

# DESARROLLO DE UN ESTUDIO SOBRE LOS ASPECTOS BIONÓMICOS Y TOXINOLÓGICOS DE LAS SERPIENTES DE LAS FAMILIAS VIPERIDAE Y ELAPIDAE DEL VALLE DEL CAUCA



El futuro es de todos

Gobierno de Colombia



# CONTENIDO



**DESARROLLO DE UN ESTUDIO SOBRE LOS ASPECTOS BIONÓMICOS Y TOXINOLÓGICOS DE LAS SERPIENTES DE LAS FAMILIAS VIPERIDAE Y ELAPIDAE DEL VALLE DEL CAUCA**

◆ Introducción

◆ Toxinología

◆ Bionomía

◆ Materiales y métodos

◆ Resultados y discusión

◆ Conclusiones

◆ Literatura citada

◆ Anexos



La cultura es de todos

Mincultura



## ENTIDADES PARTICIPANTES DEL PROYECTO

Gobernación del Valle del Cauca  
Fundación Universidad del Valle  
Sistema General de Regalías de CTeI

**PROYECTO:** Investigación y desarrollo de accidentes ofídicos en el Valle del Cauca BPIN 2017000100064.

**TÍTULO:** Desarrollo de un estudio sobre los aspectos bionómicos y toxinológicos de las serpientes de las familias Viperidae y Elapidae del Valle del Cauca.

**TIPO DE DOCUMENTO:** Informe de Investigación.

**AUTORES PRINCIPALES:** PhD. Wilmar Bolívar García, MSc. Mónica Andrea Gómez, Jennifer López Barrera, Andrés Gómez Figueroa, MSc. Diana Marcela Motta, Jorge Kelvin Torres López, Camilo Linares Vargas.

Este documento fue elaborado por Grupo de Investigación en Ecología Animal para la Fundación Universidad del Valle, financiado con recursos del fondo de Ciencia, Tecnología e Innovación del Sistema General de Regalías.

Copyright © Gobernación del Valle del Cauca/Fundación Universidad del Valle, 2021  
Diseño de la tapa: Diego Tabares

Se autoriza la reproducción siempre y cuando se mencione la fuente.

El contenido de esta publicación es responsabilidad exclusiva de los autores, en tal sentido, lo aquí registrado no compromete a la Fundación Universidad del Valle, ni a sus Directivos. Las imágenes presentadas en este documento provienen del archivo fotográfico de la Gobernación del Valle del Cauca, fuentes propias o de fuentes web, cuyas imágenes son de libre uso.

ISBN versión digital: 978-958-52738-5-6 Año 2021



# EQUIPO DEL PROYECTO



**Quím. MARLON GIOVANY  
GÓMEZ JARAMILLO**  
Director Ejecutivo

**Ing. LEONARDO VELÁSQUEZ  
ARANGO**  
Director del Proyecto

**CAROLINA CIFUENTES  
ANDRÉS HERRERA**  
Apoyo del proyecto

**DIEGO TABARES**  
Diseñador gráfico

**Ing. LORENA VALENCIA  
FELIPE ORTIZ MANBUSCAY  
CAROLINA LÓPEZ GAITÁN  
STEVEN BECERRA BALCAZAR  
NATHALI PORTILLA AGUDELO**  
Equipo de investigación de vigilancia  
tecnológica e inteligencia competitiva

**PhD. JULIO CESAR MATEUS  
MSc. ISABEL CRISTINA CASAS**  
Dirección de proyecto

**MSc. LINA MARÍA RODRÍGUEZ  
ANA SOFIA CARDONA**  
Equipo de investigación casuística

**PhD. WILMAR BOLÍVAR GARCÍA  
MSc. MÓNICA ANDREA GÓMEZ  
JENNIFER LÓPEZ BARRERA  
ANDRÉS GÓMEZ FIGUEROA  
MSc. DIANA MARCELA MOTTA  
JORGE KELVIN TORRES LÓPEZ  
CAMILO LINARES VARGAS**  
Equipo de investigación biomía y  
toxinología





## Contenido

<b>PRÓLOGO</b>	11
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	13
El accidente ofídico	14
<b>2. TOXINOLOGÍA</b>	17
Generalidades de los venenos de serpientes	17
Composición venenos serpientes de interés clínico	20
Factores de variación en la composición de los venenos	25
Importancia clínica de la variación en los componentes del veneno	28
Contexto de la composición de los venenos en Colombia	30
Variación en los venenos de las serpientes de interés clínico en Colombia	31
Perspectivas para el Valle del Cauca	35
<b>3. BIONOMÍA</b>	37
Contexto general dieta de serpientes	37
Estrategias de alimentación en serpientes	39
Variación dieta a nivel ontogénico y poblacional	40
Métodos para la evaluación de dieta en serpientes	41
Influencia de la dieta en la variación de los componentes del veneno	42
Contexto Colombiano	45
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	47
Área de estudio	47
<b>TOXINOLOGÍA</b>	48
Electroforesis en SDS-PAGE y cromatografía HPLC	52
Caracterización de las fracciones de veneno RP-HPLC-Proteómica	53
Letalidad del veneno	54
Actividad miotóxica	55
Actividad hemorrágica	55
Actividad de fosfolipasa A2	55
Actividad coagulante	56
Actividad de proteolítica	56

Antivenómica _____	57
<b>BIONOMÍA</b> _____	58
Especies de serpientes objeto de estudio _____	58
Presas potenciales _____	59
Librería de referencia presas potenciales _____	60
Extracción ADN muestras fecales serpientes _____	61
Proceso bioinformático _____	62
Análisis estadístico _____	63
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> _____	64
Representatividad de serpientes en el Valle del Cauca _____	64
Representatividad serpientes venenosas _____	66
Representatividad de serpientes no venenosas _____	67
<b>TOXINOLOGÍA</b> _____	69
Muestras de venenos obtenidas _____	69
Electroforesis en SDS-PAGE y cromatografía HPLC-Proteómica _____	70
Letalidad del veneno _____	78
Actividad miotóxica y hemorrágica _____	81
Actividad de fosfolipasa A2, proteolítica y coagulante _____	85
Antivenómica _____	90
<b>BIONOMIA</b> _____	91
Presas potenciales _____	91
Revisión de información secundaria _____	91
Revisión de contenido estomacal e intestinal _____	94
Librería de referencia _____	103
Extracción del gen 16S de las presas potenciales y amplificación PCR _____	103
Extracción ADN muestras fecales serpientes _____	109
Extracción de ADN y amplificación en PCR _____	110
<b>6. CONCLUSIONES</b> _____	123
<b>7. LITERATURA CITADA</b> _____	126
<b>8. ANEXOS</b> _____	140

## Índice de figuras

Figura 1. Proporción de estudios sobre proteómas de veneno de especies Viperidae y Elapidae. Tomado y Modificado de Lomonte et al. 2012. \_\_\_\_\_ 21

Figura 2. Principales familias de proteínas y proporciones relativas en la composición de los venenos para las familias Elapidae (izquierda) y Viperidae (Derecha): PLA2 Fosfolipasas A2; SVSP Serina-Proteinasas; SVMP, metaloproteasa de veneno de serpiente; LAAO, l-aminoácido oxidasa; 3FTx, toxina de tres dedos; KUN, péptido de kunitz; CRiSP, proteína secretora rica en cisteína; CTL, lectina de tipo C; DIS, desintegrina; NP, péptido natriurético; NGF, factor de crecimiento nervioso; CYS, cistatina; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; MVC, componente menor del veneno. Figura toma de Tasoulis y Isbister 2017. \_\_\_\_\_ 22

Figura 3. Variabilidad en la composición del veneno para 11 especies de *Micrurus*, mostrando diferentes proporciones entre los grupos 3FTx / PLA2, perfiles proteómicos para *M. alleni*, *M. altirostris*, *M. clarki*, *M. corallinus*, *M. dumerilii*, *M. fulvius*, *M. mipartitus*, *M. mosquitensis*, *M. multifasciatus*, *M. nigrocinctus* y *M. tschudii*; figura tomada y modificada de Tasoulis y Isbister 2017. \_\_\_\_\_ 23

Figura 4. Composición del veneno con proporciones de las principales familias de proteínas presentes en dos géneros de Viperidae: *Bothrops* y *Lachesis* de interés clínico para Colombia figura tomada y modificada de Tasoulis y Isbister 2017. \_\_\_\_\_ 24

Figura 5. Principales familias de proteínas presentes en los venenos para seis especies de Viperidos de interés clínico en Colombia y Valle del Cauca. (A) *Bothrocophias myersi* (Datos tomados de Pereaños et al., 2020)(B) *Bothriechis schlegelii* foto: Rubén D. Jarrín Bioweb.bio, (C) *Bothrops asper* foto: Omar Torres-Carvajal Bioweb.bio, (D) *Porthidium nasutum* Gustavo Pazmiño-Otamendi, (E) *Bothrops punctatus* foto: Andrés Calero Bioweb.bio, (F) *Lachesis acrochorda* foto: Mónica Gómez. SV/SP: Serina Proteasa, SVMP: Metaloproteasa, PLA-2: Fosfolipasa-A2, NP: Peptido Natriuretico, LAAO L-Amino acidooxidasa, CRiSP: Proteína Secretora Rica en Cisteina, DIS: Desintegrina, CTL/SNACLEC: Lectina Tipo C-Similar a Lectinas Tipo C, BaCol PLA-2: Fosfolipasa-A2 Ácido Miotóxica, PNP: Peptidos o componentes no proteicos, NUC: Nucleotidasas, HAY: Hialuronidasa, GCY: Glutamil ciclase, PLB: Fosfolipasa-B, NGF: Factor de Crecimiento Nervioso \_\_\_\_\_ 32

Figura 6. Principales familias de proteínas presentes en los venenos para cuatro especies de Elapidos de interés clínico en Colombia y Valle del Cauca; (A) *Micrurus mipartitus* foto: Morley Read Bioweb.bio, (B) *Micrurus dumerilii* foto: Santiago R. Ron Bioweb.bio, (C) *Micrurus clarki*, (D) *Micrurus multifasciatus*. SVSP: Serina Proteasa, SVMP: Metaloproteasa, 3FTx: Toxina de Tres Dedos, PLA-2: Fosfolipasa-A2, PLA-2+3FTx: proporción de veneno completo formado por estas dos familias de proteínas, LAAO: Amino acidooxidasa, KUN: Peptido tipo Kunitz. \_\_\_\_\_ 33

Figura 7. Localidades de muestreo en las cuatro ecorregiones del Valle del Cauca. Elaborado por Luz Ángela Flórez \_\_\_\_\_ 47

- Figura 8. Paisajes y trabajo de campo realizado por biólogos y estudiantes con experiencia en manipulación y manejo de herpetos. \_\_\_\_\_ 49
- Figura 9. Paisajes y trabajo de campo realizado por biólogos y estudiantes con experiencia en manipulación y manejo de herpetos. \_\_\_\_\_ 50
- Figura 10. Extracción de veneno de *Bothrops asper* en la localidad de El Placer, Anchicayá. Posteriormente liberada. \_\_\_\_\_ 51
- Figura 11. Extracción de veneno de *Micrurus mipartitus* colectada en la región Occidental. \_\_\_\_\_ 51
- Figura 12. Revisión de especímenes de serpientes venenosas de la Familia Viperidae y Elapidae del Valle del Cauca depositados en la Colección de Prácticas Zoológicas (CPZ-UV) de la Universidad del Valle. \_\_\_\_\_ 61
- Figura 13. Mapa para la distribución de especies de serpientes venenosas y no venenosas en el Valle del Cauca, datos de presencia obtenidos en los registros realizados en el marco del proyecto e información aportada por el Grupo de Investigación en Ecología Animal de la Universidad del Valle. Mapa Elaborado por Luz Ángela Flórez. \_\_\_\_\_ 65
- Figura 14. Abundancia por especie de serpiente de interés clínico para le Valle del Cauca, registrada en cada una de las eco-regiones evaluadas durante las salidas de campo. \* Registros de Isla Gorgona, corresponden a muestras facilitadas por el Grupo de Investigación en Ecología Animal de la Universidad del Valle. \_\_\_\_\_ 67
- Figura 15. Listado de especies y abundancia para las serpientes no venenosas con distribución en las cuatro eco-regiones del Valle del Cauca. (A) Registro obtenidos en el marco del proyecto durante las salidas de campo. (B) Registros aportados por el Grupo de Investigación en Ecología Animal de la Universidad del Valle \_\_\_\_\_ 68
- Figura 16. Muestras de veneno obtenidas para tres especies de interés clínico para le Valle del Cauca, registrada en cada una de las eco-regiones evaluadas durante las salidas de campo. \* Registros de Isla Gorgona, corresponden a muestras facilitadas por el Grupo de Investigación en Ecología Animal de la Universidad del Valle. \_\_\_\_\_ 69
- Figura 17. Perfiles de proteínas de venenos de *Lachesis acrochorda* obtenidos de individuos de la región del Pacífica. (A) perfiles SDS-PAGE de venenos individuales y combinados (20 µg) en condiciones reductoras en geles al 12% que se tiñeron con azul de Coomassie R-250. Los marcadores de masa molecular (Mw) se indican a la izquierda, en kDa. (B) Perfiles de RP-HPLC de los dos venenos individuales. Se fraccionaron dos miligramos en una columna C18 y se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo a 215 nm, como se describe en Materiales y métodos. Las líneas púrpura y azul claro indican los perfiles de elución del veneno de los dos individuos de la región del Pacífica, respectivamente. \_\_\_\_\_ 72
- Figura 18. Perfiles de proteínas de venenos de *Bothrops asper* obtenidos de individuos de la región del Occidental. (A) Se generaron perfiles de SDS-PAGE de venenos individuales y combinados (20 µg) en condiciones reductoras en geles al 12% que se tiñeron con azul de Coomassie R-250. Los marcadores de masa molecular (Mw) se indican a la izquierda, en kDa. (B) Perfiles de RP-HPLC de



los dos venenos. Se fraccionaron dos miligramos en una columna  $C_{18}$  y se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo a 215 nm. \_\_\_\_\_ 73

Figura 19. Perfiles de proteínas de venenos de *Bothrops asper* obtenidos de individuos de la región Pacífica. (A) Se generaron perfiles de SDS-PAGE de venenos individuales y combinados (20  $\mu$ g) en condiciones reductoras en geles al 12% que se tiñeron con azul de Coomassie R-250. Los marcadores de masa molecular (Mw) se indican a la izquierda, en kDa. (B) Perfiles de RP-HPLC de los cuatro venenos. Se fraccionaron dos miligramos en una columna  $C_{18}$  y se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo a 215 nm. \_\_\_\_\_ 73

Figura 20. Perfiles de proteínas de venenos de *Bothrops asper* obtenidos de individuos de la Isla Gorgona. (A) Se generaron perfiles de SDS-PAGE de venenos individuales y combinados (20  $\mu$ g) en condiciones reductoras en geles al 12% que se tiñeron con azul de Coomassie R-250. Los marcadores de masa molecular (Mw) se indican a la izquierda, en kDa. (B) Perfiles de RP-HPLC de los dos venenos. Se fraccionaron dos miligramos en una columna  $C_{18}$  y se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo a 215 nm. \_\_\_\_\_ 74

Figura 21. Perfil de proteínas del pool de veneno de serpiente *Lachesis acrochorda* obtenido de la región del Pacífica mediante RP-HPLC. Se fraccionaron dos miligramos en una columna  $C_{18}$  y se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo a 215 nm. \_\_\_\_\_ 74

Figura 22. Comparación del perfil cromatográfico de los venenos de *B. asper* de las tres ecorregiones. Perfiles de elución de proteínas RP-HPLC en una columna  $C_{18}$ . La región del cromatograma, indicada por óvalos amarillos, muestra las principales diferencias entre las tres muestras de veneno de grupo. **PLA2:** Fosfolipasa  $A_2$ , **SP:** Serina proteasa, **MP:** metaloproteasas. \_\_\_\_\_ 75

