa Rica). Cada carril contiene 20 µg de veneno. Adultos de Ba-T (1-4), adultos de Ba-P (5-8), *pool* de veneno de adultos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica (13), neonato de Ba-T (10), juvenil de Ba-P (9), neonatos de Ba-N (11 y 12) y *pool* de veneno de neonatos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica (14). Marcador de masa molecular Page Ruler SM0671 en kDa, al margen izquierdo (MW). Las proteínas fueron separadas en gel de poliacrilamida en gradiente (10-15%) bajo condiciones de reducción. 79
- Figura 26. Análisis de Inmunoelctrotransferencia de veneno de *B. asper* y *B. cf. asper* del suroccidente de Colombia y *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica, que muestra la inmunoreactividad del antiveneno mono-específico anti-*B. asper* Caribe (Costa Rica). Cada carril contiene 20 µg de veneno. Adultos de Ba-T (1-4), adultos de Ba-P (5-8), *pool* de veneno de adultos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica (13), neonato de Ba-T (10), juvenil de Ba-P (9), neonatos de Ba-N (11 y 12) y *pool* de veneno de neonatos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica (14). Marcador de masa molecular Page Ruler SM0671 en kDa (MW), al margen izquierdo. Las proteínas fueron separadas en gel de poliacrilamida en gradiente (10-15%) bajo condiciones de reducción. 80
- Figura 27. Curvas de evaluación para anticuerpos específicos contra antígenos de *B. asper* y *B. cf. asper* del suroccidente de Colombia. Los antivenenos fueron diluidos en factor 3 y testeados por ELISA contra veneno de A. Adultos de *B. asper* de El Tambo, Cauca. B. Adultos de *B. cf. asper* de la Valle del Patía, Cauca. C. Neonatos de *B. asper* de Barbacoas, Nariño. ■ Mono-específico anti-*B. asper* Caribe. ● Mono-específico anti-*B. asper* Pacífico. ▲ Polivalente. * Suero normal equino (SNE). Cada punto representa la media ± SD de tres repeticiones. 81
- Figura 28. Gráfico de medias. Muestra la variación intragrupos e intergrupos con base en las medias de absorbancia. A. Variación en el reconocimiento de los venenos de Ba-T (1.00), Ba-P (2.00) y Ba-N independientemente del tipo de suero. B. Variación del reconocimiento de los sueros mono-específico anti-*B. asper* Caribe (1.00), mono-específico anti-*B. asper* Pacífico (2.00) y Polivalente (3.00) independientemente de la procedencia de los venenos. $p < 0,05$, Programa SPSS v 12.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Sobre el margen derecho de cada gráfica, los valores de absorbancia (abs). Las líneas hacia arriba y hacia abajo de las cajas muestran la desviación estándar; la línea horizontal en las cajas representa la media de las absorbancias. 82
- Figura 29. Representación gráfica de los datos obtenidos para la determinación de la Dosis Letal 50 de A. *B. asper* de El Tambo, Cauca. B. *B. cf. asper* del Valle del Patía, Cauca. Línea azul: línea de regresión, línea verde: puntos experimentales. 83
- Figura 30. Actividad proteolítica. A. Venenos de *B. asper* de El Tambo, Cauca (Ba-T) y *B. cf. asper* del Valle Patía, Cauca (Ba-P). B. Venenos de *B. asper* de la Reserva Natural de las Aves el Pangán, Barbacoas, Nariño (Ba-N). 84

Figura 31. Curvas dosis – respuesta. Determinación de la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) para la población de <i>B. cf. asper</i> del Valle del Patía, Cauca. Cada una de las curvas representa el número de ensayos.	85
Figura 32. Curvas dosis – respuesta. Determinación de la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) para la población de <i>B. asper</i> de El Tambo, Cauca. Cada una de las curvas representa el número de ensayos.	85
Figura 33. Curvas dosis – respuesta. Determinación de la Dosis Coagulante Mínima (DCM) para la población de <i>B. asper</i> de El Tambo, Cauca. Cada una de las curvas representa el número de ensayos.	86
Figura 34. Curvas dosis – respuesta. Determinación de la Dosis Coagulante Mínima (DCM) para la población de <i>B. cf. asper</i> del Valle del Patía, Cauca. Cada una de las curvas representa el número de ensayos.	87
Figura 35. Hemorragia gingival. Agente <i>B. cf. asper</i> . Cortesía: Hospital Universitario San José©, Popayán, Cauca. Fotografía: Ayerbe, S. 2008.	130
Figura 36. Efectos producidos por envenenamiento de <i>B. asper</i> . A. Gangrena, síndrome compartimental. B. Síndrome compartimental. Cortesía: Hospital Universitario San José ©, Popayán, Cauca. Fotografía: Ayerbe, S. 2008.	130

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Factores de carga modificados para la curva de calibración BSA.	52
Tabla 2. Cuantificación proteica del veneno por el método de Biuret. Población <i>B. asper</i> de El Tambo, Cauca (Ba-T): individuos 1 – 4; población de <i>B. cf. asper</i> del Valle del Patía, Cauca (Ba- P): individuos 5 – 8.	61
Tabla 3. Comparación de bandas proteicas presentes y ausentes entre los ejemplares de <i>B. asper</i> y <i>B. cf. asper</i> , teniendo en cuenta la población de procedencia y su estado de crecimiento. Las bandas obtenidas de los perfiles electroforéticos, fueron detectadas y analizadas en el programa Image Quant TL versión 2005. La masa molecular \pm SD de las bandas no únicas resultó del promedio de la masa molecular de la banda para cada individuo. * La masa molecular no expresa el promedio \pm SD, ya que corresponden a bandas únicas (encontradas en solo uno del total de los individuos). Para definir su posible acción farmacológica se comparó las masas moleculares de las bandas del estudio con las de las familias proteicas presentadas por Alape <i>et al.</i> (2008). (SVMP: metaloproteinasas, Ser: Serina proteinasas, PLA: fosfolipasas, Des: desintegrinas). Ba-T (1, 2, 3, 4, 10): <i>B. asper</i> de El Tambo Cauca, Ba-P (5, 6, 7, 8, 9): <i>B. cf. asper</i> del Valle del Patía, Ba-N (11,12): <i>B. asper</i> de Nariño, PCR (13, 15): <i>B. asper</i> de la Costa Pacífica de Costa Rica, CCR (14, 16): <i>B. asper</i> del Caribe de Costa Rica. Color verde: adultos; Color naranja: neonatos; Color azul: juvenil.	66
Tabla 4. Actividades biológicas y enzimáticas de las poblaciones del suroccidente Colombiano. Los valores que están en paréntesis en la dosis letal 50, corresponden a los límites de confianza (95%), cuanto mayor la dosis letal, menor es su poder de letalidad es menor. De igual manera la lectura de las actividades proteolítica, hemorrágica y coagulante es inversamente proporcional a su valor (cuanto menor es el valor, más alta es la actividad biológica). Para la población Ba- N solamente se determinó la actividad proteolítica debido a la limitada cantidad de veneno.	94
Tabla 5. Dosis letales 50 para <i>B. asper</i> , <i>B. cf. asper</i> y especies relacionadas filogenéticamente. Vía de inoculación: intraperitoneal (IP), intravenosa (IV). Todos los valores fueron expresados en μ g / ratón, peso promedio ratón 17 g, con el fin de facilitar las comparaciones. Los valores que se encuentran en paréntesis corresponden a los límites de confianza (95%). ^a Dosis Letal de ejemplares de seis meses de edad; ^b Dosis Letal de ejemplares de un año de edad; ^c Dosis Letal de ejemplares de dos años de edad y ^d Dosis Letal de ejemplares de tres años de edad.	95

LISTA DE ANEXOS

	<i>Pág.</i>
Anexo A. Material examinado. Colección Zoológica de la Universidad de Nariño.	123
Anexo B. Tabla de Registro. Muestreo en campo.	124
Anexo C. Tabla de Registro. Extracción de veneno en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca. Estado de crecimiento, AD: adulto, JU: juvenil, NE: neonato. Sexo, m: macho, h: hembra.* Resultado de tres extracciones.	125
Anexo D. Método de Biuret (1948).	126
Anexo E. Matriz cualitativa de bandas proteicas de <i>B. asper</i> y <i>B. cf. asper</i> . Obtenidas a partir de la comparación con marcadores de pesos moleculares estándar. <i>B. asper</i> de El Tambo, Cauca (Ba-T); <i>B. cf. asper</i> del Valle del Patía, Cauca (Ba-P); <i>B. asper</i> de Barbacoas, Nariño (Ba-N); población 4: Costa Pacífica Costa Rica; población 5: Caribe Costa Rica. * Individuos neonatos; °individuo juvenil menor de un año. 1 = Presencia, 0 = ausencia.	127
Anexo F. Análisis Probit. Método de Finney. A. <i>B. asper</i> de El Tambo, Cauca. B. <i>B. cf. asper</i> del Valle del Patía, Cauca.	129
Anexo G. Registro fotográfico de actividades biológicas en pacientes mordidos por <i>B. asper</i> de El Tambo Cauca y <i>B. cf. asper</i> del Valle del Patía, Cauca.	130
Anexo H. Convenios Interinstitucionales y permisos ambientales	131

GLOSARIO

ANAFILAXIS: conjunto de manifestaciones que ocurren en el sujeto sensibilizado minutos después de exponerse a un antígeno.

ANTICUERPOS: proteínas del tipo inmunoglobulinas sintetizadas por el organismo en respuesta a un antígeno y capaces de reaccionar específicamente con el.

ANTÍGENO: sustancia capaz de provocar una respuesta inmune.

CORTICOESTEROIDES: grupo de compuestos químicamente relacionados con el colesterol y producidos por las glándulas suprarrenales; que reducen la inflamación y la alergia y suprimen las defensas inmunes del cuerpo.

LIOFILIZADO: sustancia procesada por medio del frío y del vacío, con el fin de mantener durante largo tiempo sus propiedades.

TOXINA: sustancia tóxica derivada del tejido de animales, plantas o microorganismos con efecto deletéreo sobre otros seres vivos, por contacto directo con la piel sana o superficies mucosas de los tractos digestivo o respiratorio.

TOXINOLOGÍA: ciencias interdisciplinar de la biología, que se encarga del estudio de los productos metabólicos especiales conocidos como venenos y sus aplicaciones tecnológicas, producidos por bacterias, hongos, plantas y animales.

RESUMEN

Se comparó la variación proteica del veneno de cinco poblaciones, cuatro de la especie *Bothrops asper*, dos de ellas al suroccidente de Colombia, una de la Costa Pacífica del Departamento de Nariño y otra del Departamento del Cauca, las otras dos poblaciones una de la Costa Pacífica y la otra del Caribe de Costa Rica y la quinta población de *Bothrops cf. asper* del Valle del Río Patía en el Departamento del Cauca también. La composición proteica de los venenos de *B. asper* de El Tambo, Cauca y Barbacoas, Nariño, sugiere que las poblaciones son similares; pero difieren de los venenos de *B. cf. asper* del Valle del Patía y de *B. asper* de Costa Rica, siendo la población del Caribe de Costa Rica la que mostró menor grado de similitud frente a todas las anteriores. En general, durante el cambio de estado neonato a adulto, la variación ontogénica se reflejó principalmente en el incremento de concentración y / o disminución en abundancia de proteínas que posiblemente corresponden a metaloproteinasas y fosfolipasas en los adultos. Todos los ejemplares adultos presentaron una elevada concentración de proteínas de masa molecular entre 11 - 48.4 kDa; por su parte los neonatos presentaron mayor número de proteínas de masa molecular entre 30 y 60 kDa. Los perfiles cromatográficos mostraron mayor complejidad del veneno de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica con relación a los perfiles de las poblaciones del suroccidente Colombiano; sin embargo, estas últimas se caracterizaron por presentar altas concentraciones de lo que probablemente serían metaloproteinasas, aspecto que explicaría la fuerte actividad hemorrágica encontrada tanto en la población del Valle del Patía como en la de El Tambo. Con respecto a los efectos biológicos evaluados, la letalidad del veneno de la población *B. cf. asper* del Valle del Patía duplicó a la de *B. asper* de El Tambo. De igual forma la actividad proteolítica del veneno fue mayor en la población del Valle del Patía ($0.31 \mu\text{g} \pm 0.2$) que en la de El Tambo ($0.22 \mu\text{g} \pm 0.1$) y Barbacoas ($0.12 \mu\text{g} \pm 0.02$); mientras que la actividad coagulante fue mayor en la población de El Tambo ($0.378 \mu\text{g} \pm 0.05$) que en la del Valle del Patía ($0.962 \mu\text{g} \pm 0.1$). En términos de inmunoreactividad, aunque se refleja reactividad cruzada del antiveneno monoespecífico anti-*B. asper* tanto del Pacífico como del Caribe de Costa Rica frente a las tres poblaciones del suroccidente Colombiano, el suero polivalente mostró mayor reconocimiento de los antígenos.

PALABRAS CLAVE:

TOXINOLOGIA – MANUALES
VENENOS DE *B. Asper*. INVESTIGACIONES
VENENOS

ABSTRACT

We compared the venom protein variation of five populations, four populations of the specie *Bothrops asper*, two of them from the southwestern Colombia, one from the Pacific Coast of Nariño department, and other from the Pacific Coast of Cauca department; for the other two populations, one is from the Pacific slope and the other one is from the Caribbean slope of Costa Rica, and the fifth population of *Bothrops cf. asper* from the Valle del Río Patía in the Cauca department. The venom protein composition of *B. asper* from El Tambo, Cauca and Barbacoas, Nariño, suggests that populations are similar, but these differ from the venoms of *B. cf. asper* in Valle del Río Patía and *B. asper* from Costa Rica, the population from the Caribbean slope of Costa Rica was different than all previous ones. In general, during the change of newborn to adult state, ontogenetic variation was reflected mainly in increase on concentration and / or decrease in abundance of proteins that may correspond to metalloproteinases and phospholipases in the adults. All adult specimens showed a high protein concentration with molecular mass between 11 - 48.4 kDa; on the other hand, newborns had the highest number of proteins with molecular mass between 30 and 60 kDa. The chromatographic profiles of *B. asper* from the Pacific slope of Costa Rica showed greater complexity of the venom than the profiles of the populations from southwestern Colombia; however, the last ones were characterized by high concentrations of metalloproteinases probably, that would explain the strong hemorrhagic activity found in the populations from the Valle del Patía and El Tambo, Cauca. Regarding the biological effects assessed, the venom lethality of the population *B. cf. asper* from the Valle del Patía doubled the lethality of *B. asper* from El Tambo. Similarly, venom proteolytic activity was higher in the population from Valle del Patía (0.31 mg + 0.2) than from El Tambo (0.22 mg + 0.1) and from Barbacoas (0.12 g + 0.02); whereas the clotting activity was higher in the population from El Tambo (0.378 g + 0.05) than from Valle del Patía (0.962 mg + 0.1). Although the immunoreactivity results showed cross-reactivity of monospecific antivenom anti-*B. asper* from Pacific and the Caribbean slope of Costa Rica against the three populations of the Colombian southwestern, the polyvalent serum showed the greatest antigens recognition.

1. INTRODUCCIÓN

El ofidismo es un problema de salud pública en muchos países del mundo y alcanza un promedio entre 4000 a 5000 casos al año en Colombia. Estas cifras pueden estar subestimadas, puesto que la deficiencia de los sistemas estadísticos regionales, y la carencia completa de registros de accidentes por mordedura de serpientes en los centros hospitalarios, han generado ambigüedad en las dimensiones de las cifras (Ayerbe *et al.* 1979, Charry 2003, Ruiz de Torrent *et al.* 2004).

En Colombia se han descrito cerca de 380 especies de ofidios, de los cuales el 10 a 15% son venenosos y se distribuyen en las familias Viperidae y Elapidae (Ángel 1987, Pérez y Moreno 1989). Dentro de la familia Viperidae, el género *Bothrops* está conformado por 37 especies de Centro y Suramérica, las cuales son variables tanto ecológica como geográficamente (Campbell y Lamar 2004, Ayerbe 2008, Fenwick *et al.* 2009). Aunque todas estas especies representan peligro para el hombre, *Bothrops asper* muestra la más alta incidencia de mordeduras en América del Sur (80-90%), resultado de su amplio rango de distribución, abundancia relativa y hábitats crípticos o con cierto grado de intervención (Bolaños 1982, Otero 2009, Sasa *et al.* 2009).

La región suroccidental de Colombia presenta accidentes orográficos como el Macizo Colombiano y el Nudo de los Pastos, los nacimientos de las cuencas del Río Cauca, Magdalena y Patía, está atravesada por la Cordillera de los Andes y forma parte de uno los centros de endemismo del Chocó Biogeográfico. Por lo tanto, los Departamentos de Nariño y Cauca, los cuales se encuentran en esta región, se caracterizan por presentar una alta biodiversidad y variedad de ecosistemas; además se convierte en un área favorable para la especiación, desarrollo y reproducción de especies (Salaman 1994, Navia 2005).

Cerca del 80% del total de las especies de serpientes reportadas para Colombia, se encuentran en el suroccidente Colombiano (Ayerbe y Latorre 2009). Pese a la gran diversidad de ofidios, *B. asper* [Garman, 1884] y *B. cf. asper* son responsables de la mayor tasa de morbilidad en esta región (Ayerbe 2000 y 2001, Navia 2005, Ayerbe y Latorre 2009). Poblaciones de *B. asper* se encuentran sobre la vertiente oeste de la Cordillera Occidental, hacia la Costa Pacífica de Cauca y Nariño (Pérez y Moreno 1989, Castro *et al.* 2005, Ayerbe 2008), y poblaciones de *B. cf. asper* entre el sudoeste de la Cordillera Central y el sudeste de la Occidental en el Valle del Patía (Ayerbe *et al.* 2007). Por lo tanto las diferencias geográficas entre los dos Departamentos y la distribución de las poblaciones, podrían reflejar diferencias proteicas del veneno.

Se ha documentado que la interacción de factores geográficos, genéticos y ecológicos, juega un papel importante en la variación intraespecífica de los venenos (Chippaux *et al.* 1991, Quintana *et al.* 2000, Málaga *et al.* 2000, Alape *et al.* 2008). Así, el aislamiento geográfico puede favorecer tanto la diferenciación ecosistémica del ambiente, como el aislamiento reproductivo. Esto, a su vez facilita o dificulta el

intercambio genético entre las poblaciones, y consecuentemente los cambios en su estructura y diversidad genética, podrían repercutir sobre aspectos autoecológicos y fisiológicos, como la eficacia biológica y la síntesis proteica (Klug y Cummings 1999, Griffiths *et al.* 2005).

Esta variación en la composición de los venenos produce efectos locales y sistémicos particulares, que requieren un tratamiento clínico propio para cada caso (Quevedo *et al.* 2000, Ruiz de Torrent *et al.* 2000, Alvarado *et al.* 2004, Pirela *et al.* 2006), pues en la seroterapia antiofídica la variabilidad intraespecífica de los venenos resulta en una variación terapéutica del envenenamiento (Chippaux *et al.* 1991; Núñez *et al.* 2009). Además, muchos de los accidentes bothrópicos son difíciles de manejar dados los efectos fisiopatológicos y las diferentes complicaciones clínicas que pueden tener sobre los pacientes (Gutiérrez y Lomonte 1989, Pineda y Renjifo 2000, Ayerbe 2008, Otero 2009).

Por otra parte, actualmente la toxínología se ha convertido en un área de investigación activa, debido a la necesidad de mejorar la terapia del accidente ofídico y al interés por encontrar herramientas bioquímicas, diagnósticas y terapéuticas a partir de las enzimas presentes en los venenos (Ayerbe *et al.* 2003, Quevedo *et al.* 2000). Sin embargo, a pesar de que en el Departamento del Cauca existen estudios sobre epidemiología y toxínología de ofidios, no se han realizado estudios relacionados con la variación proteica en el veneno de las serpientes, teniendo en cuenta las diferencias geográficas bajo las que se encuentran las poblaciones al sur de Colombia; hecho que debe ser considerado para su manejo diferencial y como fundamento para la producción de sueros antiofídicos más efectivos y específicos para el país.

Con base en lo anterior se hace prioritario analizar la variación proteica y los efectos biológicos de los venenos de *B. asper* del suroccidente Colombiano, y compararlos a su vez con los venenos de la especie en Costa Rica, donde ha sido bien estudiado (Alape *et al.* 2008, Alape *et al.* 2009), a fin de realizar comparaciones apropiadas con los venenos de nuestra región. La suma de estos componentes puede resultar en una diferenciación de la letalidad del veneno, donde es posible ver como el conjunto y abundancia relativa de las proteínas, constituyen una de las secreciones biológicas que representa no solo la innovación crítica de la evolución de los ofidios, sino también un rol importante en la diversificación de las serpientes (Alape *et al.* 2008).

Este estudio mostró variación intraespecífica, geográfica y ontogénica del veneno de las poblaciones del suroccidente Colombiano y de Costa Rica. A partir de perfiles electroforéticos, cromatográficos, de inmunoreactividad y de la determinación de algunas actividades biológicas, se contribuyó a la caracterización proteica del veneno de las poblaciones de *B. asper* de El Tambo (Cauca), Barbacoas (Nariño) y de *B. cf. asper* del Valle del Patía (Cauca). Por lo tanto, ésta investigación aportó y dio continuidad a los estudios realizados sobre la especie en Centroamérica (Alape *et al.* 2008), norte (Otero *et al.* 2002a, 2002b; Otero 2009) y suroccidente de Colombia (Ayerbe 2008, Ayerbe y Latorre 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la variación de las proteínas de los venenos de cuatro poblaciones de *B. asper* procedentes de la Reserva Natural de las Aves el Pangan, Barbacoas (Nariño); El Tambo (Cauca); de la Costa Pacífica y del Caribe de Costa Rica, y una población de *Bothrops cf. asper* del Valle del Patía (Cauca).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a nivel proteico los venenos de las poblaciones de *B. asper* de Cauca, Nariño y Costa Rica, y de *B. cf. asper* del Valle del Patía.
- Analizar intra e interpoblacionalmente la composición proteica de los venenos de *B. asper* de Cauca, Nariño y Costa Rica, y de *B. cf. asper* del Valle del Patía.
- Comparar a nivel interpoblacional la variación de las DL50 de *B. asper* y *B. cf. asper*.
- Determinar las actividades proteolítica, hemorrágica y coagulante del veneno de las tres poblaciones del suroccidente Colombiano.
- Determinar la inmunoreactividad de los venenos de *B. asper* y *B. cf. asper* del suroccidente de Colombia.

3. ANTECEDENTES

Los estudios toxicológicos se han desarrollado desde los años setenta (Rodríguez 2001). Institutos como el Clodomiro Picado (Costa Rica), Bioclon (México), Butantan (Brasil) y de Biomedicina de Valencia (España), entre otros, han investigado sobre variación proteica, letalidad, actividad biológica de los venenos, epidemiología y tratamiento de accidentes ofídicos de especies Bothrópicas. En Colombia, el Instituto Nacional de Salud (Bogotá) y los grupos investigación: Ofidismo y Escorpionismo (Medellín) y de investigaciones Herpetológicas y Toxicológicas (Popayán), han desarrollado estudios que incluyen purificación de proteínas, caracterizaciones bioquímicas e inmunoquímicas, estudios epidemiológicos y de citotoxicidad (Otero *et al.* 2002b, Yasnó 2005, Navia 2005, Ayerbe y Latorre 2009).

3.1 Estudios de variación proteica. Alagón *et al.* (1980) en México, determinaron la composición enzimática del veneno de *B. asper* por medio de electroforesis en gel, identificando cinco enzimas, a saber, fosfolipasas, hialuronidasas, N-benzoil-L-arginina y N-benzoil-L-tirosina etil hidrolasas, y fosfodiesterasas. Además, purificaron y caracterizaron parcialmente tres fosfolipasas tipo A₂ por cromatografía de exclusión; concluyendo que tienen 97, 96 y 266 aminoácidos respectivamente, y todas se caracterizan por presentar residuos de Glutamina y Asparagina en alta proporción.

Una diferenciación bioquímica y biológica de los venenos de *Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bothrops marajoensis* y *Bothrops moojeni* realizada por Assakura *et al.* (1992) en Brasil, mostró que estas especies pueden ser distinguidas y reconocidas tanto por la composición de su veneno como por sus patrones electroforéticos proteínicos característicos.

Málaga *et al.* (2000) en el Perú determinaron la existencia de variaciones en la composición, concentración proteica y actividad del veneno de *Bothrops atrox* con base en la ontogenia. Encontraron que los venenos de juveniles presentan mayor concentración proteica y mayor número de bandas proteicas que los adultos, algunas actividades enzimáticas como la amidolítica, fosfolipásica y L-aminoácido oxidasa también fueron más altas en los juveniles; mientras que las actividades coagulante y proteolítica incrementaron con la edad de los ejemplares.

Quevedo *et al.* (2000) a partir del veneno de *Bothrops atrox* de Colombia obtuvieron cinco fracciones, una de las cuales presentó actividad fosfolipásica; ésta fue purificada encontrando 8 isoenzimas de tipo PA₂, cuyos pesos moleculares variaban entre 16.000 y 18.000 Da; de esta manera afirmaron que el número de isoenzimas puede estar relacionado con el alto contenido de la enzima en el veneno, y que además varía teniendo en cuenta el proceso de purificación y la localidad de procedencia de la especie.

Lerma *et al.* (2004), mediante análisis cromatográfico de los venenos de *Bothrops pictus*, *B. rodengheri* y *Bothriopsis oligolepis*, encontraron diferencias significativas con respecto a su composición y actividad enzimática, y concluyen que los venenos de las serpientes peruanas de la región amazónica y de la costa ó selvas tropicales presentan variaciones en cinco actividades enzimáticas, siendo notable la ausencia de hialuronidasa en el veneno de *B. rodengheri*.

En Costa Rica Alape *et al.* (2008) estudiaron el veneno de dos poblaciones de *B. asper* procedentes del Caribe y de la Costa Pacífica de Costa Rica. Encontraron entre 27 y 30 proteínas diferentes, distribuidas en 8 grupos de toxinas: metaloproteinasas, fosfolipasas A₂, serina proteinasas, L-amino ácido oxidasas, desintegrinas, fragmentos ricos en desintegrina/ cisteína, lectinas tipo C y secreciones proteicas ricas en cisteína. Su estudio, mostró variación ontogénica, individual y geográfica; y explica que factores genéticos, ecológicos y geográficos influyen sobre la expresión proteica en los venenos de las serpientes.

Núñez *et al.* (2009), caracterizaron el proteoma de *B. atrox* de Colombia, Brasil, Ecuador y Perú, por medio de estudios de venómica y antivenómica. Manifiestan la existencia de dos fenotipos geográficamente diferenciados, y sugieren el pedomorfismo como respuesta a una tendencia selectiva durante la expansión de la especie hacia el sur trans – amazónico, a través del corredor de los Andes. Además, encontraron una alta reactividad cruzada del suero polivalente producido en Costa Rica frente a los venenos analizados.

Los estudios que existen sobre variación proteica de venenos de serpientes en Colombia son escasos y ninguno en Nariño y Cauca. La mayoría de los estudios relacionados con serpientes en la región se basan en estudios morfológicos o ecológicos con implicaciones sistemáticas y geográficas (Castro *et al.* 1995, Campbell y Lamar 2004, Anganoy *et al.* 2009).

3.2 Estudios de actividad biológica y letalidad de los venenos. En Perú, Bonilla y Zabaleta (1997) a partir del veneno de *Bothrops hyoprurus* purificaron parcialmente la enzima fosfolipasa A y caracterizaron sus actividades hemolítica, fosfolipásica y citotóxica; encontraron que la actividad citotóxica fue evidente a altas concentraciones y sugieren que las moléculas diferentes a fosfolipasas A serían las responsables del efecto citotóxico del veneno.

Maruñak *et al.* (2006), investigaron la acción del veneno de *Bothrops jararacussu* de Argentina sobre la coagulación sanguínea, por medio de métodos *in vivo* e *in vitro*, que permitieron determinar la actividad coagulante, fibrinolítica, defibrinante y la letalidad del veneno, encontrando que sus resultados se diferenciaban de los realizados para otras especies de *Bothrops*, incluso dentro de la misma especie, con distribución en otras regiones sudamericanas.

Quintana *et al.* (2000) estudiaron la variabilidad del veneno de dos poblaciones de *Bothriechis schlegelii* del suroeste y norte de Antioquia (Colombia); encontraron que las variaciones en los efectos farmacológicos, enzimáticos y en las propiedades inmunoquímicas del veneno están relacionadas con el aislamiento geográfico.

Adicionalmente, correlacionaron sus hallazgos con las variaciones morfométricas de las poblaciones.

Saldarriaga *et al.* (2003), compararon ontogénicamente las actividades farmacológicas e inmunoquímicas de los venenos de ejemplares de *B. asper* y *B. atrox* procedentes de Antioquia y Meta respectivamente. Encontraron que los venenos de los neonatos y los juveniles muestran alta actividad letal, hemorrágica, coagulante y edemática, mientras que los adultos presentan una alta actividad hemolítica; y observaron que los sueros polivalentes producidos en Costa Rica muestran reactividad cruzada frente a los venenos de todos los especímenes.

Yasnó (2005), evaluó la citotoxicidad eritropoyética en ratones y el efecto genotóxico del veneno de *B. asper* de El Tambo (Cauca, Colombia) en eritrocitos de sangre periférica de ratones, mostrando que el veneno contiene compuestos citotóxicos capaces de producir muerte celular y bloquear el sitio normal de la división, de manera inversa a la concentración del veneno; por otro lado, mostró que el veneno presenta compuestos genotóxicos que inducen a quiebres en el ADN, efecto reflejado en el incremento proporcional de micronúcleos en los eritrocitos a mayores concentraciones del veneno.

Navia (2005) determinó las dosis letales 50 para tres poblaciones de *B. asper* del Departamento del Cauca procedentes de las Cuencas del Pacífico, del Río Patía y del Río Cauca respectivamente. Evaluó la incidencia epidemiológica para la región a partir de historias clínicas del Hospital Universitario Nivel III “San José” de Popayán. Aunque las diferencias encontradas entre las tres poblaciones de *B. asper*, no son significativas, la que presentó mayor letalidad también representó el mayor número de registros (51), de un total de 82 accidentes ofídicos durante un período de 6 años (1998 a 2003) en 20 Municipios de los 42 existentes en el Departamento.

Alape *et al.* (2009) en su estudio sobre el proteoma de *B. asper*, con base en los hallazgos ontogénicos y geográficos, concluyen que los neonatos tanto del Caribe como del Pacífico de Costa Rica son más letales e inducen hemorragia y proteólisis, mientras que los adultos presentan una alta actividad miotóxica. Además, afirman que dada la variación de los componentes del veneno, existe la necesidad de usar *pools* en la producción de antiveneno y proporcionar mezclas inmunogénicas adecuadas para tratamientos terapéuticos más efectivos.

3.3 Estudios de epidemiología y tratamiento del accidente ofídico. Castro *et al.* (1999) analizaron extractos de plantas tropicales para el manejo clínico de los accidentes y la neutralización de algunos de sus efectos a través de la seroterapia. Otero *et al.* (2002b) mediante características bioquímicas y diferentes pruebas toxinológicas, determinaron la capacidad neutralizante de cuatro antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de *B. asper* y *Porthidium nasutum* de Antioquia y Chocó y afirman que el suero procedente del Instituto Nacional de Salud (Colombia) fue el de mayor potencia neutralizante. Por otra parte, Duque *et al.* (2007) investigaron sobre diferentes sustancias activas en animales, útiles para el tratamiento de los accidentes ofídicos.

En el Departamento del Cauca Ayerbe *et al.* 1977 y 1979, Ayerbe (2001) y Ayerbe y Latorre (2009) han desarrollado estudios sobre epidemiología y prevención del accidente ofídico. Entre los años 2000 y 2008 se reportaron 382 casos por accidente ofídico, sin contar los que por diversas razones no llegan a los centros hospitalarios por lo que es posible que la cifra sea superior; concluyen que el accidente ofídico afecta principalmente al sector rural y productivo, generando un impacto social y económico importante. Para Nariño no se cuenta con este tipo de información ya que no se han realizado estudios retrospectivos ó de epidemiología que indiquen la incidencia y morbilidad por ofidismo en la región.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 *Bothrops asper* (Garman 1884)

4.1.1 Posición taxonómica

Reino: Animal
Filum: Chordata
Clase: Reptilia
Orden: Squamata
Suborden: Serpentes u Ophidia
Familia: Viperidae
Subfamilia: Crotalinae
Género: *Bothrops*
Especie: *Bothrops asper*

4.1.2 Distribución y hábitat. *B. asper* ocupa las tierras bajas de México, América Central y el Noreste de América del Sur, se encuentran poblaciones insulares en la Isla Violines (Costa Rica), Gorgona (Colombia) y Trinidad (Sasa *et al.* 2009); en Colombia la especie se distribuye sobre la vertiente oeste de la Cordillera Occidental a lo largo de la Costa Pacífica hasta el Ecuador y hacia el norte hasta Venezuela (Figura 1) (Pérez y Moreno 1989, Campbell y Lamar 2004, Ayerbe 2008, Otero 2009). Habita desde nivel del mar hasta los 2500 metros de altitud, aunque la mayoría se encuentran por debajo de los 1800 metros, entre los 0 y los 600 m (Vargas 1970, Moreno 2005, Sasa *et al.* 2009); es conocida vulgarmente como taya equis, terciopelo, barba amarilla, mapaná, boquidorá, damá, cuatronarices y “Western Lancehead” (Otero 2009, Campbell and Lamar 2004).

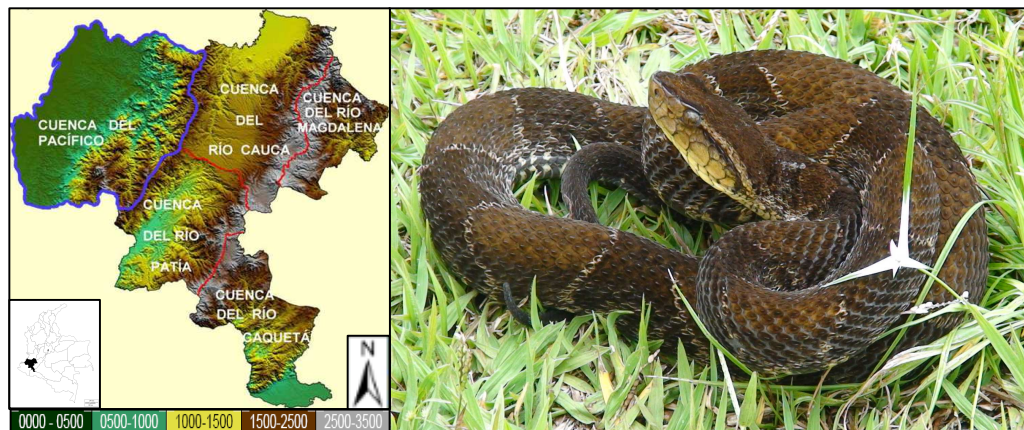
B. asper es de hábitos crepusculares y nocturnos, refugiándose durante el día en huecos naturales de troncos y raíces, a lo largo de quebradas; además es una especie ampliamente adaptable que habita bosques húmedos tropicales, bosques premontanos, vegetación riparia y suele encontrarse cerca a cultivos, rastrojos, potreros, cuerpos de agua y asentamientos humanos (Charry 2003, Sasa *et al.* 2009).

4.1.2.1. Distribución de *B. asper* en el Departamento del Cauca. Se distribuye en la cuenca del Pacífico (Figura 2), ocupando alturas que oscilan de 0 a 2000 msnm. De acuerdo con Navia (2005) limita al norte con el Departamento del Valle del Cauca, al oriente con la cima de la Cordillera Occidental, al oeste con el Océano Pacífico, las Islas de Gorgona, Gorgonilla y al sur con el Departamento de Nariño. También existe una población insular en la isla Gorgona (Sasa *et al.* 2009, Ayerbe y Latorre 2009).

Figura 1. *Bothrops asper*. Mapa físico de América Central y Norte de Sur América que muestra la distribución geográfica de *B. asper* (círculos cerrados) (Modificado de Alape *et al.* 2008). Recuadro inferior derecho: Ejemplar juvenil de la Reserva Natural de las Aves El Pangán, Barbacoas, Nariño, Colombia. Fotografía: Mora, D. 2006.



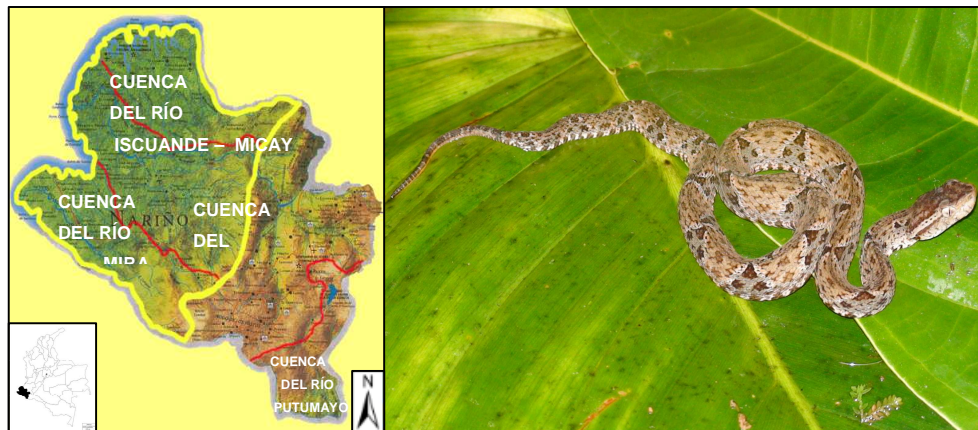
Figura 2. Distribución geográfica de la población de *B. asper* en el Departamento del Cauca. Izquierda: Cuencas hidrográficas del Departamento del Cauca con escala del rango altitudinal (msnm). Demarcación azul: Cuenca en la que se distribuye la población. Modificado de Ayerbe y Latorre (2009). Derecha: *Bothrops asper* (N° CIBUC-Se-000 004), 130 cm LT. Cortesía CIBUC®, Popayán. Fotografía: Mora, D. 2008.



4.2.1.2. Distribución de *B. asper* en el Departamento de Nariño. Se distribuye en la cuenca del Río Iscuande-Micay, en la cuenca del Río Mira y en parte de la cuenca del Río Patía, sobre la vertiente oeste de la Cordillera Occidental, hacia la Costa Pacífica del Departamento de Nariño. De acuerdo con la revisión realizada en la

Colección Zoológica de la Universidad de Nariño PSO-CZ (Anexo A) se registraron un total de seis ejemplares de la especie provenientes de diferentes Reservas (La Planada y la Reserva Natural Río Ñambí) ubicadas en el municipio de Ricaurte, el cual limita con el municipio de Barbacoas de donde provienen los ejemplares capturados para el estudio (Figura 3).

Figura 3. Distribución geográfica de la población de *Bothrops asper* de Barbacoas, Nariño. Izquierda: Cuencas hidrográficas del Departamento de Nariño. Modificado de Salazar (1996). Demarcación amarilla: Cuencas en las que se distribuye la población. Derecha: *Bothrops asper* (N° CIBUC-Se-000 193), hembra de 38 cm LT. Cortesía Reserva Natural de las Aves el Pangán[®], Nariño Fotografía: Mora, D. 2009.