Figura 23. Diagrama de cajas comparando las medias de la dosis letal<sub>50</sub> de los venenos de *B. asper* de tres ecorregiones. \_\_\_\_\_ 80

Figura 24. Actividad miotóxica de los venenos de *Bothrops asper* de las tres ecorregiones del Valle del Cauca. La actividad de la creatina quinasa plasmática (CK) se determinó después de 3 h de la inyección i.m (50  $\mu$ g / 50  $\mu$ L PBS) en ratones CFW. Las barras representan la media  $\pm$  DE ( $n = 4$ ), y fueron estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) según la prueba t de Student. \_\_\_\_\_ 82

Figura 25. Comparación de la actividad hemorrágica de los venenos de *B. asper* (3  $\mu$ g) después de inyección i.d en ratones CFW. El área hemorrágica se dibujó sobre una película transparente y se midió en  $mm^2$ . Las barras representan la media  $\pm$  DE ( $n = 5$ ). \_\_\_\_\_ 83

Figura 26. Actividad miotóxica de los venenos de *Lachesis acrochorda* del Valle del Cauca. La actividad de la creatina quinasa plasmática (CK) se determinó después de 3 h de la inyección i.m (50  $\mu$ g / 50  $\mu$ L PBS) en ratones CFW. Las barras representan la media  $\pm$  DE ( $n = 4$ ), y fueron estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) según la prueba t de Student. \_\_\_\_\_ 84

Figura 27. Comparación de la actividad hemorrágica del veneno de *Lachesis acrochorda* (3  $\mu$ g) después de inyección i.d en ratones CFW. El área hemorrágica se dibujó sobre una película transparente y se midió en  $mm^2$ . Las barras representan la media  $\pm$  DE ( $n = 5$ ). \_\_\_\_\_ 84

Figura 28. Actividad edemática de los venenos de *Bothrops asper* de las tres ecorregiones del Valle del Cauca. Los ratones recibieron una inyección subplantar que contenía 3  $\mu\text{g}$  de VEGF en 30  $\mu\text{L}$  de PBS, en la almohadilla plantar de la pata izquierda. La almohadilla derecha recibió el mismo volumen, pero de PBS. El grosor de la almohadilla plantar se midió en diferentes momentos. Cada punto representa la media  $\pm$  DE ( $n = 4$ ). Las diferencias entre VEGF y PBS fueron estadísticamente significativas (\*\*\*)  $p < 0.05$ ) a 0.5, 1 y 3 horas. \_\_\_\_\_ 85

Figura 29. Actividad de fosfolipasa  $A_2$  de los venenos de *Bothrops asper* de las tres ecorregiones del Valle del Cauca. Evaluada en ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzoico, un sustrato monodisperso sintético. Cada punto representa la media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). Las diferencias entre las dosis de veneno a 10, 20 y 40  $\mu\text{g}$  fueron estadísticamente significativas (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) \_\_\_\_\_ 86

Figura 30. Actividad proteolítica en el sustrato de azocaseína para los venenos de *Bothrops asper* de las tres ecorregiones. Cada punto representa la media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). Las diferencias entre las ecorregiones a 2.5, 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{g}$  son estadísticamente significativas (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). \_\_\_\_\_ 87

Figura 31. Actividad de fosfolipasa  $A_2$  del veneno de *Lachesis acrochorda* del Valle del Cauca. Evaluada en ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzoico, un sustrato monodisperso sintético. Cada punto representa la media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). Las diferencias entre las dosis de veneno a 10, 20 y 40  $\mu\text{g}$  fueron estadísticamente significativas (\*\*\*\*  $p < 0,001$ ). \_\_\_\_\_ 87

Figura 32. Actividad proteolítica en el sustrato de azocaseína para el veneno de *Lachesis acrochorda*. Cada punto representa la media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). Sin diferencias estadísticamente significativas. \_\_\_\_ 88

Figura 33. Actividad de coagulación en plasma sanguíneo humano de los venenos de *Bothrops asper* de las tres ecorregiones. \_\_\_\_\_ 89

Figura 34. Actividad de coagulación en plasma sanguíneo humano del veneno de *Lachesis acrochorda*. \_\_\_\_\_ 89

Figura 35. SDS-PAGE de los antivenenos de Probiol e INS. En un gel de poliacrilamida al 12.5 % se sembraron 10  $\mu\text{g}$  de cada antiveneno y se corrió a 110 V por una hora. Luego, el gel se tiñó con azul de Coomassie R-250 y se identificó la proteína IgG mediante peso molecular, usando un marcador de peso de la marca Bio-Rad. \_\_\_\_\_ 90

Figura 36. Gráfica porcentual de la dieta de A. *Bothrops asper*, B. *Bothriechis schlegelii* y C. *Porthidium nasutum* a nivel de orden de acuerdo con la revisión de información secundaria. \_\_\_\_ 93

Figura 37. Gráfica porcentual de la dieta de *Micrurus mipartitus* a nivel de orden de acuerdo con la revisión de información secundaria. \_\_\_\_\_ 94

Figura 38. Número de especímenes disectados de serpientes venenosas para revisión de presas potenciales presentes en contenido estomacal, depositados en la Colección de Prácticas Zoológicas de la Universidad del Valle (CPZ-UV). \_\_\_\_\_ 95

Figura 39. Ítems encontrados en la revisión de estómagos e intestinos de serpientes de la familia Viperidae depositadas en la Colección de Prácticas Zoológicas de la Universidad del Valle. A: Ratón, B: Cráneo de ave, C: Pelos, D: Colmillos. \_\_\_\_\_ 97

Figura 40. Amplificación del gen 16S del ADN mitocondrial de tejidos de las clases Amphibia y Reptilia correspondientes a presas potenciales. Carril 1: Marcador de peso molecular (50-1000 pb). \_\_\_\_\_ 107

Figura 41. Resultados de la extracción de ADN de posibles presas. Los colores indican la bioregión a la que pertenecen las muestras: Región Occidental (CO), Región Pacífica (RP) y no aplica (NA) para tejidos de los cuales se hizo extracción, pero no fue posible amplificar. En el eje Y se muestra la concentración de ADN obtenida a partir de la extracción (ng/μl). \_\_\_\_\_ 108

Figura 42. Pureza de las muestras de ADN extraído a partir de tejido de colecciones y campo, medido a través de la proporción 260/280. \_\_\_\_\_ 109

Figura 43. Número de individuos de *Bothrops asper*, *Bothriechis schlegelii*, *Lachesis acrochorda* y *Micrurus mipartitus* de los que se obtuvo muestra fecal. \_\_\_\_\_ 110

Figura 44. Concentración de ADN (ng/μl) obtenido a partir de muestras fecales de serpientes venenosas y discriminado por las bioregiones de interés: Región Central (RC), Región Occidental (RO) y Región Pacífica (RP). \_\_\_\_\_ 111

Figura 45. Concentración (ng/μl) y pureza del ADN obtenido a partir de muestras fecales de serpientes venenosas. \_\_\_\_\_ 112

Figura 46. Reportes bibliográficos y moleculares para la dieta de cuatro especies de serpientes venenosas. En color amarillo, los reportes de literatura y en color verdes los reportes moleculares de este estudio. \_\_\_\_\_ 114

Figura 47. Repartición de nicho alimenticio y proporciones de consumo de ítems a nivel de clase y familias para A. *Bothrops asper*, B. *Bothriechis schlegelii*, C. *Lachesis acrochorda* y D. *Micrurus mipartitus* \_\_\_\_\_ 116

## Índice de tablas

Tabla 1. Tipos de variación en la composición de venenos para las especies de interés clínico distribuidas en Colombia en diferentes regiones biogeográficas. * comparaciones con poblaciones de países diferente a Colombia, NE Localidad no especificada. _____	34
Tabla 2. Riqueza y abundancia relativa de especies de serpientes venenosas y no venosas, registradas en las salidas de campo llevadas a cabo en el marco del Proyecto. _____	65
Tabla 3. Identificación de familias de proteínas de las tres ecorregiones de <i>Bothrops asper</i> , empleando espectrofotometría de masas _____	77
Tabla 4. Identificación de familias de proteínas del veneno de <i>Lachesis acrochorda</i> comparado con lo reportado por Madrigal et al. 2012. Se empleó espectrofotometría de masas. _____	78
Tabla 5. Dosis letal <sub>50</sub> de los venenos de <i>B. asper</i> de tres ecorregiones _____	79
Tabla 6. Dosis letal <sub>50</sub> del veneno de <i>Lachesis acrochorda</i> . _____	81
Tabla 7. Géneros de presas potenciales de los géneros de serpientes de la familia Viperidae y Elapidae del Valle del Cauca y su distribución dentro del departamento. RP: Región Pacífico, CO: Región Occidental, VI: Valle Interandino, CC: Región Central. _____	98
Tabla 8. Especies cuyo tejido fue amplificado y enviado a secuenciación para la construcción de la librería de referencia. _____	105



## PRÓLOGO

El proyecto INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE ACCIDENTES OFÍDICOS EN EL VALLE DEL CAUCA tuvo como objetivo general incrementar el conocimiento sobre los factores causales, bionómicos y toxinológicos relacionados tanto con la prevención como con la atención de los accidentes ofídicos en el departamento del Valle del Cauca.

Con la ejecución de los objetivos específicos, se logró incrementar los estudios de investigación en los componentes de Casuística, Vigilancia tecnológica, así como de Bionomía y Toxinología; de la misma manera, se logró realizar 8 eventos de divulgación ante la comunidad sobre el riesgo, prevención y manejo de los accidentes ofídicos ocasionados por las serpientes de las familias Viperidae y Elapidae en el Valle del Cauca, por medio de diversos talleres focalizados en las cuatro (4) ecorregiones del Valle del Cauca. Un gran alcance fue logrado gracias a la realización de un simposio internacional virtual sobre ofidismo, donde participaron 20 ponentes tanto nacionales como internacionales expertos en el tema, con un pico de asistentes de 180 personas conectadas al tiempo. Cabe destacar los grandes hallazgos obtenidos mediante las investigaciones y que están disponibles en la página <http://ofidicos.fundacionunivalle.org/>

El accidente ofídico es considerado un evento de importancia en salud pública que está asociado con el trabajo, la pobreza y situaciones sociales complejas. En particular es el

resultado de la interacción de diversas redes ecológicas que originan el contacto entre las serpientes y los humanos, invasores por lo general de su medio ambiente; lo que ocurre con frecuencia debido a las dinámicas económicas que expanden las fronteras agrícolas o por temas culturales como por ejemplo los ritos en diversas comunidades (Ortiz, 2013).

El presente trabajo pertenece al componente de Bionomía/Toxinología del proyecto en mención, cuyo objetivo era desarrollar un estudio sobre los aspectos bionómicos y toxinológicos de las serpientes de las familias Viperidae y Elapidae del Valle del Cauca, el cual también tiene un artículo asociado como resultado del estudio.

## 1. INTRODUCCIÓN

El estudio y manejo adecuado del envenenamiento por mordedura de serpiente requiere incrementar la generación de información relacionada con la historia natural, ciclos de actividad, dieta, ecología y biología de las serpientes, ya que estos aspectos permiten identificar el riesgo de la interacción con los humanos. Este grupo natural abarca aproximadamente 3,879 especies, lo que equivale al 34% de los reptiles conocidos a nivel mundial (Hsiang et al. 2015, Guedes et al. 2017). El neotrópico en particular, alberga una proporción significativa de la diversidad de serpientes, pues cuenta con cerca de 886 especies y 12 familias (Guedes et al. 2017); sin considerar los vacíos de información que persisten para la región. Colombia se ubica entre los diez países con mayor diversidad, reconociendo en la actualidad ~ 320 especies (Uetz et al. 2021). La riqueza y los patrones de distribución en dicho país varían entre regiones, con mayor incidencia en la ecorregión Amazónica (36.29%), Pacífica (33.33%), Andes (18.88%), Valle interandino (17.04%), Caribe y Orinoquia (16.67% c/u); respectivamente (Lynch et al. 2014).

Existe la idea generalizada de que todas las serpientes poseen toxinas capaces de ocasionar daños serios al ser humano; sin embargo, a nivel mundial, las especies de serpientes consideradas de interés clínico son las pertenecientes a las familias: Viperidae (víboras del viejo y nuevo mundo y víboras de fosa; ~350 especies a nivel mundial) y Elapidae (cobras, mambas, kraits, serpientes coralinas, serpientes venenosas de Australasia y serpientes

marinas; ~ 370 especies a nivel mundial) (Perry et al. 2020). En algunos países también se han reportado reacciones adversas en mordeduras causadas por especies de las familias Atractaspididae (áspides excavadoras) y Colubridae sensu lato, pero son menos frecuentes y estudiadas (Warrell 2010). De las más de 300 especies mencionadas anteriormente para Colombia, solo el 17.77% se consideran venenosas y se encuentran clasificadas en dos familias (Viperidae, Elapidae), 8 géneros (*Bothrops*, *Bothrocophias*, *Lachesis*, *Porthidium*, *Bothriechis*, *Crotalus*, *Micrurus* e *Hydrophis*) y 48 especies.

En el departamento del Valle del Cauca se distribuyen seis (6) especies de Vipéridos: *Bothriechis schlegelii*, *Bothrocophias myersi*, *Bothrops asper*, *Bothrops punctatus*, *Lachesis acrochorda* y *Porthidium nasutum*; lo que en conjunto representan el 30% de diversidad del grupo en Colombia (Cardona-Botero et al. 2013); y seis (6) especies de Elápidos: *Micrurus ancoralis*, *M. clarki*, *M. dumerilii*, *M. mipartitus*, *M. multiscutatus* e *Hydrophis platurus*, que corresponden al 17% de las especies en Colombia (Cardona-Botero et al. 2013).

### **El accidente ofídico**

Se trata de una enfermedad tropical desatendida que afecta principalmente a países tropicales y subtropicales, como Asia, África y Latinoamérica (OMS 2019). Se define como el evento de mordedura de una serpiente, sea venenosa o no, con inoculación de veneno o sin ella. Cuando se trata de una serpiente venenosa y hay inoculación de sustancias tóxicas, se denomina ofidiotoxicosis (Cañas et al. 2016).



La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en todo el mundo suceden cerca de 5.4 millones de mordeduras de serpientes venenosas al año, de las cuales, entre el 34% y el 50% de los casos se produce envenenamiento y entre el 1.5% y 2.5%, la muerte. Es decir que, anualmente hay entre 1.8 y 2.7 millones de casos de envenenamiento que generan entre 81,410 y 137,880 muertes. De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud, en Colombia la incidencia de accidentes ofídicos se encuentra cerca de 3,500 casos anuales, con una mortalidad estimada del 1% (Benavides et al. 2012). Lo que ubica al país en el cuarto lugar de Latinoamérica con mayor número de casos, precedido por Brasil, Perú y Venezuela (Warrell 2004).

Al igual que en Latinoamérica, en Colombia la gran mayoría de accidentes ofídicos son causados por especies de la familia Viperidae (*Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*) y Elapidae (*Micrurus*) (Warrell 2004, Lynch et al. 2016). Siendo los Vipéridos los responsables del 88.3% de los casos reportados (66.8% de ellos por el género *Bothrops*). Para el Valle del Cauca, la representatividad de estas familias es alta; sin embargo, en incidencias de accidentes ofídicos, el departamento ocupa el puesto número 15, con 2.5% de los casos a nivel nacional (Lynch et al. 2016).

En concordancia con la diversidad de serpientes del Valle del Cauca y la importancia de incrementar la información e investigación frente al accidente ofídico para mejorar la prevención y la atención del mismo; el proyecto “*Investigación y desarrollo del accidente ofídico en el Valle del Cauca*” permitió fortalecer la línea base desde el punto de vista

biológico y ecológico del accidente ofídico. Obteniendo datos completamente novedosos a nivel departamental e incluso nacional. Así mismo, se emplearon técnicas de última generación que servirán como soporte para próximos estudios y comparaciones. A continuación se presenta el estado del arte respecto a los temas de toxicología y bionomía.

## 2. TOXINOLOGÍA

### Generalidades de los venenos de serpientes

Los venenos de las serpientes son secreciones potencialmente tóxicas que contienen compuestos biológicamente activos, los cuales se almacenan en glándulas especializadas y actúan, entre otras cosas, como mecanismos químicos de inmovilización de las presas (Lillywhite 2014). Se ha sugerido que la función digestiva moduló una mayor toxicidad de las secreciones salivales, que secundariamente se tornan efectivas en la captura de las presas (Mackessy 2016). En términos generales, la producción y eficacia del veneno, dependen de tres factores: 1) producción y almacenamiento, llevados a cabo en el sistema glandular; 2) diferenciación del complejo osteo-dentario (tipos de dentición) para morder e inyectar; 3) variación en la composición y estructura de los componentes del veneno (Lillywhite 2014, Mackessy 2016).

En conjunto, los rasgos o características asociadas a la producción de veneno son considerados clave en la radiación evolutiva de las especies que conforman la súper familia Colubroidea (Caenophidia) representando ejemplos de evolución divergente y convergente en este grupo (Pyron y Burbrink 2012, Calvete 2013). Los sistemas de veneno presentan mayor grado de desarrollo en las familias: Atractaspididae, Elapidae, Viperidae y Colubridae (Mackessy 2016), registrando un amplio rango de modificaciones evolutivamente independientes a nivel bioquímico y de dentición, lo cual genera variaciones en el potencial

y composición de los venenos, y a su vez refleja diferencias en los niveles de toxicidad, morbilidad y mortalidad que pueden causar en diferentes organismos (*p. ej.* humanos) (Vidal y Hedges 2009, Cañas et al. 2016, Mackessy 2016).

A nivel morfológico, el sistema de veneno esta conformado por glándulas especializadas ubicadas en la parte posterior de las fosas nasales y detrás de los ojos. En especies de la familia Colubridae (serpientes “no venenosas”) se denominan glándulas de Duvernoy y carecen de musculo compresor. En especies de las familias Viperidae y Elapidae, grupos que presentan glándulas de veneno “verdaderas”, permiten su almacenamiento y secreción inmediata a través de los colmillos frontales hipodérmicos huecos (ausentes en Colubridos); los cuales presentan dientes maxilares posteriores con morfologías variadas (simples, agrandados, múltiples o acanalados). El tipo de dentición favorece la velocidad de inyección o suministro del veneno, con mayor eficiencia en los colmillos frontales (Lillywhite 2014, Mackessy 2016).

A nivel de composición bioquímica, los venenos son mezclas complejas de proteínas, péptidos, carbohidratos, lípidos, iones metálicos y otros compuestos orgánicos como las aminas (Lillywhite 2014, Reeks *et al.* 2015). Tradicionalmente los venenos han sido agrupados en hemotóxicos y neurotóxicos, afectando el sistema circulatorio y nervioso; respectivamente. Sin embargo, algunas especies contienen compuestos de ambos tipos por lo que actualmente se implementa otra categorización que abarca de manera más específica la variación y la complejidad estructural de los venenos (Osorio et al. 2007, Lillywhite 2014):

- ***Proteasas (Enzimas proteolíticas):*** Degradan estructuralmente las proteínas en sus componentes basales: péptidos o aminoácidos. Afectan principalmente el sistema sanguíneo causando necrosis; se encuentran en los venenos de todas las serpientes; particularmente concentraciones altas en la familia Viperidae (Lillywhite 2014).
- ***Hialuronidasas (Factores de propagación):*** Afectan la matriz celular de los tejidos incluyendo de los vasos sanguíneos, facilitando la propagación de los compuestos del veneno; se encuentra en la mayoría de Colubridos principalmente Elápidos y Vipéridos (Girish et al. 2002, Lillywhite 2014).
- ***Fosfolipasas:*** Hidrolizan los fosfolípidos en la membrana celular causando edema y daño muscular; están presentes en casi todos los venenos de serpientes (Lillywhite 2014).
- ***Acetilcolinesterasa:*** Afecta la mediación en la transmisión de señales nerviosas; es compuesto común en los venenos de Elapidae, contribuyendo a los efectos neurotóxicos (Lillywhite 2014).
- ***Toxinas:*** Varían en estructura y función, afectan el sistema nervioso en la unión neuromuscular; presentes en Elápidos (Lillywhite 2014).

- **Factores de crecimiento nervioso:** Proteínas que promueven el crecimiento de células nerviosas, aumenta la permeabilidad vascular y facilita la difusión de toxinas en el envenenamiento (Lillywhite 2014, Boldrini-Franca et al. 2017).
- **Desintegrinas:** Péptidos que inhiben las integrinas presentes en las membranas celulares, encargadas de la transferencia de mensajes al citoplasma celular; este tipo de compuestos se encuentra principalmente en Vipéridos (Lillywhite 2014).

En adelante el documento se centrará en aspectos del veneno de Elapidae y Viperidae, las cuales registran mayor relevancia para Colombia y el Valle del Cauca.

### Composición venenos serpientes de interés clínico

Las técnicas ómicas de nueva generación (*p. ej.* transcriptómica y proteómica), han aumentado significativamente el conocimiento sobre la composición de los venenos de serpiente en las últimas décadas (Lomonte et al. 2012); con mayor cantidad de perfiles proteómicos para Viperidae. Sin embargo, están sobrerrepresentados, en comparación con el número de especies actualmente reconocidas como de interés clínico; en comparación con Elapidae, la cual registra una proporción más equilibrada con su riqueza de especies (Figura 1) (Lomonte et al. 2016a).



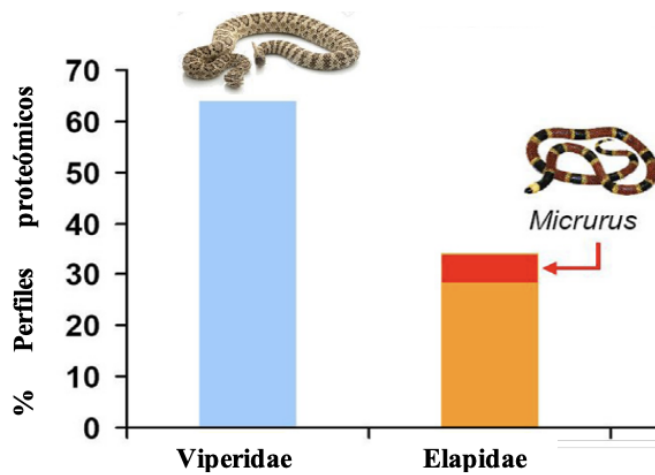


Figura 1. Proporción de estudios sobre proteómas de veneno de especies Viperidae y Elapidae. Tomado y Modificado de Lomonte et al. 2012.

A continuación, se describen las principales familias de proteínas presentes en Elapidae y Viperidae; cabe resaltar que los perfiles proteómicos no incluyen la totalidad de especies, géneros y el rango de distribución geográfica. Los venenos de las dos familias, están conformados por pocas familias de proteínas, aunque en la mayoría de los casos (análisis > 200 proteómas) pueden estar presentes en una gran diversidad de proteo-formas, lo que aumenta la complejidad final de los venenos (Figura 2) (Lomonte et al. 2012).

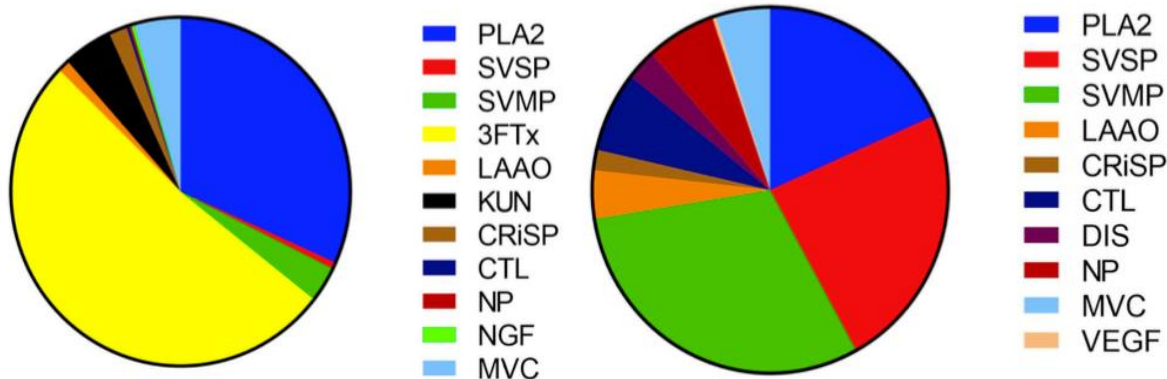


Figura 2. Principales familias de proteínas y proporciones relativas en la composición de los venenos para las familias Elapidae (izquierda) y Viperidae (Derecha): PLA2 Fosfolipasas A<sub>2</sub>; SVSP Serina-Proteinasas; SVMP, metaloproteasas de veneno de serpiente; LAAO, l-aminoácido oxidasa; 3FTx, toxina de tres dedos; KUN, péptido de kunitz; CRiSP, proteína secretora rica en cisteína; CTL, lectina de tipo C; DIS, desintegrina; NP, péptido natriurético; NGF, factor de crecimiento nervioso; CYS, cistatina; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; MVC, componente menor del veneno. Figura toma de Tasoulis y Isbister 2017.

Para el caso específico del género *Micrurus*, las toxinas se agrupan entre 6 y 8 familias de proteínas. Solo dos grupos son compartidos por la mayoría de especies con perfil proteómico: toxinas de 'tres dedos' (3FTx) y Fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Los miembros de otras familias de proteínas son comunes, pero no generalizados. Adicionalmente, en este género se presenta una significativa divergencia en los fenotipos de venenos (Figura 3) (Lomonte et al. 2016a, Tasoulis y Isbister 2017). Las  $\beta$ -neurotoxinas pre-sinápticas, Fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y las  $\alpha$ -neurotoxinas postsinápticas (3FTx o toxinas de tres dedos) son los componentes principales (> 80%) de los venenos de las corales (Tasoulis y Isbister 2017, Goldenberg et al. 2018).

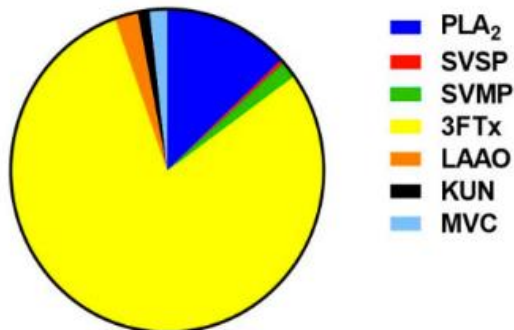
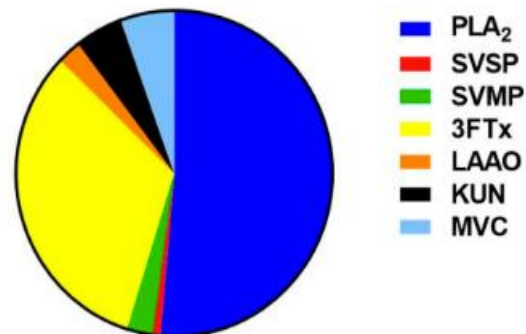
**3FTx Dominante (6 especies)****PLA2 Dominante (5 especies)**

Figura 3. Variabilidad en la composición del veneno para 11 especies de *Micrurus*, mostrando diferentes proporciones entre los grupos 3FTx / PLA<sub>2</sub>, perfiles proteómicos para *M. alleni*, *M. altirostris*, *M. clarki*, *M. corallinus*, *M. dumerelii*, *M. fulvius*, *M. mipartitus*, *M. mosquitensis*, *M. multifasciatus*, *M. nigrocinctus* y *M. tschudii*; figura tomada y modificada de Tasoulis y Isbister 2017.

A diferencia de los Elápidos, la composición de los venenos entre los géneros de Viperidae es relativamente constante, con predominancia de tres familias de proteínas: PLA<sub>2</sub>, SVMP y SVSP (Figura 4). La principal diferencia entre las dos subfamilias (Viperinae y Crotalinae) es la ausencia de compuestos KUN en Crotalinae; adicionalmente las especies de esta subfamilia poseen Glutaminil-Ciclasas. En términos más específicos los venenos de Viperidae están conformados por Serina- Proteinasas (SVSP), Metallo-Proteinasas Zn<sup>2</sup> (SVMP), Fosfolipasas (PLA<sub>2</sub>), l-aminoácido oxidasa del grupo II y proteínas sin actividad enzimática (desintegrinas, moléculas de tipo C de lectina, bradiquinina (péptidos potenciadores, miotoxinas, proteínas secretoras de cisteína, factores de crecimiento del endotelio nervioso, cistatina e inhibidores de la proteínasa de tipo Kunitz) que en conjunto representan el 67% del proteóma de esta familia (Figura 4) (Alape-Girón et al., 2009, Tasoulis y Isbister 2017).

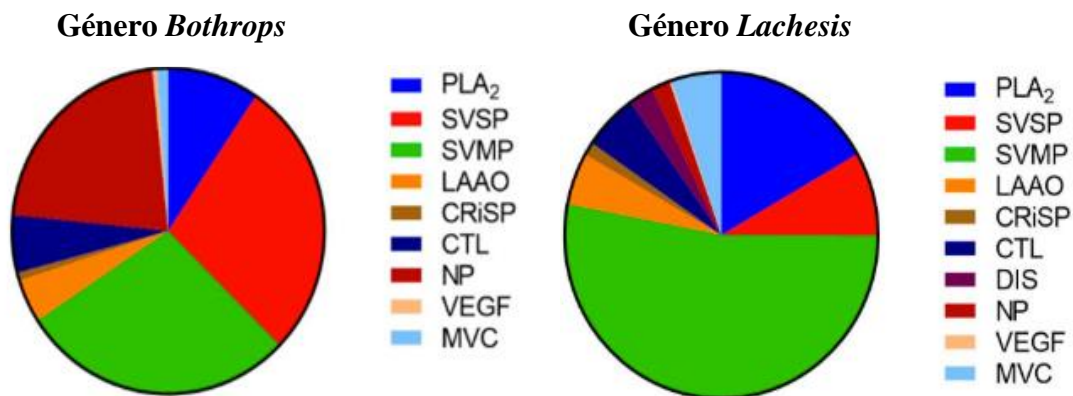


Figura 4. Composición del veneno con proporciones de las principales familias de proteínas presentes en dos géneros de Viperidae: *Bothrops* y *Lachesis* de interés clínico para Colombia figura tomada y modificada de Tasoulis y Isbister 2017.

## Factores de variación en la composición de los venenos

Existen un amplio número de investigaciones que han establecido variación estructural de los venenos a diferentes escalas biológicas en taxa; las cuales incluyen variabilidad ontogénica (entre individuos), intra-específica (poblacional) o inter-específica (especies) (Campbell y Lamar 2004, Mackessy 2016). El cambio en la composición de los venenos se ha asociado a fuentes como la filogenia y relaciones evolutivas, etapa de desarrollo (juveniles-adultos-sexo), distribución geográfica, variación estacional, ecología trófica (Mackessy 2016); y a nivel molecular, a diferencias en la expresión de genes que codifican las distintas isoformas de toxinas.