4.1.3 Características morfológicas y hábitos alimenticios. Los adultos presentan una longitud que varía entre los 110-223 cm en hembras y 99.5-193 cm en machos respectivamente (Solórzano y Cerdas 1989). Sus colmillos retráctiles ubicados en la parte anterior de la maxila dotados de un conducto central cerrado (dentición solenoglifa) pueden alcanzar hasta 2.8 cm; su cabeza es de forma triangular con escamas supracefálicas pequeñas y carenadas al igual que el resto del cuerpo; es considerada eurífaga pues su dieta es variada, se alimenta principalmente de mamíferos como ratones y conejos pequeños, reptiles como lagartos y serpientes, aves de las familias Thraupidae y Troglodytidae, y anuros de especies como *Pristimantis achatinus*, *Leptodactylus savagei* y *Rhinella marina* (Charry 2003, Hoyos et al. 2003, Sasa et al. 2009).

Se caracteriza por presentar una alta variación morfológica, con patrones de coloración que van desde café claro o habano hasta gris claro u oscuro, y sobre el dorso con manchas características en forma de equis café oscuras o negras en contraste con el color total del cuerpo; presenta una franja postorbital oscura del ancho de 1 a 2 escamas, que se extiende desde detrás del ojo al ángulo de la boca; ventralmente es de color crema uniforme o con manchas oscuras (Charry 2003, Campbell y Lamar 2004, Boada et al. 2005, Sasa et al. 2009, Saldarriaga et al. 2009).

4.2 *Bothrops* cf. *asper*.

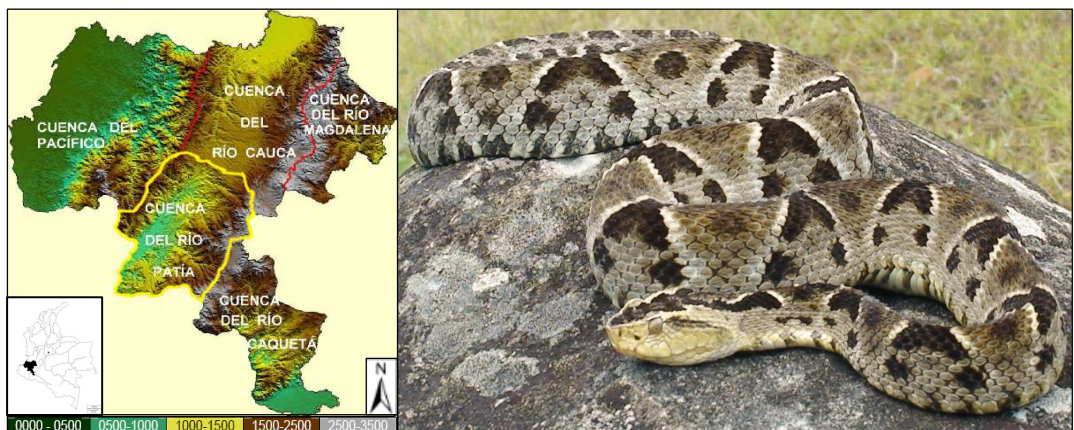
4.2.1 Posición taxonómica

Reino: Animal
Filum: Chordata
Clase: Reptilia
Orden: Squamata
Suborden: Serpentes u Ophidia
Familia: Viperidae
Subfamilia: Crotalinae
Género: *Bothrops*
Morfoespecie: *Bothrops* cf. *asper*

4.2.2 Distribución y hábitat. Conocida como equis patiana o cacica (Figura 4). Su población se distribuye entre el sudoeste de la Cordillera Central y el sudeste de la Cordillera Occidental, en la cuenca alta del Río Patía (Ayerbe 2008), la cual comprende desde el Corregimiento El Hoyo, donde se unen los ríos Quilcacé y Timbío para dar origen al Río Patía, hasta el punto donde se unen los ríos San Jorge y Guachicono con el Río Patía propiamente dicho (Las Juntas) (Lobo 1993). Limita al norte con la cuenca del Río Cauca, al este con la cima de la Cordillera Central y el Macizo Colombiano, al Oeste con la cima de la Cordillera Occidental y su pie de monte Oriental, y al sur con el Departamento de Nariño (Navia 2005).

4.2.3 Características morfológicas y hábitos alimenticios. Se sospecha que puede ser una especie distinta para el género *Bothrops* (Ayerbe *et al.* 1990). Actualmente sus características morfológicas y morfométricas se están describiendo. Los hábitos alimenticios de la especie aún son desconocidos ya que no se han realizado estudios relacionados con la dieta de estos ejemplares.

Figura 4. Distribución geográfica de la población de *Bothrops* cf. *asper* del Valle del Patía, Cauca. Izquierda: Cuencas hidrográficas del Departamento del Cauca con escala del rango altitudinal (msnm). Demarcación amarilla: Cuenca en la que se distribuye la población. Modificado de Ayerbe y Latorre (2009). Derecha: *Bothrops* cf. *asper* (N° CIBUC-Se-000 064), 160 cm LT. Cortesía CIBUC[®], Popayán. Fotografía: Mora, D. 2008.



4.3 EL VENENO DE LAS SERPIENTES

El sistema venenoso de las serpientes como estructura de depredación y defensa, cuya función primaria es debilitar, inmovilizar o matar presas antes de ser ingeridas (Ayerbe *et al.* 2003) ha tenido grandes implicaciones en diversos campos de la ciencia, principalmente en la medicina, por la alta incidencia de accidentes ofídicos sobre la población humana y la elaboración de sueros antiofídicos a partir de los venenos de Vipéridos y Elápidos (Gutiérrez and León 2009).

Los venenos de las serpientes son compuestos de alta complejidad, producto de miles de años de evolución, de los cuales aún se desconoce las funciones o acciones farmacológicas de algunos de sus componentes (Charry 2003, Duque *et al.* 2007). Se caracterizan por ser líquidos turbios, viscosos, de color variable, desde verde o amarillo hasta incoloro; están conformados por cantidades variables de agua (aproximadamente el 90%), sales, lípidos, carbohidratos, un gran número de péptidos de masa molecular baja, proteínas y toxinas con o sin actividad enzimática, y en general contienen aproximadamente un 25% de sólidos totales, los cuales confieren a los venenos dicha viscosidad (Castro *et al.* 1999, Ruiz de Torrent *et al.* 2000).

Las toxinas que componen el veneno de las serpientes son proteínas de masa molecular generalmente menor a 30 kDa; y todas las toxinas de los venenos de las serpientes del género *Micrurus* tienen masas moleculares < a 10 kDa (Chippaux *et al.* 1991, Pastrana *et al.* 2003). Entre las proteínas que los conforman están las fosfolipasas, fosfomonoesterasas, alfa-aminoacidooxidasas, acetilcolinesterasas, metaloproteinasas, NAD nucleosidasas, hialuronidasas, quinasas, proteasas, toxinas poliproteicas, cardiotoxinas, neurotoxinas, las cuales tienen receptores específicos que actúan sobre las membranas celulares (Lakhotia *et al.* 2002, Maruñak *et al.* 2006).

Los venenos pueden ser de tres tipos vasculotóxicos, miotóxicos y neurotóxicos; los venenos vasculotóxicos producidos fundamentalmente por los géneros *Bothriechis*, *Bothrocophias*, *Bothriopsis*, *Bothrops*, *Lachesis* y *Porthidium* actúan directamente sobre las proteínas celulares, destruyéndolas de forma casi inmediata; mientras que los neurotóxicos producidos por los géneros *Crotalus*, *Micrurus* y *Pelamis*, ocasionan parálisis corporal, falla pulmonar y cardíaca al actuar sobre los neuroreceptores (Ayerbe 2008, Ministerio de Salud 2005, Vázquez 1994); los géneros *Crotalus* y *Pelamis* también presentan efecto miotóxico afectando directamente a los miocitos y generando insuficiencia renal aguda por mioglobinuria (Pineda y Renjifo 2002; Ayerbe 2008).

Particularmente, el veneno de las serpientes del género *Bothrops*, es una mezcla compleja de proteínas y enzimas farmacológicamente activas (Lerma *et al.* 2004) que actúan como moléculas esenciales en el cumplimiento de diferentes funciones fisiológicas, de predación y defensa (Harvey *et al.* 2004, Ruiz de Torrent *et al.* 2005, Pérez *et al.* 2008). Pueden inducir de la aglutinación celular y de glóbulos rojos, a través de una glicoproteína llamada hemoaglutinina o lecitina, caracterizada por presentar sitios de unión a receptores de azúcar en la membrana celular. Muchos de

estos componentes, por medio de diferentes mecanismos de transporte, traspasan la membrana celular y ocasionan diversos efectos fisiopatológicos y grados de envenenamiento bothrópico, como resultado de la variación en la concentración y composición del veneno (Koscinczuk *et al.* 2002, Alvarado *et al.* 2004).

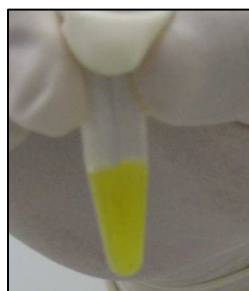
4.3.1 Variación intraespecífica del veneno. La especificidad de las proteínas y los efectos farmacológicos de los venenos, no solo dependen de la distribución anatómica de los receptores, la cantidad de receptores disponibles o de la cantidad de toxina introducida, sino también del lugar de procedencia del espécimen, su estado de crecimiento, la estación del año y el tiempo transcurrido desde la anterior inoculación de veneno (Chippaux *et al.* 1991, Pastrana *et al.* 2003). Con base en lo anterior Chippaux *et al.* (1991) propone diferentes tipos de variación intraespecífica del veneno, a saber, variación geográfica, individual, estacional, variación ontogénica y sexual. De allí que muchos de los estudios sobre venenos, tanto intra como interespecie, tengan en cuenta estos tipos de variación (Quintana *et al.* 2000, Saldarriaga *et al.* 2003, Alape *et al.* 2008).

Desde la década de los 80 se ha reportado la variación geográfica del veneno de *B. asper* (Aragón –Ortiz y Gubensek 1981). Recientemente, Alape *et al.* (2008) y Assakura *et al.* (1992) también documentaron la variación intraespecífica del veneno de *B.asper*. De acuerdo con sus estudios, el veneno de esta especie varía dependiendo de su distribución geográfica y consecuentemente presenta actividades enzimáticas y patrones electroforéticos distintos; incluso se presentan diferencias a nivel de las abundancias relativas de las familias proteicas tal como también lo indica Juárez (2007) al comparar la composición proteica de los venenos de *B. asper* de la Costa Pacífica y del Caribe de Costa Rica.

La variación intraespecífica de los venenos es un factor determinante en los cuadros clínicos presentados por los pacientes víctimas de accidentes ofídicos; y por lo tanto, el análisis de dicha variación puede permitir un manejo terapéutico más adecuado, desde el punto de vista diagnóstico y de la producción de antivenenos más efectivos (Chippaux *et al.* 1991, Quintana *et al.* 2000).

4.3.1.1 Veneno de *Bothrops asper*. *B. asper* presenta un tipo de veneno vasculotóxico y proteolítico (Figura 5), cuyas enzimas son las responsables de las alteraciones locales manifestadas generalmente en los accidentes bothrópicos (Dunn 1944, Ángel 1987).

Figura 5. Veneno de *Bothrops asper*. Cortesía CIBUC[®], Popayán. Fotografía: Mora, D. 2008.



4.3.1.1.1 Proteínas del veneno de *B. asper*. El veneno de *B. asper* contiene proteínas de alta masa molecular; enzimas, como hialuronidasas, fosfolipasas, hidrolasas y fosfodiesterasas, pero predominan las enzimas hidrolíticas (Alagón *et al.* 1980); además de hemorraginas (metaloproteinasas), las cuales son polipéptidos, caracterizadas por su acción vascular directa que ocasiona separación de las uniones endoteliales (Rodríguez 2001).

A partir del fraccionamiento de venenos de la familia Viperidae han sido separadas y purificadas diferentes proteínas con o sin actividad enzimática, como la fosfolipasa A₂, isoenzima presente en el veneno de *B. asper*, que cataliza la hidrólisis específica de los enlaces éster en la posición del carbono 2 de 1, 2 –diacil-fosfoglicéridos. Esta enzima ácida desempeña un papel importante en el metabolismo de lípidos y como anticoagulante, además ha sido ampliamente usada para estudiar la estructura de lipoproteínas o membranas biológicas y como modelo de interacciones proteína – lípido (Alagón *et al.* 1980, Quevedo *et al.* 2000; Salcedo 2005).

Igualmente en el veneno de la especie se han encontrado proteínas de alta masa molecular, miotoxinas algunas con actividad fosfolipásica (Gutiérrez y Lomonte 1989, Rodríguez 2001, Huatuco *et al.* 2004), desintegrinas, serina proteinasas, lectinas tipo C y L- amino ácido oxidasas (Alape *et al.* 2008).

Las miotoxinas bothrópicas son de naturaleza básica, y constituyen un grupo de proteínas estructural y antigénicamente relacionadas con las fosfolipasas. Se caracterizan por producir daño al sarcolema y aunque se afirma que algunos componentes pueden estar involucrados en la unión específica al sarcolema, el punto de unión a la membrana muscular, aún es desconocido (Huatuco *et al.* 2004).

Todos estos compuestos generan una acción farmacológica particular, incluyendo efectos como la acción proteolítica y sobre la coagulación sanguínea, entre otras actividades y efectos biológicos que se discutirán más adelante.

4.3.1.2 Actividad biológica del veneno de *B. asper*. La complejidad del veneno de la especie como consecuencia de la presencia de toxinas, proteínas enzimáticas y no enzimáticas, desencadena un complicado cuadro de alteraciones fisiopatológicas que incluyen efectos locales y sistémicos (Castro *et al.* 1999, Otero 2009). Además, muchos de estos compuestos, al igual que en diferentes especies del género *Bothrops*, destruyen la cubierta endotelial de los vasos sanguíneos, las proteasas desencadenan la producción de histamina y bradiquinina y afectan el mecanismo de conducción del miocardio (Vargas 1970, Rodríguez 2001, De Roodt *et al.* 2004, Maruñak *et al.* 2006).

Entre las actividades y efectos biológicos del veneno de *B. asper* la formación de edema es generada por: a). La acción directa de los componentes del veneno sobre la microvasculatura, incrementando la permeabilidad de los capilares y las vénulas y b). La presencia de miotoxinas en el veneno, las cuales generan infiltración de leucocitos e incremento de IL-6 y a su vez desencadenan procesos inflamatorios que terminan en la actividad edemática del veneno. Esta actividad también puede generar graves alteraciones por la pérdida de fluidos, e incluso ocasionar la

compresión de los tejidos, necrosis, isquemia y consecuentemente síndrome compartimental, como resultado del daño vascular ocasionado por la liberación de mediadores endógenos de la histamina, las cianinas y las prostaglandinas (Gutiérrez *et al.* 1986, Gutiérrez y Lomonte 1989, Lomonte *et al.* 1993).

Las enzimas proteolíticas se constituyen en componentes importantes de los venenos de la familia Viperidae, actúan degradando los componentes proteicos de la membrana basal de la microvasculatura, y posteriormente producen disrupción de células endoteliales por lo que se relaciona con la actividad hemorrágica. Se ha documentado que los venenos de *B. asper* de diferentes áreas geográficas presentan variación intraespecífica respecto a la actividad proteolítica. Así, *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica muestra una actividad de 87 ± 5 U/mg, mientras que *B. asper* del Caribe tiene una actividad proteolítica de 76 ± 5 U/mg (Lomonte y Gutiérrez 1983).

El mecanismo de acción sobre la coagulación se produce por agregación plaquetaria consecutiva a la lesión vascular, potenciada por la endopeptidasa del veneno, que provoca activación de los factores plaquetarios, por la activación del paso de protrombina a trombina, de fibrinógeno a fibrina y la inactivación del factor XIII, generando finalmente una coagulopatía (Pineda y Renjifo 2002, Araujo 2003, Pastrana *et al.* 2003).

Las metaloproteinasas, son uno de los componentes principales que desencadenan la actividad hemorrágica del veneno de *B. asper*, causada por la degradación de proteínas de la membrana basal en la pared de los vasos sanguíneos, acción que genera la pérdida de la integridad de los capilares, la extravasación y los efectos hematotóxicos del veneno (Gutiérrez y Lomonte 1989, Rodríguez 2001). Las manifestaciones hemorrágicas generadas por *B. asper* ocurren en varios órganos y pueden ser responsables de hipovolemia, hipotensión, hipoperfusión tisular, choque cardiovascular y severos accidentes cerebrovasculares en los pacientes (Gutiérrez *et al.* 2009).

El efecto hemolítico se produce directamente por acción de la fosfolipasa A sobre la membrana del hematíe o a través de la transformación de la lecitina en lisolecitina, que actúa como sustancia hemolítica (Pastrana *et al.* 2003), esta enzima también puede inducir acción cardiotoxica, miotoxicidad, efecto anticoagulante y actividad inductora de edema (Lazo *et al.* 1998), y conducir a una serie de drásticos eventos degenerativos que culminen con necrosis selectiva de las células de los tejidos blanco (Yasnó 2005).

El efecto mionecrótico se caracteriza porque las fibras necróticas presentan masas de miofibrillas amorfas alternando con espacios vacíos; este efecto ocurre como respuesta directa a la acción de las miotoxinas las cuales afectan la integridad de la membrana plasmática del músculo esquelético o como consecuencia indirecta de la isquemia que se desarrolla en el músculo esquelético por acción directa del veneno sobre la microvasculatura (Gutiérrez y Lomonte 1989).

4.3.1.3 Dosis Letal 50 (DL50) del veneno de *B. asper*. La dosis letal es la cantidad en miligramos, en este caso de veneno, que al ser aplicado a una población experimental, ocasiona en un período determinado de tiempo y en función de su naturaleza química, la muerte del 50% de la población (Instituto Clodomiro Picado 2010). Los resultados se expresan en términos de miligramos de veneno por gramo de peso, o en microgramos por peso total en gramos del animal. Además el valor de la DL50 es inversamente proporcional a su poder de letalidad, así, cuanto menor es la DL50 de una sustancia, mayor es su grado de toxicidad (Yasnó 2005, Instituto Clodomiro Picado 2010).

Existen diferentes variables que influyen sobre la determinación de la dosis letal 50, como la ruta de inoculación (Kococholaty *et al.* 1968), los factores de dilución y los niveles (número de concentraciones) utilizados; así, a mayor distancia en el factor de dilución mayor será la varianza asociada al sistema. De igual manera el número de ratones (n) utilizados por cada nivel de veneno y el n total de la prueba, e incluso variables de carácter biológico como las cepas de ratones (reproducibilidad en las cepas usadas) y el peso de los mismos se convierten en factores críticos durante la estimación de la dosis (Solano *et al.* In prep).

La dosis mínima letal 50 del veneno de *B. asper* reportada por Assakura *et al.* (1992) está entre 70 a 77 µg/ratón; sin embargo la DL50 obtenida en diferentes poblaciones de *B. asper* particularmente del Departamento del Cauca está entre 95.2-119.5 µg/ratón según Navia (2005) y entre 105.9-116.1 µg/ratón según Yasnó (2005), lo que indica la variación interpoblacional del veneno de la especie. Es necesario tener en cuenta que la vía de inoculación fue la misma (intraperitoneal); la variación entre las dosis letales de las poblaciones del Cauca puede atribuirse al tamaño de muestra de ratones utilizados por nivel y en total, a la diferencia en peso de los mismos y su cepa de procedencia.

4.4 EL ACCIDENTE OFÍDICO

Conocido también como ofidiotoxicosis, ofitoxemia ó simplemente mordedura de serpiente. Es el cuadro clínico que comprende un conjunto de síntomas y signos como resultado de la inoculación de sustancias venenosas o no, producto de la mordedura de una serpiente venenosa o no y que pueden ocasionar severos daños a tejidos y órganos e incluso llegar hasta la muerte (Lévano y Fernández 2004, Ayerbe 2008).

Se presentan diferentes grados de envenenamiento, leves, moderados y graves, los cuales están determinados por el tamaño del ofidio, la especie, la cantidad de veneno inoculado, la vía de inoculación, la profundidad de la mordedura, la edad, susceptibilidad y salud del paciente y el período de tiempo antes de la aplicación del tratamiento (Aguirre 2004).

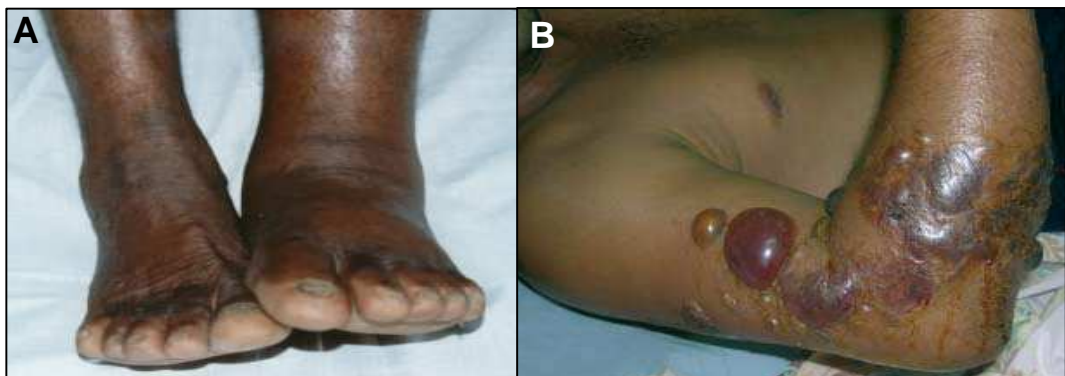
Estudios sobre ofidismo en el Departamento del Cauca durante los períodos comprendidos entre 1993 - 1997 y 2000 – 2008, concluyen que El Tambo presenta el mayor número de accidentes ofídicos, principalmente por la alta densidad de serpientes en este municipio (Ayerbe 2000, Ayerbe 2009).

4.4.1 Accidente bothrónico. Este envenenamiento es causado por las serpientes de los géneros *Bothriechis*, *Bothrocophias*, *Bothriopsis*, *Bothrops*, *Porthidium* y corresponde a los accidentes ofídicos de mayor importancia epidemiológica en el país. El cuadro clínico se caracteriza por manifestaciones locales importantes como dolor intenso, edema de carácter precoz y progresivo; frecuentemente se presentan equimosis, sangrado por los sitios de inoculación del veneno, linfadenitis regional, parestesias, hipotermia y con menor frecuencia necrosis de tejidos, formación de abscesos o desenvolvimiento de síndrome compartimental, dejando como consecuencia la pérdida funcional o anatómica del miembro afectado (Ayerbe 1995 y 2008).

Las manifestaciones sistémicas incluyen coagulopatías, hemorragias como gingivorragias, hematuria, hematochesis y hematemesis, epistaxis, hipotensión arterial, shock mixto, convulsiones, ictericia, septicemia, coagulación intravascular diseminada, náuseas, vómitos, sudor, oliguria o anuria, síntomas neurológicos secundarios a causa de hemorragia intracraneal; muerte por insuficiencia renal aguda, hemorragia en el sistema nervioso central y a nivel de los pulmones, microtrombosis capilar pulmonar masiva, trombosis coronaria ó taponamiento cardiaco e incluso aborto en las mujeres embarazadas (Ayerbe 1995, Castro *et al.* 1999, Araujo 2003, Pinho y Pereira 2001, Otero 2009)

Particularmente *B. asper* desencadena edema (Figura 6 A) en el 95% de los casos, hemorragia local (34%), hemorragias y equimosis durante los primeros 5 a 30 minutos, ampollas y flictenas (12%) (Figura 6 B), dermonecrosis y mionecrosis (10%) entre las seis u ocho horas después de la mordedura, defibrinogénesis en el 60 a 70% de los casos, la cual suele presentarse entre los 30 a 60 minutos de ocurrido el accidente (Otero 2009). Entre los hallazgos paraclínicos están, elevación de los indicadores de fase aguda (proteína C reactiva), paracoagulación por efecto de enzimas similares a la trombina con síndrome de coagulación intravascular diseminada (CID); trombocitopenia, prolongación de los tiempos de coagulación (TC) y aumento de los productos de degradación del fibrinógeno (PDF) (Ayerbe 2008).

Figura 6. (A) Edema en pierna izquierda encontrados en un accidente bothrónico moderado (Araújo 2003). (B) Flictenas a lo largo del miembro afectado. Cortesía Hospital Universitario San José, Popayán (Ayerbe 2008).



4.4.2 Sueros antiofídicos o antivenenos. Son el tratamiento específico y efectivo para este tipo de lesiones, siendo la vía intravenosa la ideal (98%); pueden ser mono o polivalentes; los monovalentes actúan para un género específico de serpientes, mientras que los polivalentes sirven para el tratamiento de diferentes géneros de la misma familia (Lévano y Fernández 2004). Sin embargo, como se obtienen a partir de la inmunización de equinos, pueden desencadenar alteraciones alérgicas llegando incluso a ocasionar la muerte del paciente, y por lo tanto estas reacciones deben ser bloqueadas con adrenalina, antihistamínicos y corticoides (Aguirre 2004).

En Colombia circulan sueros producidos en Costa Rica, Brasil, Venezuela y México, a partir de venenos de poblaciones de serpientes de dichos países y consecuentemente la eficacia del tratamiento para los accidentes nacionales no es la misma (Otero *et al.* 1992). Alape (2002) también afirma que los sueros antiofídicos preparados con venenos de una región neutralizan eficazmente solo los venenos de esa región y por lo tanto se deben producir sueros antiofídicos con venenos de ejemplares procedentes de la misma región donde se usan.

4.5 IMPORTANCIA DE LAS SERPIENTES

La protección de las serpientes en nuestro entorno es relativamente nula, y hablar de conservación de las serpientes para muchos podría sonar absurdo. Al privarlas de su hábitat se interrumpe la cadena trófica de varios animales que las incluyen en su dieta alimenticia, y al mismo tiempo se genera el crecimiento de poblaciones (roedores) que pueden ocasionar graves pérdidas en el sector agrícola y perjuicios sobre la salud humana (Vélez 2006).

Serpientes no venenosas como *Clelia clelia*, la llamada cazadora negra, es ofiófaga, pues se alimenta de serpientes venenosas como *Bothrops asper*, lo cual hace de ella una serpiente de gran utilidad para el control de las mismas poblaciones de ofidios. No obstante, el hombre debido a su concepción sobre las serpientes como animales mortales, ha ocasionado la muerte indiscriminada e indiferente de todas las serpientes (Ángel 1987).

Además, a pesar de su importancia en el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas, las serpientes también son víctimas de la persecución humana, con el fin de adquirirlas como mascotas, para elaborar accesorios o platos de cocina (Ángel 1987). No todos los ejemplares provienen de zocriaderos, sino que son extraídos directamente de su hábitat natural, y las autoridades ignorantes de su protección toleran este comercio; como por ejemplo en Medellín la venta de carne de boa es relativamente alta (Vélez 2006).

4.6 METODOS PARA EVALUAR LA VARIACIÓN PROTÉICA

4.6.1 Electroforesis. Es una técnica que detecta cambios en las propiedades físicas de las proteínas cuando un aminoácido es sustituido por otro (Griffiths *et al.* 2005). Se caracteriza por sus propiedades uniformes, es de fácil preparación, reproducible y permite medir la tasa de migración de moléculas en un medio que contiene líquido cuando se le aplica un campo eléctrico (García 2000). El proceso inicia cuando se

aplican las muestras en los pozos y la corriente eléctrica pasa por el sistema durante un tiempo apropiado, haciendo migrar las moléculas; finalmente el papel o el gel puede tratarse con colorantes selectivos para visualizar los componentes separados (Klug y Cummings 1999).

Factores como la potencia del campo eléctrico, la acción del tamiz molecular del medio (papel, almidón, gel) en que se realiza la migración, el pH, la fuerza iónica, la homogeneidad de la muestra, el gradiente de potencial, el tiempo de corrido y la concentración de la poliacrilamida afectan la tasa de migración de las moléculas (García 2000, Lecca 2003).

Esta técnica ha sido utilizada para separar diferentes moléculas, un ejemplo son las proteínas, las cuales son separadas en función de las diferencias en tamaño y en carga eléctrica. Las variaciones nucleotídicas en un gen estructural generan la sustitución de un aminoácido cargado, alterando la carga eléctrica total de la proteína, y esta diferencia en la carga se puede detectar como un cambio en la tasa de migración de la proteína en un campo electroforético (Klug y Cummings 1999).

4.6.1.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida. La electroforesis de proteínas en gel con una matriz de poliacrilamida, se conoce como electroforesis en poliacrilamida (PAGE, "polyacrilamide gel electrophoresis"); es una de las técnicas más usadas para caracterizar mezclas complejas de proteínas, además es un método rápido y económico a nivel de muestra, puesto que se requieren pequeñas cantidades de proteína. Los geles de poliacrilamida son un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas ya que presentan una serie de propiedades idóneas como: son químicamente inertes, transparentes y estables en un rango amplio de pHs, temperatura, fuerza iónica, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos (Bollag y Edelstein 1991, Lomonte 2005).

Assakura *et al.* (1992), afirma que esta técnica ha permitido reconocer y distinguir especies de serpientes de la familia Viperidae, gracias a la particularidad de los patrones electroforéticos proteínicos, siendo posible visualizar bandas polipeptídicas con su respectiva masa molecular, tal como lo muestra Alagón *et al.* (1980) con el veneno de *Bothrops asper*.

4.6.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La técnica se fundamenta en el uso de una presión alta sobre la sustancia a analizar (fase móvil), la cual permite el paso de dicha sustancia a través de la fase estacionaria con mayor poder de retención, puesto que sus componentes son del tamaño de micrones para aumentar la eficiencia en la separación de las biomoléculas (Palma *et al.* 2006, Bussi 2007).

Esta técnica es indispensable para la purificación de biomoléculas, de péptidos u oligonucleótidos sintetizados químicamente y de compuestos orgánicos de baja masa molecular (Palma *et al.* 2006). Entre las ventajas que tiene la técnica se encuentran: gran sensibilidad, determinaciones cuantitativas exactas, determinación de compuestos no volátiles, reducción en los tiempos de purificación y como

resultado se incrementa el porcentaje y rendimiento de la separación de las sustancias analizadas (Bussi 2007).

4.6.3 Inmunolectrotransferencia o Western Blotting. Esta técnica puede acoplarse con la electroforesis en gel de poliacrilamida; se fundamenta en el marcaje de anticuerpos con enzimas para la detección de cantidades muy bajas de antígenos o anticuerpos. La técnica es de gran utilidad en el análisis de mezclas antigénicas y provee información relacionada con la masa molecular de los antígenos que reaccionan (Lomonte 2005).

Los perfiles electroforéticos son transferidos a una membrana de nitrocelulosa mediante un campo eléctrico, quedan inmovilizados sobre su superficie por uniones no covalentes y son accesibles a la interacción con anticuerpos; inicialmente los anticuerpos reconocen al antígeno, luego un conjugado anti-inmunoglobulina/enzima detecta los anticuerpos unidos al antígeno y le confiere un coloreado precipitable (Lomonte 2005).

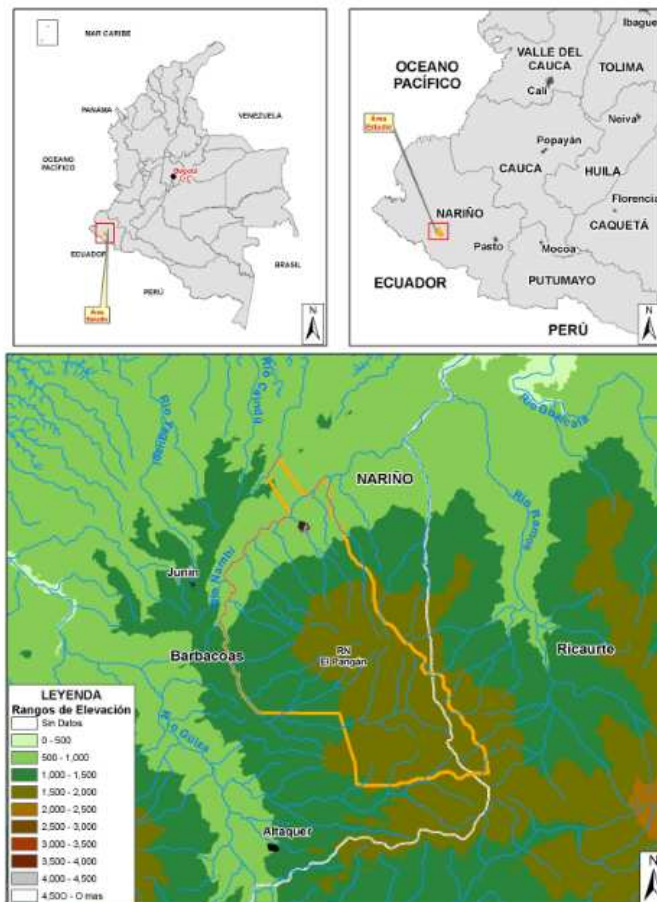
4.6.4 Métodos inmunoenzimáticos: ELISA para cuantificación de anticuerpos. Es una técnica inmunoenzimática heterogénea, simple y versátil, donde la actividad de la enzima no es afectada por la reacción antígeno- anticuerpo, siendo importante contar con una fase de separación entre reactivos unidos y reactivos libres. Se basa en el marcaje de anticuerpos con enzimas, permitiendo su cuantificación; consiste en unir el antígeno a la fase sólida, el cual es reconocido por los anticuerpos presentes en la mezcla (sueros antiofídicos) y los anticuerpos a su vez son detectados mediante un conjugado anti-inmunoglobulina/enzima. Esta metodología complementa el análisis de inmunolectrotransferencia, pues es de carácter cuantitativo (Lomonte 2005).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ÁREAS DE ESTUDIO

5.1.1 Reserva Natural de las Aves El Pangán, Nariño. Ubicada en el municipio de Barbacoas, Departamento de Nariño, al suroccidente de Colombia sobre la vertiente Oeste de Cordillera Occidental de los Andes, entre 01°21'N y 78°04'W (Figura 7). Hace parte de las tierras bajas del Pacífico Colombiano, reconocidas como parte del Chocó biogeográfico (Conservación Internacional 2006), comprende las zonas de vida de bosque pluvial tropical y bosque pluvial premontano, con una altitud entre 550 y 1.900 m. Presenta una temperatura promedio de 24°C, una precipitación media anual de 6512 mm, con régimen bimodal de fuertes lluvias entre los meses de Abril, Mayo, Septiembre, Octubre y Noviembre y una humedad del 90% (ProAves 2005).

Figura 7. Reserva Natural de las Aves El Pangán, Municipio Barbacoas, Departamento Nariño (Fuente: este estudio).

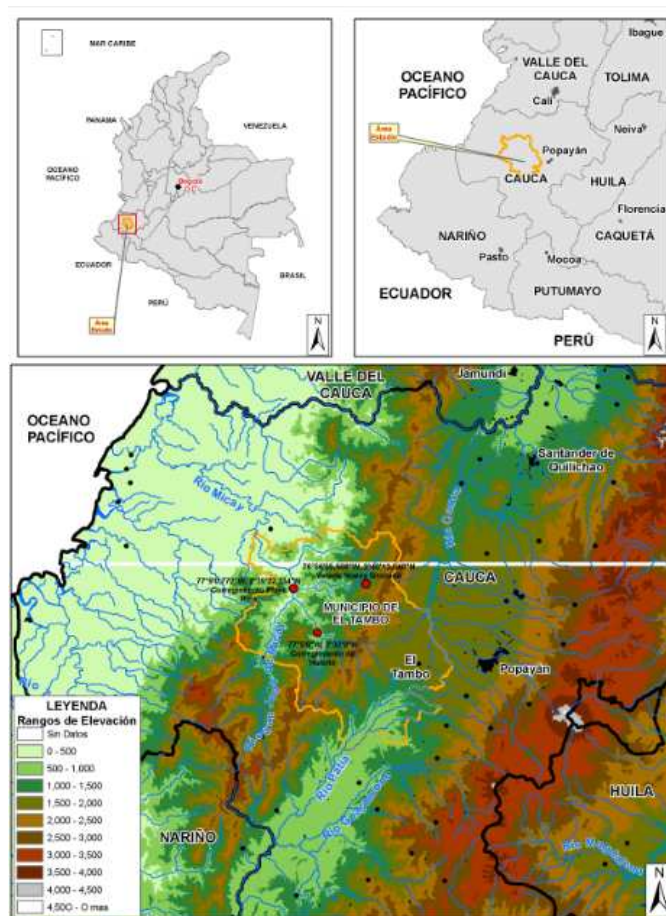


Los dos ejemplares que representaron la población de *B. asper* de Nariño (Ba-N), fueron colectados uno en el punto conocido como la Manzana y el otro a pocos metros del sendero la Sabaleta. Ambos puntos se encuentran en un perímetro cercano a la cabaña de la Reserva.

5.1.2 Municipio de El Tambo, Cauca. Está localizado hacia el occidente, a 33 kilómetros de la ciudad de Popayán (Figura 8), con una ubicación geográfica 2°27'15" N y 76°40'04" W y una altitud de 1745 m.s. n.m. Presenta una temperatura media de 18°C, está dividido en tres regiones: la región del alto Cauca, región de la cuenca alta del Río Patía y región del Río Micay. Su relieve es montañoso, incluye pie de montaña, colinas y superficie aluvial; cuenta con importantes elevaciones: los cerros de Altamira, Don Alfonso, Mechengue, Napi, Pan de Azúcar, Santana y Munchique; y hoyas como la del río Cauca que drena a la vertiente del Atlántico y las de los ríos Patía y Huisitó en el Pacífico (<http://eltambo-cauca.gov.co>).

La muestra de la población de *B. asper* de Cauca, correspondió a la vertiente oeste de la Cordillera Occidental en el Municipio El Tambo (Ba-T), en los corregimientos de Huisitó, Playa Rica y Nueva Granada.

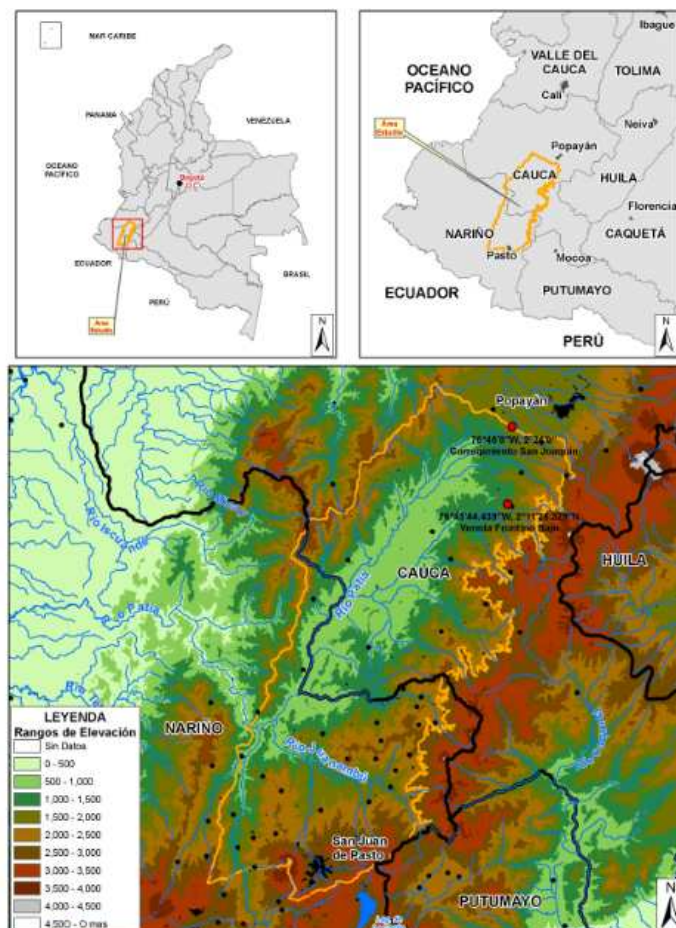
Figura 8. Municipio El Tambo, Departamento Cauca (Fuente: este estudio).



5.1.3 Valle del Río Patía. El Valle del Río Patía comprende la zona de influencia del curso alto del Río Patía ($0^{\circ} 14' N$) en el Departamento del Cauca y en el extremo norte del Departamento de Nariño (Figura 9). Su clima es altamente estacional, la precipitación anual es menor a 900 mm y tiene una altitud entre 600 y 900 m. Está rodeado por bosque nublado y bosque húmedo premontano de las Cordilleras Central y Occidental, este valle presenta una biota única propia de las zonas áridas y ha permanecido aislado de hábitats similares un tiempo suficiente para que la especiación ocurra en su flora y fauna (Lobo 1993, Díaz *et al.* 2006).

El Río Patía, que fluye desde el Macizo Colombiano hacia el occidente, al entrar en territorio de Nariño pierde la amplitud de su valle y forma la fosa Patiana, que separa la Cordillera Centro-Oriental de la Cordillera Occidental en la Hoz de Minamá, una elevación de 400 m, el cual es un imponente cañón de más de 1 km de profundidad y sesenta km de largo; luego gira en dirección Noroeste para salir a la Llanura del Pacífico, donde su cauce forma amplios meandros en zona selvática (Lobo 1993, Díaz *et al.* 2006).

Figura 9. Valle del Río Patía, Cauca- Nariño (Fuente: este estudio).



La muestra de la población de *B. cf. asper* del Valle del Patía (Ba-P), corresponde al suroriente del Municipio de El Tambo, corregimiento San Joaquín, Veredas Pomorroso y Versalles, y al Municipio la Sierra, vereda Frontino bajo en el Departamento del Cauca

5.2 TRABAJO DE CAMPO

Se realizó una salida de campo de 17 días a la Reserva Natural de las Aves el Pangán, con búsquedas diurnas y nocturnas empleando ganchos de sujeción, de presión y bolsas de tela (Scrocchi y Kretzschmar 1996). Con el fin de corroborar e identificar la especie, en campo se realizaron las respectivas observaciones físicas y morfológicas tal y como las describe Castro *et al.* (2005). Una vez capturados los ejemplares, fueron colocados en recipientes plásticos para su transporte hasta el serpentario del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC).

Entre los hábitats revisados en la Reserva Natural de las Aves el Pangán se incluyen: zonas abiertas o claros (Figura 10 A y B), plataneras (Figura 10 C) y bordes de bosque (Figura 10 D). Entre los microhábitats donde se realizaron las búsquedas están: troncos (Figura 11 A), construcciones de pequeñas cabañas abandonadas (Figura 11 B y C) donde se observó crecimiento sucesional temprano, cuevas formadas entre las raíces de los árboles o las rocas (Figura 11 D), hojarasca (Figura 11 E), y a lo largo de las quebradas o alrededor de la formación de estanques o lagunetas, (Figura 11 F). El Anexo B muestra los lugares de muestreo y el esfuerzo horas/hombre en la Reserva Natural de las Aves el Pangán.

Figura 10. Hábitats de la Reserva Natural de las Aves el Pangán donde se efectuaron las búsquedas. (A, B) Zonas abiertas o claros. (C) Plataneras. (D) Bordes de bosque. Fotografía: Mora, D. 2009.

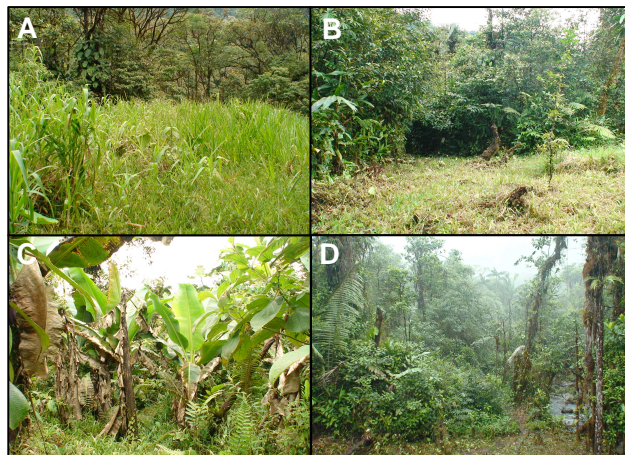
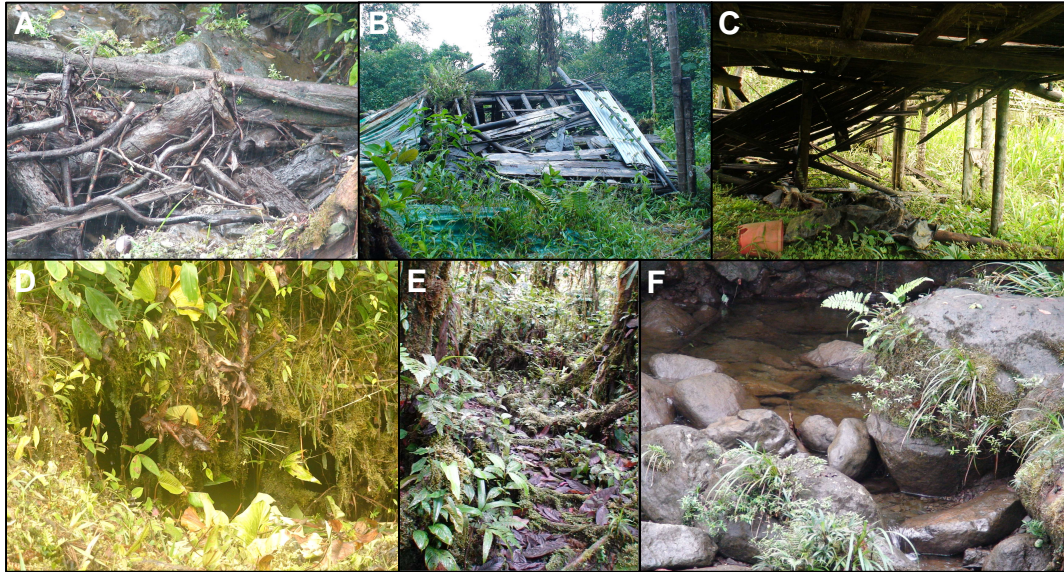


Figura 11. Microhábitats de la Reserva Natural de las Aves el Pangán. (A) Troncos. (B, C) Cabañas o estaciones abandonadas. (D) Cuevas. (E) Hojarasca. (F) Orillas de las quebradas. Fotografía: Mora, D. 2009.



5.3 TRABAJO DE LABORATORIO

5.3.1 Tamaño de muestra. Los venenos de 4 ejemplares adultos y de un juvenil menor de un año de *Bothrops* cf. *asper* de la Cuenca alta del Río Patía (Cauca) y de 4 individuos adultos y de un neonato de *B. asper* de El Tambo (Cauca) fueron extraídos y facilitados por el serpentario del CIBUC. En la Reserva Natural de las Aves el Pangán (Nariño) se capturaron dos individuos neonatos. El estado de crecimiento fue definido con base en la longitud del cuerpo así: Neonatos < 40 cm, jóvenes menores de un año < 60 cm, juveniles 60-98 cm en machos y 60-110 cm en hembras, adultos > 98 cm y 110cm en machos y hembras, respectivamente (Solórzano y Cerdas 1989, Sasa 2002).

5.3.2 Extracción del veneno. Se realizó manualmente bajo condiciones de asepsia, mediante la técnica de inmovilización y recepción en embudo y tubo eppendorf, esta técnica consistió en inmovilizar a la serpiente con ayuda de ganchos sencillos y ganchos de presión; después de que la serpiente mordiera el parafilm dispuesto sobre un embudo de vidrio unido a un tubo eppendorf, se masajeó la región de las glándulas del veneno para estimular su producción (Figura 12); una vez obtenido se congeló a una temperatura mínima de -20°C (Guerrer o-Vargas 2002).

Figura 12. Extracción de veneno de adultos de *Bothrops asper*. Técnica de inmovilización y recepción en embudo y tubo eppendorf. Cortesía CIBUC®, Popayán. Fotografía: Mora, D. 2008.



Para los neonatos de *B. asper* de la Reserva Natural de las Aves el Pangán fueron necesarias dos extracciones más, por la baja cantidad de veneno obtenido durante la primer extracción (cada una con un espacio de tiempo de 30 días con el fin de que la serpiente recuperara la tasa de producción del veneno oportunamente), para ello se implementó el uso de dos tubos eppendorf unidos con el fin de facilitar el manejo del veneno y evitar la mínima pérdida del mismo (Figura 13).

Durante la extracción del veneno se registraron diferentes datos, relacionados con el volumen de veneno, datos que fueron complementados con la talla y el peso de cada uno de los individuos, tal como se indica en el Anexo C.

Figura 13. Extracción de veneno de neonatos de *B. asper*. *Bothrops asper* (N° CIBUC – Se 000 193); hembra de 38 cm LT. Ejemplar de la Reserva Natural de las Aves el Pangán, Corregimiento Junín, Municipio Barbacoas, Nariño. Cortesía CIBUC® Fotografía: Mora, D. 2009.



5.3.3 Caracterización proteica del veneno

5.3.3.1 Cuantificación de proteínas por el método de Biuret. Inicialmente se realizó la limpieza del veneno, para ello las muestras previamente descongeladas se diluyeron

con agua destilada en tubos eppendorf, posteriormente todas las muestras fueron vortezadas y centrifugadas en una centrifuga marca *Labnet* a 21.38 x g durante 15 minutos a 8°C, con el fin de separar los componentes inactivos del veneno y obtener la concentración de proteínas a partir del sobrenadante, el pellet fue desechado.

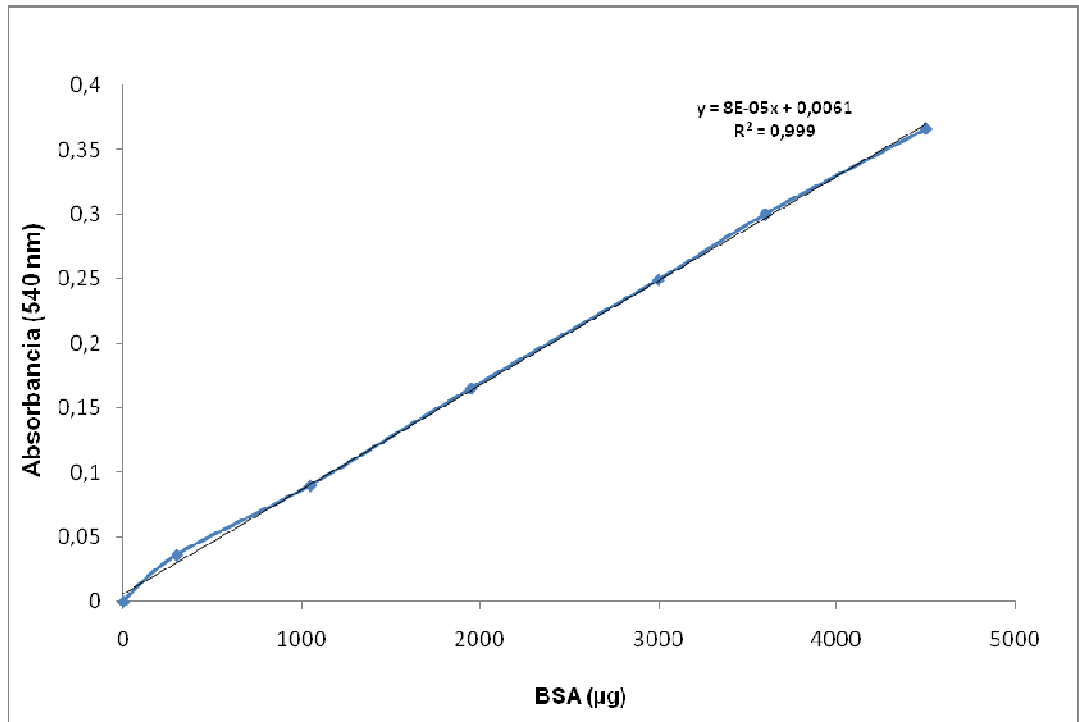
La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Biuret (Anexo D, muestra las condiciones originales del método) bajo algunas modificaciones (Tabla 1), con el objetivo de trabajar con volúmenes menores (3ml) teniendo en cuenta las bajas cantidades de veneno obtenidas a partir de los ejemplares. La curva de calibración (Figura 14) se realizó con la concentración de BSA (3 mg/ml) requerida por el método, partiendo desde 0 µg hasta 4500 µg. Una vez obtenida la curva de calibración, a partir de los sobrenadantes de cada muestra se tomaron 100 µl, los cuales se llevaron con volúmenes iguales de agua (1400 µl) y de reactivo de Biuret (1500 µl) hasta un volumen de 3000 µl.

Tabla 1. Factores de carga modificados para la curva de calibración BSA.

Tubo	Patrón BSA (µg)	Patrón BSA (3mg/ml)	Agua (µl)	Reactivo de Biuret (µl)
0	—	—	1500	1500
1	300	100 µl	1400	1500
2	1050	350 µl	1150	1500
3	1950	650 µl	850	1500
4	3000	1000 µl	500	1500
5	3600	1200 µl	300	1500
6	4500	1500 µl	—	1500

Posteriormente los tubos se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos, se observó una gama de colores entre azul y púrpura debido a los enlaces peptídicos en la proteína con el cobre en medio alcalino, y después se realizaron las respectivas lecturas espectrofotométricas a una absorbancia de 540 nm como lo sugiere el método; el espectrofotómetro fue calibrado con todos los reactivos excluyendo el veneno. Es importante tener en cuenta que el color es estable por dos horas, después de ese tiempo el color se torna menos intenso.

Figura 14. Curva de calibración para cuantificación de proteínas de *B. asper* de El Tambo Cauca y *B. cf. asper* del Valle del Patía, Cauca. Seroalbúmina Bobina (BSA). La curva de calibración se modificó para cantidades pequeñas de reactivo y de veneno, por ser un método desnaturalizante.



Los venenos se repartieron en pequeñas alícuotas en tubos eppendorf y fueron liofilizados en un equipo marca *Labconco*, con el fin de facilitar la manipulación de las muestras en cada una de las pruebas posteriores (electroforesis, cromatografía, inmunoreactividad y actividades biológicas) y para evitar etapas de descongelamiento o congelamiento drásticos que ocasionarían un eventual deterioro de las moléculas (Lecca 2003). Los venenos de los individuos neonatos y del juvenil menor de un año no fueron cuantificados proteicamente y por lo tanto, éste veneno fue extraído y liofilizado directamente.

Se realizó una prueba de t-Student con respecto al promedio (Microsoft Office Excel 2007), con el fin de determinar si la cuantificación proteica de los venenos del suroccidente Colombiano se ajustaba al promedio reportado para la especie en Costa Rica).

5.3.3.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida. Se realizaron geles de poliacrilamida al 12% y geles en gradiente de 10% a 15%, buffer compactador: 3.0 g Tris, pH 8.8, buffer separador: 18.15 g Tris, pH 6.8 (Laemmli 1970); para la preparación de las soluciones stock, el veneno fue pesado en una microbalanza marca CAHN C-33 con precisión en miligramos y llevado con agua estéril a una concentración de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Lomonte 2005).

Para el gel al 12% se tomaron de cada muestra 5 μ l (20 μ g de proteína) y se adicionó 2.5 μ l de amortiguador de muestras reductor (solución concentrada 2x) a cada una; bajo las mismas proporciones se cargó el marcador Page Ruler SM0671 (4-20% Tris-glicina SDS-PAGE); el gel fue corrido durante una hora y media a 150 v. Para los geles en gradiente, se tomaron 7.5 μ l (30 μ g de proteína) de muestra, con excepción de dos muestras; dada la limitación del veneno de los neonatos de El Tambo se tomaron 6 μ l (24 μ g de proteína), mientras que de los neonatos del Pacífico de Costa Rica por la baja señal de su patrón electroforético, se tomaron 10 μ l (40 μ g de proteína); tanto el marcador como el voltaje de corrida fueron los mismos que en el gel anterior. Todos los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (Lomonte 2005).

Como patrones de comparación se cargaron: un *pool* de venenos de 11 adultos y uno de 20 neonatos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica (Distrito de Sabanillas, Acosta) y un *pool* de venenos de 15 adultos y uno de 20 neonatos de *B. asper* del Caribe de Costa Rica (Distrito Quesada, San Carlos). Tanto los venenos de los individuos del suroccidente de Colombia, como los de la Costa Pacífica de Costa Rica se colocaron en el mismo gel, organizados por estado de crecimiento y procedencia.

La detección de las bandas y la masa molecular de las mismas fueron determinadas por medio del Software de análisis de imagen ImageQuant TL versión 2005. A partir de la masa molecular de las bandas presentes en dos o más individuos se obtuvo un valor promedio, el cual reflejó la masa molecular para la banda específica \pm la desviación estándar (SD); mientras que la masa molecular para las bandas únicas, no incluyó SD. Con base en el porcentaje estimado de concentración para cada banda que proporciona el programa se hicieron las comparaciones respectivas. A cada banda se le asignó una posible actividad farmacológica, comparando las masas moleculares con las de los grupos proteicos encontrados por Alape *et al.* (2008).

Se expresaron porcentajes de comparación intra e interpoblacional. Los porcentajes de variación ontogénica intrapoblacional se obtuvieron del número de bandas proteicas compartidas entre adultos y neonatos o juveniles, respecto al número total de bandas proteicas para toda la población. Los porcentajes de comparación interpoblacional se obtuvieron del número de bandas proteicas compartidas entre las poblaciones frente al número total de bandas para las poblaciones comparadas.

Se elaboró una matriz de presencias y ausencias (1 y 0, respectivamente) de las bandas proteicas detectadas para todos los individuos, teniendo en cuenta el lugar de procedencia de los especímenes y su estado de crecimiento. Dicha matriz fue cargada en el programa NTSYS pc. 2.1, el cual permitió comparar los patrones electroforéticos intra e interpoblacionalmente por medio de un fenograma, utilizando el coeficiente de Jaccard (J). Este coeficiente muestra la similaridad entre los OTUS (individuos de *B. asper* y *B. cf. asper*) en una escala de 0 a 1, donde 1 es el valor máximo de similitud.

5.3.3.3 Cromatografía. Se realizaron cromatografías a partir de un *pool* de ejemplares adultos de la población de *B. asper* de El Tambo, Cauca y de *B. cf. asper*

del Valle del Patía, Cauca; la separación se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa, 1 miligramo de veneno fue disuelto en 250 µl de solución A, la muestra fue centrifugada a 13000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente, a fin de limpiar el veneno y remover el material insoluble.

Para la separación de las proteínas se usó el sistema AGILENT™ 1100 series y una columna RP10 C₁₈ de 2.6 x 200 mm y 10 µm tamaño de partícula, eluido a 1.25 ml/min con un gradiente de 0.1% TFA, 5% acetonitrilo (solución A) y de 0.1%, 95% acetonitrilo (solución B) (5% B por 10 min, seguido de 5-10% B por 20 min, 10-20% B por 45 min, 20-45% B por 80 min, 45-70% B por 20 min, y 70% B por 10 min). La detección de las proteínas fue a 215 nm. Con el fin de tener un patrón comparativo, también se realizó la separación de las proteínas de un *pool* de venenos de especímenes adultos de la Costa Pacífica de Costa Rica.

Los picos de cada cromatograma fueron numerados y comparados con los resultados mostrados por Alape *et al.* (2008), lo que permitió asignarle a cada pico una posible actividad farmacológica.

5.3.3.4 Inmunoelectroforesis o Western blotting. A partir de la separación electroforética de los antígenos (veneno), se realizó una transferencia a un medio de soporte en forma de membrana (nitrocelulosa); para ello se ensambló el “cassette” de transferencia, se colocó junto con un bloque de enfriamiento y una barra magnética en la cámara, sobre un agitador magnético a baja velocidad; la transferencia se realizó a 50 mAmp durante toda la noche (Lomonte 2005).

Las membranas fueron bloqueadas con caseína (2%) durante 30 minutos, y los antígenos fueron inmunodetectados con suero mono-específico anti-*B. asper* Pacífico y mono-específico anti-*B. asper* Caribe, manufacturados en el Instituto Clodomiro Picado (Universidad de Costa Rica); como control se utilizó suero normal equino (SNE) y suero anticoral; los cuales fueron diluidos 1/150 con caseína al 1% preparada en PBS (salina bufferizada en fosfatos 0.12 M NaCl pH 7.2 ± 0.2).

Después de incubación durante hora y media con los sueros y los lavados respectivos (Tween 20 al 0.05%), se agregó Anti IgG-Equino conjugado con peroxidasa (1/8000) durante hora y media. Para los controles con suero normal equino también se utilizó conjugado con peroxidasa, pero para el control con suero anticoral se utilizó conjugado con fosfatasa alcalina (1/10000), después de los lavados se revelaron con sustrato precipitable para peroxidasa (30 mg de 4-Cl naftol en 10 ml de metanol, 50 ml de amortiguador Tris pH 7.5 y 30 µl de peróxido de hidrógeno) y para fosfatasa alcalina (SIGMA).

5.3.3.5 ELISA para cuantificación de anticuerpos. Esta metodología fue desarrollada siguiendo el protocolo propuesto por Lomonte (2005); 144 Pozos se recubrieron durante toda la noche, 48 de ellos con 0.5 µg de proteína/pozo (cantidad mínima de antígeno capaz de proporcionar la máxima señal) de veneno de *B. asper* de El Tambo Cauca, 48 con veneno de *B. cf. asper* del Valle del Patía, Cauca y 48 con veneno de *B. asper* de Barbacoas, Nariño, diluidos en 100 µl de buffer 0.1 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 9.0; posteriormente las placas fueron decantadas y bloqueadas con

caseína (2%) en PBS. Después de realizar los respectivos lavados (PBS-Tween 0.05%, pH 7.2), se hicieron diluciones seriadas de los sueros a testear (factor 3), suero monoespecífico anti-*B. asper* del Pacífico, Caribe, suero polivalente (constituido por veneno de *Lachesis stenophrys*, *Crotalus simus*, *Bothrops asper*), en caseína preparada al 2% en PBS y se agregaron 100 µl a los pozos por triplicado.

Las placas fueron lavadas seis veces con citrato de sodio 0.1 M pH 5 (amortiguador), se procedió a agregar Anti-IgG conjugado con fosfolipasa, diluido 1:20000 con PBS y se incubó durante una hora. Las placas fueron lavadas nuevamente, se adicionó *p*-nitrofenilfosfato a buffer de dietanolamina (0.001 M MgCl₂, 0.09 M dietanolamina, pH 9.8) y se añadieron 100 µl/ pozo del sustrato correspondiente a la enzima, finalmente se incubó a temperatura ambiente hasta obtener un color adecuado (señal de fondo < 0.1 - 0.2 y señales máximas cercanas a 1.5 - 2.0). Las absorbancias fueron leídas a 405 nm en un lector de microplacas (Multiskan Labsystems).

A partir de las absorbancias se elaboraron curvas de dilución vs absorbancia; para determinar el grado de reconocimiento de los sueros frente a los venenos de las poblaciones. Cada punto de la gráfica representó la media \pm SD de las tres repeticiones. Posteriormente, se construyó una matriz con las variables: venenos y sueros antiofídicos, las cuales fueron testeadas con un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con el fin de determinar si se presentaban o no diferencias significativas intra e intergrupalmente. Luego, se realizó una prueba tipo Tukey para la variable de los sueros, a fin de identificar cual de los sueros reconocía más las poblaciones del suroccidente de Colombia. Estas pruebas estadísticas se hicieron en el programa SPSS v 12.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

5.3.4 Actividades biológicas

5.3.4.1 Dosis letal 50 por el método de Finney. Éste es un método paramétrico, aceptado por la Organización Mundial de la Salud, el cual consiste en inyectar por vía intraperitoneal (I.P) un volumen de 0.5 ml de diluciones seriadas de veneno cercanas a la dilución de trabajo encontrada en ensayos preliminares. La vía de inoculación fue la intraperitoneal, ya que es una vía de inoculación de absorción rápida, evidencia mayor susceptibilidad del animal y del veneno inoculado, también al ser una vía de inoculación frecuente entre las investigaciones se convierte en un punto comparable.

Se preparó un *pool* de veneno de individuos adultos de la población de *B. asper* de El Tambo, Cauca y de *B. cf. asper* Valle del Patía, Cauca (los neonatos de la población del *B. asper* de Nariño no se tuvieron en cuenta para la determinación de la dosis letal por la baja cantidad de veneno disponible); de cada adulto se pesaron 6 mg de veneno y se diluyeron en 6 ml de PBS con una concentración final de 1mg/ml (solución de trabajo).

A partir del promedio de las DL50 de *B. asper* de El Tambo, reportadas por Navia (2005) 6.06 µg/g y por Yasnó (2005) 6.52 µg/g, se preparó la solución madre para esta población, utilizando PBS como diluyente; para la población de *B. cf. asper* se tomó como referencia la DL50 reportada por Navia (2005) 5.96 µg/g. Para cada

población se evaluaron diez y nueve concentraciones respectivamente (sigma 1.2) y por cada dosis se inyectaron lotes de seis ratones.

Para la prueba se utilizaron ratones albinos *Mus musculus*, sin distinción de sexo, de la Cepa CD-1 (16 a 18 gr de peso corporal) suministrados por el Bioterio del Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica, los animales fueron alimentados con dieta para ratones en iguales condiciones (*ad limitum*) y con acceso constante al agua (*ad libitum*). Terminado el tiempo máximo de observación (24 y 48 horas) se realizó la eutanasia de los animales sobrevivientes mediante inhalación de dióxido de carbono.

La DL50 fue calculada utilizando el paquete estadístico de Probitos (Finney 1971), el cual suministra el valor de la DL50 expresada como μg de veneno por ratón de 16-18 gramos y los límites de confianza. La validez de la prueba radica en tener animales durante toda la prueba bajo condiciones experimentales constantes de temperatura y alimentación (Monje 2007).

5.3.4.2 Determinación de la actividad proteolítica. Se realizó de acuerdo a las condiciones experimentales de Gutiérrez *et al* (2008) con algunas modificaciones. Inicialmente se preparó un sustrato de azocaseína de 10 mg/ml en buffer Tris-HCl 50 Mm, NaCl 0.15 M y Ca Cl_2 5 Mm, pH 8.0 y tres soluciones de trabajo diluidas en el mismo buffer, de 2 mg/ml para las dos poblaciones del Cauca (*pool* de veneno de individuos adultos) y de 0.2 mg/ml para los neonatos de Nariño; a partir de las cuales se evaluaron por triplicado cuatro concentraciones, 2000 μg , 500 μg , 10 μg y 5 μg .

Posteriormente se mezclaron 90 μl de azocaseína con 20 μl de la solución de veneno respectiva; las muestras se incubaron a 37° C durante noventa minutos, la reacción fue detenida adicionando 200 μl de ácido tricloroacético al 5% y terminado el tiempo de incubación, se centrifugó a 1830 x g durante cinco minutos. Se tomaron 150 μl de sobrenadante y se mezclaron con 150 μl de NaOH 0.5 M, la absorbancia se determinó en un lector de placas ELISA (Labsystems Multiskan RC) a una longitud de onda de 450 nm; el blanco estuvo conformado por todos los reactivos exceptuando el veneno.

La actividad proteolítica se expresó en Unidades/mg; para ello a partir de la relación entre el promedio de las absorbancias corregidas (de cada valor de absorbancia se sustrajo el valor basal de la lectura del blanco) y el tiempo total de incubación, se obtuvo la variación de la absorbancia por minuto; y con base en la variación reportada por Gutiérrez *et al.* (2008) donde una unidad proteolítica es definida como un cambio de 0.2 en absorbancia por minuto, se obtuvo la actividad proteolítica para cada población.

5.3.4.3 Determinación de la actividad hemorrágica. Se realizó esta actividad biológica, ya que resulta en gran parte de la acción de metaloproteinasas ocasionando la ruptura de la integridad de los microvasos sanguíneos y posterior extravasación (Instituto Clodomiro Picado 2010). Se prepararon soluciones con diferentes concentraciones (2 μg , 1 μg , 0.5 μg , 0.25 μg , 0.125 μg y 0.0625 μg) para el *pool* de veneno de Ba-P y (8 μg , 4 μg , 2 μg , 1 μg , 0.5 μg , 0.25 μg , 0.125 μg) para Ba-T, empleando PBS como diluyente. La dosis fue determinada en piel de ratones de la

Cepa CD-1; se inyectaron grupos de 4 y 5 ratones con soluciones de veneno (0.1 ml) por la vía intradérmica, en la región abdominal.

Dos horas después los ratones fueron eutanizados mediante inhalación de dióxido de carbono, con el fin de remover la piel y medir el área hemorrágica en la superficie interna. El diámetro de la lesión hemorrágica fue determinado mediante el siguiente cálculo:

$$Diámetro = 2X \left(\sqrt{\frac{\text{área} \cdot \text{hemorrágica}}{\Pi}} \right)$$

Finalmente se construyó una curva dosis- respuesta (μg de veneno: eje de las abscisas vs. mm diámetro de lesión hemorrágica, en el eje de las ordenadas) con el programa Microsoft Office Excel 2007, empleando una escala logarítmica para la dosis de veneno y una escala milimétrica para el diámetro de la lesión. La dosis de veneno que corresponde a un diámetro de 10 mm, corresponde a la dosis hemorrágica mínima (Instituto Clodomiro Picado 2010).

5.3.4.4 Determinación de la actividad coagulante. Esta actividad fue determinada sobre plasma humano; para ello se extrajeron aproximadamente 15 ml de sangre, a los cuales se les añadió 1.6 ml de citrato de sodio y se centrifugaron a 2000 x g. Se colocaron 200 μl de plasma citrado en tubos de vidrio y se procedió a incubar durante 3 a 5 minutos en baño maría a 37°C. Posteriormente a cada tubo se le agregó 0.1 ml de soluciones con diferentes concentraciones de veneno (8, 4, 2, 1, 0.5 y 0.25 μg) las cuales fueron disueltas en PBS. Para cada concentración de veneno se trabajó por triplicado, como controles negativos se utilizó 0.1 ml de PBS en plasma y el tiempo de coagulación se midió con un cronómetro.

A partir del promedio de los tiempos de coagulación, se construyó una curva dosis - respuesta (μg de veneno en el eje de las abscisas vs el tiempo de coagulación en el eje de las ordenadas) utilizando el programa Microsoft Office Excel 2007. Con base en la ecuación de la recta, obtenida del análisis de regresión, se determinó la dosis de veneno que indujo la coagulación del plasma en 60 segundos, tiempo que corresponde a la dosis coagulante mínima – plasma (DCM-P) (Instituto Clodomiro Picado 2010).

5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

La significancia entre las medias de las muestras experimentales, tanto para la actividad coagulante como hemorrágica, fue determinada por pruebas U de Mann Whitney (muestras menores a 10 datos) con el programa PAST v 1.38 (Hammer *et al.* 2001). Cuando se compararon más de dos muestras, se realizaron análisis de varianza, seguidos de una prueba *post hoc* de Tukey para comparar pares de medias, utilizando el programa estadístico SPSS v 12.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Un valor de *p* menor a 0.05 fue considerado significativo.

5.5 CONVENIOS INSTITUCIONALES

La extracción de veneno y la cuantificación de proteínas fueron realizadas en el Centro de Investigaciones Biomédicas-Bioterio de la Universidad del Cauca (CIBUC) (Colombia), bajo el marco del Convenio Interinstitucional de colaboración académica, científica y cultural, establecido desde 1989 y vigente hasta la fecha entre la Universidad de Nariño y la Universidad del Cauca. Los perfiles electroforéticos y cromatográficos, al igual que los ensayos de inmunoreactividad y las actividades biológicas, fueron desarrolladas en el Instituto Clodomiro Picado, de la Universidad de Costa Rica (Costa Rica), bajo los términos de una pasantía (Anexo H).

5.6. PERMISOS AMBIENTALES

La investigación fue amparada por el Permiso de Investigación Científica en Diversidad Biológica No. 18 del 14 de Octubre de 2009, el Contrato de Acceso a Productos Derivados para Investigación Científica sin interés Comercial No. 32, firmado en la Ciudad de Bogotá el día 3 de Diciembre de 2009 (Expediente RGE 0057 Radicado 4120-E184637 del 28 de Julio de 2009) y el Permiso para Exportación y/o Importación de especímenes de la Diversidad Biológica no listados en los apéndices de la convención CITES otorgados por la Dirección de Licencias, Permisos y Trámites Ambientales del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Colombia (Anexo H).

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERIZACIÓN PROTEICA DEL VENENO

6.1.1 Cuantificación de proteínas. Se determinó la concentración proteica para el veneno de cada uno de los ejemplares adultos (Tabla 2). El promedio de cuantificación proteica para la población Ba-T (17.86 g/dl), se ajustó tanto al promedio reportado por el Instituto Clodomiro Picado (23.3 ± 0.9 g/dl, datos sin publicar) para *B. asper* de la Costa Pacífica ($t_{\text{calculado}} = 0.876 < t_{\text{crítico}} = 3.282$; $p > 0.5$), como al promedio de *B. asper* del Caribe de Costa Rica de 22.4 g/dl ($t_{\text{calculado}} = 0.765 < t_{\text{crítico}} = 3.282$; $p > 0.5$). Los valores fueron transformados en g/dl para términos de comparación.

Tabla 2. Cuantificación proteica del veneno por el método de Biuret. Población *B. asper* de El Tambo, Cauca (Ba-T): individuos 1 – 4; población de *B. cf. asper* del Valle del Patía, Cauca (Ba-P): individuos 5 – 8.

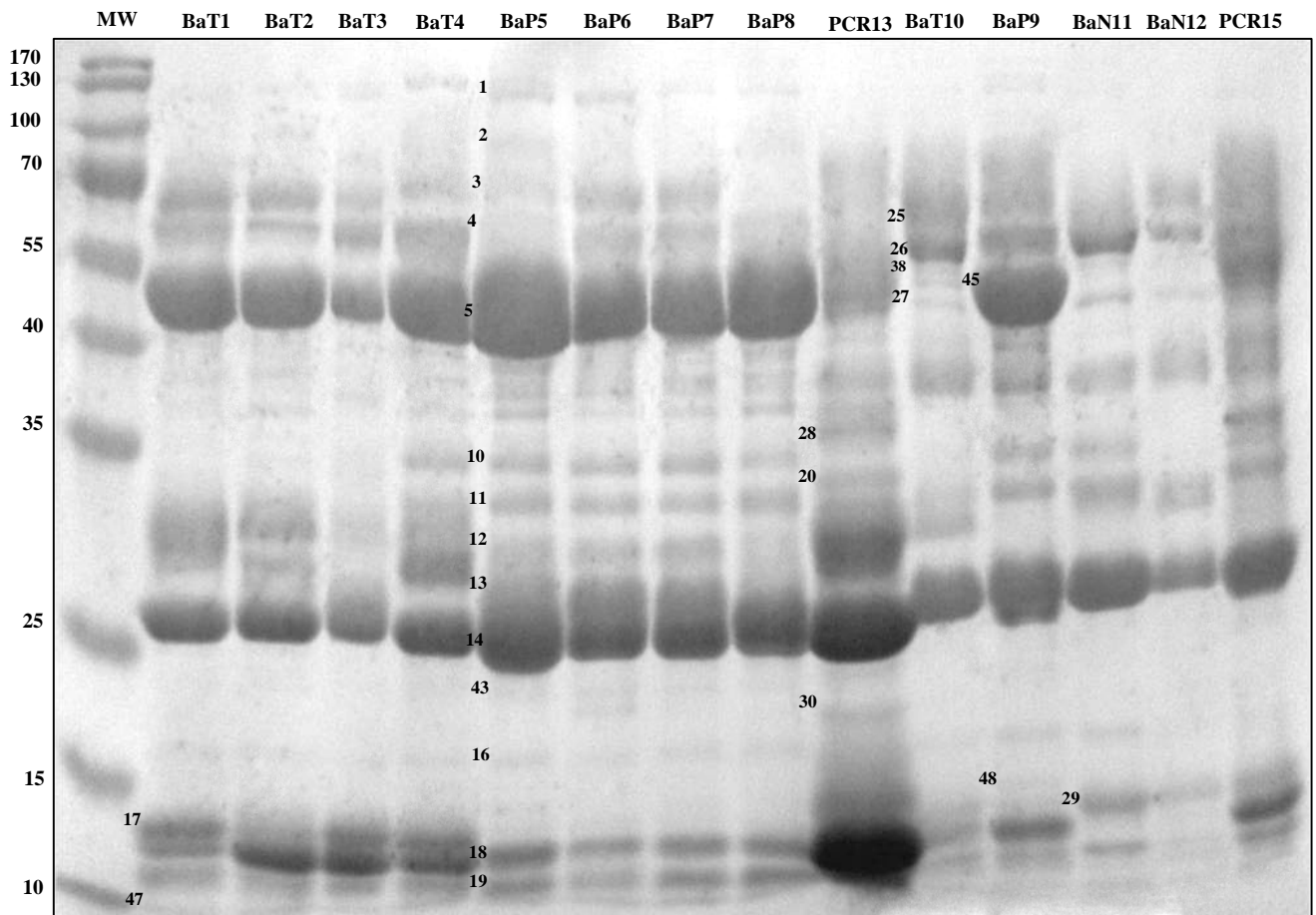
Población	Individuo	Código Ejemplar	Absorbancia			Concentración de Proteínas (g/dl)
			1 lectura	2 lectura	3 lectura	
Ba – T	1	<i>B. asper</i> CIBUC-Se-000 004	0,397	0,401	0,390	4,873
	2	<i>B. asper</i> CIBUC-Se-000 055	0,413	0,363	0,365	4,673
	3	<i>B. asper</i> CIBUC-Se-000 102	0,162	0,156	0,176	23,832
	4	<i>B. asper</i> CIBUC-Se-000 020	0,267	0,252	0,261	38,084
Ba – P	5	<i>B. cf. asper</i> CIBUC-Se-000 133	0,393	0,405	0,408	4,948
	6	<i>B. cf. asper</i> CIBUC-Se-000 147	0,269	0,267	0,281	3,323
	7	<i>B. cf. asper</i> CIBUC-000 085	0,201	0,190	0,220	2,473
	8	<i>B. cf. asper</i> CIBUC-Se-000 113	0,406	0,400	0,413	4,998

En el caso de la población Ba-P, el promedio de la cuantificación proteica (3.93 g/dl) no se ajusta con el reportado por el Instituto Clodomiro Picado para la población de la Costa Pacífica ($t_{\text{calculado}} = 31.04 > t_{\text{crítico}} = 3.282$; $p < 0.5$), ni con el promedio de la población del Caribe de Costa Rica ($t_{\text{calculado}} = 29.60 > t_{\text{crítico}} = 3.282$; $p < 0.5$).