Estos genes se han diversificado por múltiples mecanismos, incluidos varios pasos de duplicación y modificaciones de las distintas copias por acumulación de mutaciones sustitutivas (Amazonas et al. 2019). La heterogeneidad del veneno también tiene importantes consecuencias médicas al causar diferencias significativas en la toxicidad y la patogenicidad del veneno (Amazonas et al. 2018). La etapa desarrollo modula diferentes factores del veneno, principalmente el rendimiento o eficacia, relacionados a variaciones morfológicas, dado a que el tamaño de la cabeza y el volumen de la glándula de veneno incrementan con la edad. Algunos autores plantean que las toxinas de serpientes adultas, pueden ser entre uno o dos ordenes de magnitud mayores que individuos neonatos (Mackessy 2016).

Los cambios alométricos en la cantidad total de veneno por lo general está acompañados de variaciones en la composición y estructura de los componentes, en las diferentes fases del

desarrollo (juveniles, sub-adultos o adultos (Guércio et al. 2006, Mackessy 2016). En algunas especies venenosas, los juveniles poseen venenos con mayor concentración de neurotoxinas, mientras que los adultos poseen venenos con niveles más altos de componentes digestivos. La actividad de coagulación del plasma (Proteasas) tiende a ser mayor en individuos juveniles o sub-adultos en comparación con adultos de especies de Vipéridos como *Bothrops atrox* (López-Lozano et al. 2002).

El tipo de dieta, es un factor relevante a considerar en los cambios en la composición del veneno, se relaciona directamente con la capacidad de una especie para capturar y aprehender las presas; la cuales potencialmente son sensibles a varios tipos de toxinas (Mackessy 2002, Mackessy 2016). Para el caso de los Vipéridos y Elápidos, diferentes investigaciones han determinado variaciones geográficas en la dieta, mientras que otras registran ítems alimenticios similares a través de su rango de distribución (Mociño-Deloya 2016). Por ejemplo, Gutiérrez et al. 1980 y Saldarriaga et al. 2003; determinaron cambios ontogénicos en la dieta de juveniles y adultos desde presas de sangre fría (ranas y lagartos) a sangre caliente (mamíferos); junto con variaciones en las actividades tóxicas y enzimáticas de los venenos de *B. asper*, en poblaciones de Costa Rica y Colombia; respectivamente (Alape-Girón 2009). Una relación similar entre la toxicidad del veneno y presa preferida se observó para numerosas especies de serpientes de coral sudamericanas (da Silva y Aired 2001).

Los cambios en la composición y estructura de los venenos generan diferentes mecanismos de acción, esto presenta un valor biológico intrínseco pues la variabilidad ontogenética del



veneno también tiene implicaciones en el entendimiento de los envenenamientos en humanos (Alape-Girón 2009). Por ejemplo Sasa et al. (2009), analizaron la letalidad del veneno de *B. asper* en ratones y ranas, evidenciando que el veneno de los adultos al parecer es menos letal que el de los juveniles para organismos ectotérmicos. Bajo este contexto, es posible realizar investigaciones asociadas a la relación entre la preferencia de dieta y la composición del veneno en serpientes. Lo anterior ha sido abordado desde dos enfoques o hipótesis: (1) la preferencia de presa debe determinar los componentes del veneno y (2) la amplitud de la dieta debe estar correlacionada positivamente con la complejidad del veneno (Mackessy 2016).

La variabilidad geográfica del veneno asociada al tipo de dieta, puede tener un impacto en el tratamiento de las víctimas de mordeduras y en la selección de especímenes para la producción de antivenenos (Alape-Girón 2009). Por ejemplo, *B. asper* es considerada una especie de hábitos alimenticios oportunistas o generalistas, es decir, un rango más amplio de presas con mayor incidencia en los adultos, lo cual le puede proveer venenos más complejos o diversos. Caso contrario ocurre con algunas especies de cascabel en la cuales el cambio ontogenético en la actividad parece estar asociado con una disminución en la toxicidad del veneno y una dependencia de presas más grandes por parte de los adultos (Alape-Girón 2009).

### **Importancia clínica de la variación en los componentes del veneno**

La variabilidad de los venenos a diferentes escalas genera cambios en los sitios inmunológicos de reconocimiento de anticuerpos que se usan en el tratamiento de la mordedura de serpiente. Por lo tanto, la efectividad de un suero antiofídico particular puede variar dependiendo de la ubicación geográfica donde ocurrió o la fase de desarrollo de la serpiente causante de la mordedura; afectando la capacidad de neutralización de las toxinas (Fry et al. 2003 Lillywhite 2014). Una mejor comprensión de la carga epidemiológica de la mordedura de serpiente, es decir, la incidencia, la distribución geográfica, las circunstancias de mordedura y la gravedad, mejoraría su manejo (Chippaux 2017).

El rango de variación resalta la necesidad de identificar diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición de los venenos a nivel ontogénico, individual y distribución geográfica de las especies de interés (Gutiérrez et al. 2009a, Lomonte et al. 2014a). La caracterización y evaluación de estos factores genera una comprensión más adecuada de los mecanismos moleculares para los efectos potencialmente letales y en última instancia posibilita mejorar la eficacia de los antivenenos (Calvete 2011). Lo anterior adquiere relevancia en términos de un problema de salud pública, principalmente en las regiones tropicales considerando la riqueza de especies y el rango de distribución de serpientes de interés clínico (Zanetti et al. 2018)

La mayoría de antivenenos producidos en Latinoamérica para el proceso de inmunización están compuestos por mezclas de venenos de una o varias especies, incluyendo venenos de

serpientes de diferentes edades, géneros y orígenes geográficos (Gay et al. 2015, Kalil y Fan 2017). El diseño de sueros poliespecíficos de amplio rango se ha convertido en un factor clave para mitigar el déficit del suministro de suero antiofídicos en algunos países de la región, a partir que, estructuralmente las toxinas de especies filogenéticamente distantes, a menudo comparten determinantes antigénicos (Calvete 2011). Sin embargo, es necesario evaluar la variabilidad intraespecífica de los componentes de los venenos, como herramienta para decidir si se deben considerar los grupos de venenos de diferentes regiones, o si el veneno de una región es representativo de toda la especie (Gutiérrez et al. 2009b), implementando reactividad cruzada de los antivenenos polivalentes contra los venenos no incluidos en la mezcla de inmunización (Calvete 2011).

Para Colombia, las serpientes de interés clínico, se distribuyen en una amplia gama de regiones biogeográficas con diferentes condiciones; lo cual establece diferencias en el uso de nicho ecológico y posiblemente cambios en la composición de los venenos (Calvete 2017). Para especies como: *Bothriechis schlegelii*, (Prezotto-Neto et al. 2016), *Lachesis spp.* (Madrigal et al. 2017), *B. asper* (Alape-Girón et al. 2009, Segura et al. 2012) o *Micrurus mipartitus* (Rey-Suárez et al. 2011); se ha reportado variabilidad intraespecífica en la composición de sus venenos y por ende cambios en la respuesta o efectos de los sueros antiofídicos. Sin embargo, la información relacionada a la variabilidad de los venenos a diferentes escalas junto con la reactividad cruzada de los antídotos contra los venenos homólogos y heterólogos; es escasa o se encuentra fragmentada (Chippaux 2017).

## Contexto de la composición de los venenos en Colombia

En los últimos años, avances en campos de la proteómica y transcriptómica han posibilitado la caracterización de una gran cantidad de componentes junto con alto grado de variación en los venenos de serpientes (Reeks et al. 2015). Para Colombia, de las 46 especies de interés clínico, el 94.74% de Vipéridos y el 37.03% de Elápidos, han sido caracterizadas. No obstante, la mayoría de información asociada a los perfiles de la composición de los venenos ha sido referenciada a partir de especies con distribución geográfica compartida con otros países (Cañas et al. 2016).

Las investigaciones que incluyen individuos presentes en el país se han centrado en especies como *B. asper*, *B. atrox*, *B. punctatus*, *Bothrocophias myersi*, *C. durissius*, *L. muta*, *Lachesis spp.*, *Porthidium spp.* y *M. mipartirus* (Culma et al. 2014, Jiménez-Charris et al. 2015, Lomonte et al. 2016a, Fonseca et al. 2018, Niño-Pérez 2018, Pereañes et al. 2020). En el caso de las especies de Viperidae (

Figura 5) los venenos están conformados principalmente por Metaloproteinasas dependientes de  $Zn^{+2}$  (SVMPS), Serina-Proteinasas (SVSP), Fosfolipasas A2, Lectinas Tipo C (CTL) péptidos natriuréticos, proteínas de secreción rica en cisteína (CRISPs) e inhibidores de proteasas tipo Kunitz (Niño-Pérez 2018).

Los venenos de *Micrurus* han sido menos evaluados; para las especies de interés clínico de este género se tiene línea base para especies como *M. mipartirus*, *M. dumerilii*, *M. clarki* y *M. multifasciatus* (Rey-Suárez et al. 2011, Rey-Suárez et al. 2016, Lomonte et al. 2016a,

Lomonte et al. 2016b). Las toxinas predominantes en estas especies pertenecen a las familias 3FTx y PLA 2, y en menor grado SP, CTL, LAAO, SVMP, NUCL, tipo Ohanin (OHA), tipo Kunitz (KUN) y acetilcolinesterasa (ACh-ase); las cuales son de abundancia marcadamente menor (< 5%) (Figura 6) (Rey-Suárez et al. 2011, Rey-Suárez et al. 2016, Lomonte et al. 2016a, Lomonte et al. 2016b).

### **Variación en los venenos de las serpientes de interés clínico en Colombia**

A escala nacional, las investigaciones que evalúen el grado de variación de la composición de los venenos de las especies de interés clínico se han centrado en especies de Vipéridos (~88.89%). Principalmente en *L. acrochorda*, *B. asper* y *B. atrox*, para las cuales se han determinado variaciones a nivel geográfico y ontogénico en diferentes regiones biogeográficas. Géneros como *Bothriechis* y *Porthidium*, han recibido menos atención, estableciendo cambios intra e inter específicos entre algunas bioregiones (Tabla 1).

Para los Elápidos, tan solo se han establecido variaciones geográficas para *M. mipartitus*, una limitación importante se relaciona con su disponibilidad en términos de las bajas cantidades de veneno obtenidas y las dificultades para mantener a estas serpientes en cautiverio (Rey-Suárez et al. 2016, Lomonte et al. 2016a).

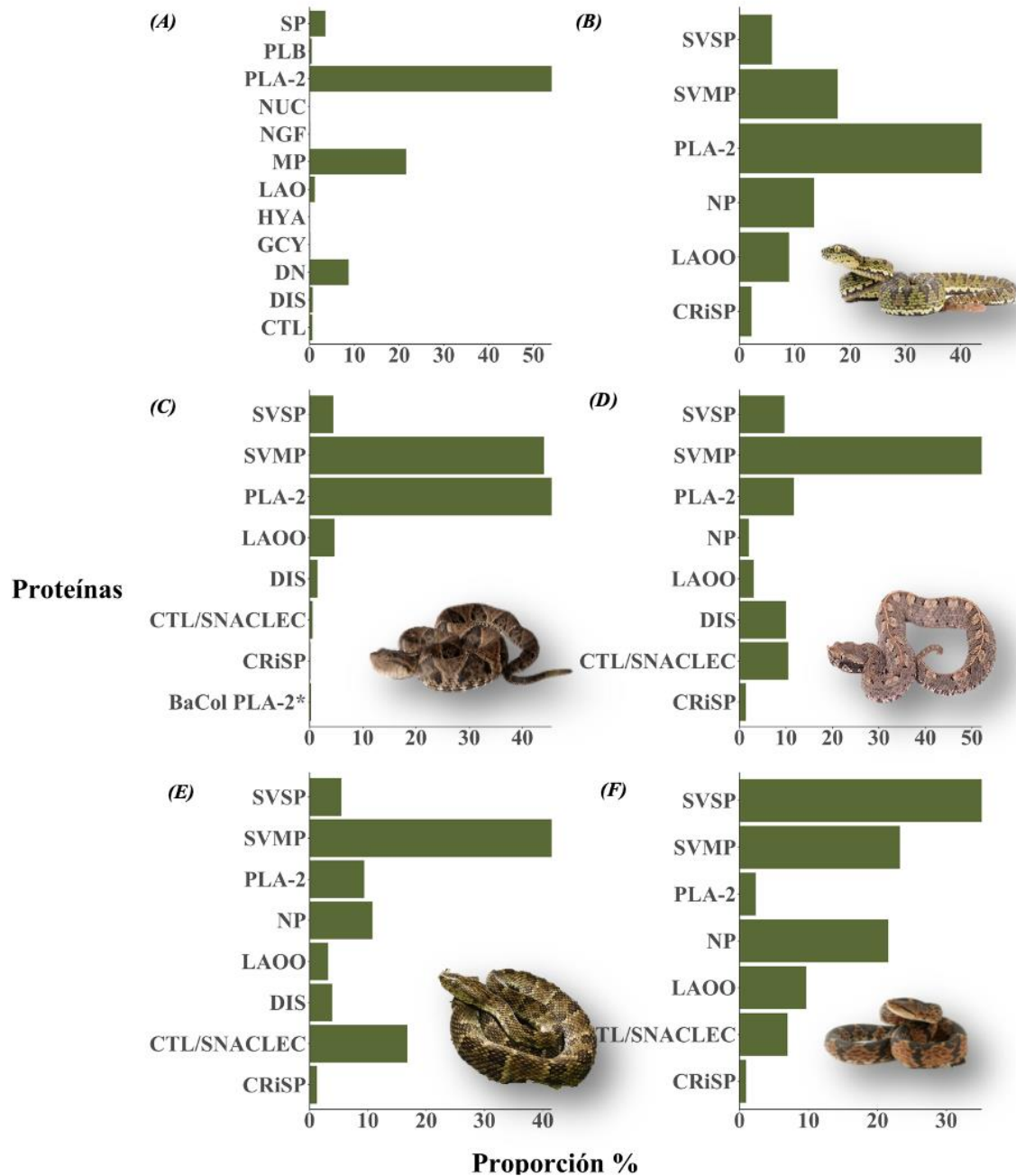


Figura 5. Principales familias de proteínas presentes en los venenos para seis especies de Vipéridos de interés clínico en Colombia y Valle del Cauca. (A) *Bothrocophias myersi* (Datos tomados de Pereañes et al., 2020)(B) *Bothriechis schlegelii* foto: Rubén D. Jarrín Bioweb. Bio, (C)*Bothrops asper* foto: Omar Torres-Carvajal Bioweb. Bio, (D) *Porthidium nasutum* Gustavo Pazmiño-Otamendi, (E) *Bothrops punctatus* foto: Andrés Calero Bioweb. Bio, (F) *Lachesis acrochorda* foto: Mónica Gómez. SV/SP: Serina Proteasa, SVMP:



*Metaloproteasas, PLA-2: Fosfolipasa-A2, NP: Péptido Natriuretico, LAOO L-Amino acidooxidasa, CRiSP: Proteína Secretora Rica en Cisteína, DIS: Desintegrina, CTL/SNACLEC: Lectina Tipo C-Similar a Lectinas Tipo C, BaCol PLA-2: Fosfolipasa-A2 Ácido Miotóxica, PNP: Péptidos o componentes no proteicos, NUC: Nucleotidasas, HAY: Hialuronidasa, GCY: Glutamil ciclasa, PLB: Fosfolipasa-B, NGF: Factor de Crecimiento Nervioso*

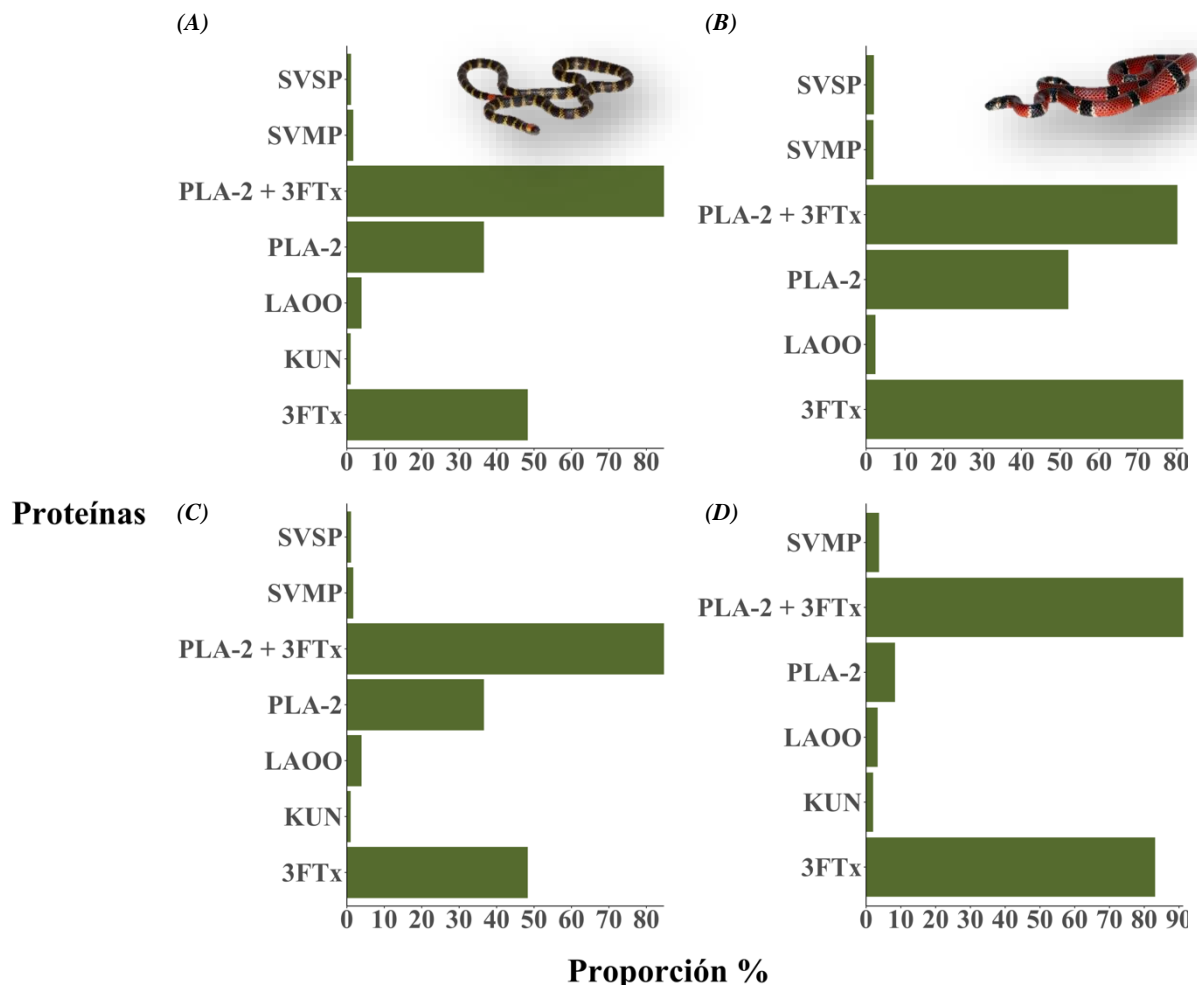


Figura 6. Principales familias de proteínas presentes en los venenos para cuatro especies de Elápidos de interés clínico en Colombia y Valle del Cauca; (A) *Micrurus mipartitus* foto: Morley Read Bioweb.bio, (B) *Micrurus dumerilii* foto: Santiago R. Ron Bioweb.bio, (C) *Micrurus clarki*, (D) *Micrurus multifasciatus*. SVSP: Serina Proteasa, SVMP: Metaloproteasas, 3FTx: Toxina de Tres Dedos, PLA-2: Fosfolipasa-A2, PLA-2+3FTx: proporción de veneno completo formado por estas dos familias de proteínas, LAOO: Amino acidooxidasa, KUN: Péptido tipo Kunitz.

Tabla 1. Tipos de variación en la composición de venenos para las especies de interés clínico distribuidas en Colombia en diferentes regiones biogeográficas. \* comparaciones con poblaciones de países diferente a Colombia, NE Localidad no especificada.

Especies/ Géneros	Región	Departamento	Tipo Variación	Fuente
<i>Bothriechis schlegelii</i>	Pacífica	Cauca	Geográfica	Niño-Pérez 2018
	Andina	Risaralda		
	Andina	Antioquia	Geográfica*	Prezotto-Neto et al. 2016
<i>Bothrops asper</i>	Andina	Tolima	Geográfica	Niño-Pérez 2018
	Caribe	Cesar		
	Pacífica	Cauca		
	Andina	Antioquia	Ontogénica	Saldarriaga et al. 2003
<i>Bothrops atrox</i>	Amazonia	NE	Geográfica	Niño-Pérez 2018
	Orinoquia	NE		
	Orinoquia	Meta	Geográfica*	Núñez et al. 2009
	Valle interandino	Magdalena	Geográfica*	Calvete et al. 2011
<i>Crotalus durissus</i>	Andina	Tolima	Geográfica	Niño-Pérez 2018
	Caribe	Cesar		
	Orinoquia	Meta		
<i>Lachesis acrochorda</i>	Pacífica	NE	Geográfica	Madrigal et al. 2012
	Valle interandino	Magdalena		
	Orinoquia	Meta		

	Pacífica	Cauca		
	Pacífica	Antioquia	Geográfica*	Otero et al. 1998
Lachesis muta	Valle interandino	Magdalena	Geográfica*	Pla et al. 2013
<i>Porthidium spp.</i> ( <i>lansbergii-nasutum</i> )	Andina + Pacífica	Antioquia+Risaralda	Inter-específica	Niño-Pérez 2018
<i>Porthidium lansbergi</i>	Caribe	Atlántico	Intra-específica	De arco-Rodríguez et al. 2019
<i>Micrurus mipartirus</i>	Andina	Antioquia	Geográfica*	Rey-Suárez et al. 2012
	Andina	Antioquia	Ontogénica	Duque et al. 2016

## Perspectivas para el Valle del Cauca

La OMS establece que para la producción de sueros antiofídicos adecuados es necesario incluir mezclas de venenos de diferentes orígenes geográficos y edades, en función del grado de variación intra-específica de las especies de interés (OMS 2018). Lo anterior plantea la necesidad de establecer una preparación de veneno de referencia nacional o regional que pueda ser usada para ensayar la capacidad de neutralización de los antivenenos; considerando los siguientes factores (OMS 2018, Niño-Pérez 2018):

- Región geográfica en la cual será implementado el suero antiofídico.
- Especies de importancia médica de la región de interés y énfasis en la variabilidad de la composición de los venenos en el rango distribución de estas especies.
- Información de neutralización cruzada de los sueros antiofídicos contra venenos de especies no incluidas en la mezcla de inmunización.

Para el Valle del Cauca, varios de los aspectos anteriormente mencionados son poco conocidos. En este contexto, es necesario establecer una línea base de evaluación la composición de los venenos a diferentes escalas, con el objetivo de sustentar el diseño de inmunización de mezclas de veneno que se implementan en la producción de los antivenenos poliespecíficos adecuados para diversas áreas geográficas (Niño-Pérez 2018).

### 3. BIONOMÍA

#### Contexto general dieta de serpientes

La bionomía de ecología trófica se define como el estudio de la estructura de las relaciones alimenticias entre los organismos y su entorno. Entre los aspectos que dictan los parámetros básicos que componen la ecología trófica de las especies se encuentran el tipo de presa y los mecanismos para conseguirla; estos factores modulan el crecimiento, supervivencia y reproducción. De igual forma, los procesos relacionados con la búsqueda, obtención y consumo de recursos alimenticios regulan las interacciones a nivel intra e inter específico (Marti et al. 1993) y están relacionados con características comportamentales y morfológicas de las especies. Para el caso de las serpientes, su ecología trófica conlleva patrones particulares asociados a variabilidad morfológica, fisiológica, modo de forrajeo y el contexto histórico (filogenia). Presentan una variedad de adaptaciones, por ejemplo, algunos grupos tienen un sistema de producción e inyección de veneno, fuerza corporal extrema en relación a su tamaño corporal y una alta capacidad de expansión del cráneo (Bolívar-García et al. 2019). Presentan dos modos principales de forrajeo: *Forrajeo activo*, en el cual la búsqueda de presas se lleva a cabo en áreas extensas y el segundo modo, se denomina, *Caza al acecho*, en esta los individuos esperan en sitio, hasta que una presa este a su alcance y la atrapan (Bolívar-García et al. 2019).

Las serpientes, dependiendo de la complejidad de la red trófica son consideradas como consumidores secundarios, terciarios o depredadores topos (Lynch et al. 2014). El tipo de dieta de las serpientes, esta regulado por factores intrínsecos a los individuos y especies tales como: el tamaño corporal, proporciones de la cabeza y dentición; debido a la falta de capacidad para reducir el tamaño de las presas por masticación, presentan preferencia por determinados ítems alimenticios; en este contexto, la movilidad de las mandíbulas y los huesos del cráneo, modulan, la forma y masa del tipo de recursos a los que pueden acceder (Bolívar-García et al. 2019). En general, las serpientes presentan una dieta carnívora con un amplio espectro de presas de distintos niveles taxonómicos (Lynch et al. 2014). Sin embargo, sus hábitos alimenticios permiten clasificarlas en dos categorías; la primera, son las serpientes fosoriales del infraorden Scolecophidias (Anomalepididae, Typhlopidae y Leptotyphlopidae), cuya alimentación abarca presas pequeñas de cuerpo blando como huevos y pulpas de hormigas, termitas y lombrices de tierra; estas especies de serpientes deben sus hábitos alimenticios a que presentan un cráneo fijo con pocas modificaciones, boca pequeña y dentición limitada (Lynch et al. 2014, O'Shea 2018). La segunda categoría corresponde a las serpientes no fosoriales, agrupadas en el clado Macrostromata la cual incluye la mayoría de especies; en contraste con las Scolecophidias, las modificaciones craneales les permiten a estas especies una gran flexibilidad para la ingesta de presas grandes. Por lo tanto, el espectro de dieta de las Macrostromata es mucho más amplio pues incluye: lombrices, artrópodos, moluscos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Lynch et al. 2014).



## Estrategias de alimentación en serpientes

La variación en el tipo de dieta de las especies de serpientes en función de la variabilidad morfológica, conlleva diferentes tipos de estrategias para la captura de las presas; que pueden clasificarse entre mecánicas (constricción y sujeción) y químicas (veneno); las cuales son el resultado de múltiples factores como la integración genética, las interacciones con el ambiente (Arnold 2001, Rodríguez-Robles et al. 1999), las limitantes fisiológicas y las limitantes morfológicas (Shine 1991, Madsen y Shine et al. 1993, Shine et al. 2002). Cada una de estas estrategias representa un costo energético por parte del depredador por lo que los beneficios nutricionales de la dieta deben exceder todos estos costos para permitir que el depredador pueda sobrevivir y reproducirse (Greene 1984).

La estrategia química confiere ciertas ventajas sobre la estrategia mecánica, debido a que el riesgo de las serpientes constrictoras es más alto consecuencia que están en contacto constante con la presa, lo que aumenta la probabilidad de sufrir lesiones (Mackessy y Saviola 2016). Por lo tanto, la aparición y evolución de la estrategia química o el veneno, presente en las familias Viperidae, Elapidae y algunas especies de la familia Colubridae (Mackessy y Saviola 2016) está estrechamente relacionada con la efectividad en la captura de presas y las funciones defensivas del depredador (Lillywhite 2014). Además, algunas serpientes venenosas pueden llegar a ingerir presas que excedan hasta en un 50% su masa corporal (Greene 1984) gracias a la movilidad que presentan la mandíbula y los huesos del cráneo (Lynch *et al.* 2016). De esta manera, cubren sus necesidades alimenticias en un solo evento de captura, evitando los riesgos de depredación y gasto energético, que implica cazar presas

pequeñas en repetidas ocasiones (Mociño-Deloya 2015, Campbell y Lamar 2004, Loughran et al. 2013).

### **Variación dieta a nivel ontogénico y poblacional**

El tipo de dieta de las serpientes esta modulado por factores intrínsecos a los individuos y las especies en su rango de distribución; particularmente por atributos morfológicos tales como: tamaño corporal, proporciones de la cabeza, la dentición incluso dimorfismos sexual. Esto conlleva a una variación ontogénica, regulada principalmente por el tamaño y longitud de los individuos, que limitan el tamaño y tipo de presa que pueden ingerir; el patrón más común en serpientes es la variación ontogénica de presas pequeñas (e.g invertebrados) a grandes (e.g vertebrados con mayor aporte energético) conforme se da la transición de juvenil-adulto (Bolívar-García et al. 2019).

La variación en la dieta no solo se evidencia a nivel ontogénico. Investigaciones han determinado que algunas especies pueden presentar variaciones alimenticias a lo largo de su rango de distribución (Glaudas et al. 2008) consecuencia de cambios e aspectos de su historia natural y la disponibilidad de presas (Greene 1984). Por ejemplo, en un estudio, realizado por Mociño-Deloya (2015), se reportan diferencias significativas en la dieta de una de tres poblaciones de *Crotalus polystictus*. El resultado se asoció con cambios en la disponibilidad de presas y el tipo de hábitat pues la población de serpientes, en cuestión, estaba ubicada a una mayor altura con poca productividad vegetal. De igual manera, Mociño-Deloya (2015) reporta variaciones intra-poblacionales debido al dimorfismo sexual expresadas en el tamaño

corporal y de la cabeza de las serpientes. Es decir, aunque ambos sexos hacían uso de roedores, los machos consumían mamíferos de mayor tamaño, como conejos y ardillas. En este estudio también se expone que poblaciones de *Crotalus willardi* de la Sierra San Luis y la Sierra Pan Duro consumen presas pequeñas como ciempiés y lagartijas tanto en estados juveniles como de adulto, mientras que poblaciones de esta misma especie ubicadas en Estados Unidos, presentan preferencias por presas más grandes en estado de adultez.

### **Métodos para la evaluación de dieta en serpientes**

Conocer la dieta y estrategias de alimentación de las serpientes es importante en la medida en que esta información es una herramienta para la conservación y manejo, tanto de las especies presa como del ensamblaje de depredadores (Serrano 2000). No obstante, pese a su importancia, la información sobre los hábitos alimenticios de las serpientes es escasa, principalmente porque son organismos discretos, difíciles de observar mientras se están alimentando (Campbell y Lamar 2004, Hamilton et al. 2012), y por la baja densidad de algunas especies, se dificulta la obtención de una muestra representativa que permita abarcar todo el espectro de la dieta (Mociño-Deloya 2015). En el caso de las especies de la familia Viperidae, los datos que actualmente se tienen señalan que su alimentación abarca desde artrópodos, anfibios y reptiles, hasta organismos homeotérmicos como aves y mamíferos (Lynch et al. 2014, O´Shea 2018), mientras que, la dieta de la familia Elapidae está compuesta principalmente por reptiles incluyendo otras serpientes (Lillywhite 2014).

Actualmente, algunas de las técnicas que se utilizan para conocer la dieta de los ofidios son las observaciones directas (Mociño-Deloya y Setser 2007, Loughran et al. 2013), la regurgitación (Ávila-Villegas et al. 2007), el análisis de muestras fecales en busca de ítems alimenticios (Mociño-Deloya et al. 2008), las técnicas moleculares para la extracción de ADN de muestras fecales (Kartzinel y Pringle 2014), la extracción y el análisis de tubos digestivos de ejemplares depositados en colecciones (Meza-Ramos et al. 2010, Glaudas et al. 2008), el análisis de animales muertos en carreteras (Dugan y Hayes 2012) y el uso de telemetría (Wittenberg 2012). Particularmente, las técnicas de genética molecular (análisis de ADN por PCR), en ausencia de evidencia morfológica, permiten identificar taxones de presas en el contenido estomacal, intestinal y fecal (Carreon y Heath 2009) con una mayor resolución de la que se podría obtener mediante la observación directa de ítems en la materia fecal. Por consiguiente, la información molecular contribuye a un nuevo nivel de precisión en los estudios de ecología trófica (Karttinen et al. 2010) de manera que, investigadores en los diferentes grupos taxonómicos han optado por el uso de este tipo de técnicas que facilitan la elaboración de perfiles de dieta y reducen la interacción y el daño que puede ocasionarse en la manipulación de los organismos (Pompanon et al. 2012). Además de las ventajas que confiere sobre la ecología trófica en especies difíciles de observar mientras se alimentan (Kartzinel y Pringle 2014).