6.1.2. Comparación de perfiles electroforéticos

6.1.2.1. Variación intraespecífica. Los patrones electroforéticos (Figuras 15 y 16) muestran diferencias tanto a nivel intra como interpoblacional; siendo mayor la variación a nivel interpoblacional. En general, se observan bandas que se presentan en el 50% de los individuos, cuyas masas moleculares se encuentran entre 116.8 kDa, 62 a 35 kDa y 33 a 9 kDa. Así, proteínas de alta masa molecular como la 1 (116.8 kDa) se encuentran en la mayoría de los ejemplares adultos y algunos neonatos de Colombia y del Caribe de Costa Rica (CCR); sin embargo está ausente en ejemplares adultos y neonatos del Pacífico de Costa Rica (PCR) y adultos del CCR (Ver Tabla 3).

Figura 15. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida de veneno de adultos y neonatos de las poblaciones de *B. asper* y *B. cf. asper* del suroccidente de Colombia y *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica.



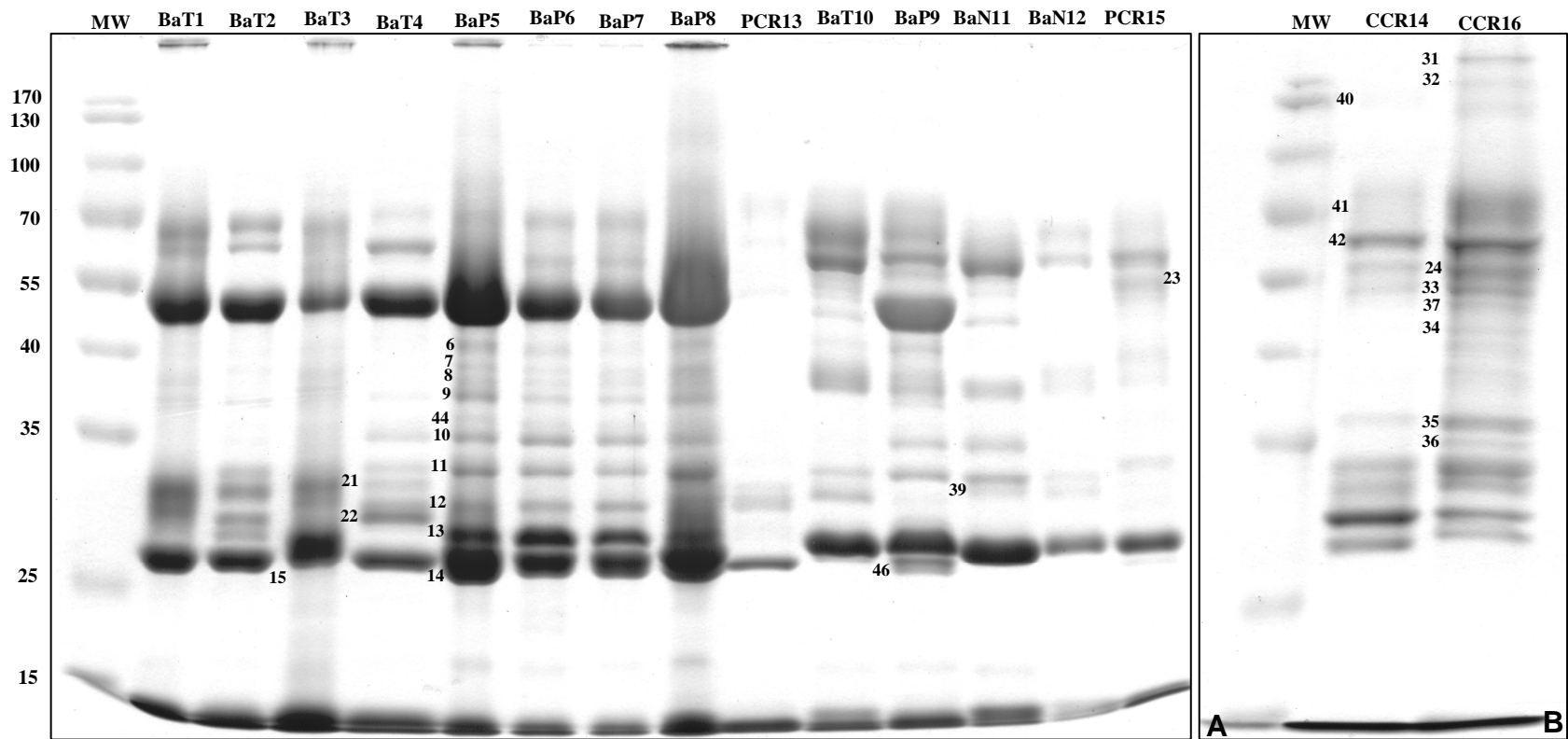
Margen superior del gel: veneno de adultos de *B. asper* de El Tambo, Cauca (BaT1-4); adultos de *B. cf. asper* del Valle del Patía (BaP5-8); pool de veneno de adultos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica (PCR13); neonato de *B. asper* de El Tambo (BaT10); juvenil de *B. cf. asper* del Valle del Patía (BaP9), neonatos de *B. asper* de Barbacoas,

Nariño (BaN11-12); *pool* de veneno de neonatos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica (PCR15). Numeración al interior de la imagen: bandas proteicas. Margen izquierdo: marcador de masa molecular Page Ruler SM0671 (MW) en kDa. Las proteínas fueron separadas en gel en gradiente (10-15%) bajo condiciones de reducción y teñidos con azul de coomassie.

Proteínas de 10 a 15.7 kDa y 36.7 kDa se presentan en la mayoría de ejemplares adultos y neonatos de todas las poblaciones, aunque aquellas que están por debajo de los 25 kDa están ausentes tanto en adultos como en neonatos del CCR. La proteína correspondiente a la banda 5 (48.4 kDa) se presenta en individuos adultos del suroccidente de Colombia, de la PCR y en el juvenil de Ba-P, pero está ausente en los neonatos de todas las poblaciones y los adultos del CCR.

Igualmente hay bandas que se presentan solamente en el 6.25% de los individuos, las cuales contribuyen a la diferenciación ontogénica del veneno. Así, la banda 23 (54.3 kDa) se encuentra solamente en los neonatos de la PCR, mientras que la 30 (17.7 kDa) es propia de los adultos de esta misma población; algunas bandas entre 42.2 y 209.4 kDa son propias de los neonatos del CCR, mientras que la banda 40 (136.2 kDa) es característica de adultos de esta población. La banda 45 (52 kDa) es propia de los neonatos de Ba-T, y la 46 (26.5 kDa) y 48 (13.4 kDa) solo se presentan en el juvenil de la población de Ba-P. Todas las demás bandas proteicas se presentan entre el 12 y 44 % de los individuos, y permiten explicar el grado de similitud entre las poblaciones.

Figura 16. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida de veneno de adultos y neonatos de las poblaciones de *B. asper* y *B. cf. asper* del suroccidente de Colombia, *B. asper* de la Costa Pacífica y del Caribe de Costa Rica.



Margen superior del gel: A. veneno de adultos de *B. asper* de El Tambo, Cauca (BaT1-4); adultos de *B. cf. asper* del Valle del Patía (BaP5-8); *pool* de veneno de adultos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica (PCR13); neonato de *B. asper* de El Tambo (BaT10); juvenil de *B. cf. asper* del Valle del Patía (BaP9), neonatos de *B. asper* de Barbacoas, Nariño (BaN11-12); *pool* de veneno de neonatos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica (PCR15). B. *Pool* de veneno de adultos del Caribe de Costa Rica (CCR14) y *pool* de neonatos (CCR16). Numeración al interior de la imagen: bandas proteicas. Margen izquierdo marcador de masa molecular Page Ruler SM0671 (MW) en kDa. Las proteínas fueron separadas en un gel al 12% bajo condiciones de reducción y teñidos con azul de coomassie.

Tabla 3. Comparación de bandas proteicas presentes y ausentes entre los ejemplares de *B. asper* y *B. cf. asper*, teniendo en cuenta la población de procedencia y su estado de crecimiento. Las bandas obtenidas de los perfiles electroforéticos, fueron detectadas y analizadas en el programa Image Quant TL versión 2005.

Banda			Suroccidente de Colombia											Costa Rica				
N°	Masa molecular (kDa)	Posible acción farmacológica	Ba-T					Ba-P					Ba-N		PCR		CCR	
			1	2	3	4	10	5	6	7	8	9	11	12	13	15	14	16
1	116,8 ± 5,1	SVMP	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
2	88,2 ± 6,9	SVMP	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
3	62,5 ± 3,0	SVMP	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
4	52,9 ± 1,1	SVMP	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
5	48,4 ± 2,0	SVMP	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
6	40,0 ± 0,9	SVMP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
7	37,6 ± 0,2	SVMP	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
8	36,7 ± 0,5	Ser	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
9	35,7 ± 0,1	Ser	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
10	34,8 ± 0,1	Ser	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
11	33,6 ± 0,2	Ser	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
12	31,5 ± 0,3	Ser	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
13	28,9 ± 0,6	Ser	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
14	27,1 ± 0,3	Ser	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
15	23,1 ± 1,8	Ser	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
16	15,7 ± 0,5	PLA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
17	12,1 ± 0,4	PLA	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
18	11,0 ± 0,3	PLA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
19	9,9 ± 0,3	PLA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
20	34,1 ± 0,1	Ser	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
21	32,6 ± 0,3	Ser	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
22	30,4 ± 0,7	Ser	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
23	54,3 ± 0,0	SVMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
24	52,1 ± 1,0	SVMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
25	64,0 ± 1,7	SVMP	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
26	57,6 ± 1,1	SVMP	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
27	44,8 ± 2,5	SVMP	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
28	34,9 *	Ser	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
29	12,3 ± 0,7	PLA	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
30	17,7 *	PLA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
31	209,4 *	SVMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
32	167,5*	SVMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Proteína Banda N°			Suroccidente de Colombia									Costa Rica						
N°	Masa molecular (kDa)	Posible acción farmacológica	Ba-T				Ba-P					Ba-N		PCR		CCR		
			1	2	3	4	10	5	6	7	8	9	11	12	13	15	14	16
33	48,5* 0,2	SVMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
34	42,2*	SVMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
35	35,9 ± 0,1	SVMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
36	35,0 *	Ser	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
37	45,7 *	SVMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
38	53,9 ± 1,9	SVMP	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
39	31,9 ± 1,2	Ser	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
40	136,2 *	SVMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
41	76,5 ± 7,0	SVMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
42	57,6 ± 2,6	SVMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
43	21,4 ± 0,9	Ser	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
44	35,1 ± 0,1	Ser	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
45	52,0 *	SVMP	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	26,5 *	Ser	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
47	9,0 ± 0,1	Des	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
48	13,4 *	PLA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

La masa molecular \pm SD de las bandas no únicas resultó del promedio de la masa molecular de la banda para cada individuo. * La masa molecular no expresa el promedio \pm SD, ya que corresponden a bandas únicas (encontradas en solo uno del total de los individuos). Para definir su posible acción farmacológica se comparó las masas moleculares de las bandas del estudio con las de las familias proteicas presentadas por Alape *et al.* (2008). (SVMP: metaloproteinasas, Ser: Serina proteinasas, PLA: fosfolipasas, Des: desintegrinas). Ba-T (1, 2, 3, 4, 10): *B. asper* de El Tambo Cauca, Ba-P (5, 6, 7, 8, 9): *B. cf. asper* del Valle del Patía, Ba-N (11,12): *B. asper* de Nariño, PCR (13, 15): *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica, CCR (14, 16): *B. asper* del Caribe de Costa Rica. Color verde: adultos; Color naranja: neonatos; Color azul: juvenil.

6.1.2.1.1. Variación ontogénica. Al comparar el veneno de ejemplares adultos con neonatos (Tabla 3), se encuentran con mayor frecuencia proteínas de baja masa molecular (9 a 12 kDa) en los adultos, mientras que proteínas entre 60 y 30 kDa son más frecuentes en neonatos.

Adicionalmente, se muestra pérdida de proteínas de media y alta masa molecular y/o disminución de la concentración de las mismas, durante el proceso de crecimiento. Así, proteínas entre 44 y 67 kDa que comprenden el 10.7 % del total de las proteínas en los neonatos, son sustituidas por un menor número de proteínas de masa molecular entre 52 y 116.8 kDa en el estado adulto.

La proteína que corresponde a la banda 13 presenta una alta concentración en los neonatos (44.10 a 53.97%); sin embargo en los adultos esta proteína presenta baja concentración (0.55 a 14.98%); por el contrario la banda 14 presente en adultos se

encuentra más concentrada (22.43 a 38.77%) principalmente en las poblaciones del suroccidente Colombiano. Por su parte proteínas de 36.7 kDa (Banda 8, Figura 16) se conservan en ambos estados de crecimiento, aunque con mayor concentración en los neonatos. Además, hacia el estado adulto se incrementa la concentración y frecuencia de proteínas de masa molecular baja (9 - 11 kDa) duplicándose en concentración con respecto a los neonatos.

6.1.2.1.2 Variación intrapoblacional. Se observa variación individual y ontogénica, relacionada también con la presencia y ausencia de algunas proteínas (Figuras 15 y 16, Tabla 3), y con diferencias en la concentración proteica. Ba-T, presenta mayor variación intrapoblacional, puesto que los ejemplares que la conforman comparten cerca del 77% de sus componentes. La variación ontogénica es evidente, manifestando que el neonato comparte alrededor del 35% de las bandas con los ejemplares adultos.

La variación intrapoblacional de Ba-P es menor, ya que los ejemplares adultos comparten cerca del 89.4% de sus proteínas de masa molecular media. Por otra parte, la variación ontogénica no es marcada porque el ejemplar 9 es un juvenil, y por lo tanto se observó mayor porcentaje de proteínas compartidas entre los dos estados de crecimiento. El juvenil se caracterizó por presentar principalmente proteínas de masa molecular media (28.9 y 36.7 kDa) altamente concentradas y por la presencia de proteínas como la 46 (26.5 kDa), 26 (57.6 kDa) y 48 (13.4 kDa) las cuales no se observan en adultos.

En cuanto a los neonatos provenientes de la población de Barbacoas, Nariño, aunque comparten aproximadamente cerca del 64% de sus proteínas; la presencia de las bandas 1, 10, 16, 38 y 47 en el individuo 11 (Figura 15 y 16), les confieren diferencias intrapoblacionales.

6.1.2.1.3 Variación interpoblacional. A nivel interpoblacional (Figuras 15 y 16, Tabla 3), los ejemplares adultos de la población de *B. asper* de El Tambo, Cauca comparten cerca del 66.6% de sus bandas proteicas con la población de *B. cf. asper* del Valle Patía. Comparten proteínas que oscilan entre 40 y 117 kDa, las proteínas de masa molecular media son más concentradas en Ba-P que en Ba-T, mientras que proteínas de masa molecular baja (15 a 10 kDa) son más concentradas en Ba-T. Ba-T se diferencia por no presentar proteínas como la 7, la 12 y la 44, las cuales son características de los adultos y del juvenil de Ba-P.

Al comparar Ba-T con la población de PCR, a pesar de que algunas proteínas se comparten (38.4%), es evidente la diferencia con respecto a la concentración de las mismas. Proteínas de masa molecular entre 55 y 40 kDa están más concentradas en Ba-T que en PCR, mientras que proteínas de masa molecular entre 27.1 y 9.9 kDa son más concentradas en PCR. Al contrastarla con la población de adultos de CCR, comparten el 22.5 % de las bandas, las diferencias son marcadas y aunque algunos de los individuos comparten proteínas de 15.7 kDa y de 30.4 a 32.6 kDa, otras bandas proteicas de 209.4 kDa, 48.5 kDa, 35.9 kDa, 57.6 kDa y 76.5 kDa, son únicas de la población CCR.

Entre la población Ba-P y la población de PCR se comparte el 32% de las bandas proteicas, se observan proteínas comunes entre 9.9 kDa y 48.4 kDa, y se muestra una mayor frecuencia de proteínas de masa molecular media en Ba-P, pero de menor concentración que las de Costa Rica. Proteínas de masa molecular baja están más concentradas en la población de PCR que en Ba-P. Al contrastarla con la población del Caribe, comparten el 10.7% de sus proteínas; Ba-P se caracteriza por presentar mayor frecuencia de proteínas de masa molecular media, mientras que CCR presenta un mayor número de proteínas de masa molecular alta y media. Particularmente las bandas 7 y 44 están presentes en todos los adultos y el juvenil de Ba-P, pero no se encuentran ni en la población de Ba-T, ni Ba-N.

Las poblaciones de adultos de la Costa Pacífica y del Caribe de Costa Rica comparten el 22.7% de sus bandas proteicas, lo que representa una marcada diferencia entre sus perfiles proteicos.

Se observa similitud entre los neonatos de Ba-N y el neonato de Ba-T en proteínas de masa molecular entre 28.9 y 44.8 kDa; con los neonatos de la Costa Pacífica de Costa Rica, Ba-N comparte proteínas principalmente de masa molecular media y baja; y al compararla con los neonatos del Caribe de Costa Rica, estos últimos presentan proteínas de mayor masa molecular y más concentración de proteínas de masa molecular media; sin embargo, los neonatos de Nariño presentan proteínas de masa molecular baja en mayor concentración que los neonatos del Caribe. Con respecto al juvenil aunque se comparten bandas proteicas entre 28.9 y 36.7 kDa, su concentración varía; al ser un ejemplar juvenil presenta una gran cantidad de proteínas similares a las de los adultos y proteínas de masa molecular media que lo diferencian completamente de los neonatos de Nariño.

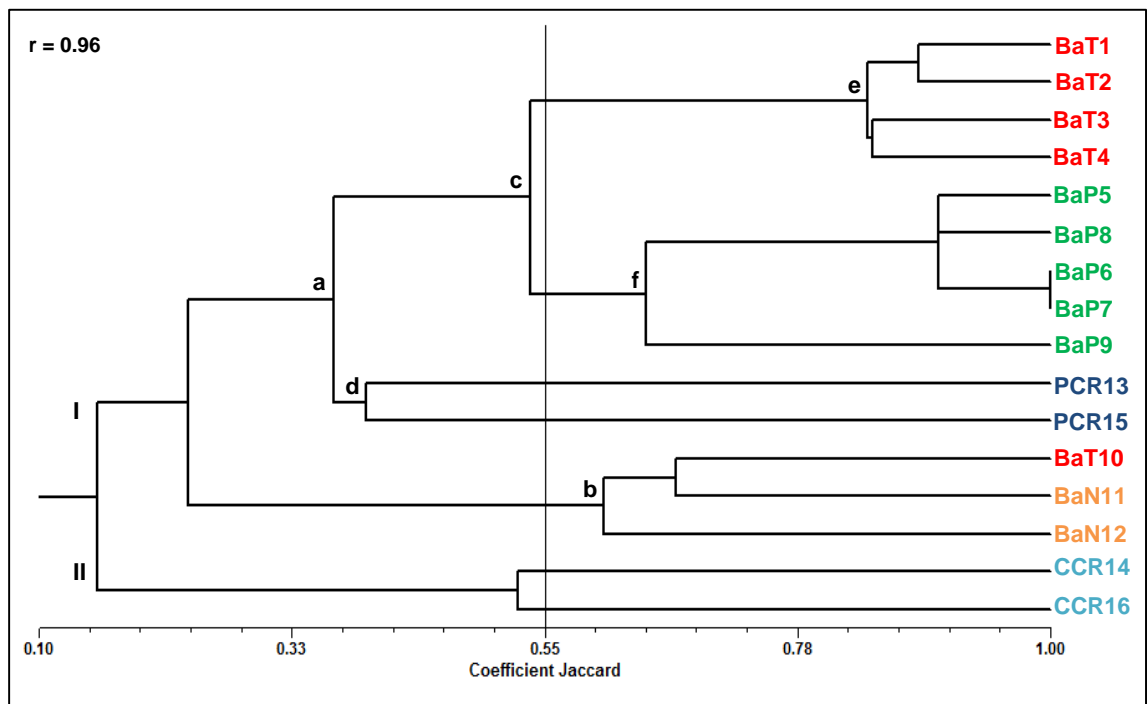
El análisis de similitud (Figura 17) con base en la matriz de datos cualitativos construida a partir de presencias y ausencia de bandas (Anexo E), confirma todos los tipos de variación descritos anteriormente.

La variación interpoblacional fue mayor, ya que la separación de cada una de las poblaciones se presenta entre un rango de 0.14 y 0.55 (coeficiente de Jaccard), mientras que la separación a nivel intrapoblacional se presenta a distancias entre 0.4 y 1, donde 1 es el valor máximo de similitud. Se observa la formación de dos grandes grupos a una distancia de 0.15, lo que denota la alta diferencia entre las poblaciones de *B. asper* del Caribe de Costa Rica (II) y las poblaciones de *B. asper* del Pacífico, tanto del suroccidente de Colombia como de Costa Rica y *B. cf. asper* del Valle del Patía (I). Asimismo, el grupo I se subdivide y separa a los neonatos del Cauca y Nariño (b) de los ejemplares adultos del Cauca, Patía y de la Costa Pacífica de Costa Rica (a).

A su vez el subgrupo a está conformado por el c y d, el primero agrupa a todos los individuos adultos del suroccidente de Colombia, del cual (a la derecha de la línea de referencia) se forman dos subgrupos definidos (e y f); el subgrupo e formado por los adultos de Ba-T con una mayor variación intrapoblacional (promedio de similitud 0.84); el subgrupo f formado por los adultos de Ba-P, los cuales manifiestan menor variación que los adultos de la población anterior, puesto que se agrupan a

distancias cercanas a uno y a pesar de que el ejemplar juvenil (9) también está agrupado en este subgrupo, muestra menor similitud con los ejemplares adultos de su población (promedio de similitud 0.64). El subgrupo d está conformado por los ejemplares adultos y neonatos de la Costa Pacífica de Costa Rica, los cuales se separan entre sí a una distancia aproximada de 0.39. Finalmente el subgrupo b conformado por individuos neonatos de Ba-T y Ba-N, también muestra variación entre los neonatos de las respectivas poblaciones.

Figura 17. Fenograma de similitud, construido en el programa NTSYS pc. 2.1, a partir de datos binarios extraídos de los perfiles electroforéticos.



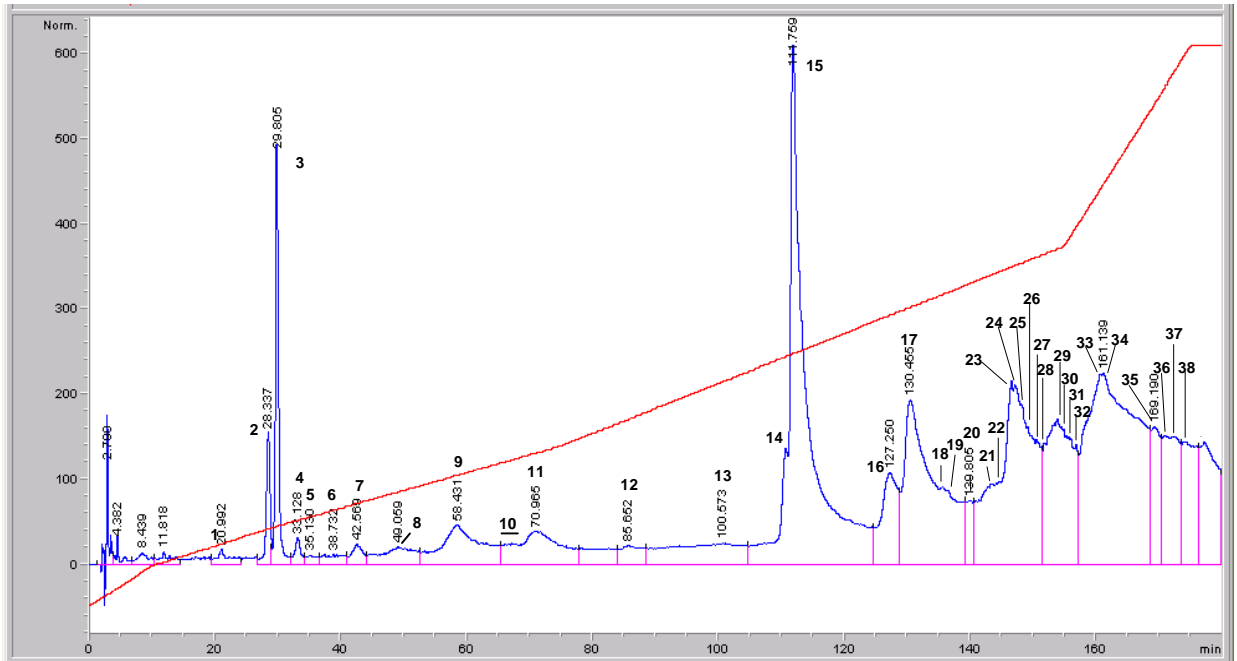
Numeración al margen derecho del fenograma: muestras de veneno de los ejemplares. Adultos (**BaT1-4**) y neonato (**BaT10**) de *B. asper* de El Tambo, Cauca; adultos (**BaP5-8**) y juvenil (**BaP9**) de *B. cf. asper* del Valle del Patía, Cauca; neonatos de *B. asper* de Barbacoas, Nariño (**BaN11-12**); *pool* de veneno de adultos (**PCR13**) y *pool* de veneno de neonatos (**PCR15**) de *B. asper* de de la Costa Pacífica de Costa Rica; *pool* de veneno de adultos (**CCR14**) y *pool* de neonatos (**CCR16**) del Caribe de Costa Rica. Los números romanos (I y II) y las letras (a-f) al interior del fenograma muestran los grupos y subgrupos formados. El valor r, corresponde al coeficiente de correlación cofenética y expresa el grado de distorsión entre la matriz original y la matriz cofenética obtenida a partir de los valores del fenograma. El Coeficiente de Jaccard en una escala de 0.10 a 1, donde los valores más cercanos a 1, tienden a expresar el grado de similitud máxima.

6.1.3 Comparación de perfiles cromatográficos

6.1.3.1 Variación Interpoblacional. Se obtuvieron cromatogramas RP-HPLC de cuatro venenos, el de la población de la Costa Pacífica de Costa Rica fue empleado como patrón de comparación (Figura 18) y tres correspondientes a las poblaciones del

suroccidente Colombiano: las poblaciones de adultos de *B. asper* de El Tambo, Cauca (Figura 19) y de *B. cf. asper* del Valle del Patía, Cauca (Figura 20) y la población de neonatos de *B. asper* de Barbacoas, Nariño (Figura 22).

Figura 18. Perfil cromatográfico de proteínas por HPLC, fase reversa. *Pool* de venenos de especímenes adultos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica.



Un miligramo de proteínas de veneno total fueron aplicados a una columna RP10 C18, bajo las siguientes condiciones de cromatográficas: (5% B) por 10 min, 5-10% B por 20 minutos, 10-20% B por 45 min, 20- 45% B por 80 min, 45-70% B por 20 minutos y 70% B por 10 min.

De acuerdo con estudios previos de proteómica para la especie en Costa Rica (Alape *et al.* 2008) y teniendo en cuenta los tiempos de retención y el porcentaje de B, es posible identificar aproximadamente la familia proteica a la que pertenece cada fragmento, con el fin de realizar una analogía frente a los perfiles obtenidos y facilitar la descripción para las poblaciones del suroccidente de Colombia. Así, para la población de *B. asper* de PCR (Figura 19 A), se observan 38 picos, distribuidos en seis grupos de toxinas, 3 familias proteicas mayores (Metaloproteinasas (SVMs por sus siglas en inglés), fosfolipasas A₂ (PLA₂) y serina proteinasas) y 3 menores (desintegrinas, fragmentos de metaloproteinasas tipo P-III ricos en desintegrina/cisteína (fragmentos DC), proteínas secretoras ricas en Cisteína (CRISP)). Alape *et al.* (2008) describen 4 familias proteicas mayores y 4 menores; no obstante dada la menor resolución de nuestros cromatogramas, una familia mayor L-amino ácido oxidasa (LAO) y una menor lectinas tipo-C, fueron difíciles de identificar.

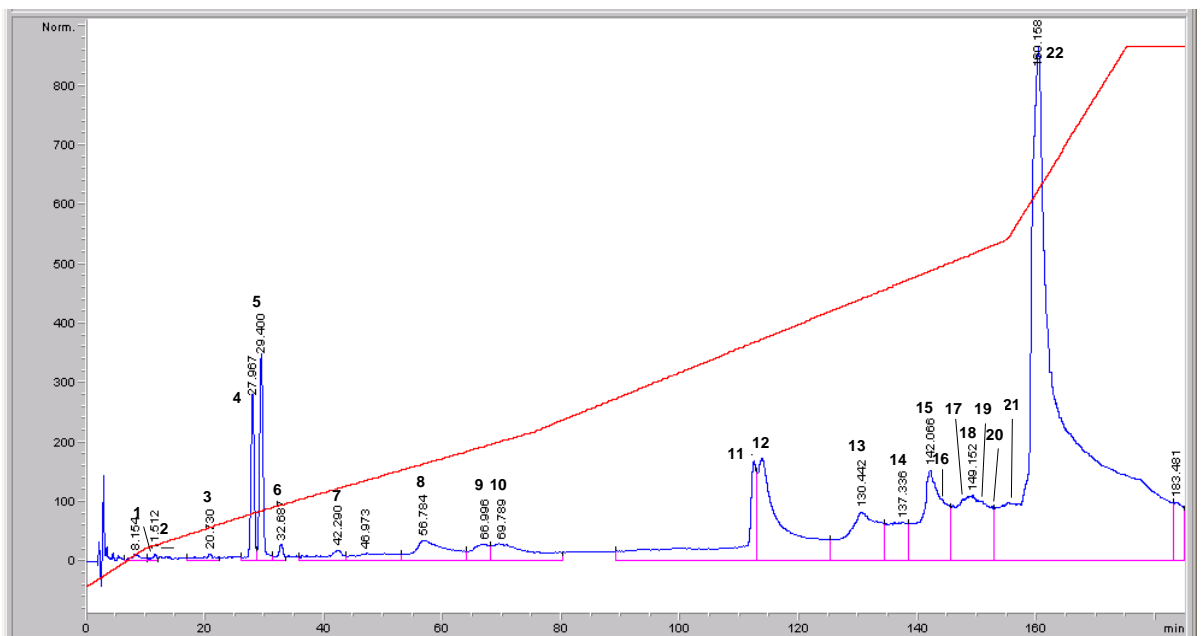
En el perfil cromatográfico de la población *B. asper* de PCR (Figura 18), 1-3, 5 y 7 son picos cuyo material peptídico no ha sido identificado (n.p), el pico 4 posiblemente

corresponde a desintegrinas, los picos 8-10, 12-13 no se observan en el cromatograma propuesto por Alape *et al.* (2008), el pico 11 corresponde probablemente a fragmentos DC, 14-16 a fosfolipasas, el pico 17 correspondería a CRISP, 18 a 22 pueden ser serina proteinasas, y del 23 al 38 metaloproteinasas. Particularmente las fosfolipasas (14-15) representan una alta concentración, mientras que las desintegrinas y el fragmento DC son los componentes con menor concentración. La concentración entre las metaloproteinasas es variable y el pico 34 es el que mayor representación muestra dentro de esta familia proteica.

Con respecto a la abundancia de picos dentro de las familias proteicas, las metaloproteinasas representan alrededor del 42% y por el contrario las desintegrinas, CRISP y fragmentos DC representan el 2.6% aproximadamente.

El perfil cromatográfico de la población Ba-T (Figura 19), a diferencia del anterior solamente presentó 22 picos, los cuales corresponden a seis grupos de toxinas, distribuidos en tres familias proteicas mayores (SVMs, PLA₂, serina proteinasas) y tres menores (desintegrinas, fragmentos DC y CRISP). Los picos 1 – 5 y 7 son material peptídico no identificado, el pico 6 posiblemente son desintegrinas, los picos 8 y 9 no presentan correspondencia con los del cromatograma de Costa Rica, el pico 10 correspondería a fragmentos DC, 11 y 12 a fosfolipasas, el 13 pueden ser CRISP, los picos 14-16 serina proteinasas y finalmente desde el pico 17 al 22 metaloproteinasas.

Figura 19. Perfil cromatográfico de proteínas por HPLC, fase reversa. *Pool* de venenos de especímenes adultos de *B. asper* de El Tambo, Cauca.

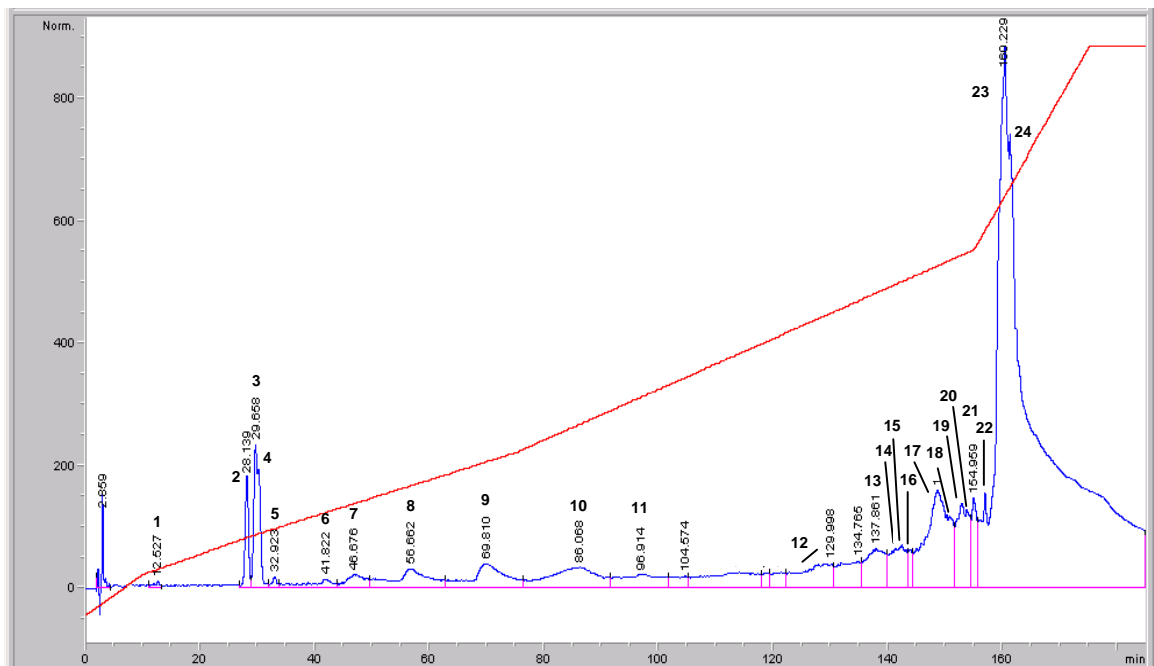


Un miligramo de proteínas de veneno total fueron aplicados a una columna RP10 C18, bajo las siguientes condiciones de cromatográficas: (5% B) por 10 min, 5-10% B por 20 minutos, 10-20% B por 45 min, 20- 45% B por 80 min, 45-70% B por 20 minutos y 70% B por 10 min.

En Ba-T es importante resaltar la elevada concentración de algunas metaloproteinasas, y por el contrario la baja concentración de fosfolipasas frente a la población de la Costa Pacífica de Costa Rica. En relación a la abundancia de picos por familia, las metaloproteinasas también representan el mayor porcentaje con 27.27%, mientras que las desintegrinas, fragmentos DC y las CRISP representan el 4.54%.

La población Ba-P (Figura 20), presenta 24 picos, distribuidos en cinco grupos de toxinas, dos familias proteicas principales (SVMPs, serina proteinasas) y tres familias proteicas menores (desintegrinas, fragmentos DC y CRISP). Los picos 1-4 y 6 corresponderían a material peptídico no identificado, el pico 5 probablemente a desintegrinas, 7-8, 10-11, no tienen correspondencia en el perfil de Costa Rica, el pico 9 posiblemente corresponde a fragmentos DC, el pico 12 a CRISP, 13-16 a serina proteinasas y del 17 al 24 a metaloproteinasas. En esta población se observó ausencia de picos de fosfolipasas. Al igual que en la anterior población la concentración de los picos que posiblemente corresponden a metaloproteinasas es elevada respecto a las demás proteínas y representan el mayor porcentaje en abundancia (33.3%).

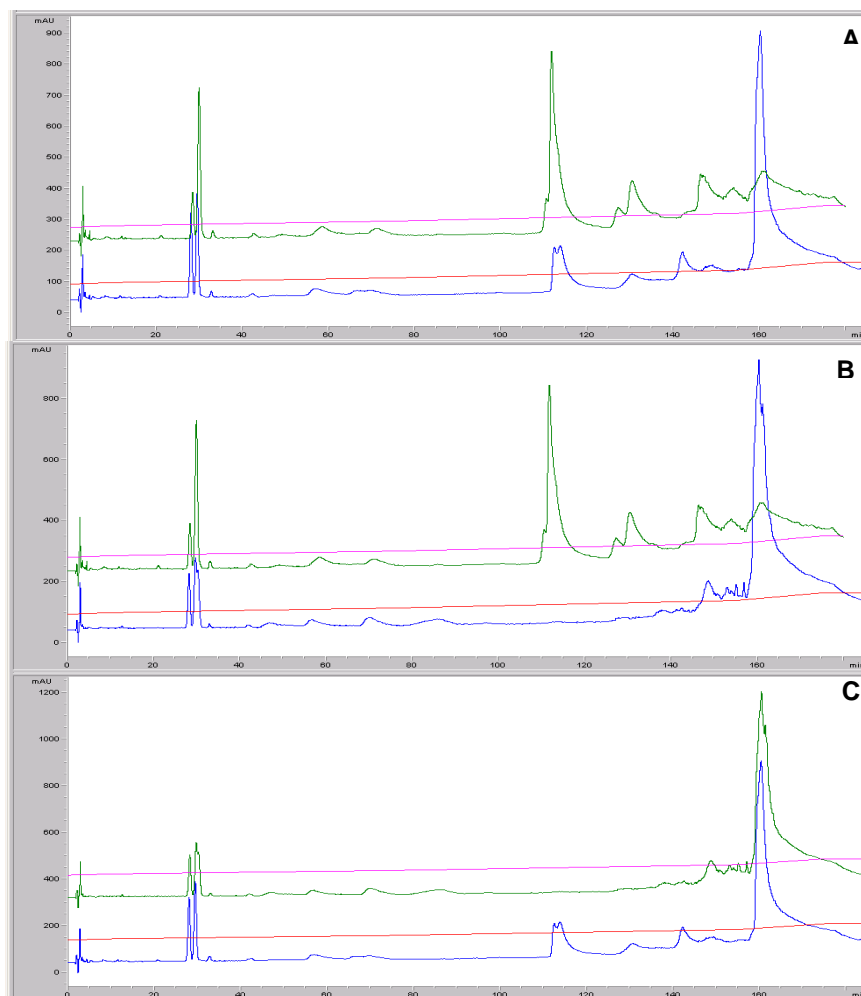
Figura 20. Perfil cromatográfico de proteínas por HPLC, fase reversa. Pool de venenos de especímenes adultos de *B. cf. asper* del Valle del Patía.