### **Influencia de la dieta en la variación de los componentes del veneno**

Entre las estrategias de alimentación de las serpientes está el medio químico mediante el uso de veneno, es importante resaltar que al igual que la dieta, éste puede presentar variaciones a

nivel ontogénico y poblacional (Gibbs y Mackessy 2009). Lo que ha permitido plantear que existe cierto grado de relación co-evolutivo que regula la coexistencia de las especies y se refleja en la toxicidad y especificidad de los venenos en distintos tipos de presas (Mackessy y Saviola 2016).

Existen un amplio número de investigaciones, que han establecido variación estructural de los venenos a diferentes escalas biológicas; las cuales incluyen variabilidad, ontogénica (entre individuos), intra-específica (poblacional) o inter-específica (especies) (Campbell y Lamar 2004, Mackessy 2016, Phuong et al. 2016). El cambio en la composición de los venenos se ha asociado a fuentes como: filogenia, etapa de desarrollo (juveniles-adultos-sexo), distribución geográfica, variación estacional y ecología trófica (Mackessy 2016); siendo el tipo de dieta, un factor relevante a considerar en los cambios en la composición del veneno, a partir relaciona directamente con la capacidad de una especie para capturar y aprehender las presas; la cuales potencialmente son sensibles a varios tipos de toxinas (Mackessy 2003, Gibbs et al. 2011, Mackessy 2016). Bajo la premisa que las serpientes desempeñan un rol significativo en un área particular, es posible plantear la existencia de algún tipo de ajuste co-evolutivo entre las especies depredadoras y presas; en diferentes zonas geográficas; reflejado en la configuración de la efectividad del veneno a una presa particular, es decir toxicidad específica para el taxón de los venenos o sus componentes (Mackessy 2016).

Los cambios en la composición y estructura de los venenos, generan diferentes mecanismos de acción, esto presenta un valor biológico intrínseco la caracterización de la variabilidad

ontogénica de veneno de las serpientes también tiene implicaciones para entender las características de los envenenamientos en humanos (Alape-Girón 2008); Por ejemplo Sasa et al. (2009), en un análisis de la letalidad del veneno de *Bothrops asper* en ratones y ranas, plantean que el veneno de los adultos al parecer es menos letal que el de los juveniles para organismos ectotérmicos. Una relación similar entre la toxicidad del veneno y presa preferida se observó para numerosas especies de serpientes de coral sudamericanas (da Silva y Aired 2001); lo anterior sustenta el planteamiento de la preferencia del tipo de presa, determina los tipos de proteínas de veneno que emplea una especie. Bajo este contexto, es posible realizar investigaciones, asociadas a la relación entre a preferencia de dieta y la composición del veneno en serpientes; lo anterior ha sido abordado desde dos enfoques o hipótesis: (1) *la preferencia de presa debe determinar los componentes del veneno* y (2) *la amplitud de la dieta debe estar correlacionada positivamente con la complejidad del veneno* (Mackessy 2016).

Para el caso de los Vipéridos y Elápidos, diferentes investigaciones, han determinado para algunas especies variaciones geográficas en la dieta, mientras que otras registran ítems alimenticios similares a través de su rango de distribución (Mociño-Deloya 2016). Por ejemplo, Gutiérrez et al. (1980) y Saldarriaga et al. (2003); determinaron cambios ontogénicos en la dieta de juveniles y adultos desde presas de sangre fría (ranas y lagartos) a sangre caliente (mamíferos); junto con variaciones en las actividades tóxicas y enzimáticas de los venenos de *Bothrops asper*, en poblaciones de Costa Rica y Colombia respectivamente (Alape-Girón 2008); Saldarriaga et al. (2003) evaluando la variabilidad del veneno en

individuos entre 0-6 meses y 1-3 años de *Bothrops asper*, en Antioquia, y *Bothrops atrox*, en Meta, encontró una importante variabilidad ontogénica para cada especie, en la que los venenos de los especímenes juveniles presentaron mayor actividad letal (hemorrágicos y formadores de edema) que la de los especímenes adultos. La diferencia más significativa se dio en las serpientes *Bothrops asper*. Terán y Lomonte (2016) en su estudio sobre la letalidad de seis especies de Vipéridos del Ecuador, demuestran variaciones importantes en la actividad letal de los venenos, relacionada con factores como el origen geográfico, la variabilidad individual y la ontogenia (Ford y Hampton 2009).

Para caso de las serpientes de coral del género *Micrurus*, Da Silva y Aired (2001), evaluaron la toxicidad del veneno de 15 especies sobre presas con mayor tasa de consumo y plantean que los venenos presentaron una actividad más letal (toxicidad específica mayor) sobre las presas consumidas con regularidad que sobre poco frecuentes. Rey-Suarez et al. (2012) comprobaron que las especies de *Micrurus* que se alimentan de un espectro amplio de presas pueden presentar un patrón de veneno más complejo que las especies que presentan preferencias por un número limitado de presas.

### Contexto Colombiano

La variabilidad geográfica del veneno asociada al tipo de dieta, puede tener un impacto en el tratamiento de las víctimas de mordeduras y en la selección de especímenes para la producción de antivenenos (Alape-Girón 2008); por ejemplo, *Bothrops asper* es considerada una especie de hábitos alimenticios oportunistas o generalistas, es decir un rango más amplio

de presas con mayor incidencia en los adultos, lo cual le puede proveer, venenos más complejos o diversos. Estos cambios a nivel inter-específico, plantea la necesidad de evaluar la relación entre dieta y veneno, teniendo en cuenta sus posibles implicaciones en los accidentes ofídicos. Sin embargo, para Colombia el estado actual de conocimiento para grupos como Vipéridos y Elápidos, es fraccionado en temas tales como: cambios en la dieta asociados a la variación estacional del recurso alimenticio o variaciones poblacionales en el tipo de dieta.

Considerando lo anterior, y la importancia de generar conocimiento sobre las diversas especializaciones de las dietas que modulan la composición y los sistemas de administración de veneno (Lillywhite 2014) y que esta diversidad repercute directamente en el conocimiento sobre accidentes ofídicos. Esta investigación permitió aportar conocimiento sobre la ecología trófica de las serpientes venenosas de las familias Viperidae y Elapidae con distribución en el Valle del Cauca. Esta investigación representa el primer acercamiento a nivel nacional donde emplean herramientas moleculares para estimar la dieta de las serpientes venenosas e intentar realizar asociaciones con posibles cambios en la composición de los venenos.

En un esfuerzo por enlazar los aspectos que se encuentran implicados en el accidente ofídico, el presente estudio tuvo como objetivo identificar factores asociados con la toxínología de los venenos y la bionomía de las serpientes de las familias Viperidae y Elapidae que causan la mayor cantidad de accidentes ofídicos en el Valle del Cauca.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

El trabajo de campo se realizó en diferentes localidades rurales del departamento del Valle del Cauca, abarcando las cuatro ecorregiones: región Pacífica (*El Placer-Dagua, La Cascada-Dagua, Hidroeléctrica CELSIA-Buenaventura, Chucheros-Buenaventura, La Esperanza-Buenaventura*); región Occidental (*El Peón-Jamundí, Fenicia-Riofrío, Salónica-Riofrío, El Saladito-Cali, El Minuto-Cali*), Valle Interandino (*Andinópolis-Trujillo*) y región Central (*El Pomo-Cerrito, Tenjo-Palmira*) (Figura 7).

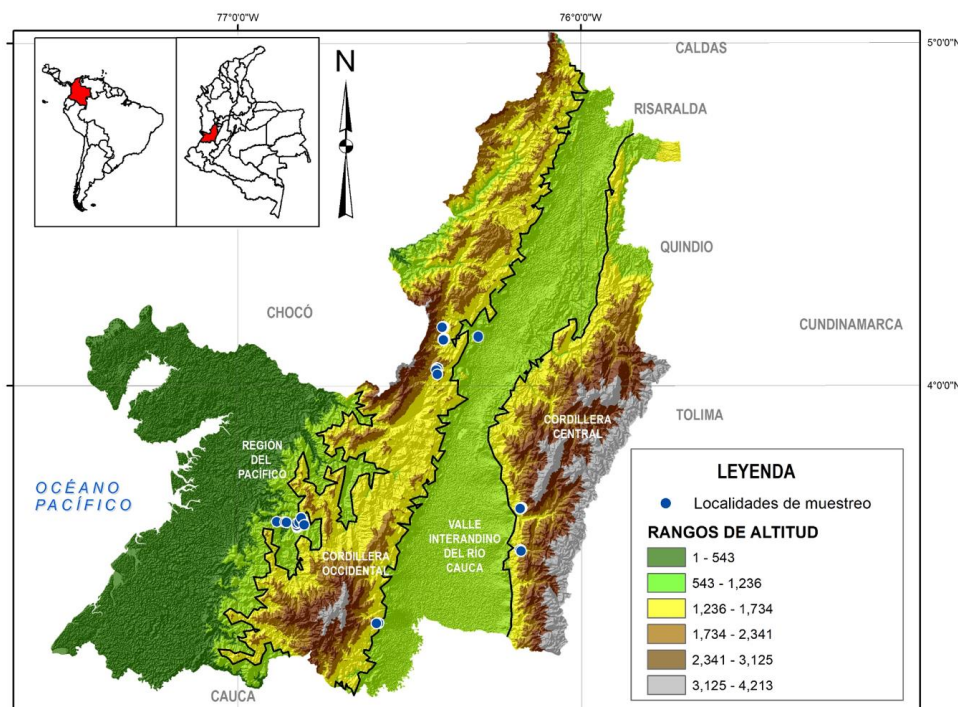


Figura 7. Localidades de muestreo en las cuatro ecorregiones del Valle del Cauca. Elaborado por Luz Ángela Flórez

#### 4.1 TOXINOLOGÍA

La captura, manipulación e identificación de serpientes fue realizado por biólogos herpetólogos de la Universidad del Valle, Cali (Figura 9, Figura 11). Se emplearon todos los elementos de bioseguridad necesarios (botas, ganchos herpetológicos, pinzas herpetológicas, bolsas de tela de diferentes tamaños, linternas, etc.). Se registró cada serpiente observada, venenosa y no venenosa. En caso de ser venenosas se procedió a las extracciones de veneno en campo, y cada individuo se liberó nuevamente en el sitio de colecta. En caso de ser encontradas muertas, se intentó hacer extracción de veneno, se colectó y el espécimen se ingresó a la Colección de Prácticas Zoológicas de la Universidad del Valle.



*Figura 8a. Paisajes y trabajo de campo realizado por biólogos y estudiantes con experiencia en manipulación y manejo de herpetos.*





*Figura 9b. Paisajes y trabajo de campo realizado por biólogos y estudiantes con experiencia en manipulación y manejo de herpetos.*



*Figura 10a. Paisajes y trabajo de campo realizado por biólogos y estudiantes con experiencia en manipulación y manejo de herpetos.*



*Figura 11b. Paisajes y trabajo de campo realizado por biólogos y estudiantes con experiencia en manipulación y manejo de herpetos.*

La extracción de veneno se realizó de dos maneras dependiendo del tamaño de la serpiente: para las de un tamaño superior a 50 cm, se emplearon frascos de vidrio cubiertos con papel parafilm, de manera que el individuo mordiera sobre dicho papel y simultáneamente, mientras se realizaba un masaje manual sobre las glándulas, el veneno se recoge dentro del recipiente (Figura 12). Seguidamente y empleando una micropipeta, se traspasa el contenido a tubos eppendorf. Para las pequeñas (< 50 cm), se ubicaron los colmillos dentro de un tubo colector de veneno (eppendorf) (Figura 13), lo que permitió masajear las glándulas manualmente drenando el veneno directamente al tubo. Una vez obtenido el veneno, se almacenó en nitrógeno líquido y se trasladó a las instalaciones de la Universidad del Valle donde se procedió con la liofilización.





*Figura 12. Extracción de veneno de Bothrops asper en la localidad de El Placer, Anchicayá. Posteriormente liberada.*



*Figura 13. Extracción de veneno de Micrurus mipartitus colectada en la región Occidental.*

## Electroforesis en SDS-PAGE y cromatografía HPLC

Para la electroforesis se utilizaron cámaras de electroforesis verticales, gel de poliacrilamida al 12.5% (gel de corrida + gel de apilamiento), azul de Coomassie R-250 para la tinción y Wide Range de sigma, un marcador de peso molecular de amplio rango. Los venenos se procesaron a una concentración de 50 ug/uL y para la correcta separación de las proteínas se usó el método de *condiciones reductoras*, el cual evita las interacciones, rompe puentes y separa las subunidades de las moléculas, ayudando a que el peso molecular de lo que se ve expresado en el gel sea más real. Se sembraron 3 uL de marcador molecular y 15 uL de cada muestra de veneno.

La composición de los venenos se analizó siguiendo la estrategia de Calvete (2011) con ligeras modificaciones (Lomonte et al. 2014b). Se disolvió veneno (2 mg) en 200 µl de agua que contenía ácido trifluoroacético (TFA; solución A) al 0,1% y se sometió a cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) en una columna C18 (250 x 4,6 mm, 5 partícula µm; Teknokroma) utilizando un cromatógrafo Agilent 1200. La elución se realizó a 1 ml / min aplicando un gradiente hacia la solución B (acetonitrilo, que contiene TFA al 0,1%), como sigue: 0% B durante 5 min, 0-15% B durante 10 min, 15-45% B durante 60 min, 45-70% B durante 10 min y 70% B durante 9 min [16]. Las fracciones se recogieron manualmente, se secaron en una centrífuga de vacío y se separaron adicionalmente mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (2-mercaptoetanol al 5% a 100 ° C durante 5 min), usando geles al 12%. Las abundancias relativas de proteínas se estimaron mediante la integración de señales de pico a 215 nm utilizando el software ChemStation® (Agilent).

Cuando un pico de HPLC contenía dos o más bandas de SDS-PAGE, su distribución relativa se estimó por densitometría utilizando el software ImageLab® (Bio-Rad).

### **Caracterización de las fracciones de veneno RP-HPLC-Proteómica**

Las bandas de proteína se escindieron de los geles teñidos con azul de Coomassie R-250 y se sometieron a reducción (ditiotreitól 10 mM) y alquilación (yodoacetamida 50 mM), seguido de digestión en gel durante la noche con tripsina bovina de grado de secuenciación (en bicarbonato amónico 50 mM) 37 ° C. Los péptidos trípticos se extrajeron con acetonitrilo al 50% que contenía TFA al 1% y se analizaron mediante MALDI-TOF-TOF en un analizador de proteómica AB4800-Plus (Applied Biosystems).