Un miligramo de proteínas de veneno total fueron aplicados a una columna RP10 C18, bajo las siguientes condiciones de cromatográficas: (5% B) por 10 min, 5-10% B por 20 minutos, 10-20% B por 45 min, 20- 45% B por 80 min, 45-70% B por 20 minutos y 70% B por 10 min.

Al realizar la comparación de los anteriores cromatogramas (Figura 21 A, B y C) con base en presencias y ausencias de picos, las tres poblaciones mostraron una similitud del 28.57% aproximadamente, entre los 0 y los 60 minutos de tiempo de retención (presencia y ausencia de picos durante los primeros 60 minutos), aunque la concentración de algunos componentes no identificados presentó variación entre los 25 y 35 minutos y fue más alta en la población de Costa Rica que en Ba-T y Ba-P, por ejemplo el pico 3 de la población de Costa Rica (500 nm) comparado con los picos 5 de Ba-T y 3 de Ba-P, los cuales se leyeron a 350 nm y 250 nm, respectivamente.

Figura 21. Comparación de cromatogramas obtenidos por RP-HPLC, fase reversa de un *pool* de venenos de especímenes adultos de *B. cf. asper* y *B. asper* del suroccidente de Colombia y de la Costa Pacífica de Costa Rica.



A. Verde: *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica y azul: *B. asper* de El Tambo, Cauca.
B. Verde: *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica y azul: *B. cf. asper* del Valle del Patía, Cauca. C. Azul: *B. asper* de El Tambo, Cauca y verde: *B. cf. asper* del Valle del Patía, Cauca.

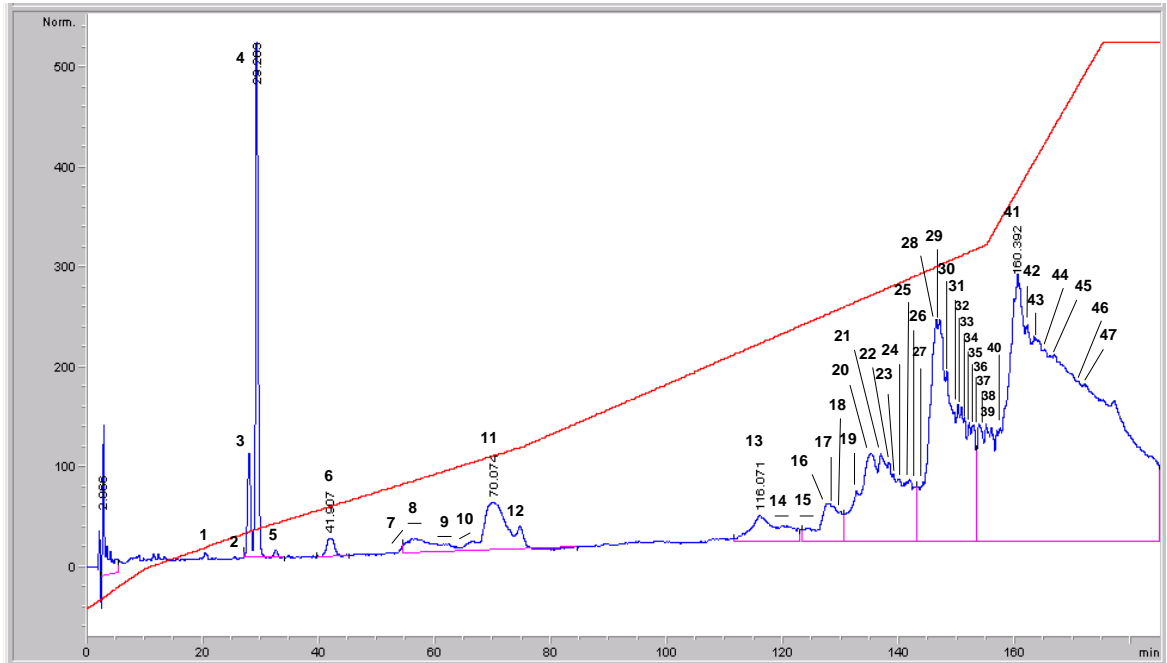
Todas las poblaciones presentan el pico que posiblemente corresponderían a los fragmentos DC (70 minutos); sin embargo entre los 65 y 75 minutos Ba-T se caracteriza por presentar un pico adicional que no se observa en la población de Ba-P. Por su parte Ba-P también presenta dos picos entre los 80 y 100 minutos ausentes en las otras poblaciones.

Entre los 100 y 120 minutos tanto la población de Ba-T, como la del Pacífico de Costa Rica presentan fosfolipasas en distinta concentración, mientras que en la población Ba-P estos picos no se presentan. Todas las poblaciones presentan el pico de las CRISP (130 minutos aproximadamente) no obstante la mayor concentración de esta familia proteica la presenta *B. asper* de Costa Rica. En cuanto a los picos de las serina proteinasas (entre los 135 y 145 minutos), se observa una mayor concentración en la población de Ba-T, seguida de Ba-P y finalmente la de Costa Rica. Entre los 145 y los 165 minutos se observan diferencias conspicuas entre los venenos, por ejemplo, algunas metaloproteinasas (picos 22 en Ba-T y 23-24 en Ba-P) se encuentran en mayor concentración en las poblaciones del suroccidente de Colombia, mientras que la población de PCR se caracteriza por presentar mayor abundancia de picos que corresponden a esta familia proteica (42%), pero en menor concentración.

La población Ba-N, representada por ejemplares neonatos (Figura 22), muestra 47 picos los cuales se distribuyen en seis familias proteicas, los picos 1-4 y 6 corresponden a material peptídico no identificado, el pico 5 probablemente sean desintegrinas, los picos 7-10 y 12 no tienen correspondencia con picos del perfil de Costa Rica, el pico 11 posiblemente correspondería a fragmentos DC, los picos 13-15 a fosfolipasas, los picos 16 y 17 a CRISP, desde el pico 18 a 27 a serina proteinasas y desde el 28 al 47 a metaloproteinasas. La abundancia de metaloproteinasas es alta, representando cerca del 42.55%.

Como es evidente, se observaron picos que no presentan correspondencia con los perfiles cromatográficos de Alape *et al.* (2008), esto puede ser debido a que el tiempo de retención total en nuestro estudio fue mayor (185 min), y por tanto al ampliar la escala de tiempo, algunos picos no descritos anteriormente para la población de PCR por Alape *et al.* (2008), son visibles bajo estas condiciones cromatográficas. Sin embargo, algunos de esos picos, cuya concentración es relativamente alta, pueden ser proteínas que expliquen la diferenciación a nivel interpoblacional.

Figura 22. Perfil cromatográfico de proteínas por HPLC, fase reversa de un *pool* de venenos de especímenes neonatos de *B. asper* de la Reserva Natural de las Aves el Pangán, Barbacoas, Nariño.

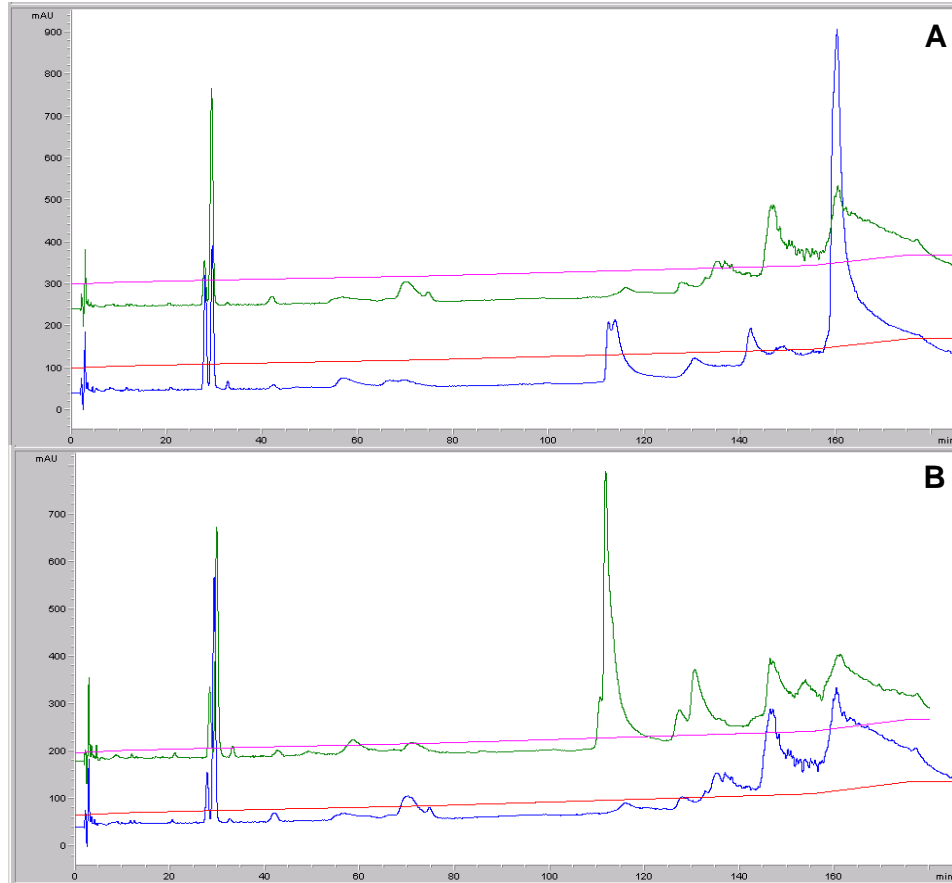


Un miligramo de proteínas de veneno total fueron aplicados a una columna RP10 C18, bajo las siguientes condiciones de cromatográficas: (5% B) por 10 min, 5-10% B por 20 minutos, 10-20% B por 45 min, 20- 45% B por 80 min, 45-70% B por 20 minutos y 70% B por 10 min.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de los perfiles electroforéticos, donde se observó similitud de los neonatos de Ba-N con el neonato de Ba-T, se comparó el perfil cromatográfico de los primeros con el de las poblaciones de adultos de Ba-T (Figura 23 A), con el fin de analizar los posibles cambios ontogénicos. Se observa un similitud (62.5 % aproximadamente) en la composición proteica entre los 10 y 40 minutos, aunque la concentración de algunos picos (proteína(s)) varía, el pico de las desintegrinas por ejemplo presenta una concentración baja respecto a las poblaciones de adultos; entre los 40 y 80 minutos, los neonatos presentan mayor concentración proteica de fragmentos DC y otros picos que corresponden a material peptídico no identificado o que no muestran correspondencia con el perfil de Costa Rica.

La concentración y abundancia de fosfolipasas es menor que la presentada por los adultos de Ba-T, la concentración de CRISP es similar en las dos poblaciones, la abundancia y concentración de serina proteinasas es mayor en los neonatos, y aunque la abundancia de SVMPs es mayor en los neonatos, esta familia proteica presenta picos con mayor concentración en los adultos.

Figura 23. Comparación de cromatogramas obtenidos por separación de proteínas por HPLC, fase reversa de un *pool* de venenos de especímenes neonatos de Barbacoas, Nariño versus adultos de *B. asper* de El Tambo, Cauca y de la Costa Pacífica de Costa Rica.



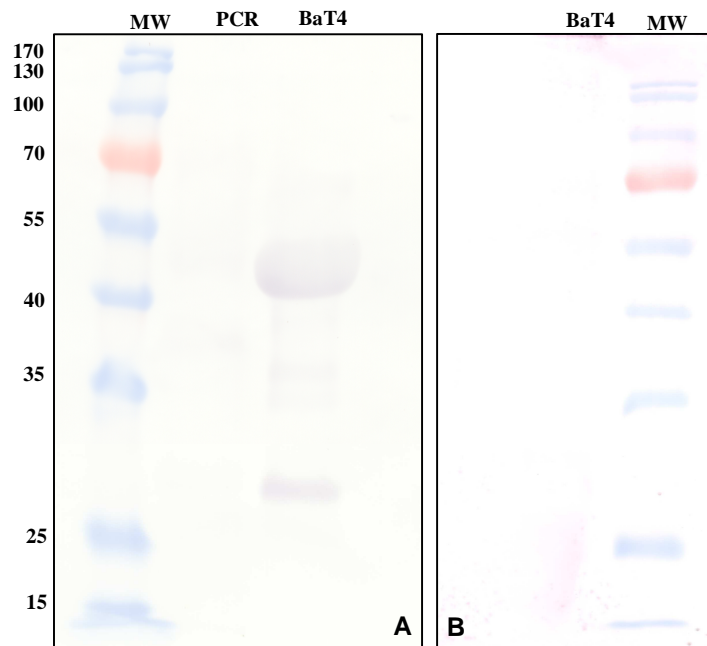
A. Verde: *B. asper* neonatos de Barbacoas Nariño y azul: *B. asper* adultos de El Tambo, Cauca. B. Verde: *B. asper* adultos de la Costa Pacífica de Costa Rica y azul: *B. asper* neonatos de Barbacoas, Nariño.

Con base en lo anterior, se observa disminución de posibles metaloproteinasas, y disminución en la concentración de lo que podrían ser serina proteinasas, durante el cambio de estado neonato a adulto; mientras en este último se observa ganancia en concentración de algunas SVMPs e incremento en abundancia y concentración de fosfolipasas.

Por otra parte aunque no es pertinente la comparación entre el veneno de los neonatos de Ba-N y el de los adultos de la Costa Pacífica de Costa Rica, cabe destacar que la concentración y abundancia de las familias proteicas que los componen es similar; no obstante se observa una marcada diferencia en la concentración de las fosfolipasas, la cual es mayor en los adultos de la PCR que en los neonatos de Ba-N (Figura 23 B).

6.1.4 Proteínas reconocidas por antiveneno. Como controles negativos del análisis de inmunoelectrotransferencia (Figura 24) se usaron suero normal equino (SNE) y suero anticoral, este último al basarse en la inmunización de equinos con veneno de coral se convierte en un buen control, pues la composición proteica de este veneno es diferente al de las serpientes de la familia Viperidae.

Figura 24. Controles de Inmunoelectrotransferencia. *Pool* de veneno de adultos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica (PCR) y *B. asper* de El Tambo, Cauca (CIBUC-Se-000 020) (BaT4).



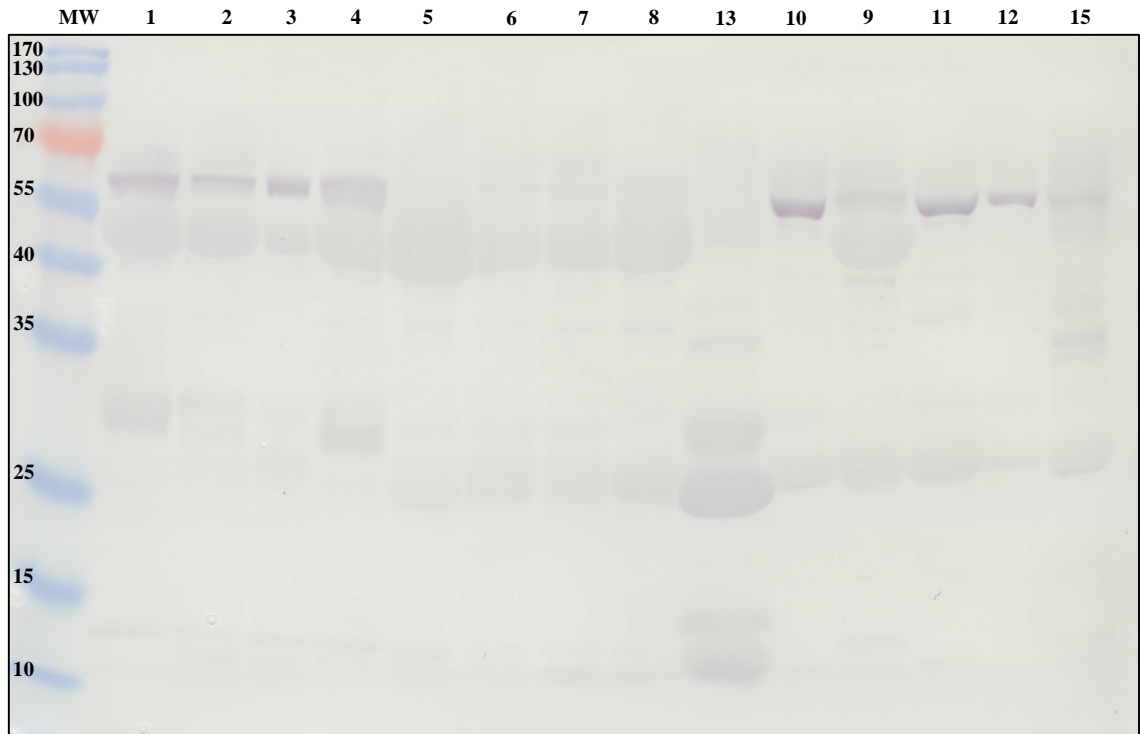
A. Control con suero normal equino (SNE). B. Control con suero anticoral, producido por el Instituto Clodomiro Picado (Costa Rica). Marcadores de masa molecular en kDa, sobre los márgenes izquierda y derecha (MW). Las proteínas fueron separadas en gel de poliacrilamida (12 %) bajo condiciones de reducción.

Es de esperar que los dos controles no muestren reconocimiento hacia los venenos; sin embargo se observó que el SNE reconoció en cierto grado los venenos de Ba-T y de PCR; esta es una situación que se ha presentado anteriormente en estudios realizados en el Instituto Clodomiro Picado. Por el contrario, el suero anticoral, fue un mejor control, ya que mostró reconocimiento mínimo del veneno de Ba-T.

Los perfiles de inmunoreactividad (Figura 25 y 26) de los dos antivenenos a evaluar (monoespecífico anti-*B. asper* Pacífico y monoespecífico anti-*B. asper* Caribe) contra los venenos de adultos (13) y neonatos (15) de las poblaciones de la Costa Pacífica de Costa Rica, muestran un alto grado de reconocimiento de proteínas, ya que la mayoría de las bandas fueron inmunoteñidas. Por lo tanto este veneno se convirtió

en el control positivo para realizar las comparaciones apropiadas con los venenos del suroccidente de Colombia.

Figura 25. Análisis de Inmunoelctrotransferencia de veneno de *B. asper* y *B. cf. asper* del suroccidente de Colombia y *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica, que muestra la inmunoreactividad del antiveneno monoespecífico anti-*B. asper* Pacífico (Costa Rica).



Cada carril contiene 20 µg de veneno. Adultos de Ba-T (1-4), adultos de Ba-P (5-8), *pool* de veneno de adultos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica (13), neonato de Ba-T (10), juvenil de Ba-P (9), neonatos de Ba-N (11 y 12) y *pool* de veneno de neonatos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica (14). Marcador de masa molecular Page Ruler SM0671 en kDa, al margen izquierdo (MW). Las proteínas fueron separadas en gel de poliacrilamida en gradiente (10-15%) bajo condiciones de reducción.

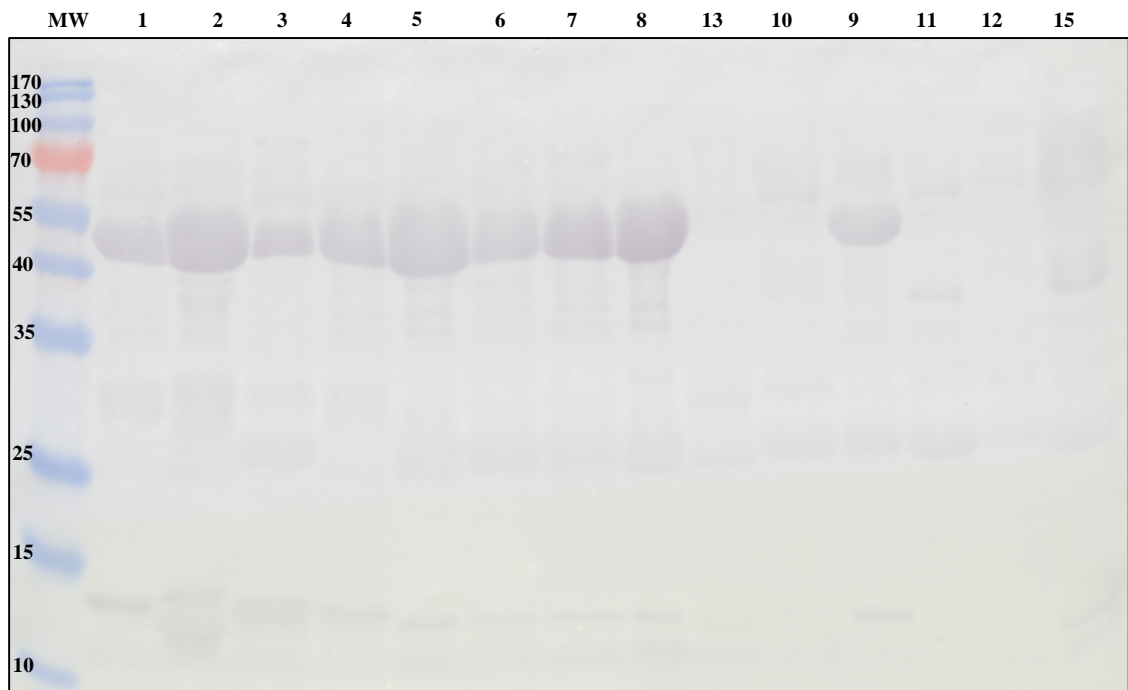
El revelado con suero monoespecífico anti-*B. asper* Pacífico, refleja reconocimiento de bandas entre 70 y 40 kDa en los adultos, la proteína que corresponde a la banda 4 de 52.9 kDa (Figura 16) sobresale entre ellas; mientras en la población del Valle del Patía fue poco reconocida. También se observa leve reconocimiento de proteínas de masa molecular media (27.1 a 31.5 kDa) y reconocimiento parcial de proteínas de masa molecular baja (9.9 kDa).

Proteínas de alta masa molecular como la 1 y la 2 (Figura 16), y la gran mayoría de las proteínas con pesos moleculares entre 30 y 40 kDa no fueron reconocidas por este suero. En los neonatos la inmunoreactividad fue alta principalmente de proteínas entre 57 y 64 kDa, también se reconocieron en menor proporción proteínas

entre 28.9 y 33.6 kDa, mientras que proteínas de baja masa molecular fueron escasamente reconocidas por el suero.

El suero monoespecífico anti- *B. asper* Caribe (Figura 26) reconoció fuertemente la banda 5 (48.4 kDa) del veneno de todas las poblaciones y en menor grado proteínas con masa molecular entre 40 y 35 kDa. A diferencia del suero monoespecífico anti-*B.asper* Pacífico, este suero reconoció la banda 8 (36.7 kDa). También se observa un leve reconocimiento de proteínas con masa molecular entre 27.1 y 31.5 kDa, pero un mayor reconocimiento de proteínas entre 15 y 10 kDa. Este suero no reconoció eficientemente las proteínas presentes en los neonatos (57.6 y 64 kDa).

Figura 26. Análisis de Inmunolectrotransferencia de veneno de *B. asper* y *B. cf. asper* del suroccidente de Colombia y *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica, que muestra la inmunoreactividad del antiveneno monoespecífico anti-*B. asper* Caribe (Costa Rica).

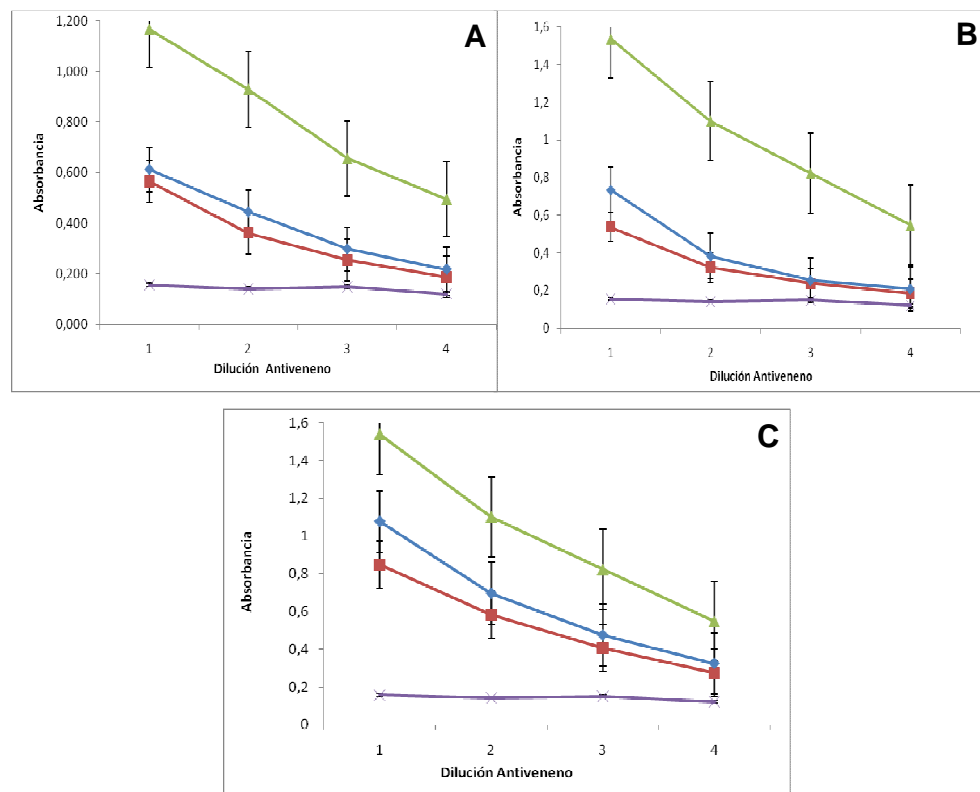


Cada carril contiene 20 µg de veneno. Adultos de Ba-T (1-4), adultos de Ba-P (5-8), *pool* de veneno de adultos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica (13), neonato de Ba-T (10), juvenil de Ba-P (9), neonatos de Ba-N (11 y 12) y *pool* de veneno de neonatos de *B. asper* de la Costa Pacífica de Costa Rica (14). Marcador de masa molecular Page Ruler SM0671 en kDa (MW), al margen izquierdo. Las proteínas fueron separadas en gel de poliacrilamida en gradiente (10-15%) bajo condiciones de reducción.

6.1.5 Cuantificación de anticuerpos. Los sueros monoespecíficos anti-*B.asper* tanto del Caribe como del Pacífico reconocieron de forma similar los venenos de Ba-T y Ba-P (Figura 27 A-C); sin embargo, los componentes proteicos tienden a ser mejor reconocidos por el suero monoespecífico anti-*B. asper* Pacífico. Los venenos de los

neonatos de Ba-N fueron mejor reconocidos por los sueros monoespecíficos que los adultos de Ba-T y Ba-P, y de igual forma tienden a ser mejor reconocidos por el suero monoespecífico anti- *B. asper* Pacífico. Cabe resaltar que pese al reconocimiento observado por parte de los sueros monoespecíficos, el suero que mejor reconoció los venenos de las tres poblaciones del suroccidente de Colombia, fue el polivalente, resultado que se refleja en las altas lecturas de absorbancia para este suero.

Figura 27. Curvas de evaluación para anticuerpos específicos contra antígenos de *B. asper* y *B. cf. asper* del suroccidente de Colombia.



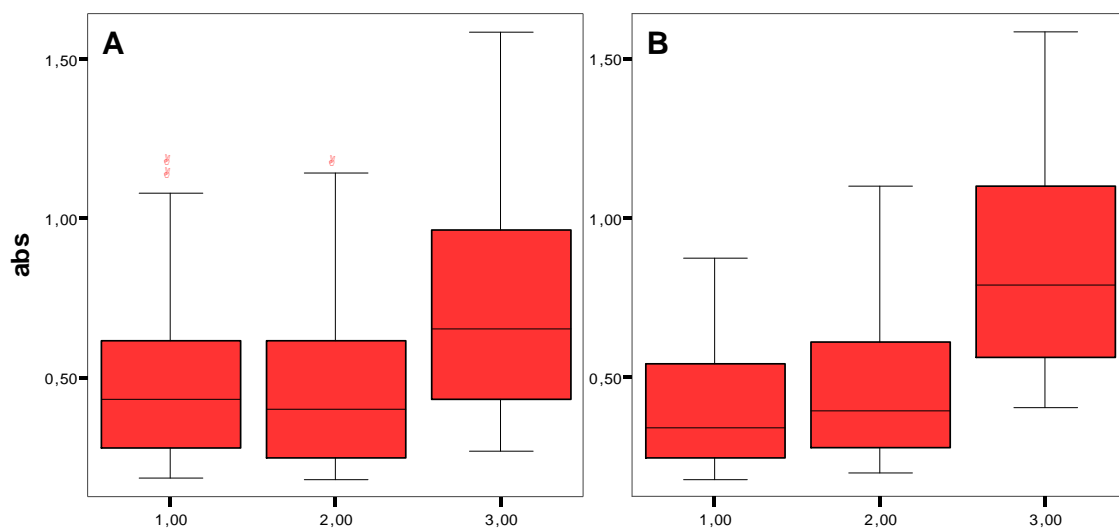
Los antivenenos fueron diluidos en factor 3 y testados por ELISA contra veneno de A. Adultos de *B. asper* de El Tambo, Cauca. B. Adultos de *B. cf. asper* de la Valle del Patía, Cauca. C. Neonatos de *B. asper* de Barbacoas, Nariño. ■ Monoespecífico anti-*B. asper* Caribe. ● Monoespecífico anti-*B. asper* Pacífico. ▲ Polivalente. * Suero normal equino (SNE). Cada punto representa la media \pm SD de tres repeticiones.

Tanto los sueros, como los venenos de cada población y la interacción entre las dos variables comparadas presentaron diferencias significativas respecto a la cuantificación de anticuerpos ($F_{\text{SUE}} = 1341$, $F_{\text{VEN}} = 1254$, $F_{\text{SUE-VEN}} = 13.341$; $p < 0.005$), después de previa transformación (Log_{10}) y normalidad de los datos ($0.825 > p > 0.05$). Debido a la importancia de determinar cómo se presentaban las diferencias significativas con respecto al reconocimiento de los venenos por parte de los sueros, la formación de los grupos (prueba *a posteriori* tipo Tukey), basada en el grado de

parecido entre sus medias, las cuales corresponden en orden ascendente a suero monoespecífico anti-*B.asper* Caribe (0.11), suero monoespecífico anti-*B.asper* Pacífico (0.38) y suero polivalente (0.44), muestran que el polivalente difiere del suero del Caribe y en menor grado del suero del Pacífico.

El veneno de la población de neonatos de Ba-N fue la más reconocido tanto por los sueros monoespecíficos como por el polivalente; por su parte los venenos de Ba-T y Ba-P fue reconocidos de forma similar entre sí (Figura 28 A). El suero polivalente mostró mejor reconocimiento de los venenos en general (Figura 28 B), seguido del suero monoespecíficos anti-*B. asper* Pacífico y finalmente el del Caribe.

Figura 28. Gráfico de medias. Muestra la variación intragrupos e intergrupos con base en las medias de absorbancia.



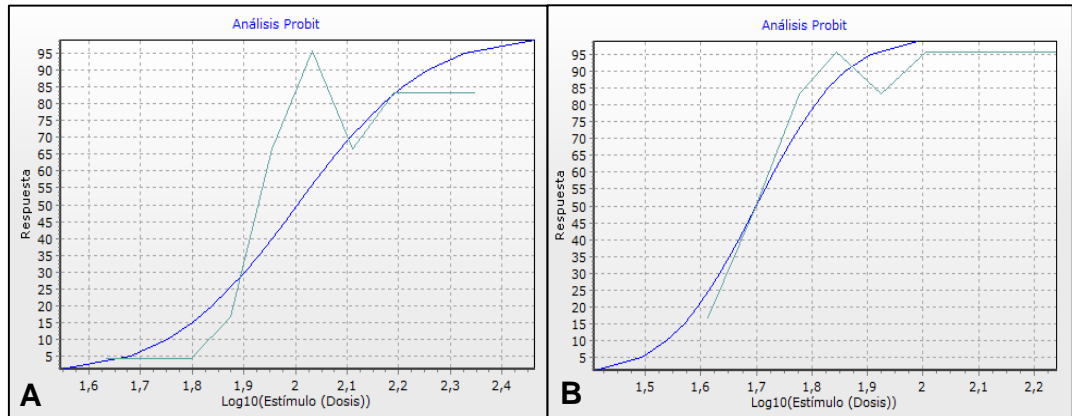
A. Variación en el reconocimiento de los venenos de Ba-T (1.00), Ba-P (2.00) y Ba-N independientemente del tipo de suero. B. Variación del reconocimiento de los sueros monoespecífico anti-*B.asper* Caribe (1.00), monoespecífico anti-*B.asper* Pacífico (2.00) y Polivalente (3.00) independientemente de la procedencia de los venenos. $p < 0,05$, Programa SPSS v 12.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Sobre el margen derecho de cada gráfica, los valores de absorbancia (abs). Las líneas hacia arriba y hacia abajo de las cajas muestran la desviación estándar; la línea horizontal en las cajas representa la media de las absorbancias.

6.2 Actividad biológica y enzimática

6.2.1 Dosis letal 50. Para la población de *B. asper* de El Tambo, Cauca la DL50 fue de 100.94 (83.18-122.83 IC 95%) $\mu\text{g}/\text{ratón}$ y para la de *B. cf. asper* del Valle del Patía, Cauca fue de 50.07 (37.44 – 58.31 IC 95%) $\mu\text{g}/\text{ratón}$. En el Anexo F se muestra la distribución log normal y los percentiles de la dosis, calculados por el análisis de Probits (Método de Finney) del paquete estadístico BioStat 2009 Profesional 5.8.0. Las Figuras 29 A y B muestran la gráficas construidas a partir de

los niveles evaluados, donde el punto medio de la línea de regresión corresponde a la DL50 de cada población.

Figura 29. Representación gráfica de los datos obtenidos para la determinación de la Dosis Letal 50 de A. *B. asper* de El Tambo, Cauca. B. *B. cf. asper* del Valle del Patía, Cauca. Línea azul: línea de regresión, línea verde: puntos experimentales.



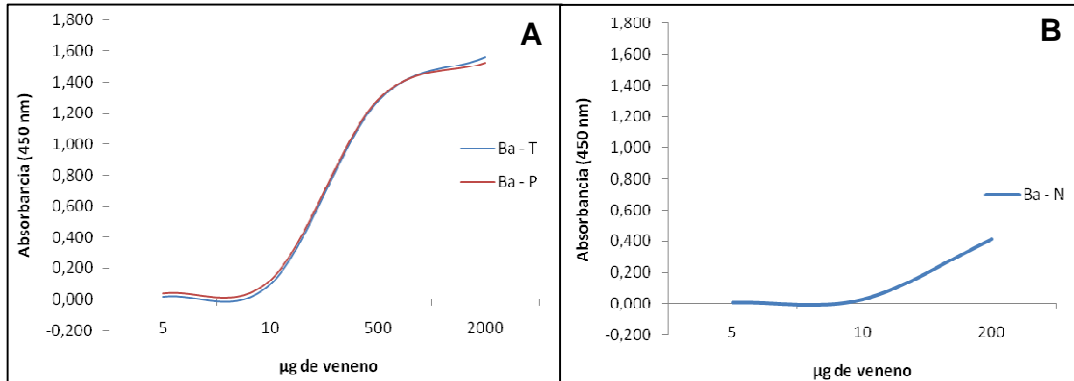
6.2.2 Actividad proteolítica. Tanto para la población de *B. asper* de El Tambo, Cauca y *B. cf. asper* de la Valle del Patía se observa que al incrementar la concentración de veneno de 5 a 500 μg la actividad proteolítica aumenta proporcionalmente, aunque entre los 5 y 10 μg dicho incremento no es marcado; mientras que de 500 a 2000 μg se observa una tendencia a mantener una actividad proteolítica constante (Figura 30 A).

La actividad proteolítica del veneno de los neonatos de *B. asper* de Nariño (Figura 30 B) denota un comportamiento similar al observado en el caso anterior, ya que aumenta de forma directamente proporcional a la cantidad de veneno evaluada (de 5 a 200 μg); no se observó el comportamiento de la actividad a mayores concentraciones de veneno dada la limitación del mismo.

Se observa similitud al comparar gráficamente la actividad proteolítica de Ba-P y Ba-T; sin embargo al comparar estas poblaciones con Ba-N, se observa que la actividad proteolítica a 5 μg es menor para Ba-N, diferencia que se hace más notoria a una concentración de 10 μg , donde la actividad proteolítica del veneno de los adultos triplica la de los neonatos.

Para términos de comparación, se determinó la unidad de actividad proteolítica, definida como un cambio de 0.2 en la absorbancia por minuto (Gutiérrez *et al.* 2008). Para la población Ba-T fue de 0.221 ± 0.1 U/mg, para Ba-P fue de 0.315 ± 0.2 U/mg y para Ba – N de 0.123 ± 0.02 U/mg, lo cual muestra que la población de Ba-P presenta una actividad mayor que Ba-T; y los neonatos (Ba-N) presentan menor actividad proteolítica que los adultos.

Figura 30. Actividad proteolítica. A. Venenos de *B. asper* de El Tambo, Cauca (Ba-T) y *B. cf. asper* del Valle Patía, Cauca (Ba-P). B. Venenos de *B. asper* de la Reserva Natural de las Aves el Pangán, Barbacoas, Nariño (Ba-N).



6.2.3 Actividad hemorrágica. La dosis hemorrágica se determinó tanto para la población del Valle del Patía, como para la población de El Tambo, con el fin de confirmar la presencia de metaloproteinasas, ya que en el cromatograma obtenido por HPLC se observó una alta concentración y abundancia de picos correspondientes a esta familia proteica.

La dosis hemorrágica mínima (DHM) para la población Ba-P fue de $0.249 \pm 0.048 \mu\text{g}$ y la DHM para la población Ba-T fue de $1.45 \pm 0.22 \mu\text{g}$. Las Figuras 31 y 32 muestran la curvas dosis – respuesta, donde se relaciona el diámetro de la lesión hemorrágica con las concentraciones de veneno evaluadas, entre un rango de 0.0625 a 2 µg de veneno (factor 2) para la primer población, y concentraciones entre 0.125 y 8 µg para la segunda población. Se presentaron diferencias significativas entre las dosis mínimas hemorrágicas de las dos poblaciones ($0.0199 < p = 0.05$).

Figura 31. Curvas dosis – respuesta. Determinación de la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) para la población de *B. cf. asper* del Valle del Patía, Cauca. Cada una de las curvas representa el número de ensayos.