Los péptidos se mezclaron con un volumen igual de ácido  $\alpha$ -ciano-hidroxicinámico saturado (en acetonitrilo al 50%, TFA al 0,1%) y se colocaron (1  $\mu$ l) en una placa Opti-TOF de 384 pocillos, se secaron y analizaron en modo reflector positivo. Los espectros de TOF se adquirieron utilizando 1500 disparos y una intensidad de láser de 3000. Los 10 iones precursores más intensos se seleccionaron automáticamente y sus espectros de fragmentación de TOF / TOF se adquirieron utilizando 500 disparos a una intensidad de láser de 3900. La calibración externa en cada serie se realizó con Estándares CalMix® (ABSciex) manchados en la misma placa. Para la identificación de proteínas, los espectros resultantes se buscaron en la base de datos UniProt / SwissProt utilizando ProteinPilot® v.4 y el algoritmo Paragon® (ABSciex) con una confianza  $\geq 95\%$ , o se interpretaron manualmente. Se realizaron búsquedas manuales en pocas secuencias de péptidos con puntuaciones de confianza más bajas mediante BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para determinar la similitud de

proteínas y la asignación de familias de proteínas. Las muestras que dieron lugar a identificaciones negativas se limpiaron más con micro-C18 ZipTips® (Millipore) y se volvieron a analizar como se describe.

Las fracciones de RP-HPLC correspondientes a péptidos pequeños (eluyendo en los picos iniciales del cromatograma) se analizaron mediante nESI-MS / MS en un instrumento Q-Trap® 3200 (Applied Biosystems). Se cargaron muestras (10 µl) en puntas capilares recubiertas de metal (Proxeon) y se infundieron directamente en una fuente nano-ESI operada a 1300 V. Los iones de péptidos se fragmentaron por disociación inducida por colisión utilizando la herramienta Enhanced Product Ion con atrapamiento de Q0. Los ajustes para los análisis de MS / MS fueron: Q1, resolución unitaria; energía de colisión, 25–45 eV; tiempo de llenado de la trampa de iones lineal Q3, 250 ms; y tasa de exploración Q3, 1000 amu / s. Los espectros CID resultantes se interpretaron manualmente.

### **Letalidad del veneno**

La potencia letal del veneno se evaluó mediante inyección intraperitoneal, en grupos de cuatro ratones de 16 a 18 g de peso corporal. Las muertes inducidas por la inyección de diferentes dosis de veneno, disuelto en solución salina tamponada con fosfato (PBS; NaCl 0,12 M, tampón fosfato sódico 0,04 M, pH 7,2), se registraron después de 48 h. La dosis letal mediana (LD<sub>50</sub>) se calculó mediante probits (Finney 1971), utilizando el software BioStat® (AnalySoft).



### **Actividad miotóxica**

Se inyectó veneno (50 µg en 50 µl de PBS) en el músculo gastrocnemio de grupos de cuatro ratones (18-20 g). Un grupo de control recibió una inyección de PBS solo. Después de 3 h, se recogió sangre de la punta de la cola en capilares heparinizados, y se determinó la actividad de la creatina quinasa (CK) en plasma usando un ensayo cinético UV (CK-Nac, Analyticon). Seis horas después de la inyección, los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO<sub>2</sub> y se obtuvieron muestras de tejido muscular inyectado para el procesamiento histológico de secciones fijadas con formalina, tinción con hematoxilina-eosina y evaluación microscópica (Gutiérrez et al. 1986).

### **Actividad hemorrágica**

Grupos de cinco ratones (18-20 g) recibieron una inyección de veneno intradérmico (3 µg en 100 µl de PBS) en la piel abdominal. Después de 2 h, los animales fueron sacrificados y se les quitó la piel para medir las áreas hemorrágicas.

### **Actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub>**

La actividad de PLA<sub>2</sub> se ensayó en el sustrato cromogénico sintético monodisperso ácido 4-nitro-3-octanoiloxibenzoico (NOBA), y en fosfatidilcolina micelar (PC) mediante el método colorimétrico con rojo fenol (Araújo y Radvanyi, 1987). En el primer caso, se mezclaron 25 µl que contenían diversas cantidades de veneno con 200 µl de Tris 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 0,1 M, pH 8,0 y 25 µl de NOBA para lograr una concentración final de sustrato de 0,32 mM. Las placas se incubaron a 37 ° C durante 60 min y las absorbancias se registraron a 405

nm en un lector de microplacas. La actividad de PLA2 se expresó como el cambio en la absorbancia  $\times 1000$ . En el segundo método, se agregaron 20  $\mu\text{l}$  que contenían 0,6 a 5  $\mu\text{g}$  de veneno a 1 ml de sustrato (0,25% p / v de sn-3-fosfatidilcolina, 0,4% v / v Triton X-100, 0,004% p / v de rojo fenol) en una cubeta termorregulada a 30 ° C. La disminución de la absorbancia a 558 nm se controló de forma continua durante 1 min. Una unidad de actividad PLA2 se definió como el cambio de 0,001 en absorbancia por minuto. Ambos ensayos se realizaron por triplicado.

### **Actividad coagulante**

El efecto coagulante del veneno se probó añadiendo 20  $\mu\text{g}$  (en 50  $\mu\text{l}$  de PBS) a 200  $\mu\text{l}$  de plasma humano citratado, previamente incubado a 37 ° C. Se añadió PBS solo para controlar las alícuotas de plasma. Se registraron los tiempos de coagulación y se consideró que el veneno carecía de actividad coagulante si no se observaba coagulación después de 30 min de incubación. Los ensayos se realizaron por duplicado.

### **Actividad proteolítica**

Se agregaron cantidades variables de veneno (1.3-40  $\mu\text{g}$ ) a 100  $\mu\text{l}$  de azocaseína (10 mg / ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.15 M, tampón  $\text{CaCl}_2$  5 mM, pH 8.0) y se incubaron durante 90 min a 37 ° C. La reacción se detuvo mediante la adición de 200  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético al 5% y, después de la centrifugación, se mezclaron 150  $\mu\text{l}$  de sobrenadantes con 150  $\mu\text{l}$  de NaOH 0,5 M y se registraron las absorbancias a 450 nm. La absorbancia de la azocaseína

incubada con PBS solo se utilizó como blanco, restando de todas las lecturas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **Antivenómica**

Se entenderá antivenómico como el término asociado a la identificación de proteínas venenosas que contengan epítomos reconocidos por un antiveneno mediante técnicas proteómicas (Lomonte et al. 2008, Calvete et al 2009a, Calvete et al. 2009b). Se disolvieron 2 mg de veneno completo en 70  $\mu$ l de tampón fosfato 20 mM, pH 7.0, se mezclaron con 4 mg de IgG de antiveneno polivalente purificado y se incubaron con agitación suave durante 1 hora a 37° C. La concentración de IgG se determinó espectrofotométricamente usando un coeficiente de extinción ( $\epsilon$ ) de 1.4 para una concentración de IgG de 1 mg / ml a 280 nm, usando una cubeta de longitud de luz de 1 cm. Posteriormente, se agregaron 6 mg de antisuero polivalente del INS en 350  $\mu$ l de tampón fosfato 20 mM, pH 7.0, y la mezcla se incubó durante otra hora a 37 ° C. Los inmunocomplejos se precipitaron por centrifugación a 13.000 rpm durante 30 minutos y el sobrenadante se sometió a separación de fase inversa. Las fracciones de HPLC se caracterizaron empleando un control bajo el mismo procedimiento, exceptuando la inclusión de antiveneno.

### ***Preparación de los sueros antiofídicos***

**Probiol:** En el caso del suero antiofídico de Probiol el cual viene liofilizado, se debe rehidratar en 10 ml de agua milli-q, pasar 10 ml a un tubo Falcon. Se mide la concentración del suero rehidratado en el nanodrop a 280 nm. Posteriormente realizar una centrifuga de 5

minutos a 11400 rpm a 23°C, luego se pasa el sobrenadante a otro tubo Falcon. Se mide la concentración del sobrenadante del suero antiofídico en el nanodrop a 280nm.

**INS-COL:** el suero antiofídico de INS-COL no requiere preparación previa. Se toman 10 ml del suero antiofídico de INS-COL y se mide la concentración en el nanodrop a 280 nm.

## 4.2 BIONOMÍA

### **Especies de serpientes objeto de estudio**

La caracterización de la dieta mediante ADN fecal se centró en once especies (5 especies de la familia Elapidae y 6 especies de la familia Viperidae) de serpientes de interés clínico, las cuales se distribuyen naturalmente en el Valle del Cauca. Para la búsqueda de estas especies; se implementó la técnica de relevamiento por encuentro visual (REV), en un modelo de caminatas libres; todos los recorridos se realizaron en jornada diurna y nocturna entre las 08:00-12:00 y 19:00-23:00 horas. Para la obtención de muestras fecales, los individuos se capturaron manualmente se determinó el sexo y se tomaron medidas morfológicas como longitud rostro cloaca (LRC) y peso. Posteriormente, se depositaron en cajas plásticas, previamente desinfectadas con etanol al 70%; se esperó la deposición fecal espontánea de los individuos de 2-3 días (duración jornadas de campo); las cajas fueron revisadas periódicamente para garantizar la recolección de muestras de manera oportuna antes de que se degradaran; en los casos que no se obtuvo deposición espontánea, se manipuló el individuo realizando un leve masaje ventral desde la parte media del cuerpo hasta la cloaca. Las heces se recogieron con hisopos estériles y se depositaron en tubos Eppendorf que contenían RNA

later®. Finalizado el proceso de toma de muestras, los individuos se liberaron en el sitio de captura.

### **Presas potenciales**

Para los procesos moleculares, bioinformáticos y estadísticos, se siguió la propuesta metodológica de Motta et al. 2021, a continuación, descrita.

Para identificación de las presas potenciales de vertebrados y obtención de muestras de ADN, se implementaron tres aproximaciones. La primera consistió en el registro de individuos en los sitios donde habitan las serpientes de interés; por medio de REV. El segundo método, se basó en revisión de información secundaria, donde se realizó la búsqueda de literatura disponible relacionada con la ecología trófica de las especies de serpientes objeto de estudio. El tercer método consistió en la revisión de contenido estomacal e intestinal de individuos de la familia Viperidae y Elapidae del Valle del Cauca depositados en la Colección de Practicas Zoológica de Docencia de la Universidad del Valle (CPZ-UV). El tracto digestivo se removió a través de una incisión del esófago a la cloaca para ser revisado exhaustivamente. El estómago y el intestino grueso se disectaron en búsqueda de ítems alimenticios (Figura 14). Los contenidos estomacales e intestinales se depositaron en frascos con alcohol al 70% debidamente rotulados para posteriormente examinarlos de manera cuidadosa al estereoscopio. Los ítems encontrados fueron identificados hasta el nivel de orden y especie en la medida que el estado del material lo permitió.

Consolidado los listados de presas a nivel de género, por localidad y zona de vida, se realizó la búsqueda de estas especies en la Colección de Practicas Zoológica de Docencia de la Universidad del Valle (CPZ-UV); con el objetivo de obtener copias de tejidos para la extracción del material genético, procurando que la localidad de colecta del voucher correspondiera al punto de registro en campo o zonas cercanas. En los casos de especies no encontradas en colección. En los casos de especies no encontradas en colección, se obtuvieron las secuencias de ADN del gen 16S en la plataforma del GenBank (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Todas las muestras se congelaron hasta su procesamiento en laboratorio.

### **Librería de referencia presas potenciales**

Para la extracción del ADN de las presas potenciales sin disponibilidad de secuencias en GenBank, se siguió la propuesta metodológica de (Motta-González et al. 2020); donde se utilizó el Kit comercial Blood and Tissue de Qiagen® y se siguieron las especificaciones del fabricante. Mediante espectrofotometría Nanodrop (260 nm) se cuantificó la concentración los productos de la extracción. y se amplificó por PCR un fragmento de 600 pb para el gen 16S con los primers 16SA 5´ CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT 3´ y 16SB 5´ CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T 3´. El protocolo de PCR consistió en una desnaturalización inicial de 94 °C por 4 minutos, anillamiento a 45 °C por 30 segundos y una elongación a 72 °C por 60 segundos, por 35 ciclos, además de una elongación final de 5 minutos a 72 °C. Los fragmentos amplificados se revelaron en gel de agarosa al 1.2% con 1 µl de Gelred ® (Biotium Inc). y se secuenciaron en el GenCore de la Universidad de los Andes. La librería

de referencia de presas contiene secuencias del GenBank y secuencias de ADN extraído a partir de tejido del sitio de interés.



*Figura 14. Revisión de especímenes de serpientes venenosas de la Familia Viperidae y Elapidae del Valle del Cauca depositados en la Colección de Prácticas Zoológicas (CPZ-UV) de la Universidad del Valle.*

### **Extracción ADN muestras fecales serpientes**

Para extracción del ADN presente en las muestras fecales obtenidas de las especies de serpientes; se siguió la propuesta metodológica de (Motta-González<sup>1</sup> et al. 2020). Se utilizó el kit de extracción de ADN DNA Spin Stool de Stratec®; con modificaciones al tiempo de incubación de la muestra en buffer de lisis (18 horas) y la incubación para la remoción de contaminantes (30 minutos, con vortex cada 10 minutos). Los productos de la extracción, se cuantificaron mediante espectrofotometría Nanodrop (260 nm) para detectar la calidad y la



concentración. . Se corrieron reacciones de amplificación (PCR) utilizando los primers VERT (Vences et al. 2016) Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial de 94°C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94° por 30 segundos, anillamiento a 66- 66.5 °C por 30 segundos, extensión a 72°C por 45 segundos y, una elongación final de 72°C por 6 minutos (Motta-González et al. 2020). Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.5%.

Para purificar las muestras se realizaron cortes de bandas en geles de agarosa. y con el kit de purificación en gel Zymoclean®. Posteriormente se llevó a cabo una ligación de barcodes para el marcaje de las muestras.

### Proceso bioinformático

A las lecturas resultantes del proceso de secuenciación, se le removieron los adaptadores con TRIMMOMATIC (Bolger *et al.*, 2014) usando los parámetros slidingwindow 4:25, milen 50 y headcrop 24. Se removieron también secuencias de primer mediante CUTADAPT (Martin, 2011) y luego se hizo un ensamblaje de lecturas paired end mediante VELVET. La replicación, remoción de quimeras y clusterización de las lecturas ensambladas se hizo con VSEARCH de Qiime (Rognes *et al.*, 2016). Para identificar las presas con respecto a la librería de referencia se usó BLAST con un mínimo de solapamiento de secuencias del 95% y un *e*value de  $10^{-3}$  (Altschul *et al.*, 1990), esto para asignar los reads a grupos taxonómicos. Se usó la familia como nivel taxonómico para identificar los OTUs correspondientes a presas y las secuencias resultantes en aciertos de BLAST se asignaron a su respectivo taxa.



## **Análisis estadístico**

Se construyeron matrices de presencia/ausencia para comparar los datos bibliográficos con los datos moleculares; a través del índice de correlación de matrices (rvadjust) del paquete Matrix Correlacion (Hovde et al. 2017) de R (R Core Team).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó un total 17 salidas de campo divididas entre las ecorregiones con base en el número de accidentes ofídicos reportados para las mismas. Región Occidental: 9 salidas de campo. Región Pacífica: 5 salidas de campo. Región Central: 2 salidas de campo. Valle Interandino; 1 salida de campo. Se emplearon 2,500 h/hombre durante los muestreos.

### **Representatividad de serpientes en el Valle del Cauca**

Durante la fase de campo en marco del presente proyecto se registraron 50 individuos, agrupados en seis familias, 25 géneros y 25 especies; el mayor número de capturas se presentó en la ecorregión Pacífica, con 18 especies y el 60% de los individuos, seguida de la región Occidental con 11 y 34% de los registros; las dos zonas restantes (región Central y Valle interandino) presentaron una riqueza y abundancia de especies menor al 5% (Tabla 2).

*Con el objetivo de fortalecer la información asociada a la riqueza y diversidad de serpientes en el departamento, a los registros de campo realizados durante el proyecto se le aunaron los colectados durante los últimos cinco años en diferentes proyectos ejecutados por el grupo de Investigación en Ecología Animal de la Universidad del Valle ( registro de 49 especies de serpientes; 42 no venenosas y 7 venenosas). En conjunto, esta información permite sugerir una representatividad actual del 63.42% de los registros históricos para la riqueza de serpientes en el Valle del Cauca (Figura 13).*

Tabla 2. Riqueza y abundancia relativa de especies de serpientes venenosas y no venenosas, registradas en las salidas de campo llevadas a cabo en el marco del Proyecto.