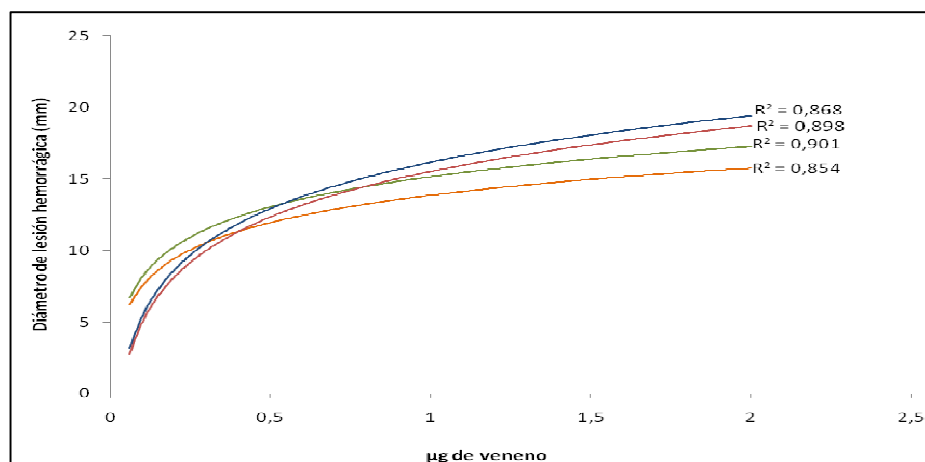
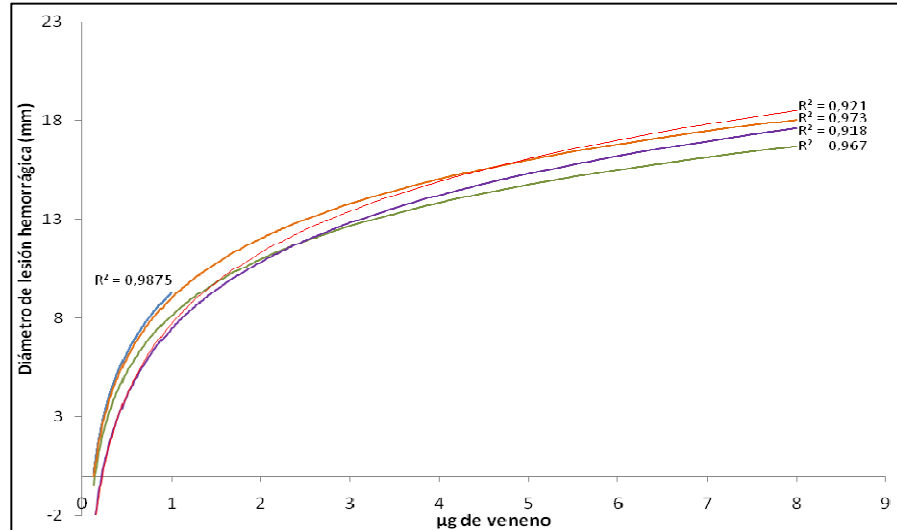


Figura 32. Curvas dosis – respuesta. Determinación de la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) para la población de *B. asper* de El Tambo, Cauca. Cada una de las curvas representa el número de ensayos.



6.2.4 Actividad coagulante. La actividad coagulante también se determinó para las dos poblaciones, puesto que confirma la presencia de serina proteinasas y metaloproteinasas en el veneno. La dosis mínima coagulante (DCM) para la población de *B. asper* de El Tambo Cauca fue de $0.378 \pm 0.05 \mu\text{g}$ y la de *B. cf. asper* de Valle del Patía fue de $0.962 \pm 0.11 \mu\text{g}$. No existen diferencias altamente significativas entre las dosis mínimas coagulantes para las poblaciones ($0.08 > p = 0.05$).

Las Figuras 33 y 34 muestran las curvas dosis – respuesta para cada una de las poblaciones, las cuales relacionan las concentraciones de veneno evaluadas (0.25 a 8 µg) con el tiempo de coagulación.

Figura 33. Curvas dosis – respuesta. Determinación de la Dosis Coagulante Mínima (DCM) para la población de *B. asper* de El Tambo, Cauca Cada una de las curvas representa el número de ensayos.

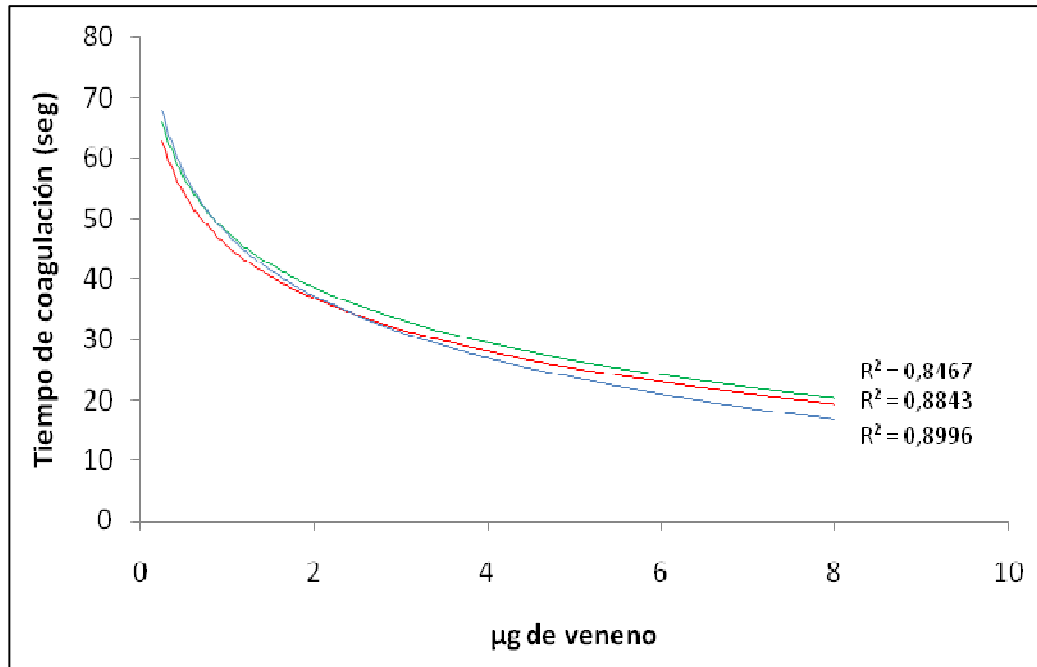
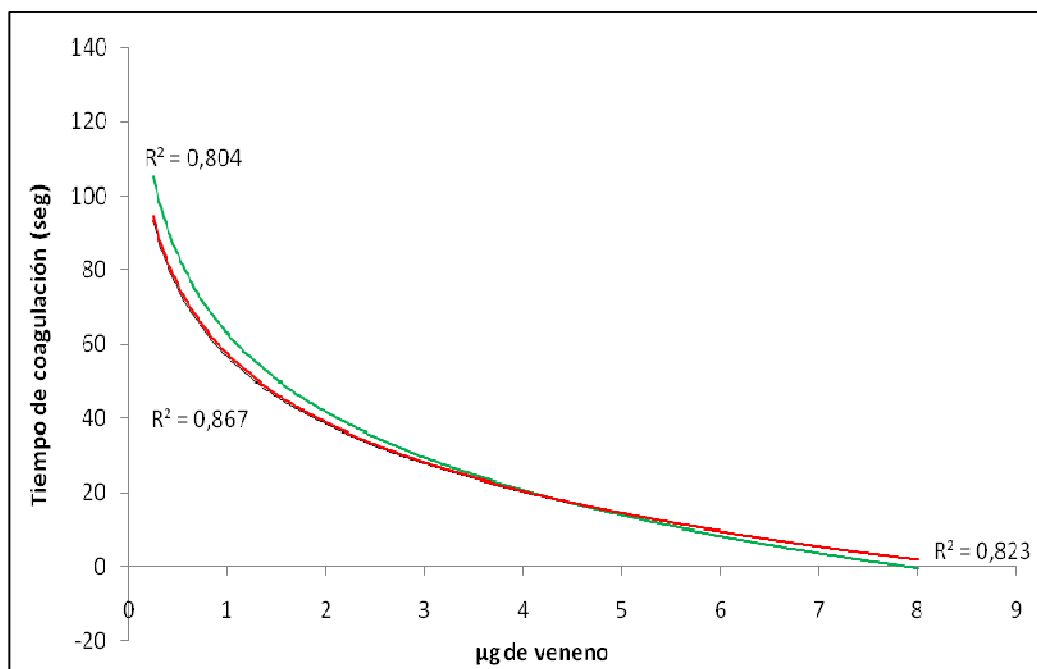


Figura 34. Curvas dosis – respuesta. Determinación de la Dosis Coagulante Mínima (DCM) para la población de *B. cf. asper* del Valle del Patía, Cauca. Cada una de las curvas representa el número de ensayos.



7. DISCUSIÓN

7.1 EL VENENO

Chippaux *et al.* (1991) relaciona proporcionalmente la talla con la cantidad de veneno inoculado por la serpiente. En el presente estudio, la relación se observó ontogénicamente, ya que la cantidad de veneno producida por los adultos fue más alta que la de los neonatos. Sin embargo, a pesar de que *B. asper* CIBUC-Se-000 020 y *B. asper* CIBUC-Se-000 102 fueron los ejemplares de mayores tamaños (1.42 m y 1.40 m respectivamente) y los que produjeron la mayor cantidad de veneno, la relación establecida por Chippaux *et al.* (1991) no se mantiene en todos los ejemplares, pues algunos presentaron grandes tallas con baja producción de veneno.

Respecto a la producción del veneno, para *B. asper* de El Tambo se obtuvieron 0.85 ± 0.37 ml de veneno promedio en individuos adultos; estos resultados concuerdan con lo reportado por Sasa *et al.* (2009), quien afirma que la producción de veneno de *B. asper* de Costa Rica es alta, con un promedio de 0.65 ± 0.37 ml en ejemplares adultos y subadultos. Por el contrario la producción de veneno *B. cf. asper* del Valle del Patía fue baja con un promedio de 0.17 ± 0.098 ml también en individuos adultos. Cabe resaltar que el tamaño de muestra utilizada para ese estudio fue muy limitado.

La variación en la producción de veneno por *B. asper*, puede ser un indicador de la conocida dosificación del veneno, en la cual las serpientes controlan el flujo de veneno, por la acción de una glándula accesorio, considerada como un esfínter, que hace parte del aparato venenoso de los vipéridos (Gans and Kochva 1965). Como resultado los vipéridos inoculan más o menos veneno, dependiendo de la situación de amenaza bajo la que se encuentren; incluso se ha reportado en diferentes estudios que el 30% de los casos corresponden a mordeduras secas (Kochva 1987, Young *et al.* 2002, Carrasquilla 2005).

Por otra parte, es necesario mencionar que las serpientes adultas al encontrarse en cautiverio han adquirido un comportamiento diferente en relación a la captura de las presas, y por tanto, probablemente no emplearán la misma cantidad de veneno que en estado silvestre. Incluso se ha observado que ejemplares de la especie al tener asegurada la alimentación en cautiverio, se limitan a matar la presa sin necesidad de inocular veneno (S. Ayerbe comunicación personal y observación personal), puesto que la producción del mismo implicaría un mayor costo energético.

Con respecto a la concentración proteica, la población de *B. asper* de El Tambo Cauca (Ba-T) presentó un mayor promedio frente a la población del Valle del Patía (Ba-P), y pese a que el promedio de Ba-T se ajustó al reportado para las poblaciones tanto de la Costa Pacífica como del Caribe de Costa Rica, a nivel intrapoblacional la concentración proteica fue variable; por ejemplo, son notorias las diferencias en cuantificación proteica de los ejemplares CIBUC-Se-000 020 y CIBUC-Se-000 102

(Tabla 2), posiblemente este hecho este relacionado con la variabilidad individual del veneno reportada por Chippaux *et al.* (1991). Por el contrario los valores obtenidos para *B. cf. asper* fueron más homogéneos. Los resultados fueron comparados con los reportados por el Instituto Clodomiro Picado, ya que la cuantificación proteica también fue realizada por el método de Biuret.

7.2 VARIACIÓN INTRAESPECÍFICA

Los perfiles electroforéticos y cromatográficos manifestaron diferencias en la composición y concentración proteica del veneno de todas las poblaciones comparadas. Este tipo de variación ha sido bien documentada, y de acuerdo con Chippaux *et al.* (1991) y Stanchi *et al.* (1999) puede presentarse a nivel intra e interpoblacional.

Los adultos de las poblaciones del suroccidente de Colombia y de Costa Rica, se caracterizaron por presentar bandas proteicas con una masa molecular aproximada de 27.1 kDa y 9.9 kDa. Aunque con algunas diferencias en las condiciones de separación en gel; estas bandas pueden corresponder a las bandas conspicuas reportadas para la Costa Pacífica y Caribe de Costa Rica (Assakura *et al.* 1992, Alape *et al.* 2008). Assakura *et al.* (1992) muestran que los venenos de *B. asper* del Caribe de Costa Rica presentan compuestos de 23.5 kDa, y tanto los venenos de *B. asper* de la Costa Pacífica como del Caribe presentan compuestos con masas moleculares de 12 kDa. Recientemente Alape *et al.* (2008), a partir de análisis del proteoma de individuos adultos y neonatos *de B. asper*, describen que los adultos de *B. asper* de la Costa Pacífica presentan una banda principal que corresponde a proteína(s) con una masa molecular de aproximadamente 23 kDa, y una banda menor que corresponde a proteína(s) de masa molecular de 17 kDa; en el caso de los adultos del Caribe las bandas características de la población tienen una masa molecular de 25 kDa.

En general los adultos presentaron con mayor frecuencia proteínas entre 11 y 48.4 kDa, mientras que los neonatos presentaron proteínas entre 30 y 60 kDa, lo que refleja la tendencia hacia un incremento de proteínas de alta masa molecular en los neonatos. Alape *et al.* (2009), también encontraron que los neonatos presentan una mayor concentración y frecuencia de proteínas de alta masa molecular (20 a 67 kDa), mientras que los adultos presentan proteínas entre 14 y 45 kDa. La misma situación es descrita por Saldarriaga *et al.* (2003), donde los venenos de especímenes recién nacidos y juveniles presentan un mayor número de bandas electroforéticas de masa molecular más alta, que el de los adultos. La presencia de proteínas de alta masa molecular en neonatos, resulta en un incremento de la complejidad del veneno, indicando que los requerimientos para inmovilizar las presas pueden cambiar con la edad (Alape *et al.* 2008).

Los perfiles electroforéticos y los cromatogramas muestran correspondencia entre ellos; así los componentes de alta masa molecular y concentración (metaloproteinasas) en el SDS-PAGE, corresponden a los picos que eluyen al final de los cromatogramas con altas concentraciones. En general se observó que la frecuencia de bandas proteicas y picos compartidos entre las poblaciones, las cuales

le confieren su similaridad o distinción, gira alrededor de seis familias proteicas metaloproteinasas, serina proteinasas, fosfolipasas, desintegrinas, fragmentos DC y CRISP (Alape *et al.* 2008).

Los resultados muestran que la concentración de algunos picos (Figura 22 y 23) que podrían corresponder a metaloproteinasas, es considerablemente alta en las poblaciones de adultos del suroccidente Colombiano, incluso mayor que en las poblaciones de Costa Rica (Figura 21) y además representan el mayor porcentaje dentro de las proteínas del veneno. Según Guércio *et al.* (2006) las metaloproteinasas forman gran parte del veneno de *B. atrox* (especie relacionada filogenéticamente con *B. asper*) y su presencia está relacionada con las actividades hematotóxicas promotoras de hemorragia, defibrinogénación, edema local y necrosis, propias de las especies del género *Bothrops* (Gutiérrez *et al.* 1980, Guércio *et al.* 2006 Saldarriaga *et al.* 2003).

En el veneno de *B. asper* se encuentran dos tipos de metaloproteinasas, las P-I son responsables de la hemorragia local y son características del estado adulto; mientras que las P-III causan la hemorragia sistémica durante el envenenamiento y se encuentran en elevadas concentraciones en el estado neonato o juvenil (Rucavado *et al.* 2002, Alape *et al.* 2008, Alape *et al.* 2009, Gutiérrez *et al.* 2009). Teniendo en cuenta los tipos de Metaloproteinasas, P-I y P-III y su actividad biológica respectiva, es probable que las poblaciones de adultos tanto de *B. asper* de El Tambo como de *B. cf. asper* del Valle del Patía presenten metaloproteinasas similares a tipo P-I, puesto que la actividad hemorrágica local, como se verá más adelante, fue alta en las dos poblaciones.

Dadas las variaciones ontogénicas mostradas por Alape *et al.* (2008), era de esperar el veneno de los ejemplares neonatos se separara totalmente del veneno de los adultos en el fenograma de similitud. Además, el perfil cromatográfico de los neonatos de *B. asper* de Barbacoas Nariño mostró una mayor complejidad del veneno con respecto al de los adultos y estuvo conformado aproximadamente por el 42.5% por metaloproteinasas, lo que concuerda con los resultados encontrados en los perfiles electroforéticos, donde los venenos de los neonatos se caracterizaron por presentar mayor cantidad de proteínas de alto peso molecular, las cuales podrían estar implicadas, como se mencionó anteriormente, en la inmovilización de las presas (Alape *et al.* 2008).

Las serina proteinasas representan el segundo mayor porcentaje de los componentes del veneno, con cerca del 17.3% en la población de Ba-P y 13.6 % en Ba-T. Aunque Alape *et al.* (2009) también muestra que esta familia proteica se encuentra en un alto porcentaje principalmente en los ejemplares adultos de la población del Caribe de Costa Rica (18.2%), de acuerdo con su porcentaje sobre el total del veneno, estas proteínas ocupan el tercer lugar y se ubican después de las fosfolipasas.

En cuanto a las fosfolipasas, en los perfiles cromatográficos se observó una baja concentración de esta familia proteica en Ba-T; mientras que la población de la Costa Pacífica de Costa Rica mostró una alta concentración de las mismas. En la población

del Valle del Patía aunque en el cromatograma no se detectan las fosfolipasas, las bandas proteicas 17 y 19 (Figura 16) de los perfiles electroforéticos podrían representar dicha actividad farmacológica; posiblemente la baja concentración en el que se encuentran en el veneno impida que se perciban con las condiciones cromatográficas establecidas. Según Alape *et al.* (2008) los especímenes adultos presentan un alto contenido de fosfolipasas miotóxicas A₂, lo que involucra un alto riesgo de envenenamiento severo con dermonecrosis y mionecrosis (Otero *et al.* 2002a).

Al pasar del estado (Ba-N) neonato al adulto (Ba-T), las fosfolipasas mantienen una concentración relativamente baja; mientras que en las poblaciones de *B. asper* de la Costa Pacífica y del Caribe Costa Rica experimentan un cambio ontogénico, donde el número y la concentración de fosfolipasas aumenta al pasar del estado neonato al adulto (Alape *et al.* 2009). Las desintegrinas, los fragmentos DC y las CRISP, al igual que lo reportado por Alape *et al.* (2008), representaron los más bajos porcentajes entre los componentes del veneno de las poblaciones del suroccidente de Colombia.

Se presentó variación ontogénica relacionada con las actividades biológicas en el veneno de los neonatos de Ba-N con respecto a la población de Ba-T, observándose un incremento en la actividad proteolítica al pasar de neonato a adulto. Tal variación ontogénica se ha reportado en diferentes estudios, donde los cambios en las actividades toxicas y enzimáticas del veneno pueden estar relacionados con una modificación en los hábitos alimenticios al pasar de un estado de crecimiento a otro, de presas ectotermicas (ranas y lagartos) a presas homotermas (mamíferos y aves) resultado de la adaptación por procesos evolutivos al tipo y al tamaño de la presa (Guércio *et al.* 2006, Alape *et al.* 2008, Sasa *et al.* 2009).

Es importante resaltar las variaciones ontogénicas de los venenos por las implicaciones en las manifestaciones clínicas del envenenamiento (Otero 2009), pues se ha documentado que a pesar de que los neonatos inoculan bajas cantidades de veneno en una mordedura, pueden ocasionar considerables efectos vasculotóxicos como hemorragia y edema (Saldarriaga *et al.* 2003).

7.2.1 Variación intrapoblacional. La variación fue mayor entre los individuos de El Tambo Cauca que entre los del Valle del Patía, tal como se observa en el fenograma de similitud (Figura 20). La variación individual es de gran importancia e incluso puede superar a la variación interpoblacional; además se convierte en evidencia de que la composición proteica es un reflejo de una posible variación genética (Chippaux *et al.* 1991; Alape *et al.* 2008).

La variación intrapoblacional fue menor en la población Ba-P. William and White (1987) plantean que en poblaciones aisladas y pequeñas, como es el caso de esta población, el *pool* de genes codificadores es menos diverso, llevando así a la producción de un veneno más homogéneo. Por lo tanto, este grado de variación podría reflejar un proceso inicial de divergencia o un fenómeno de endogamia en la población, dadas las condiciones de aislamiento geográfico en las que se encuentra (como se detallará más adelante), las cuales se constituyen en factores que afectan directamente la diversidad genética de las poblaciones. Por el contrario en

poblaciones grandes, como por ejemplo Ba-T, donde hay libre entrecruzamiento, la variación individual es directamente proporcional (William and White 1987), hecho que explicaría su mayor variación intrapoblacional.

Por otra parte, los resultados de este trabajo mostraron variación entre los adultos de cada una de las poblaciones, tal como se observa en los perfiles electroforéticos; situación que también fue observada por Alape *et al.* (2008) en las poblaciones de Costa Rica.

7.2.2 Variación interpoblacional. Se observó alta variación interpoblacional (índice de Jaccard), principalmente entre las poblaciones de adultos del suroccidente de Colombia y las poblaciones de la Costa Pacífica y del Caribe de Costa Rica, como se muestra en la Figura 20; mientras que la variación entre la población de *B. asper* de El Tambo Cauca y *B. cf. asper* del Valle del Patía fue menor. Adicionalmente, los neonatos de *B. asper* de Barbacoas Nariño reflejaron similitud con el neonato de la población de *B. asper* de El Tambo Cauca.

Si se parte del hecho de que la variabilidad en la composición del veneno se encuentra bajo control genético (Alape *et al.* 2008), y que la variabilidad genética puede ser alterada por factores geográficos y ecológicos, es probable que se altere la expresión proteica del veneno por las condiciones geográficas en las que se encuentran las poblaciones, como se profundizará más adelante.

7.3 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y ENZIMÁTICAS

De acuerdo con los resultados obtenidos, los venenos del suroccidente de Colombia se caracterizan por presentar principalmente metaloproteinasas y serina proteinasas y en menor proporción fosfolipasas, desintegrinas fragmentos DC y CRISP. La acción o la sinergia de una o más de estas familias proteicas puede explicar la variación y diferencia de las actividades biológicas (Matsui *et al.* 2000, Gutiérrez *et al.* 2009) encontradas entre las poblaciones, variación que ha sido documentada a nivel intra en interespecie en propiedades hemolíticas, coagulantes o anticoagulantes, proteolíticas y necrosantes del veneno (Dunn 1944). La Tabla 4 resume las actividades biológicas determinadas para los venenos de cada una de las poblaciones.

7.3.1 Letalidad de las poblaciones. Es importante confrontar los resultados obtenidos con dosis letales previamente reportadas para la misma especie a lo largo de toda su distribución geográfica, y con dosis de especies relacionadas filogenéticamente (Tabla 5). Esto con el fin de tener un panorama más amplio respecto a la letalidad de las poblaciones de estudio.

Las dosis letales reportadas por Yasnó (2005) y Navia (2005) para *B. asper* en la misma área geográfica, muestran similitud con la dosis encontrada en este estudio para la población de esta especie en El Tambo Cauca; sin embargo, la dosis letal de *B. cf. asper* del Valle del Patía determinada por Navia (2005) contrasta fuertemente con los resultados.

Tabla 4. Actividades biológicas y enzimáticas de las poblaciones del suroccidente Colombiano.

Población	Dosis letal 50 ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)	Actividad proteolítica (U/mg)	Actividad hemorrágica (μg)	Actividad Coagulante (μg)
Ba-T	100.9 (83.2-122.8)	0.221 \pm 0.1	1.44 \pm 0.2	0.37 \pm 0.05
Ba-P	50.07 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ (37.4-58.3)	0.315 \pm 0.2	0.24 \pm 0.04	0.96 \pm 0.1
Ba-N	-	0.123 \pm 0.02	-	-

Los valores que están en paréntesis en la dosis letal 50, corresponden a los límites de confianza (95%), cuanto mayor la dosis letal, menor es su poder de letalidad es menor. De igual manera la lectura de las actividades hemorrágica y coagulante es inversamente proporcional a su valor (cuanto menor es el valor, más alta es la actividad biológica). Para la población Ba- N solamente se determinó la actividad proteolítica debido a la limitada cantidad de veneno.

Es evidente la diferencia en letalidad entre *B. cf. asper* del Valle del Patía y *B. asper* de El Tambo, pues la dosis letal de Ba-P duplica a la de Ba-T, lo cual refleja la variabilidad tanto en componentes como en la concentración proteica de los venenos. Aunque la producción de veneno de los ejemplares adultos de Ba-P fue baja, el hecho de presentar una dosis letal más alta que la encontrada para Ba-T, puede explicarse posiblemente por la concentración y presencia de proteínas particulares (metaloproteinasas y/o serina proteinasas, Figuras 15, 16 y Figura 22) que la diferencian de las demás poblaciones y que a nivel evolutivo podrían haberse convertido en componentes eficaces para inmovilizar sus presas.

Así, Ba-P posiblemente presente mayor concentración de proteínas tóxicas que reflejen la alta letalidad de su población; mientras que los ejemplares de Ba-T, aunque presentaron un mayor promedio de producción de veneno, este puede estar conformado por una alta concentración de proteínas menos tóxicas que las de Ba-P. Estas son posibles hipótesis que deberían ser analizadas con mayor profundidad, pues son de gran importancia biológica para las poblaciones y también de importancia clínica para contribuir al manejo de los accidentes ofídicos que ocasionan. Ferreira *et al.* (1992) propone establecer una relación inversamente proporcional entre la concentración de proteínas y la dosis letal; sin embargo, la dosis letal está condicionada por diferentes factores, donde tanto la composición como la concentración proteica juegan un rol importante.

Además, cabe resaltar que la dosis letal fue determinada con un *pool* de veneno de ejemplares adultos, mientras que la reportada por Navia (2005) tuvo en cuenta un solo individuo. El hecho de incluir un mayor número de ejemplares para la determinación de esta prueba y el diseño del experimento (método de Finney),

reflejan mejor la letalidad de la población. También hay que considerar que la medida de letalidad en modelos vivos tiene una gran incertidumbre, y como se mencionó anteriormente existen diferentes factores tanto biológicos como del diseño del método que pueden influir en la determinación de la dosis (Solano *et al.* In prep).

Tabla 5. Dosis letales 50 para *B. asper*, *B. cf. asper* y especies relacionadas filogenéticamente. Vía de inoculación: intraperitoneal (IP), intravenosa (IV).

Especie	Procedencia	Autor	Dosis Letal 50	Vía de inoculación
<i>B. asper</i>	Guatemala	Saravia <i>et al.</i> (2001)	56.8 (44.5-72.4) µg/ratón	IP
<i>B. asper</i>	Costa Rica	Bolaños (1972)	59.7 (54.3-65.1) µg/ratón	-
<i>B. asper</i>	Costa Rica, costa Atlántica	Assakura <i>et al.</i> 1992	71 (62-92) µg/ratón	IP
<i>B. asper</i>	Costa Rica, costa Pacífica	Assakura <i>et al.</i> 1992	77 (68-87) µg/ratón	IP
<i>B. asper</i>	Antioquia	Saldarriaga <i>et al.</i> (2003)	42.9 (35.5-53.3) µg/ratón ^a	IP
<i>B. asper</i>	Antioquia	Saldarriaga <i>et al.</i> (2003)	48.1 (43.1-53.1) µg/ratón ^b	IP
<i>B. asper</i>	Antioquia	Saldarriaga <i>et al.</i> (2003)	49.4 (40.7-58.1) µg/ratón ^c	IP
<i>B. asper</i>	Antioquia	Saldarriaga <i>et al.</i> (2003)	67.1 (60.1-74.1) µg/ratón ^d	IP
<i>B. asper</i>	Tambo, Cauca	Yasnó (2005)	110.8 (105.9-116.1) µg/ratón	IP
<i>B. asper</i>	Tambo, Cauca	Navia (2005)	103.1 (95.2-119.5) µg/ratón	IP
<i>B. asper</i>	Tambo, Cauca	Este estudio	100.9 (83.2-122.8) µg/ratón	IP
<i>B. cf. asper</i>	Valle del Patía, Cauca	Navia (2005)	101.3 (90-122.8) µg/ratón	IP
<i>B. cf. asper</i>	Valle del Patía, Cauca	Este estudio	50.07 (37.4-58.3) µg/ratón	IP
<i>B. asper</i>	Manabí, Ecuador	Kuch <i>et al.</i> (1996)	65 µg/ratón	IP
<i>B. asper</i>	Guayas, Ecuador	Kuch <i>et al.</i> (1996)	85 µg/ratón	IP
<i>B. asper</i>	Los Ríos, Ecuador	Kuch <i>et al.</i> (1996)	85 µg/ratón	IP
<i>B. atrox</i>	Tucurú, Pará	Assakura <i>et al.</i> (1992)	95 (83-117) µg/ratón	IP
<i>B. atrox</i>	Antioquia	Saldarriaga <i>et al.</i> (2003)	51.8 (37.9-65.7) µg/ratón ^a	IP
<i>B. atrox</i>	Antioquia	Saldarriaga <i>et al.</i> (2003)	59.7 (54-65.4) µg/ratón ^b	IP
<i>B. atrox</i>	Antioquia	Saldarriaga <i>et al.</i> (2003)	65.5 (54.1-76.9) µg/ratón ^c	IP
<i>B. atrox</i>	Antioquia	Saldarriaga <i>et al.</i> (2003)	81.4 (80.2-83.6) µg/ratón ^d	IP
<i>B. marajoensis</i>	Isla Marajó, Pará	Assakura <i>et al.</i> (1992)	113 (102-127) µg/ratón	IP
<i>B. moojeni</i>	Brasilia, Goías	Assakura <i>et al.</i> (1992)	145 (128-173) µg/ratón	IP
<i>B. leucurus</i>	Brasil	Pidde <i>et al.</i> (2008)	63.7 (58-71.4) µg/ratón	IP
<i>B. colombiensis</i>	Venezuela, el Guapo	Girón <i>et al.</i> (2008)	197.2 µg/ratón	IP

No obstante, a pesar de la diferencia en el tamaño de la muestra, podría presentarse un fenómeno previamente descrito por Chippaux *et al.* (1991), quien manifiesta que con el tiempo los venenos en algunas especies tienden a ser más tóxicos, como respuesta a factores de adaptación, a nuevas condiciones de hábitat o a variaciones drásticas del medio ambiente; pero, para confirmar este comportamiento sería necesario monitorear la población.

Sumado a lo anterior, *B. cf. asper* del Valle del Patía y *B. asper* son poblaciones responsables de la mayor tasa de accidentes ofídicos en la región (Cauca- Nariño). *B. cf. asper* presenta el mayor porcentaje por incidencia epidemiológica, y aunque la mortalidad no es alta, fue el principal agente causante de accidentes ofídicos en el Departamento del Cauca (cerca del 43% de los casos) entre los períodos 2000-2008 (Navia 2005, Ayerbe y Latorre 2009).

Al comparar la letalidad de Ba-T y Ba-P con dosis letales de ejemplares adultos a nivel nacional, las poblaciones de *B. asper* del norte de Colombia son más letales que las del suroccidente; a nivel internacional aunque se observa variación entre las mismas, la letalidad parece disminuir conforme la distribución de la especie tiende hacia el sur (Tabla 5). Posiblemente, este patrón puede ser un indicio de que la toxicidad del veneno de *B. asper*, esté relacionado con la concentración de alguna(s) toxina(s) específica(s). Tal como ocurre para poblaciones de *Crotalus durissus* a lo largo de toda su distribución, donde el grado de toxicidad de su veneno está asociado con el incremento en la concentración de crototoxina, lo que refleja en general que la toxicidad del veneno de esta especie ha evolucionado durante su invasión a Sur América (Calvete *et al.* 2009).

Adicionalmente, la dosis letal de *B. cf. asper* del Valle del Patía comparada con las reportadas para *B. asper* de otros países es baja (50.07 µg/ratón), y por lo tanto manifiesta una mayor letalidad; sin embargo, es similar a las dosis de Guatemala (56.8 µg/ratón) y del Norte de Colombia (49.4 µg/ratón, ejemplares de dos años de edad). Frente a especies del mismo género del clado *Bothrops atrox-asper* (Fenwick *et al.* 2009), la población de *B. asper* de El Tambo (Cauca) es menos letal que *B. atrox* y *B. leucurus*; pero más letal que *B. marajoensis*, *B. moojeni* y *B. colombiensis*. Por el contrario, *B. cf. asper* del Valle del Patía, es más letal que todas las especies del mismo género.

7.3.2. Actividad proteolítica. Los efectos de la actividad proteolítica, utilizando diferentes concentraciones de veneno para cada población, también fueron reportados por Lomonte y Gutiérrez (1983), quienes afirman que la relación entre la cantidad de veneno empleado y la actividad proteolítica es lineal hasta cierto punto, sin embargo después de presentarse el máximo de la actividad, la curva se mantiene estable.

Por otra parte, se observa variación entre las actividades proteolíticas de las poblaciones. Aunque la diferencia no es marcada, tiende a ser mayor en la población de *B. cf. asper* del Valle del Patía. Gutiérrez y Rucavado (2000) y Gutiérrez *et al.* (2005), manifiestan que la actividad hemorrágica se encuentra asociada a su

capacidad proteolítica, esto podría explicar el hecho de que Ba-P haya presentado una mayor actividad proteolítica y hemorrágica, frente a las otras poblaciones.

La actividad proteolítica de los venenos de las poblaciones de *B. asper* de El Tambo (0.221 ± 0.1 U/mg), *B. asper* de Barbacoas, Nariño (0.123 ± 0.02 U/mg) y *B. cf. asper* del Valle del Patía (0.315 ± 0.2 U/mg) fue más baja que la reportada por Assakura *et al.* (1992) para los venenos de *B. asper* de la Costa Pacífica y del Caribe de Costa Rica (2.31 U/mg y 1.47 U/mg respectivamente). Ferreira *et al.* (1992), manifiestan que existe una correlación inversa entre la actividad proteolítica y la letalidad de nueve especies de *Bothrops*, por lo tanto venenos que tienen una alta actividad proteolítica contienen pequeñas cantidades de toxina letal y consecuentemente presentan disminución en la letalidad; según lo anterior las poblaciones de *B. asper* de Costa Rica deberían ser menos letales que las del suroccidente Colombiano, pero sucede lo contrario.

De allí que la correlación establecida por Ferreira *et al.* (1992) no es clara, y difícilmente se podría relacionar una sola actividad biológica con la letalidad del veneno; pues la actividad proteolítica es el resultado de la interacción de diferentes componentes del veneno, como la L –aminoácido oxidasa, las metaloproteinasas, las serina proteinasas y las desintegrinas, las cuales están involucradas tanto en esta actividad como en los procesos de la agregación plaquetaria e inducción a la hemorragia (Lazo *et al.* 2007, Gutiérrez *et al.* 2009).

La actividad proteolítica se ve favorecida por diferentes sustancias vasodilatadoras, las cuales facilitan la acción de las hidrolasas digestivas, metaloproteinasas dependientes de zinc, fosfolipasas A₂ y hialuronidasas (Cuesta *et al.* 2008). Éstas proteínas modifican la homeostasis de uno o varios sistemas, generando diferentes síntomas que pueden resultar en una necrosis extensiva (Ribeiro y Jorge 1997); y como consecuencia, el tejido afectado se convierte en un ambiente apto para la proliferación de microorganismos (Cuesta *et al.* 2008) presentes en la cavidad bucal de las serpientes (Henao *et al.* 2005, Ayerbe *et al.* 2008). Por lo tanto, teniendo en cuenta que la actividad proteolítica de Ba-P fue más alta que la de Ba-T, los accidentes por individuos de Ba-P serían más propensos a presentar infección bacteriana que los accidentes ocasionados por las poblaciones de *B. asper* del suroccidente Colombiano.

7.3.3 Actividad hemorrágica. Tanto las metaloproteinasas, como las serina proteinasas y las desintegrinas (aunque estas últimas se encontraron con menor frecuencia en los venenos) son las responsables de la actividad hemorrágica en los venenos. Estas proteínas son altamente tóxicas, producen sangrado severo, evitan la formación del tapón hemostático (inhibición de la función plaquetaria) y consecuentemente hidrolizan la membrana basal de la microvasculatura y los componentes de la matriz extracelular tales como colágeno tipo IV, fibronectina y laminina (Wolfsberg *et al.* 1995, Gutiérrez *et al.* 2009).

Al comparar la dosis hemorrágica de *B. asper* de El Tambo Cauca ($1.44 \mu\text{g} \pm 0.2$), con la reportada al norte de Colombia, para ejemplares adultos de la misma especie,

mayores de tres años ($1.8 \mu\text{g} \pm 0.02$), la dosis fue similar (Saldarriaga *et al.* 2003). Sin embargo, el veneno de *B. cf. asper* del Valle del Patía resultó ser más hemorrágico ($0.24 \mu\text{g} \pm 0.04$) que los anteriores. A su vez los venenos de las poblaciones suroccidentales fueron más hemorrágicos que los venenos de las poblaciones del Caribe y de la Costa Pacífica de Costa Rica cuyas actividades hemorrágicas son de $4 \mu\text{g}$ y $5.7 \mu\text{g}$ respectivamente (Assakura *et al.* 1992). Este contraste puede explicarse posiblemente por la presencia de una alta concentración de metaloproteinasas tipo P-I en los venenos (Gutiérrez *et al.* 2009), la cual sería mayor en la población de *B. cf. asper*.

Aunque la actividad hemorrágica sistémica no fue determinada para ninguna de las poblaciones, las observaciones a nivel clínico manifiestan que las hemorragias cerebrales, cutáneas, renales y gingivorragias (Anexo G, Figura 35) son un síntoma predominante en los accidentes ocasionados por *B. cf. asper* del Valle del Patía, y están asociadas al síndrome de desfibrinación en donde la sangre se torna incoagulable por la destrucción del Fibrinógeno (Factor II), generando Fibrina inestable por liberación de Fibrinopéptido A (S. Ayerbe comunicación personal). Por lo tanto, dado que la hemorragia sistémica es resultado de un elevado contenido de metaloproteinasas tipo P- III (propias de neonatos) (Gutiérrez *et al.* 2005, Gutiérrez *et al.* 2009), podría presentarse el mismo fenómeno de pedomorfismo reportado para poblaciones de *B. atrox* de Ecuador, Perú y Brasil (Núñez *et al.* 2009).

Si se retoma el hecho de que los venenos de adultos se caracterizan por una mayor cantidad de metaloproteinasas tipo P-I, mientras que los venenos de neonatos y juveniles presentan mayor proporción de metaloproteinasas tipo P-III (Saldarriaga *et al.* 2003; Alape *et al.* 2008). Al correlacionar dichos cambios ontogénicos con las características bioquímicas y farmacológicas, los venenos de los neonatos y juveniles presentan una mayor letalidad, actividades coagulantes y hemorrágicas que los venenos de adultos (Saldarriaga *et al.* 2003). Por lo tanto, si un ejemplar adulto presenta mayor cantidad de metaloproteinasas tipo P-III, significaría que su veneno exhibe un perfil pedomorfo (Núñez *et al.* 2009, Calvete 2010).

7.4.4. Actividad coagulante. Contrario a la actividad hemorrágica, la población de *B. asper* de El Tambo Cauca mostró una mayor actividad coagulante frente a la población del Valle del Patía. Estos resultados también confirman las observaciones clínicas en el Departamento del Cauca, donde en los accidentes ocasionados por parte de esta población predomina el efecto procoagulante con aparición frecuente de síndrome isquémico el cual se complica con síndrome compartimental ó gangrena (Anexo G, Figura 36 A y B) (S. Ayerbe comunicación personal).

La alta actividad coagulante desencadenada por la población de El Tambo Cauca, puede deberse a un incremento en la concentración de serina proteinasas en comparación con la población del Valle del Patía. De acuerdo con Rucavado *et al.* (2004), tanto las metaloproteinasas como las serina proteinasas ocasionan efecto procoagulante de los venenos, y como consecuencia se desarrolla defibrinogénación y desfibrinación, caída de los niveles de fibrinógeno e incremento de los productos de degradación de fibrinógeno.

Exámenes paraclínicos descritos por Navia (2005), demuestran que la población de *B. asper* de El Tambo Cauca genera mayor alteración de los niveles de fibrinógeno, pues todos los casos analizados presentaron alteración de los niveles de fibrinógeno, mientras que para la población de *B. cf. asper* del Valle del Patía, los niveles fueron alterados en el 66% de los casos. De igual manera, el tiempo de protrombina se altera en el 73% de los casos para Ba-T, mientras que para Ba-P, el tiempo de protrombina se altera en el 49% del total de los casos.

Ba-T presentó una actividad coagulante ($0.37 \mu\text{g} \pm 0.05$) alta en relación con las reportadas para *B. asper* del norte de Colombia, a saber $0.3 \mu\text{g}$ para especímenes de seis meses de edad, $0.8 \mu\text{g} \pm 0.03$ para especímenes de un año de edad, $1 \mu\text{g} \pm 0.04$ para ejemplares de dos años y $3.4 \mu\text{g} \pm 0.01$ para especímenes de tres años (Saldarriaga *et al.* 2003), y se observa que es similar a la dosis de los especímenes de seis meses de edad. La actividad coagulante en Ba-P fue menor ($0.96 \mu\text{g} \pm 0.1$) y se acerca a la actividad reportada para ejemplares de *B. asper* de dos años de edad. Frente a la actividad coagulante reportada por Assakura *et al.* (1992) para *B. asper* del Caribe y de la Costa Pacífica de Costa Rica ($31 \mu\text{g}$ y $450 \mu\text{g}$ respectivamente), nuestras poblaciones muestran una alta actividad coagulante.

7.4 INMUNOREACTIVIDAD E INMUNOENSAYOS

La variación proteica del veneno de las poblaciones de *B. asper* estudiadas y los ensayos de toxicidad que demostraron diferencias considerables con relación a los efectos causados por los venenos de estas poblaciones, nos sugirió realizar inmunoensayos. Afortunadamente los venenos de las poblaciones de *B. asper* del suroccidente de Colombia presentaron reactividad cruzada frente a los sueros monoespecíficos anti-*B. asper* Pacífico y Caribe y polivalente de Costa Rica. Este hecho comparte lo planteado por Tu *et al.* (1980), Sánchez *et al.* (2003) y Gutiérrez *et al.* (2010) sobre la capacidad de algunos sueros antiofídicos de presentar reactividad cruzada incluso en especies filogenéticamente distanciadas.

Como se presentó en el capítulo de resultados existe tendencia a un mejor reconocimiento de los venenos por parte del suero monoespecífico-anti *B. asper* Pacífico, quizás porque dos de las poblaciones también se encuentran hacia la Costa Pacífica de Nariño y Cauca. No obstante, el suero polivalente fue el que mejor reconoció los venenos de todas las poblaciones, posiblemente porque tiene una potencia más amplia frente a diferentes especies de la familia Viperidae, abarcando al mismo tiempo una mayor variedad de proteínas.

Como era de esperarse el suero anti- *B. asper* Pacífico de Costa Rica reconoció fuertemente los venenos de ejemplares adultos y neonatos procedentes del Pacífico de Costa Rica; estudios previos habían descrito el alto reconocimiento inmunológico hacia la mayoría de las bandas electroforéticas (Gutiérrez *et al.* 2010). Al comparar los análisis de inmunoreactividad (Figura 25 y 26) con los presentados por Gutiérrez *et al.* (2010), proteínas de alto peso molecular fueron mayormente reconocidas que las de menor peso molecular; sin embargo, los venenos de las poblaciones del suroccidente de Colombia, difieren en reconocimiento en relación con las

poblaciones de Costa Rica, aspecto que se observa claramente en la intensidad de inmunotinción de las diferentes bandas electroforéticas.

Con respecto a los venenos, el de los neonatos de *B. asper* de Barbacoas Nariño, fue el mejor reconocido tanto por el suero monoespecífico anti-*B. asper* Pacífico como por el polivalente de Costa Rica. Esto puede reflejar mayor similaridad proteica entre los venenos de las poblaciones de neonatos del suroccidente de Colombia y los venenos de las poblaciones de Costa Rica.

De acuerdo con estudios de inmunoreactividad y neutralización de venenos de adultos y neonatos del Pacífico y Caribe de Costa Rica (Gutiérrez *et al.* 2010), los sueros evaluados se caracterizan por reconocer principalmente metaloproteinasas (proteínas de alto peso molecular); este hecho explicaría lo observado en los perfiles de inmunoreactividad, donde las bandas de mayor peso molecular fueron las más reconocidas (Figura 25 y 26) en las poblaciones del suroccidente Colombiano. Según Gutiérrez *et al.* (2010), las metaloproteinasas tipo P-III son las más reconocidas por los sueros de Costa Rica, lo que también explicaría el hecho de que los venenos de los neonatos de Ba-N hayan sido los mejor reconocidos, pues los venenos de neonatos son ricos en este tipo de metaloproteinasas (Alape *et al.* 2008).

Los resultados muestran diferencias ontogénicas respecto al reconocimiento inmunológico (intensidad de inmunotinción, Figura 25 y 26), a diferencia de lo encontrado por Gutiérrez *et al.* (2010) quienes mostraron que a pesar de las variaciones regionales y ontogénicas del veneno, se presenta un alto grado de reactividad cruzada entre las poblaciones de Costa Rica y no hay diferencias significativas respecto al reconocimiento de los venenos teniendo en cuenta el estado de crecimiento.

Con base en lo anterior, es importante tener en cuenta la variación intraespecífica y geográfica del veneno de *B. asper*, ya que permite evaluar la conveniencia de incluir *pools* de venenos de diferentes regiones geográficas, o si el veneno de una región geográfica es representativo para la especie (Gutiérrez *et al.* 2009), con el objetivo de lograr una producción de suero más efectivo (Calvete 2010) para esta especie ampliamente distribuida.

7.5 VARIACIÓN GEOGRÁFICA DE LOS VENENOS

Los vipéridos entraron a Suramérica en el Mioceno (Albino y Montalvo 2006); el género *Bothrops* habría entrado al continente antes del levantamiento del Istmo de Panamá, y su ancestro conocido como *Protobothrops* fue el primero en colonizar América del Sur posiblemente durante el Mioceno medio (entre 23 y 10 Ma), éste ancestro habría dado origen a todas las especies actuales del género *Bothrops* (Wüster *et al.* 2002, Scanferla y Nenda 2005). La radiación del género ocurrió aproximadamente hace 10 a 15 Ma (Mioceno), desde el norte de Sur América hacia el sur y a Centro América, culminando paralelamente con la formación del Istmo de Panamá en el Plioceno (3.5 Mya). Entre las hipótesis que intentan explicar el proceso de diversificación, están: la edad relativa del clado *Bothrops atrox-asper* y la rápida radiación adaptativa del género al interior de hábitats desprovistos de vipéridos

competidores (Wüster *et al.* 2002). Sumado a lo anterior, la combinación de acontecimientos geográficos y ecológicos durante los períodos del Pleistoceno glacial, habrían permitido su dispersión y consecuente diversificación (Vanzolini y Heyer 1985).

En América del Sur, el levantamiento de las cordilleras Occidental y Central de los Andes Colombianos, que experimentaron su modelación entre el Mioceno y Plioceno (25 a 5 Ma) y alcanzaron su elevación actual durante el Pleistoceno (Gregory – Wodzicki 2000, Argollo 2006, Hincapie *et al.* 2009), habría permitido la divergencia de las poblaciones Chocoanas y Cis- Andinas (Castellano *et al.* 2006, Noonan and Wray 2006, Saldarriaga *et al.* 2009) y posiblemente la diferenciación de las poblaciones de *B. asper* al Suroccidente de Colombia. Este fenómeno también ocurrió con las poblaciones de *B. asper* en Costa Rica, donde la herpetofauna original de las tierras bajas fue fragmentada en poblaciones alopátricas del Caribe y Pacífico, como resultado del levantamiento de las cordilleras de América Central (8-5 Mya) que culminó con la formación del Istmo de Panamá (Alape *et al.* 2008).

Además de la Cordillera Occidental con alturas que sobrepasan los 4000 m (Ramos y Folguera 2005), otras barreras físicas y ecológicas que también podrían haber promovido la divergencia y variación entre las poblaciones de *B. asper* del Suroccidente Colombiano son: a). La contaminación con ácido sulfúrico y clorhídrico de la cuenca alta del Río Cauca (535 Km), en los primeros kilómetros (80 km) de su recorrido, por el Río Vinagre, desde los 2000 m en el punto conocido como la Hidroeléctrica de Florida II, hace por lo menos 1.5 Ma (Ayerbe *et al.* 1990, CVC 2004). b.) Las condiciones ecológicas del Valle del Patía, resultado del hundimiento de un bloque intermedio durante la formación de las Cordilleras Occidental y Central, en el cual por encima de los 1000 m la vegetación xerofítica es reemplazada por bosques subandinos, y debido a su aislamiento (Plioceno-Pleistoceno) se ha convertido en un enclave subxerofítico propio para la especiación (Alberico & Negret 1992, Lobo 1993).

Por otra parte, Saldarriaga *et al.* (2009), basados en diferencias fenotípicas y análisis moleculares de varios ejemplares de *B. asper*, consideran cuatro linajes moleculares, uno de los cuales representa la región Chocoana, la cual se extiende desde Panamá al noreste de Ecuador, y se caracteriza por la ausencia de barreras geográficas evidentes, que puedan evitar el flujo genético entre las poblaciones. Con base en lo anterior, es de esperar que *B. asper* de El Tambo Cauca y de Barbacoas, Nariño pertenezcan a este linaje, dada su distribución geográfica y la contigüidad de sus poblaciones; además al ser poblaciones cercanas deberían presentar mayor similitud genética (proteica) y mostrar una correlación positiva entre la divergencia proteica y la distancia geográfica (Sasa 2002). Efectivamente los perfiles electroforéticos reflejaron similitud entre los neonatos de *B. asper* de Ba-T y Ba-N; así, aunque las poblaciones están separadas por la Hoz de Minamá y el Río Patía, estas barreras geográficas no son suficientes como para impedir el flujo genético interpoblacional, y por tanto la baja variación observada podría resultar del aislamiento por distancia, asumiendo tipos uniformes de migración a lo largo de la distribución geográfica de la especie tal como lo manifiesta Sasa (2002).

También es importante considerar la propuesta realizada por Núñez *et al.* (2009) para la especie *B. atrox*, la cual muestra un fenotipo de veneno conocido como “*neonate asper-like*”. Pues el posible pedomorfismo manifestado por la población de Ba-P podría explicarse bajo las mismas premisas de Núñez *et al.* (2009). La primera, manifiesta que una pequeña población de serpientes bajo condiciones de presión selectiva que permitan mantener la tendencia pedomorfica se adaptará a la restricción de presas en el ecosistema; la segunda donde la falta de presión selectiva, quizás permitió una rápida evolución de las poblaciones colonizadoras de *B. atrox*, sin necesidad de modificar e incrementar la complejidad del veneno que caracteriza a las serpientes adultas (generalistas). De esta forma también podría argumentarse el mantenimiento de las altas actividades hemorrágicas y letales (propias de los neonatos) en la población del Valle del Patía.

Es evidente que los eventos históricos y geográficos han jugado un papel importante en la divergencia y dinámica de las poblaciones de *Bothrops asper* (Sasa 2002). Por lo cual, pueden convertirse en factores que promuevan la variación intraespecífica de los venenos de individuos que habitan diferentes regiones (Guércio *et al.* 2006, Alape *et al.* 2008, Núñez *et al.* 2009), incluyendo las poblaciones al sur de Colombia.

7.6 CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS

Los estudios realizados con *B. asper* han demostrado la gran variabilidad intraespecífica, no sólo a nivel toxinológico sino también, morfológico y morfométrico, relacionados con variación en patrones de color, tamaño, dimorfismo sexual, escamación, entre otras características (Sasa *et al.* 2009, Saldarriaga *et al.* 2009). Variación que al igual que en *B. atrox* (Núñez *et al.* 2009) es producto de su amplia distribución, de la variedad de hábitats en la que se encuentran, o de encontrarse conformada por varias sub-especies (Fenwick *et al.* 2009, Saldarriaga *et al.* 2009).

Ayerbe *et al.* (1990) propusieron la existencia de dos especies nuevas de *Bothrops* en el Valle alto del Patía y el Valle del Río Cauca, una de las cuales correspondería a la asignación de *Bothrops* con forma de *asper* (*B. cf. asper*), puesto que observaciones morfológicas y de distribución geográfica han llevado a pensar que son dos especies diferentes; así al encontrar variación y diferenciación a nivel proteico entre las poblaciones de *B. asper* de El Tambo Cauca y *B. cf. asper* del Valle del Patía, podría convertirse en otro argumento para soportar su distinción taxonómica.

Sin embargo, surgen las siguientes cuestiones: **1.** ¿La diferenciación a nivel proteico entre los venenos de *B. asper* y *B. cf. asper* corresponde a una variación geográfica, como se ha encontrado para otras poblaciones de la especie?. **2.** ¿La diferenciación a nivel proteico entre los venenos de *B. asper* y *B. cf. asper* apoyaría el hecho de definirla como especie, tal como lo sugiere Ayerbe *et al.* (2009)?. Cabe retomar que la diferenciación proteica fue menor entre las poblaciones de *B. asper* del suroccidente Colombiano, en comparación con las de la Costa Pacífica y del Caribe de Costa Rica. No obstante, para dar respuesta a estas preguntas es importante continuar con los estudios sobre morfología realizados en la Universidad del Cauca y

además encaminar estudios moleculares y filogeográficos, con el fin de esclarecer la situación taxonómica de *B. cf. asper*.

8. CONCLUSIONES

Nuestros resultados reflejaron variación proteica de los venenos a nivel intraespecífico, ontogénico y geográfico. La variación interpoblacional fue mayor que la intrapoblacional, observándose diferencias proteicas principalmente entre las poblaciones del suroccidente de Colombia y de Costa Rica.

Las poblaciones de adultos se caracterizaron por una elevada concentración de proteínas que podrían corresponder a metaloproteinasas tipo P-I, dada la alta actividad hemorrágica local en comparación con las poblaciones de Costa Rica. En la población de *B. cf. asper* del Valle del Patía, además de las metaloproteinasas tipo P-I, también podrían encontrarse SVMPs tipo P-III por la alta frecuencia de hemorragias sistémicas observadas a nivel clínico; y al mismo reflejar tendencia pedomorfica.

En general los adultos presentaron con mayor frecuencia proteínas entre 11 y 48.4 kDa, mientras que los neonatos presentaron proteínas entre 30 y 60 kDa, lo que refleja la tendencia hacia un incremento de proteínas de alta masa molecular en los neonatos, las cuales podrían corresponder a metaloproteinasas.

Pese a la variación intrapoblacional, las poblaciones pueden distinguirse entre sí por sus perfiles proteicos particulares. Los patrones de los venenos de serpientes que corresponden a una misma área geográfica fueron más similares que los de procedencia geográfica distinta; y por lo tanto las propiedades de los venenos pueden ser utilizadas para identificar la zona de origen de los animales.

Los factores geográficos, juegan un papel importante en la diversificación de las poblaciones de *B. asper* en Costa Rica y al suroccidente de Colombia. Así, los procesos de levantamiento de las Cordilleras Occidental y Central, las formaciones aluviales, la formación del Valle del Patía y los agentes contaminantes sobre el Río Cauca, habrían permitido la divergencia de las poblaciones de *B. asper* y *B. cf. asper* en nuestra región. Mientras que la ausencia de barreras geográficas evidentes entre las poblaciones de *B. asper* de El Tambo Cauca y de *B. asper* de Barbacoas Nariño explicarían la similitud entre ellas.

Teniendo en cuenta todos los niveles de variación del veneno de *B. asper* del suroccidente de Colombia, su relación con la acción biológica y clínica, y aunque se observó reactividad cruzada por parte de los sueros monoespecíficos anti- *B. asper* y polivalente de Costa Rica frente a estos venenos, el bajo reconocimiento de algunas proteínas, las cuales podrían ser las responsables de las altas actividades biológicas (hemorrágicas y coagulantes) de los venenos en esta región, apoya la importancia de utilizar ejemplares procedentes de diferentes áreas geográficas, principalmente cuando se trata de especies con amplia distribución; todo esto con el fin mejorar la eficacia de los antivenenos.

9. RECOMENDACIONES

Es importante determinar efectos biológicos adicionales, tales como la dosis edemática, la actividad necrotizante, la actividad miotóxica y hemorrágica sistémica; además de evaluar estas actividades biológicas para cada una de las familias proteicas del veneno de las tres poblaciones. Esto permitiría contribuir no sólo al mayor entendimiento de la composición de los venenos y de sus efectos clínicos, sino también al manejo de los accidentes ofídicos al suroccidente de Colombia.

Son relevantes estudios de caracterización proteica y toxinológica de venenos de especies del mismo género y de géneros relacionados filogenéticamente, que comparten la distribución geográfica de las poblaciones de estudio; por ejemplo especies como *Bothriechis schlegelii*, *Bothrocophias campbelli*, *B. colombianus*, *B. myersi*, *Bothrops rhombeatus* y *B. punctatus*, con el fin de observar si se presentan patrones proteicos particulares, puesto que algunos autores (Navia 2005) han reportado intergradación de especies entre individuos de *B. cf. asper* y *B. rhombeatus*.

Es importante concluir los estudios morfológicos de la población designada como *B. cf. asper*, los cuales están siendo realizados en la Universidad del Cauca, y adicionalmente desarrollar estudios moleculares y filogeográficos de las poblaciones investigadas, que permitan despejar las consideraciones taxonómicas y comprender mejor los procesos de divergencia de las poblaciones de la especie *B. asper*.

Es pertinente, desarrollar estudios de antivenomica, ya que permitirían evaluar patrones de reconocimiento inmune por parte de sueros de diferentes institutos productores, y así determinar el suero de capacidad neutralizante más apropiada frente a los venenos de la región suroccidental de Colombia, mejorando notoriamente el tratamiento clínico de las mordeduras por las serpientes nativas.

Teniendo en cuenta la variación proteica encontrada en las poblaciones, es importante realizar estudios enfocados a moléculas de interés farmacológico, biotecnológico y médico, como se ha realizado con diferentes especies de la familia Viperidae.

10. BIBLIOGRAFIA

- AGUIRRE, L. Mordeduras y picaduras venenosas. Anafilaxia. En: RODRÍGUEZ, A. Manual de toxicología clínica. Santiago de Cuba, Cuba: Cardero, D., 2004. p. 119-127.
- ALAGÓN, A.; R. MOLINAR; L. POSSANI; P. FLETCHER; J. CRONAN and J. JULIA. Venom from the snake *Bothrops asper* Garman, purification and characterization of three phospholipases A₂. En: Biochem. J. México: s.n., 1980. V.185. p. 695-704.
- ALAPE, A.; L. SANZ; J. ESCOLANO; M. FLÓREZ-DÍAZ; M. MADRIGAL; M. SASA and J. CALVETE. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*. Geographic, individual, and ontogenetic variations. En: Journal of Proteome Research. s.1.: American Chemical Society, 2008. V. 7 N°8. p. 3556-3571.
- ALAPE, A.; M. FLORES; L. SANZ M. MADRIGAL; J. ESCOLANO; M. SASA and J. CALVETE. Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*. Perspectives and applications. En: Toxicon. s.1.: Elsevier Ltd., 2009. V. 54. p. 938-948.
- ALBERICO, M. and NEGRET. A.J. Primer aporte sobre los mamíferos del Valle del Patía (Cauca-Nariño). En: Rev. Novedades Colombianas. Nueva época. Cauca: Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca, 1992. N°5. p. 66-71.
- ALBINO, A. and C. MONTALVO. Snakes from the Cerro Azul formation (upper Miocene), central Argentina, with a review of fossil viperids from south America. En: Journal of Vertebrate Paleontology. s.1.: the Society of Vertebrate Paleontology., 2006. V. 26 N°3. p. 581-587.
- ALVARADO, A.; O. VILLAFÁN; Y. LEÓN y A. AGUILAR. Obtención de una fracción crotálica con actividad hemoaglutinante y evaluación in vivo e in vitro del probable daño a tejidos. En: Tec. Pecu Méx. México: s.n., 2004. V. 42 N°2. p. 247-260.
- ANGANROY, M.; M. BETANCOURTH; D. MORA; E. PEREZ y B. CEPEDA. Colección herpetológica del museo de historia natural de la Universidad de Nariño. En: PRIMERA REUNIÓN DE HERPETOLOGÍA DEL SUROCCIDENTE COLOMBIANO (1 : 2009 : Popayán). Ponencias de la 1 ° Reunión de Herpetología del Suroccidente Colombiano. Popayán: J. MUESES, 2009. 45 p.
- ÁNGEL, R. Serpientes de Colombia, su relación con el hombre. Medellín, Colombia: Fondo Rotatorio de Publicaciones, 1987. 232 p.
- ARAGÓN –ORTÍZ, F and F. GUBENSEK. *Bothrops asper* venom from the Atlantic and Pacific zones of Costa Rica. En: Toxicon. Great Britain: Pergamon Press Ltd., 1981. V.19. p. 797-805.

ARAUJO, M. Ofidismo. En: PITTA, GBB.; CASTRO, AA. y BURIHAN, E. Editores. *Angiología e cirugía vascular: guía ilustrado*. Maceió, Brasil: UNCISAL/ECMAL y LAVA, 2003. p. 1- 9.

ARGOLLO, J. Aspectos geológicos. *Botánica económica de los Andes Centrales*. s.1.: Universidad Mayor de San Andrés, 2006. 10 p.

ASSAKURA, M.; M. FURTADO and F. MANDELBAUM. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead Vipers (*Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). En: *Comp. Biochem. Physiol.* São Paulo, Brasil: Pergamon Press Ltd., 1992. V. 102 B N° 4 p. 727-732.

AYERBE, S. Pautas para el manejo de las mordeduras de serpientes. p. 3-10. En: *Temas de pediatría Nestlé*. Bogotá, Colombia: Nestlé, 1995. N°133. 31 p.

AYERBE, S. Ofidismo en el Departamento del Cauca, Colombia. Epidemiología, etiología, clínica y complicaciones. En: *Rev. Fac. Cienc. Salud. Universidad del Cauca*. Popayán, Colombia: s.n., 2000. V. 2 N°4 p. 21-27.

AYERBE, S. Tratamiento del ofidismo en el Departamento del Cauca, Colombia. En: *Rev. Fac. Cienc. Salud. Universidad del Cauca*. Popayán, Colombia: s.n., 2001. V. 3 N°1 p. 20-26.

AYERBE, S. Ofidismo en Colombia. Enfoque, diagnóstico y tratamiento. Capítulo 52. p. 757-768. En: ORDÓÑEZ, C.A.; FERRADA, R. y BUITRAGO, R. Editores. *Cuidado intensivo y trauma*. 2ª. Edición. Bogotá, Colombia: Distribuna, 2008. 880 p. ISBN-958332679-8.

AYERBE, S. Ofidismo en Colombia. Enfoque, diagnóstico y tratamiento. Capítulo 87. p. 1143-1167. En: ORDÓÑEZ C.A.; FERRADA, R. y BUITRAGO, R. Editores. *Cuidado intensivo y trauma*. 2ª. Edición. Bogotá, Colombia: Distribuna, 2009. 1278 p. ISBN-978-958-8379-14-2.

AYERBE, S.; L. OTERO; A. PAREDES y D. GÁLVEZ. Ofidiotoxicosis en el Departamento del Cauca. 1ª Parte. Herpetología clínica y clasificación. En: *Cuadernos de medicina Popayán*. Popayán, Colombia: s.n., 1977. V. 2 N° 3 p. 1-7. ISSN-0010-6364.

AYERBE, S.; A. PAREDES y D. GÁLVEZ. Ofidiotoxicosis en el Departamento del Cauca. 2ª Parte: aspectos clínicos, epidemiológicos, manejo y complicaciones. En: *Cuadernos de medicina Popayán*. Popayán, Colombia: s.n., 1979. V. 4 N° 1-2 p. 33-45. ISSN-0010-6364.

AYERBE, S.; M. TIDWELL y M. TIDWELL. Observaciones sobre la biología y comportamiento de la serpiente coral "rabo de ají" (*Micrurus mipartitus*). Descripción de una subespecie nueva. En: *Rev. Novedades Colombianas*. Nueva época. Cauca: Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca, 1990. N° 2. p. 30-41. ISSN-0121-3520.

AYERBE, S.; F. ARRIETA; C. CHANTRÉ; E. CORAL y J. GUERRERO. Catálogo de los reptiles presentes en las colecciones de referencia y exhibición del Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca. Popayán, Colombia: Universidad del Cauca, 2007. 84 p. ISBN: 978-958-44-1926-2.

AYERBE, S. y J.P. LATORRE. Manual para la prevención y mejoramiento en la atención del paciente con accidente ofídico. Secretaría Departamental de Salud del Cauca. Popayán, Colombia: López, 2009. p.1- 60. ISBN-978-958-44-5272-6.

BOADA, C.; D. SALAZAR-V.; A. FREIRE and U. KUCH. The diet of *Bothrops asper* (Garman, 1884) in the pacific lowland of Ecuador. En: Rev. Herpetozooa. s.1.: Wine, 2005. V. 18 N°1/2. 3 p.

BOLAÑOS, R. Toxicity of Costa Rican snake venoms for the white mouse. En: Am J Trop Med Hyg. s.p.1.: s.n., 1972. V 21. p. 360-363.

BOLAÑOS, R. Las serpientes venenosas de Centro América y el problema del ofidismo. Primera parte: aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. En: Rev. Cost. Cienc. Méd. s.p.1., 1982. V. 3 N°2. p. 165-184.

BOLLAG, D. and J. EDELSTEIN. Protein Methods. New York, United States of America: Wiley-Liss, 1991. 230 p. ISBN 0-471-56871-6.

BONILLA, C. y A. ZAVALETA. Estudio bioquímico del veneno de la serpiente *Bothrops hyoprurus*. En: Rev. Perú. Med. Exp. Salud pública. Lima: INS., 1997. V. 14 N°2. p. 18-32.

CALVETE, J.J. Antivenomics and venom phenotyping: A marriage of convenience to address the performance and range of clinical use of antivenoms. Artículo *in press*. En: Toxicon. s.1.: Elsevier, 2010. doi:10.1016/j.toxicon.2009.12.015. p. 1-8.

CALVETE, J.J; A. BORGES; A. SEGURA; M. FLORES-DÍAZ; A. ALAPE-GIRÓN, J. M. GUTIÉRREZ; N. DIEZE; L. DE SOUSAF; D. KIRIAKOSF; E. SÁNCHEZH; J. FAKSB; J. ESCOLANO and L. SANZ. Snake venomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. En: Journal of Proteomics. s.1.: Elsevier, 2009. V. 72. p. 227-240.

CAMPBELL, JA. and WW. LAMAR. The venomous reptiles of the western hemisphere. Ithaca and London: Comstock Publ. Assoc. Div. Cornell Univ. Press, 2004. V. 1. 378 p.

CARRASQUILLA, A. Serpientes venenosas. Documento con fines educativos. s.1.: Borugo LTDA, 2005. 10 p.

- CASTELLANO, A. y N. CHAMARRAVI. Colombia: estación biogeográfica en el origen de su diversidad biótica. En: Revista Luna Azul. Caldas, Colombia: Universidad de Caldas, 2006. p. 1-3.
- CASTRO, O.; J. GUTIÉRREZ; M. BARRIOS; I. CASTRO; M. ROMERO y E. UMAÑA. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpiente: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. En: Rev. Biol. Trop. Costa Rica: s.n., 1999. V. 47 N°3 p. 605-616.
- CASTRO, F.; S. AYERBE; J. CALDERÓN y B. CEPEDA. Nuevo registro para Colombia de *Bothrocophias campbelli* y notas sobre *B. colombianus* y *B. myersi*. En: Novedades Colombianas. Cauca: Museo de Historia Natural Universidad del Cauca, 2005. V. 8 N°1 p. 77. ISSN 0121-3520.
- CUESTA, J.; L. PEÑA y A. ZULUAGA. ¿Es necesaria la profilaxis antibiótica en la ofidiotoxicosis?. En: Rev. Asociación Colombiana de Infectología. Antioquia, Medellín: s.n., 2008. V. 12 N°1. p. 280-289.
- CHARRY, H. Ofidismo. Síntesis de conceptos básicos. Manizales, Caldas: s.n., 2003. 23 p.
- CHIPPAUX, JP.; V. WILLIAMS and J. WHITE. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. En: Rev. Toxicol. Great Britain: Pergamon Press Ltd., 1991. V. 29 N°11 p. 1279-303. ISSN 0041- 0 101.
- CONSERVACIÓN INTERNACIONAL. Colombia. Chocó- Manabí. Corredor de conservación. Obtenida el 16 de Agosto de 2006 en <http://www.chocomanabi.org/>.
- CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICACIA (HPLC). Curso de Análisis Instrumental. Instituto de Ingeniería Química: J. BUSSI, 2007. 68 diapositivas: s.1.
- CVC. Valle del Cauca. Colombia. Proyecto de modelación del río Cauca – PMC fase II. Identificación de parámetros críticos en el río Cauca y sus principales ríos tributarios Tramo Salvajina – la Virginia. Santiago de Cali: Universidad del Valle. V 9. 2004. p. 348.
- DE ROODT, A.; J. ESTÉVEZ-RAMÍREZ; J. PANIAGUA-SOLÍS; S. LITWIN; A. CARVAJAL-SAUCEDO; J. DOLAB; L. ROBLES- ORTÍZ y A. ALAGÓN. Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. En: Gac Méd Méx. México: s.n., 2004. V. 141 N°1 p. 13-21.
- DÍAZ, O.; S. SIERRA y V. QUINTERO. Departamento de Cauca. Indicadores. Demografía, salud, calidad de vida, educación, violencia y situaciones especiales. Bogotá, Colombia: El autor, 2006. 24 p.
- DUNN, E. Los géneros de anfibios y reptiles de Colombia. III parte: Reptiles; orden de las serpientes. En: Caldasia. Bogotá, Colombia: Instituto de Ciencias Naturales, 1944. V. 3 N°11. p. 157-224.

DUQUE, J.; A. SÁNCHEZ; L. FIERRO; S. GARZÓN y R. CASTAÑO. Venenos de serpientes y moléculas antiveneno. En: Rev. Acad. Colomb. Cienc. Cali, Colombia: s.n., 2007. V. 31 N°118 p. 109-137.

FENWICK, A.; R. GUTBERLET; J. EVANS and C. PARKINSON. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). En: Zoological Journal of Linnean Society. London: The Linnean Society of London, 2009. V.156. p. 617-640.

FERREIRA, M.; A. MOURA-DA-SILVA; F. FRANCA; J.L. CARDOSO and I. MOTA. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. En: Toxicon. s.1.: Pergamon Press Ltd., 1992. V. 30 N° 12 p. 1603-1608.

FINEY, D.J. Statistical methods in biological assay. London: Charles Griffin and Company Limited, 1971p. 100-117.

GANS, C. and E. KOCHVA. Short communications the accessory gland in the venom apparatus of viperid snakes. En: Toxicon. Great Britain: Pergamon Press Ltd., 1965. V. 3. p. 61-63.

GARCÍA, H. Electroforesis en geles de policrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. En: Univ Diag. Marianao, La Habana: s.n., 2000. V. 1 N°2 p. 31-41.

GARMAN, S. The reptiles and batrachians. Mem. Mus. comp. Zool, Cambridge. Massachusetts: s.n., 1884. [1883] [CNAH reprint 10]. V. 8 N°3. 185 p .

GIRÓN, M.; A. SALAZAR; I. AGUILAR; J. PÉREZ; E. SÁNCHEZ; C. AROCHA-PIÑANGO; A. RODRÍGUEZ-ACOSTA and B. GUERRERO. Hemorrhagic, coagulant and fibrinolytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes. En : Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. s.1. : Elsevier, 2008. N°147. p. 113-121.

GORNALL, A.; C. BARDAWILL and M. DAVID. Determination of serum proteins by means of the Biuret Reaction. En : The Journal of Biological Chemistry. Toronto, Canada: s.n., 1948. p. 751-766.

GREGORY-WODSICKI, K. Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. En : Geological Society of America Bulletin. s.1. : Geological Society of America Bulletin, 2000. N°112. p. 1091-1105.

GRIFFITHS, A.; S. WESSLER; R. LEWONTIN; W. GUBART; D. SUZUKI and M. JEFFREY. Populations genetics. En: Introduction to genetics analysis. Eighth Edition. New York: W.H. Freeman and Company, 2005. p. 666-717.

GUÉRCIO, R.; A. SHEVCHENKO; A. SHEVCHENKO; J. LÓPEZ- LOZANO; J. PABA; M. SOUSA and C. RICART. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. En: Proteome Science. s.1.: BioMed Central Ltda., 2006. V. 4 N°11. p. 1-14.

GUERRERO, V.J. Aislamiento, purificación y evaluación de neurotoxinas del escorpión *Centruroides margaritatus* (Buthidae) del Municipio del Patía, Departamento del Cauca, Colombia. Popayán, 2002, p. 100. Trabajo de Grado (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.

GUTIÉRREZ, J.M.; O. ARROYO y R. BOLAÑOS. Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. En : *Toxicon*. s.1. : Pergamon Press Ltd., 1980. V. 18. p. 603-610.

GUTIERREZ, JM. and G. LEÓN. Snake antivenoms Technological, clinical and public health issue. En: *Animal Toxins. State of the art. Perspectives in Health and Biotechnology*. Brasil: Editora UFMG, 2009. p. 393 – 421.

GUTIERREZ, J.M. and B. LOMONTE. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. En: *Mem. Inst. Butantan*. Brasil: s.n., 1989. V. 51 N° 4. p. 211 – 223.

GUTIÉRREZ J.M. and A. RUCAVADO. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. En: *Biochimie. s. 1. : Société française de biochimie et biologie moléculaire*, 2000. N° 82. p. 841–850.

GUTIÉRREZ, J.M.; B. LOMONTE; J. GENÉ and L. CERDAS. Comparative study of the edema – forming activity of Costa Rican snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. En: *Comp. Biochem. Physiol. Great Britain: Pergamoun Journal.*, 1986. V. 85C N° 1. p. 171-175.

GUTIÉRREZ, J.; T. ESCALANTE and A. RUCAVADO. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. En: *Toxicon*. s. 1. : Elsevier Ltd., 2009. V. 54 N° 7 p. 976-987.

GUTIÉRREZ, J.; A. RUCAVADO; T. ESCALANTE and C. DÍAZ. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. En: *Toxicon*. s. 1. : Elsevier Ltd., 2005. V. 45. p. 997-1011.

GUTIÉRREZ, J.; L. SANZ; J. ESCOLANO; J. FERNÁNDEZ; B. LOMONTE; Y. ANGULO; A. RUCAVADO; D. WARRELL and J. CALVETE. Snake venomomics of the lesser Antillean pit vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: Correlation with toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. En : *Journal of Proteome Research*. American Chemical Society, 2008. N° 7. p. 4396-4408.

GUTIÉRREZ, J.; L. SANZ; M. FLÓREZ-DÍAZ; L. FIGUEROA; M. MADRIGAL; M. HERRERA; M. VILLALTA; G. LEÓN; R. ESTRADA; A. BORGES; A. ALAPE and J. CALVETE. Impact of regional variation in *Bothrops asper* snake venom on the design

of antivenoms: Integrating antivenomics and neutralization approaches. En : Journal of Proteome Research. American Chemical Society., 2010. N°9. p. 564-577.

HAMMER, O.; D. HARPER and P. RYAN. PAST: Palaeontological Statistics software package for education and data analysis. En: P

HARVEY, F.; R. ANDREWS and J. CADLE. Herpetology. Tercera edición. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2004. 983 p. ISBN 0-13-100849-8.

HENAO, E.; J. LATORRE; C. MUÑOZ; L. CALDAS; S. DELGADO y S. AYERBE. Caracterización de la flora bacteriana patógena, presente en la cavidad bucal de las víboras en el serpentario del museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca. Cauca: Facultad de Salud, 2005. 10 p.

HINCAPIE, G.; J. JARAMILLO; V. RODRÍGUEZ; R. AGUILERA; S. ORTÍZ; J. RESTREPO; J. MARÍN; H. BERMÚDEZ; A. PARDO; R. CERÓN y E. RUIZ. Evaluación Geológica y Prospectividad de la Cuenca Cauca-Patía, Colombia. En: SIMPOSIO BOLIVARIANO EXPLORACIÓN PETROLERA EN CUENCAS SUBANDINAS HELD EN CARTAGENA, COLOMBIA (10 : 2009 : Cartagena). Extenso del x simposio Bolivariano exploración petrolera en cuencas subandinas held en Cartagena, Colombia. Cartagena, 2009. 10 p.

HOYOS, M.; R. OTERO; M. SALDARRIAGA y N. JARAMILLO. Divergencia morfométrica entre *Bothrops atrox* y *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae). En: Actual. Biol. Medellín, Colombia: s.n., 2003. V. 25 N°79 p. 157-165.

<http://www.eltambo-cauca.gov.co/index.shtml>. El Tambo. Por la grandeza de El Tambo. Obtenida el 20 de Septiembre de 2008.

<http://www.proaves.org/>. ProAves. Bienvenido a fundación ProAves. Obtenida el 15 de Septiembre de 2008.

HUATUCO, S.; E. ESCOBAR y A. YARLEQUÉ. Aislamiento y caracterización parcial de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae). En: Rev. Perú. Biol. Perú: s.n., 2004. V.11 N°1 p. 79-84. ISSN 1727-9933.

IMPACTO DE LAS INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS EN LA PRODUCCIÓN DE SUEROS ANTIOFÍDICOS POR UNA EMPRESA UNIVERSITARIA. Instituto Clodomiro Picado, San José de Costa Rica: ALBERTO ALAPE, 2002. 55 diapositivas: Costa Rica.

INSTITUTO CLODOMIRO PICADO. Manual de Métodos de Laboratorio. Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos. Costa Rica: Universidad de Costa Rica, 2010. 31 p. ISBN 978-9968-555-00-4.

JUÁREZ, P. Venómica. Mecanismos moleculares y evolutivos de la diversificación estructural de las familias de las desintegrinas. España, 2007. 150 p. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

KLUG W. and M. CUMMINGS. Conceptos de genética. En: _____. Genética de poblaciones. Quinta Edición. Madrid, España: Prentice Hall, 1999. p. 695-717.

KOCHOLATY, W.; T. BILLINGS, B. ASHLEY, E. LEDFORD and J. GOETZ. Effect of the route of administration on the neutralizing potency of antivenins. En: *Toxicon*. Great Britain: Pergamon Press Ltd., 1968. V. 5: 165-170.

KOCHVA, C. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. En: *Toxicon*. Great Britain: Pergamon Journals Ltd., 1987. V. 25 N°1. p. 65-106.

KOSCINCZUK, P.; T. BORDA S. MARUÑAK y O, ACOSTA DE PÉREZ. Alteraciones histopatológicas del tejido renal inducidas por veneno de serpientes (*Bothrops neuwiddii*, *Bothrops alternatus* y *Crotalus durissus terrificus*) en ratas. Corrientes, Argentina: s.n., 2002. 3 p.

KUCH, U; D. MEBS; J. M. GUTIERREZ2 and A. FREIRE. Biochemical and biological Characterization of Ecuadorian pitviper venoms (genera *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrops* and *Lachesis*). En: *Toxicon*. s.1. : Elsevier Ltd., 1996. V. 36 N° 6 p. 714-717.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. En: *Nature*. s.p.1.,1970. V. 227 N°259. p. 680-685.

LAKHOTIA, M.; D. KOTHARI; D. CHOUDHARY; S. SHARMA and P. JAIN. A Case of saw scale viper snakebite presenting as pleuro-pericardial haemorrhage. En : *Journal*, Indian Academy of Clinical Medicine. India: s.n., 2002. V. 3 N°4. p. 392-394.

LANDE, R. Natural selection and random genetic drift in phenotypic evolution. En : *Evolution*. s.1. : Society for the Study of Evolution, 1976. V. 30 N°2. p. 314-334.

LAZO, F.; O. MÁLAGA, A. YARLEQUÉ, R. SEVERINO. Algunas propiedades bioquímicas de una L-aminoácido oxidasa aislada del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. En: *Rev. Soc. Quím. Perú*. Perú: s.n., 2007. V. 73 N°3. p. 131-141.

LAZO, F.; E. RODRÍGUEZ y A. YARLEQUÉ. Evaluación comparativa de dos métodos para determinar la actividad de fosfolipasa A en venenos de serpientes. En: *Revista Peruana de Biología*. Perú: s.n., 1998. V. 5 N°2. p. 1 – 5.

LECCA, L. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Serie de normas técnicas N°38. Lima, Perú: Instituto Nacional de Salud, 2003. 69 p.

LERMA, J.; G. SANDOVAL; R. INGA; M. MUÑOZ; E. CAVERO y A. YARLEQUÉ. Análisis cromatográfico del contenido enzimático del veneno de tres serpientes peruanas. Trujillo, Perú: Arnaldoa, 2004. V. 11 N° 2. 13 p.

LÉVANO, J. y R. FERNÁNDEZ. Diagnóstico y tratamiento de los accidentes por animales ponzoñosos. Lima, Perú: Instituto Nacional de Salud. Centro Nacional de Productos Biológicos, 2004. p. 15 – 56.

LOBO, A. Hidrología e hidrogeología. En: LEYVA, P. Colombia Pacífico. Tomo 1. Santa Fe de Bogotá: Fondo para la protección del Medio Ambiente "José Celestino Mutis", 1993. Publicación digital en la página web de la Biblioteca Luis Ángel Arango del Banco de la República. Obtenida el 22 de marzo de 2008 en <http://www.lablaa.org/bibliotecavirtual.htm>.

LOMONTE, B. Manual de Laboratorio. Inmunología General-Laboratorio. Costa Rica: Universidad de Costa Rica, 2005. 121 p.

LOMONTE, B. y J. M. GUTIÉRREZ. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. En: Rev. Biol. Trop. Costa Rica: Instituto Clodomiro Picado, 1983. V. 31 N°1. p. 37- 40.

LOMONTE, B.; A. TARKOWSKI and L. HANSON. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. En: Rev. Inflammation. Plenum Publishing Corporation, 1993. V. 17 N°2. p. 93-105.

MÁLAGA, O.; C. PATINGOSO; Y. MORANTE; V. HEREDIA; J. CÁRDENAS y A. YARLEQUÉ. Variaciones en la composición proteica, actividades enzimáticas y biológicas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (Viperidae) en relación con la edad. En: Revista Peruana de Biología. Perú: s.n., 2000. V. 7 N° 2 p. 14.

MARUÑAK, S.; R. RUIZ DE TORRENT; G. TEIBLER; C. GAY; L. LEIVA y O. ACOSTA DE PÉREZ. Acción del veneno de *Bothrops jararacussu* de Argentina sobre la coagulación sanguínea. En: Vet. Corrientes, Argentina: s.n., 2006. V. 8 N° 1 p. 119-128. ISSN 1514-6634.

MATSUI, T.; Y. FUJIMURA and K. TITANI. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. En: Biochimica et Biophysica Acta 1477.s.1. : Elsevier Ltda., 2000. p. 146-156.

MIINISTERIO DE SALUD – INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Accidentes ofídicos. 2005. Obtenida el 23 de Marzo del 2008 en http://www.ins.gov.co/pdf_investiga/2005_vig-ofidismo.pdf.

MONJE, S. Determinación de la Dosis Letal Media (DL50) de cinco especies del género *Micrurus* en estado de cautiverio en Nilo – Cundinamarca (Colombia). Florencia, 2007. 125 p. Trabajo de Grado (Biólogo). Universidad de la Amazonía. Facultad Ciencias Básicas. Programa de Biología con énfasis en Biorecursos.

MORENO, C. Cuando muerden las serpientes. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia: Un periódico, 2005. 3 p.

NAVIA, R. Determinación de la Dosis Letal 50 del veneno de tres poblaciones de *Bothrops asper* (SERPENTES: VIPERIDAE) y su incidencia epidemiológica en el Departamento del Cauca, Colombia. 2005. 100 p. Trabajo de Grado (Biólogo).

Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. En: Genetics. Texas: Weir, B.S., 1978. V. 89 p. 583-590.

NOONAN, B. and K. WRAY. Neotropical diversification: the effects of a complex history on diversity within the poison frog genus *Dendrobates*. En : Journal of Biogeography. U.S.A: s.n., 2006. V. 33 p. 1007–1020.

NÚÑEZ, V.; P. CID; L. SANZ; P. DE LA TORRE; Y. ANGULO; B. LOMONTE; J. GUTIÉRREZ y J. CALVETE. Snake venomics and antivenomics of the *Bothrops atrox* venoms from Colombia and de Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. En: Journal of Proteomics. s.1. : Elsevier Ltd., 2009. V. 73 p. 57-78.

OTERO, R. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. En: Toxicon. s.1.: Elsevier Ltd., 2009. V. 54 N°7 p. 998-1011.

OTERO, R.; J. GUTIÉRREZ; M. MESA; E. DUQUE; O. RODRÍGUEZ; J. ARANGO; F. GÓMEZ; A. TORO; F. CANO; L. RODRÍGUEZ; E. CANO; J. MARTÍNEZ; W. CORNEJO; L. GÓMEZ; F. URIBE; S. CÁRDENAS; V. NUÑEZ and A. DÍAZ. Complications of *Bothrops*, *Porthidium* and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. En: Toxicon. s.1.: Elsevier Ltd., 2002a. V. 40 p. 1107-1114.

OTERO, R.; V. NÚÑEZ; J. BARONA; A. DÍAZ y M. SALDARRIAGA. Características bioquímicas y capacidad neutralizante de 4 antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum* de Antioquia y Chocó. En: IATREIA. Antioquia, Colombia: s.n., 2002b. v. 15 N°1 p. 5-15.

OTERO, R.; R. VALDERRAMA; R. OSORIO y L. POSADA. Programa de atención primaria del accidente ofídico. Una propuesta para Colombia. En: IATREIA. Antioquia, Colombia: s.n., 1992. V. 5 N°2 p. 96-102.

PALMA, M.; M. MENDES; M. MARQUES; B. MONSON; L. DELAZARI y KEYTI SOUZA. Fundamentos em análise de proteómica. Parte I. Brasil, Rio Claro: Laboratorio de Biología estructural e zooquímica, 2006. p. 38- 46.

PASTRANA, J.; R. BLASCO; R. ERCE y M. PINILLOS. Picaduras y mordeduras de animales. Animals sting and bites. En: Anales. Navarra, Brasil: s.n., 2003. V. 26 p. 23.

PERDOMO, A. y H. PATIÑO. El accidente ofídico en Panamá. Sección toxicológica del centro de investigación e Información de medicamentos y tóxicos (CIIMET). Panamá: s.n., 2003. p. 1- 4.

PEREAÑEZ, J.; S. JIMÉNEZ; J. QUINTANA; V. NUÑEZ; M. FERNÁNDEZ y Y. RESTREPO. Inhibición de las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta inducidas por el veneno de *Bothrops asper* por extractos etanolíticos de tres especies de heliconias. En: Rev. Fac. Química Farmacéutica, Antioquia: s.n., 2008. V.15 N° 1. p. 157 – 164.

PÉREZ, C. y A. MORENO. Ofidios de Colombia. Monografía VI. En: Mus. Reg. Sci. Nat. Madrid, España: s.n., 1989. V. 7. No 1 520 p.

PÉREZ, M.; C. ROJO; M. DE VICENTE y M. ENCINAS. Estudio del veneno de serpientes: tipos y tratamientos. En: Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. Madrid, España: s.n., 2008. V. 2 N°2. p. 100-104.

PIDDE, G.; L. ALVES; F. PORTARO; M. FURTADO and D. TAMBOURGI. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. En: Toxicon. s.1.: Elsevier Ltd., 2008. V. 52 p. 842-851.

PINEDA, D. y RENJIFO, J. Accidente ofídico. p. 15-61. En: PINEDA, D. y HERNÁNDEZ, C. Accidentes por animales venenosos. Bogotá, Colombia: División de biblioteca y publicaciones, Instituto Nacional de Salud, 2002. 194 p. ISBN 958-13-0130-5.

PINHO, F. y I. PEREIRA. Ofidismo. En: Revista da Associação Médica Brasileira. São Paulo, Brasil: s.n., 2001. V. 47 N°1. p.19. ISSN 0104-4230.

PIRELA, R.; J. LÓPEZ y J. HERNÁNDEZ. Caracterización toxinológica del veneno total de la serpiente de cascabel *Crotalus durissus cumanensis* (Viperidae), presente en la localidad de Porshoure, Guajira Venezolana. En: Revista Científica. Maracaibo, Venezuela: s.n., 2006. V. 16 N°3. 13 p. ISSN 0798-2259.

PROAVES. Proyecto Pangán: una iniciativa comunitaria de conservación en la Reserva el Pangán. Plan de Manejo de la Reserva de las Aves el Pangán. Colombia: s.n., 2005. p. 54-89.

QUEVEDO, B.; J. RAMÍREZ-ÁVILA y E. LÓPEZ. Purificación de fosfolipasa A₂ a partir de veneno de *Bothrops atrox*. Bogotá, Colombia: s.n., 2000. 5 p.

QUINTANA, J.; R. OTERO; V. NÚÑEZ; F. TORO. Estudio de la variabilidad en el Veneno de 2 poblaciones de *Bothriechis schlegelii* del suroeste y norte de Antioquia y correlación Morfométrica. En: IATREIA. Medellín, Colombia: s.n., 2000. V. 13 N° 2 (Resumen) 1 p.

RAMOS, V. y FOLGUERA, A. Los Andes Australes: Una Evolución Tectónica excepcional entre el Sur de Mendoza y el Norte de Neuquen. En: CONGRESO DE EXPLORACIÓN Y DESARROLLO DE HIDROCARBUROS, ARCHIVOS ELECTRÓNICOS, MAR DEL PLATA (6 : 2005 : Argentina). Ponencia en 6° congreso de exploración y desarrollo de hidrocarburos, archivos electrónicos, Mar del Plata, Argentina, Universidad de Buenos Aires, 2005. 10 p.

- RANGEL – CH, O y J. AGUIRRE. La isla Gorgona y sus Ecosistemas. En : P. LEYVA. Colombia Pacífico. Bogotá: Fondo FEN-Colombia, 1993. p. 50-63.
- RIBEIRO, L. and JORGE M. Infections in the bite site after envenoming by snakes of the *Bothrops* genus. En: Journal of Venomous Animals and Toxins. Botucatu, Brasil: Scielo., 1997.V. 3 N°2. ISSN 0104-7930.
- RODRIGUEZ – ACOSTA, A. Los venenos y el síndrome de envenenamiento ofídico. Venezuela: s.n., 2001. 13 p.
- RUCAVADO, A.; T. ESCALANTE; C. TEIXEIRA; C. FERNÁNDES; C. DÍAZ and J. M. GUTIERREZ. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. En : Mediators of Inflammation. s.1. : Taylor & Francis Ltd., 2002. V.11. p. 121-128.
- RUÍZ DE TORRENT, R.; L. LEIVA y O. ACOSTA DE PÉREZ. Neutralización de la actividad proteolítica de venenos de víboras del género *Bothrops* del litoral Argentino. En: Rev. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Corrientes, Argentina: s.n., 2000. 3 p.
- RUÍZ DE TORRENT, R.; O. ACOSTA DE PÉREZ; G. TEIBLER; S. MARUÑAK; P. KOSCUNCZUK y M. SÁNCHEZ. Regeneración muscular por mionecrosis inducida por veneno de *Bothrops moojeni*. Corrientes, Argentina: s.n., 2005. 3 p.
- SALAMAN, P. Surveys and conservation of diversity in the Chocó South –West Colombia. Bird Life International. Report No. 61. s.1.: Cambridge, 1994. 167 p.
- SALAZAR, F. Mapa cuencas hidrográficas de 1^{ero} y 2^{do} orden. En: ENCUENTRO NACIONAL SOBRE LA DIMENSIÓN SOCIAL DEL AGUA DNP-UPA OIKOS ALEA. (1 : 1996 : Colombia). Encuentro nacional sobre la dimensión social del agua DNP-UPA OIKOS ALEA. 1996. 1 p.
- SALCEDO, P. Accidente Ofídico. Guías para manejo de urgencias. Panamá: s.n., 2005. p. 1033 – 1044.
- SALDARRIAGA, M.; R. OTERO; V. NUÑEZ; M. TORO; A. DÍAZ y J. GUTIERREZ. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. En: Toxicon. s.1.: Elsevier Ltd., 2003. V. 42 p. 405-411.
- SALDARRIAGA, M.; M. SASA; R. PARDO y M. MÉNDEZ. Phenotypic differences in a cryptic predator: Factors influencing morphological variation in the terciopelo *Bothrops asper* (Garman, 1884; Serpentes: Viperidae). En: Toxicon. s.1.: Elsevier Ltd., 2009. V. 54. p. 923-937.

- SÁNCHEZ, E.; M. RAMÍREZ; J. GALÁN; G. LÓPEZ; A. RODRÍGUEZ y J. PÉREZ. Cross reactivity of three antivenoms against North American snake venoms. En: *Toxicon*. s.1.: Elsevier Ltd., 2003. p. 315-320.
- SARAVIA, P.; E. ROJAS; T. ESCALANTE; V. ARCE; E. CHAVEZ; R. VAZQUEZ; B. LOMONTE; G. ROJAS Y J. GUTIERREZ. The venom of *Bothrops asper* from Guatemala: toxic activities and neutralization by antivenoms. En: *Toxicon*. Brasil © Elsevier Ltd., 2001. p. 401-405.
- SARAVIA, P.; E. ROJAS; V. ARCE; C. GUEVARA; J. LÓPEZ; E. CHÁVEZ; R. VELÁZQUEZ; G. ROJAS y J. GUTIÉRREZ. Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: pathophysiological and therapeutic implications. En: *Rev. Biol. Trop. Costa Rica*: s.n., 2002. V.50 N° 1 p. 337-346.
- SASA, M. Morphological variation in the lancehead pitviper *Bothrops asper* (Garman) (Serpentes: Viperidae) from Middle America. En: *Rev. Biol. Trop. San José, Costa Rica*: s.n., 2002. V. 50 N° 1. p. 259-271.
- SASA, M.; D. WAKSO; W. LAMAR. Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. En: *Toxicon*. s.1. : Elsevier Ltd., 2009. V. 54 N° 7 p. 904-922.
- SAVAGE, J.M., 2002. *The Amphibians and Reptiles of Costa Rica: A Herpetofauna between Two Continents, between Two Seas*. Chicago: University of Chicago Press, 2002. 934 p. ISBN 0-226-73537-0.
- SCANFERLA, C. y S. NENDA. El registro más antiguo del género *Bothrops* (Serpentes, Viperidae), provenientes del pleistoceno inferior a medio de Argentina. En: *Rev. Mus. Argentino. Cienc. Nat.* Buenos Aires, Argentina: s.n., 2005. V. 7 N° 2 p. 177-181.
- SCROCHI, G. y S. KRETZSCHMAR. Guía de métodos de captura y preparación de anfibios y reptiles para estudios científicos y manejo de colecciones herpetológicas. Miscelánea 102. Argentina: Fundación Miguel Lillo, Ministerio de Cultura y Educación, San Miguel de Tucumán, 1996. 43 p.
- SOLANO, G.; A. SEGURA; M. HERRERA; A. GÓMEZ; M. VILLALTA; J. M. GUTIÉRREZ and G. LEÓN. Study of the design and analytical properties of the lethality neutralization assay used to estimate antivenom potency against *Bothrops asper* snake venom. s.p.1. In Prep. p 1-33.
- SOLÓRZANO, A. and L. CERDAS. Reproductive biology and distribution of the Terciopelo *Bothrops asper* Garman (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica. En: *Herpetologica*. s.1.: <http://www.jstor.org/stable/3892835>., 1989. V. 45. N° 4 p. 444-450.

STANCHI, N.; C. DILORENZO; C. GÓMEZ; C. GRISOLIA y J. COPES. Characterization of *Bothrops* venoms of Argentina by sds-polyacrylamide gel electrophoresis. En: *Analecta Veterinaria*. Argentina: s.n., 1999. V. 19 No ½ p. 62-65. ISSN 1514-2590.

TU, A.; J. STERMITZ and H. ISHIZAKI. Comparative study of pit viper venoms of genera *Trimeresurus* from Asia and *Bothrops* From América: an immunological and isotachopheretic study. En : *Comp. Biochem. Physiol.* Great Britain: Pergamon Press Ltd., 1980. V. 66B p. 249 – 254.

VANZOLINI, P and R. HEYER. The American herpethofauna and the Interchange. Capítulo 18. En: STEHLI, F.; F. WEBB and S. WEBB. (Eds). *The great american biotic interchange*. New York and London, 1985. V. 4. 532 p.

VARGAS, O. *Las Serpientes en Colombia y su relación con patología veterinaria*. Medellín, Colombia: s.n., 1970. 7 p.

VÁZQUEZ, A. *Mordedura de serpientes venenosas*. Bogotá, Colombia: s.n., 1994. 9 p.

VÉLEZ, J. *Serpientes. Las especies menos protegidas de nuestra fauna*. Caldas, Colombia: Museo de Historia Natural, hexágono Roche, 2006. V. 3 p. 5 – 16.

WOLFSBERG, T; P. PRIMAKOFF; D. MYLES; and J. WHITE. ADAM, a novel family of membrane proteins containing a Desintegrin and Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix Interactions. En : *The Journal of Cell Biology*. s.1.: The Rockefeller University Press, 1995. V. 131 N°2 p. 275-278.

WÜSTER, W.; M. SALOMÃO; J. QUIJADA-MASCAREÑAS; R. THORPE, and B.B.B.S.P. Origins and evolution of the South American pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. p. 111–128. En: G. SCHUETT, M. HÖGGREN, M. DOUGLAS, and H. W. GREENE (eds.), *Biology of the Vipers*. Utah: Eagle Mountain Publishing.

YASNÓ, F. Determinación del efecto citotóxico y genotóxico del veneno de serpiente *Bothrops asper* (VIPERIDAE) en eritrocitos de sangre periférica de ratones (*Mus musculus*) mediante la prueba de micronúcleos. 2005. 65 p. Trabajo de Grado (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Departamento de Biología.

YOCKTENG, R. and J. CAVELIER. Diversidad y mecanismos de dispersión de árboles de la Isla Gorgona y de los bosques húmedos tropicales del Pacífico colombo-ecuatoriano. En: *Rev. Biol. Trop.* s.p.1., 1998. V. 46 N°1 p. 45-53.

YOUNG, B.; C. LEE and K. DALEY. Do Snakes Meter Venom?. En: *BioScience*. American Institute of Biological Sciences: <http://www.jstor.org/stable/1314413>, 2002. V. 52 N°12 p. 1121-1126.

11. ANEXOS

Anexo A. Material examinado. Colección Zoológica de la Universidad de Nariño.

Abreviaciones de las Instituciones

PSO- CZ: Colección Zoológica de Pasto

Barbacoas, Ricaurte, Reserva Natural la Planada (PSO-CZ 114, PSO-CZ 148),
Barbacoas, Altaquer, Vereda el Barro, Reserva Natural Río Ñambí (PSO-CZ 040,
PSO-CZ 046, PSO-CZ 069, PSO-CZ 119).

Anexo B. Tabla de Registro. Muestreo en campo.

Lugar	Búsquedas	Esfuerzo horas/hombre	Observaciones
Alrededores de la cabaña	5:30 pm 6:30 pm	2 horas	Neblina
Sendero vía Junín	9: 00 am a 12:00 m	6 horas	Soleado
Sendero el Pangán	3: 00 pm a 6:00 pm	6 horas	Llovizna
Sendero Bocatoma	9:00 pm 10:30 pm	3 horas	
Sendero los venados	9:00 am a 2:00 pm	20 horas	Soleado
Alrededores de la cabaña	4:00 pm a 6:30 pm	5 horas	
Sendero el Pangán, ruinas de la primer cabaña del fundador de la Reserva	9:00 am a 2:00 pm	15 horas	Soleado
Sendero vía Junín, camino viejo hasta polea Río Ñambí	8:30 am a 1:30 pm	10 horas	Soleado
Alrededores de la cabaña	3:00 pm a 4:30 pm	3 horas	Con llovizna cerca de las 4:30 pm
Sendero los venados (1100 msnm)	9:00 am a 2: 30 pm	16,5 horas	Llovizna hacia las horas del medio día
Sendero cabaña – Junín, camino nuevo, la colinera (cultivo de plátano)	9:00 am a 2:00 pm	10 horas	Soleado, con lluvia hacia las dos de la tarde
Sendero los venados (1100 msnm)	9:30 am a 6:00 pm	25,5 horas	Soleado
Sendero cabaña hacia Junín, camino viejo	9:15 am a 3:30 pm	12,5 horas	Soleado, con lluvia desde las 11:00 am a las 3:30 pm
Sendero Cabaña- Polea Nueva	4:00 pm a 7:30 pm	10,5 horas	Llovizna
Sendero la Sabaleta , Alrededores Río Ñambí	10:00 am a 1: 30 pm	7 horas	Soleado
	4:30 pm a 7:30 pm	6 horas	Soleado
Sendero los venados (1100 msnm)	8:45 am a 5 pm	16,5 horas	Cielo nublado con llovizna hacia las horas de la tarde
Sendero cabaña – Junín, camino nuevo hacia la manzana	8:40 am a 1:00 pm	8 ,66 horas	Soleado
Sendero el Pangán	3:00 pm a 5:00 pm	6 horas	Llovizna
Sendero los venados (1100 msnm)	9:50 am a 4:00 pm	14, 33 horas	Soleado, con llovizna hacia las horas de la tarde
Cultivo de plátano, descenso desde la carretera, por la torre de Movistar	10:00 am a 1:30 pm	14 horas	Soleado, con llovizna hacia el medio día

Anexo C. Tabla de Registro. Extracción de veneno en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca. Estado de crecimiento, AD: adulto, JU: juvenil, NE: neonato. Sexo, m: macho, h: hembra.* Resultado de tres extracciones.

Población	Número de Campo	Número de Terrario	Fecha de Captura	Fecha de Ingreso	Lugar de Procedencia	Estado de crecimiento	Sexo	Talla (cm)	Peso (g)	Colector de veneno	Veneno
<i>B. asper</i> de El Tambo, Cauca (Ba-T)	CIBUC-Se-000	20	Sin dato	Sin dato	Municipio El Tambo, Departamento Cauca	AD	Sn	142	1300	José Arnulfo Camacho	1,3 ml
	CIBUC-Se-0004	4	29/07/02	29/07/02	Corregimiento Huisitó, El Tambo, Cauca (1000 m)	AD	Sn	130	800	José Arnulfo Camacho	0,5 ml
	CIBUC-Se-00055	55	21/05/06	23/05/06	Corregimiento Playa Rica, El Tambo, Cauca (500 m)	AD	Sn	125	800	José Arnulfo Camacho	0,6 ml
	CIBUC-Se-00102	102	24/09/07	03/10/07	Corregimiento Playa Rica, El Tambo, Cauca (500 m)	AD	Sn	140	700	Dany Santana	1 ml
	CIBUC-Se-00186	160	22/09/09	15/10/09	Vereda Nueva Granada, Corregimiento La Gallera, El Tambo, Cauca (500 m)	NE	M	34,5	14	Edwin Royer Coral Plaza	1,8 mg
<i>B. cf. asper</i> del Valle del Patía, Cauca (Ba-P)	CIBUC-Se-00147	129	Sin dato	11/10/08	Vereda Pomorrosos, Corregimiento San Joaquín, El Tambo, Cauca (1400 m)	AD	Sn	119	1000	MD.Santiago Ayerbe	0,1 ml
	CIBUC-Se-00085	85	26/08/07	27/08/07	Vereda Pomorrosos, Corregimiento San Joaquín, El Tambo, Cauca (1400 m)	AD	Sn	125	500	Dany Santana	0,09 ml
	CIBUC-Se-00133	114 ^a	19/07/08	28/07/08	Vereda Versalles, Vereda Pomorrosos, Corregimiento San Joaquín, El Tambo, Cauca (1400 m)	AD	H	124	1100	Edwin Royer Coral Plaza	0,2 ml
	CIBUC-Se-00113	113	01/01/08	02/01/08	Vereda Pomorrosos, Corregimiento San Joaquín, El Tambo, Cauca (1400 m)	AD	Sn	128	400	MD.Santiago Ayerbe	0,3 ml
	CIBUC-Se-00162	143	25/02/09	03/03/09	Vereda Frontino bajo, Municipio La Sierra, Cauca	JU	Sn	56,7	51,6	Edwin Royer Coral Plaza	5,6 mg
<i>B. asper</i> de Barbacoas, Nariño (Ba-N)	CIBUC-Se-00193	172	11/08/09	19/08/09	Reserva Natural de las Aves el Pangán, Municipio Barbacoas, Departamento Nariño	NE	H	38	19	Edwin Royer Coral Plaza	5 mg*
	CIBUC-Se-00194	173	11/08/09	19/08/09	RN de las Aves el Pangán, Barbacoas, Nariño	NE	H	30	14	Edwin Royer Coral Plaza	6,5 mg*

Anexo D. Método de Biuret (1948)

Este método es simple, rápido y específico, además se requieren cantidades mínimas entre 1 a 10 mg de proteína en la muestra para dar la lectura (Gornall *et al.* 1948). Para el desarrollo experimental del método inicialmente se debe elaborar una curva de calibración (Figura 33) con seroalbúmina bovina (BSA) a una concentración de 3 mg/ml; se agrega 0.9 g de albúmina a 300 ml de agua destilada, se agita suavemente y se deja varias horas o durante toda la noche a 4° C, luego se mezcla suavemente por inversión y se almacena a 4°C. La curva se construye con las concentraciones de BSA frente a la lectura de las absorbancias respectivas (previa adición del reactivo de Biuret), posteriormente la ecuación obtenida a partir de la regresión lineal, permite encontrar las cantidades de proteína presentes en la muestra.

Anexo E. Matriz cualitativa de bandas proteicas de *B. asper* y *B. cf. asper*. Obtenidas a partir de la comparación con marcadores de pesos moleculares estándar. *B. asper* de El Tambo, Cauca (Ba-T); *B. cf. asper* del Valle del Patía, Cauca (Ba-P); *B. asper* de Barbacoas, Nariño (Ba-N); población 4: Costa Pacífica Costa Rica; población 5: Caribe Costa Rica. * Individuos neonatos; ° individuo juvenil menor de un año. 1 = Presencia, 0 = ausencia.

Banda N°	Suroccidente de Colombia										Costa Rica					
	Ba-T					Ba-P					Ba-N		Población 4		Población 5	
	1	2	3	4	10*	5	6	7	8	9°	11	12	13	14	15	16
1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
2	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
3	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
4	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
5	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
7	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
9	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
10	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
11	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
12	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
13	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
14	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
15	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
17	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
21	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
22	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
25	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
26	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
27	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
29	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
38	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
43	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
47	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Anexo F. Análisis Probit. Método de Finney. A. *B. asper* de El Tambo, Cauca. B. *B. cf. asper* del Valle del Patía, Cauca.

Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]							
Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado
1,6335	0,0417	0,03	6	0,25	0,1801	0,0699	0,0271
1,716	0,0417	0,0719	6	0,25	0,4314	-0,1814	0,0763
1,7993	0,0417	0,1494	6	0,25	0,8966	-0,6466	0,4663
1,8751	0,1667	0,2564	6	1	1,5381	-0,5381	0,1883
1,9542	0,6667	0,4002	6	4	2,4012	1,5988	1,0646
2,0334	0,9583	0,5592	6	5,75	3,3552	2,3948	1,7093
2,1106	0,6667	0,7056	6	4	4,2335	-0,2335	0,0129
2,1903	0,8333	0,8277	6	5	4,9662	0,0338	0,0002
2,2695	0,8333	0,911	6	5	5,466	-0,466	0,0397
2,3483	0,8333	0,9597	6	5	5,758	-0,758	0,0998
Chi cuadrado							
Chi cuadrado	3,6845						
Grados de Libertad	8						
nivel p	0,8844						
Percentil de Dosis (Estímulo)							
Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar		
1	2,6732	1,5455	0,1255	35,1179	10,2889		
5	3,3548	1,6798	0,0936	47,8462	10,3968		
10	3,7183	1,7515	0,0777	56,426	10,1463		
16	4,0056	1,8081	0,066	64,2834	9,8086		
20	4,1585	1,8382	0,0603	68,904	9,6028		
25	4,3258	1,8712	0,0547	74,3375	9,391		
30	4,476	1,9008	0,0504	79,5802	9,2525		
40	4,7471	1,9542	0,0449	89,9964	9,311		
50	5	2,0041	0,0432	100,9417	10,053		
60	5,2529	2,0539	0,0453	113,2183	11,824		
70	5,524	2,1073	0,0512	128,0372	15,1164		
75	5,6742	2,1369	0,0556	137,0673	17,6075		
80	5,8415	2,1699	0,0614	147,8759	20,9658		
84	5,9944	2,2	0,0671	158,5048	24,5994		
90	6,2817	2,2567	0,0789	180,5769	32,9901		
95	6,6452	2,3283	0,095	212,9581	46,9324		
99	7,3268	2,4626	0,1269	290,1433	85,9712		
Nivel del intervalo de confianza							
	0,05						
Análisis Probit - Método Finney [Distribución Lognormal]							
Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado
1,6128	0,1667	0,2443	6	1	1,4656	-0,4656	0,1479
1,699	0,5	0,4978	6	3	2,987	0,013	0,0001
1,7782	0,8333	0,7343	6	5	4,4058	0,5942	0,0801
1,8451	0,9583	0,8769	6	5,75	5,2614	0,4886	0,0454
1,9243	0,8333	0,9634	6	5	5,7801	-0,7801	0,1053
2,0043	0,9583	0,9924	6	5,75	5,9546	-0,2046	0,007
2,0828	0,9583	0,9989	6	5,75	5,9932	-0,2432	0,0099
2,1614	0,9583	0,9999	6	5,75	5,9993	-0,2493	0,0104
2,2405	0,9583	1	6	5,75	6	-0,25	0,0104
Chi cuadrado							
Chi cuadrado	0,4165						
Grados de Libertad	7						
nivel p	0,9997						
Percentil de Dosis (Estímulo)							
Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar		
1	2,6732	1,4078	0,1774	25,5756	10,7415		
5	3,3548	1,4933	0,1359	31,1393	9,9032		
10	3,7183	1,5389	0,1142	34,5858	9,2026		
16	4,0056	1,5749	0,0976	37,5778	8,513		
20	4,1585	1,5941	0,0889	39,2751	8,0988		
25	4,3258	1,6151	0,0798	41,2188	7,6137		
30	4,476	1,6339	0,0719	43,046	7,1573		
40	4,7471	1,6679	0,0589	46,5511	6,3295		
50	5	1,6997	0,0491	50,0787	5,6725		
60	5,2529	1,7314	0,0432	53,8736	5,3688		
70	5,524	1,7654	0,0431	58,2605	5,7875		
75	5,6742	1,7842	0,0459	60,843	6,4355		
80	5,8415	1,8052	0,0509	63,8542	7,5007		
84	5,9944	1,8244	0,0569	66,7382	8,7635		
90	6,2817	1,8604	0,0703	72,5118	11,797		
95	6,6452	1,906	0,0898	80,5373	16,7755		
99	7,3268	1,9915	0,1295	98,0575	29,6767		

A

B

Anexo G. Registro fotográfico de actividades biológicas en pacientes mordidos por *B. asper* de El Tambo Cauca y *B. cf. asper* del Valle del Patía, Cauca.

Figura 35. Hemorragia gingival. Agente *B. cf. asper*. Cortesía: Hospital Universitario San José[®], Popayán, Cauca. Fotografía: Ayerbe, S. 2008.



Figura 36. Efectos producidos por envenenamiento de *B. asper*. A. Gangrena, síndrome compartimental. B. Síndrome compartimental. Cortesía: Hospital Universitario San José[®], Popayán, Cauca. Fotografía: Ayerbe, S. 2008.



Anexo H. Convenios institucionales y permisos ambientales.

CONVENIO DE COLABORACION ACADEMICA, CIENTIFICA Y CULTURAL, ENTRE LA UNIVERSIDAD DEL CAUCA Y LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO.

Entre los suscritos, HERNAN OTONIEL FERNANDEZ ORDOÑEZ, mayor de edad, identificado con la cédula de ciudadanía número 10'515.444, expedida en Popayán, en su carácter de Rector de la Universidad del Cauca, y por lo mismo, como representante legal de este establecimiento Público Nacional, de una parte, quien para efectos de este documento se denominará U.D.C. y, de otra, EFREN CORAL QUINTERO, también mayor de edad, identificado con la cédula de ciudadanía No. 5'199.650 expedida en Pasto, en su calidad de Rector de la Universidad de Nariño, y por lo mismo, representante legal de dicha Institución, y que en adelante se llamará UNIVERSIDAD DE NARIÑO, celebramos el presente convenio, previas las siguientes

CONSIDERACIONES :

- I La U.D.C. y la Universidad de Nariño, están interesadas en realizar acciones tendientes al desarrollo de actividades con proyección comunitaria.
- II Ambas Instituciones se encuentran unidas por una comunidad de intereses y objetivos en los campos académico, científico y cultural.
- III Para lograr el avance académico y cultural es de fundamental importancia que se establezcan relaciones de intercambio en estos campos.
- IV Son precisamente las Universidades, las Instituciones llamadas, por razón de su misión, finalidad y objetivos, a establecer canales de comunicación que permitan el intercambio del conocimiento científico y cultural.

Al efecto, han decidido concertar en esta fecha un Convenio de Cooperación Académica, Científica y Cultural, que se regirá por las siguientes

CLAUSULAS :

PRIMERA. LA UNIVERSIDAD DEL CAUCA Y LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO, se comprometen a realizar conjuntamente los siguientes programas : 1) FORMACION AVANZADA, PROFESIONAL Y TECNOLOGICA: Realización de Programas conducentes a la obtención de títulos de Doctor, Magister,

Especialista, Profesional y Tecnólogo. 2) ACTUALIZACIÓN: Diseño, implementación y revisión de cursos realizados bajo las modalidades de Seminarios, Simposios, Coloquios, Foros, Mesas Redondas, Conferencias, etc. 3) FORMACION DE DOCENTES: El convenio impartirá Formación y Capacitación docente mediante Programas que acuerden desarrollar las dos Instituciones. 4) ASESORIAS: El Convenio incluirá actividades conjuntas en consultoría y asesoría a organismos de los sectores público y privado, que así lo contraten. 5) INVESTIGACION: En la ejecución de todos los Programas de formación avanzada y los demás que acuerden desarrollar las partes, U. de Nariño y la U.D.C. de común acuerdo, establecerán un Programa general de investigación. Igualmente los proyectos podrán financiarse con el concurso del ICPEB EDUCACIONES y otros organismos públicos y privados. 6) DESARROLLO INSTITUCIONAL: Las dos Universidades establecerán programas de desarrollo Institucional. 7) DESARROLLO REGIONAL: La U.D.C. y U. de Nariño, estudiarán acciones conjuntas para promover el desarrollo regional. SEGUNDA. U. DE NARIÑO, y la U.D.C. procurarán la formalización de otros convenios con organismos del sector público y privado, nacionales o internacionales, para obtener contribuciones a sus objetivos y fines en materia cultural, científica, académica, tecnológica, financiera y locativa. TERCERA. Este convenio deberá ser aprobado de acuerdo con las disposiciones legales de cada una de las partes contratantes y entrará en vigor el día de su firma, siguiendo los procedimientos de rigor. CUARTA. La materialización de las acciones previstas en el Convenio, se llevará a cabo mediante acuerdos específicos, en ellos se detallarán, tanto las actividades como los medios de financiación de las mismas. QUINTA. El presente convenio tendrá duración de cinco (5) años, contados a partir de la fecha de suscripción del presente documento y será prorrogado tácitamente por iguales períodos de tiempo, a menos que se proponga su modificación o ampliación a iniciativa de cualquiera de las dos partes, con un mínimo de noventa (90) días, antes de la fecha de su vencimiento. En caso que alguna de las partes desee darlo por terminado se compromete a cumplir las acciones que se hubieren ya iniciado. Para constancia se firma en Popayán a los

LA UNIVERSIDAD DEL CAUCA

HERNAN OYENTE FERNANDEZ

Rector



UNIVERSIDAD DE NARIÑO

HERNAN CORAL QUINERO

Rector





28 de abril, 2009

ICP-367-09

Señorita
Diana Mora Obando
Programa de Biología
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Nariño, Colombia

Estimada señorita Mora:

Tengo el agrado de informarle que su solicitud de pasantía para realizar experimentos en el marco de su propuesta de tesis titulada "ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN PROTEICA DE LOS VENENOS DE *Bothrops asper* (Garman, 1884) DE LA RESERVA NATURAL DE LAS AVES EL PANGAN, BARBACOAS (NARIÑO), EL TAMBO (CAUCA) Y *Bothrops cf. asper* DEL VALLE DEL PATIA (CAUCA) " ha sido aprobada por el Consejo Científico del Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, en sesión del pasado 27 de Abril.

Durante esta experiencia, se pretende que usted desarrolle pruebas de letalidad y caracterización bioquímica de venenos de *B. asper* que traería para tal fin. Los insumos requeridos para semejantes ensayos serían aportados por nuestra institución, mientras que los fondos de transporte y manutención correrían por su parte. La supervisión de su trabajo en Costa Rica sería mi responsabilidad.

Las fechas para efectuar la experiencia podremos determinarlas por mutuo acuerdo a su debido momento, y se espera que los resultados de la pasantía tengan carácter colaborativo.

Si requiere de mayor información, por favor no dude en contactarme.

Atentamente,

Mahmood Sasa, Ph.D.
Profesor Asociado

Cc: archivo