Ecorregión	Especies	Número de Individuos	Especies No Venenosas	Especies Venenosas
<b>Pacífica</b>	18	30	14	4
<b>Región Occidental</b>	11	17	8	3
<b>Valle Inter-Andino</b>	1	1	1	0
<b>Región Central</b>	2	2	1	1

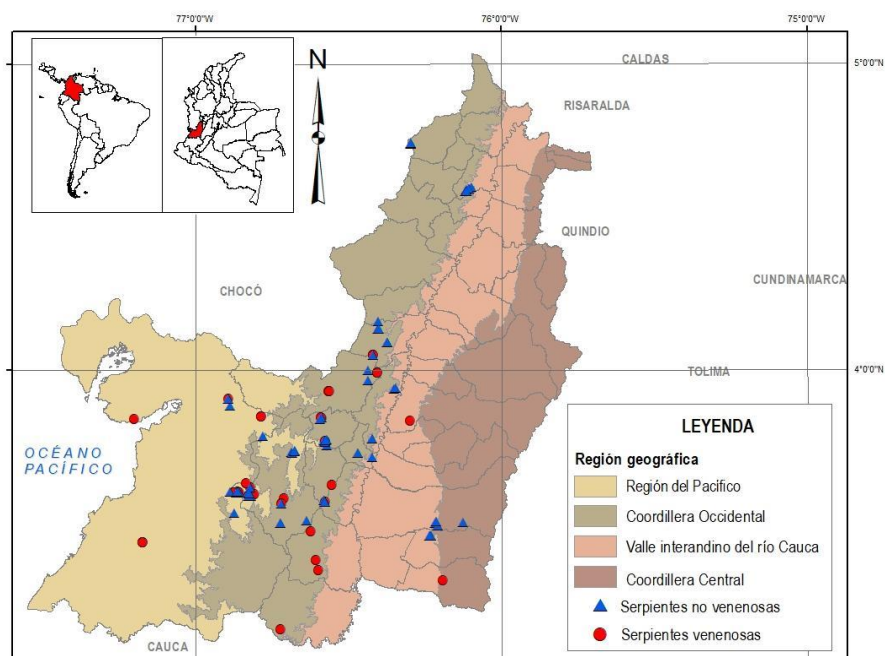


Figura 15. Mapa para la distribución de especies de serpientes venenosas y no venenosas en el Valle del Cauca, datos de presencia obtenidos en los registros realizados en el marco del proyecto e información aportada por el Grupo de Investigación en Ecología Animal de la Universidad del Valle. Mapa Elaborado por Luz Ángela Flórez.

### Representatividad serpientes venenosas

Las jornadas de campo permitieron registrar 26 individuos; con mayor representatividad de la familia Viperidae, correspondientes a cuatro géneros (*Bothrops*, *Bothriechis*, *Lachesis* y *Porthidium*). La especie *Bothrops asper* (equis) presentó el 69.23% de los registros, seguida de *Bothriechis schlegelii* y *Lachesis acrochorda* ambas con el 7.69% y *Porthidium nasutum* con el 3.45%. Para la familia Elapidae, se registró sólo una especie: *Micrurus mipartitus* con dos individuos, equivalentes al 7.69% (Figura 16).

En términos de la distribución por ecorregiones; la región Pacífica presentó la mayor cantidad de registros con 14 individuos y 4 especies, todas pertenecientes a la familia Viperidae (*Bothrops asper*, *Bothriechis schlegelii*, *Lachesis acrochorda* y *Porthidium nasutum*); seguida de la región Occidental con 6 individuos y 3 especies (*Bothrops asper*, *Bothriechis schlegelii* y *Micrurus mipartitus*) y la región Central con un individuo de *Bothrops asper*. Cabe resaltar, que se incluyeron muestras de especies (4 *Bothrops asper* – 1 *Micrurus mipartitus*) encontradas en el Parque Nacional Natural Isla Gorgona; con el objetivo de reforzar y aumentar la cantidad de información para el desarrollo de esta investigación. Los datos fueron facilitados por el Grupo de Investigación en Ecología Animal de la Universidad del Valle, en el marco del proyecto *Monitoreo de Anfibios y Reptiles en el PNN-Isla Gorgona*.

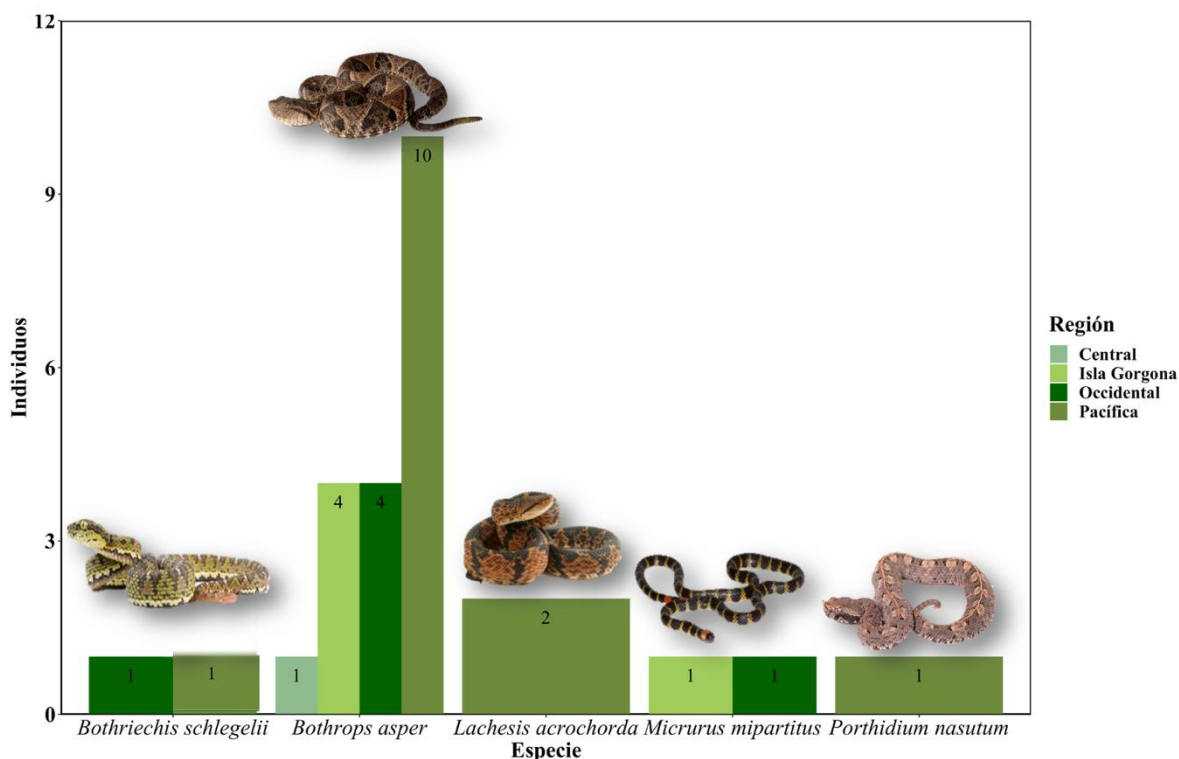


Figura 16. Abundancia por especie de serpiente de interés clínico para le Valle del Cauca, registrada en cada una de las eco-regiones evaluadas durante las salidas de campo. \* Registros de Isla Gorgona, corresponden a muestras facilitadas por el Grupo de Investigación en Ecología Animal de la Universidad del Valle.

### Representatividad de serpientes no venenosas

Para el Valle del Cauca, han sido reportadas aproximadamente 76 especies de serpientes que no se consideran un problema de salud pública, es decir, no son venenosas; agrupadas en seis familias y alrededor de 39 géneros (Cardona-Botero et al. 2013, Cañas et al. 2016). Durante este proyecto, se registraron 29 individuos, pertenecientes a tres familias, 16 géneros y 20 especies; con mayor representatividad en la riqueza en la ecorregión Pacífica con 12 spp, seguida de la región Occidental con 8 spp., y la región Central y Valle Interandino ambas

con 1 spp. En términos de abundancia relativa por especie, se presentó una baja incidencia de captura, entre 1 y 3 individuos (Figura 13(A)).

Para complementar, lo registros de especies se utilizó información del Grupo de Investigación en Ecología Animal de la Universidad del Valle, el cual, en los últimos cinco años, ha registrado para el departamento 143 individuos y 40 especies (Figura 13 (B)).

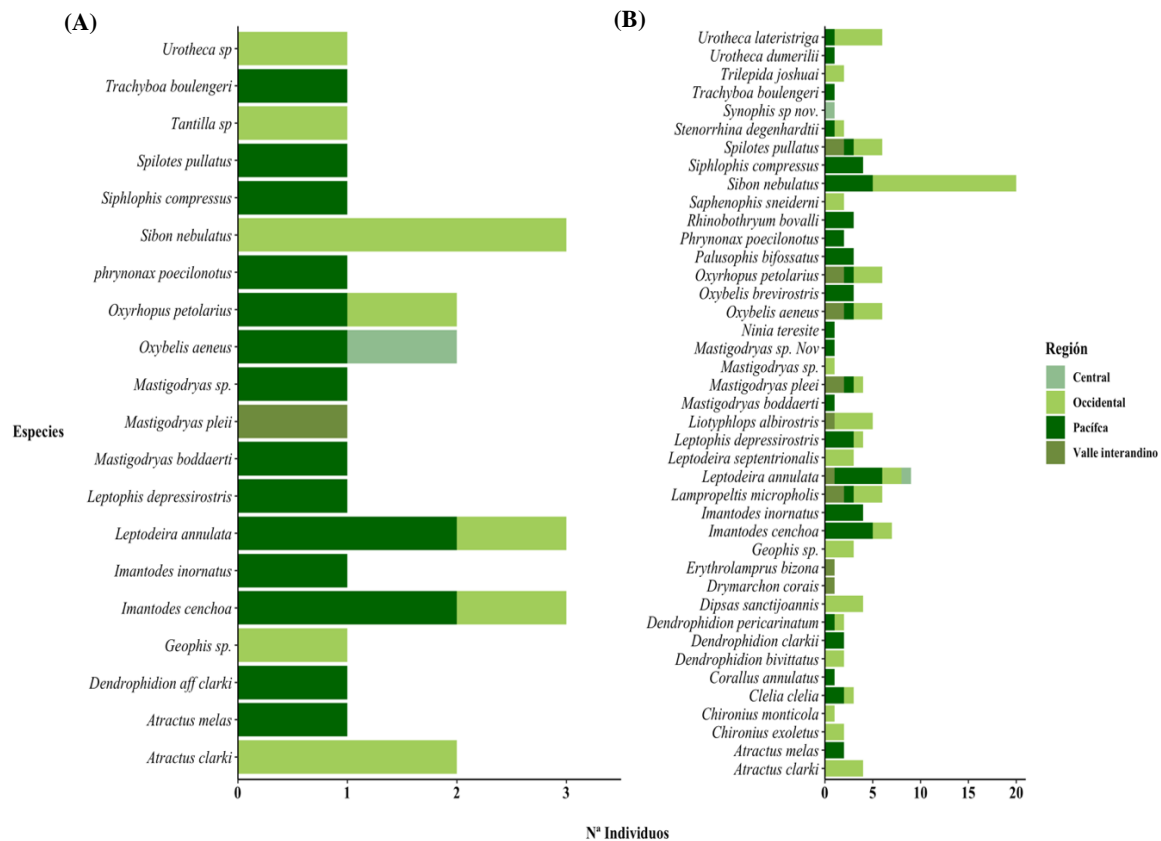


Figura 17. Listado de especies y abundancia para las serpientes no venenosas con distribución en las cuatro eco-regiones del Valle del Cauca. (A) Registro obtenidos en el marco del proyecto durante las salidas de campo. (B) Registros aportados por el Grupo de Investigación en Ecología Animal de la Universidad del Valle

## 5.1 TOXINOLOGÍA

### Muestras de venenos obtenidas

Se obtuvieron 26 muestras de veneno, correspondientes a 20 individuos de cuatro especies. Con mayor representatividad de *B. asper* con el 79.92% del total de muestras, seguida de *B. schlegelii* con 11.53%, *L. acrochorda* 7.69% y *M. mipartitus* 3.84%. Posterior al proceso de liofilización 14 muestras presentaron condiciones idóneas en relación a la cantidad obtenida; para la caracterización de sus componentes: 10 de *B. asper*, 2 *L. acrochorda* y 2 *B. schlegelii* (Figura 18).

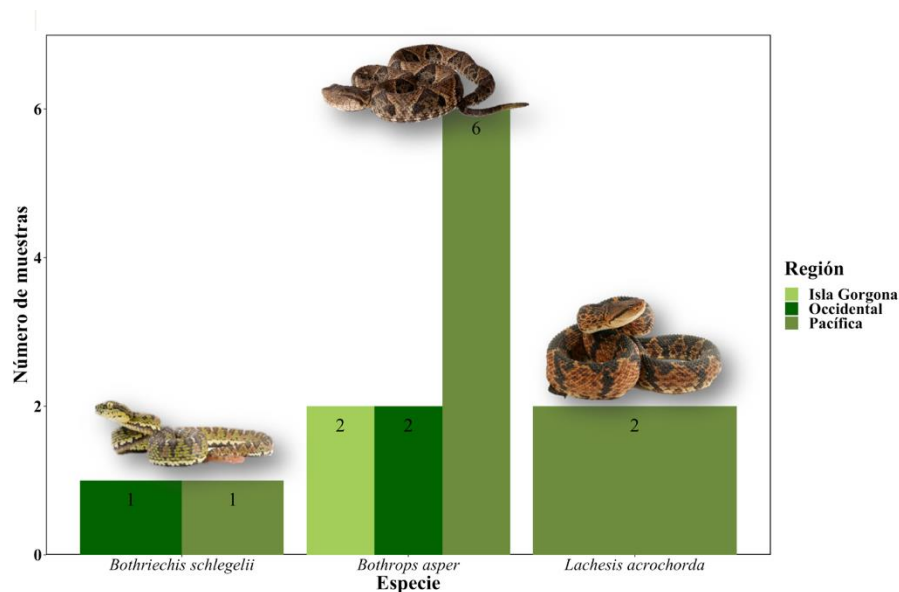


Figura 18. Muestras de veneno obtenidas para tres especies de interés clínico para le Valle del Cauca, registrada en cada una de las eco-regiones evaluadas durante las salidas de campo. \* Registros de Isla Gorgona, corresponden a muestras facilitadas por el Grupo de Investigación en Ecología Animal de la Universidad del Valle.

### Electroforesis en SDS-PAGE y cromatografía HPLC-Proteómica

Las 14 muestras de veneno crudos correspondientes a tres especies: *B. asper*, *B. schlegelii* y *L. acrochorda*; se caracterizaron por fraccionamiento y separación mediante HPLC y electroforesis en SDS-PAGE. Para la electroforesis se utilizaron cámaras de electroforesis verticales, gel de poliacrilamida al 12.5% (gel de corrida + gel de apilamiento), azul de Coomassie R-250 para la tinción y Wide Range de sigma, un marcador de peso molecular de amplio rango. Los venenos se procesaron a una concentración de 50 ug/uL y para la correcta separación de las proteínas se usó el método de *condiciones reductoras*, el cual evita las interacciones, rompe puentes y separa las subunidades de las moléculas, ayudando a que el peso molecular de lo que se ve expresado en el gel sea más real. Se sembraron 3 uL de marcador molecular y 15 uL de cada muestra de veneno. La cromatografía se efectuó aplicando un gradiente lineal, con el uso de las siguientes soluciones: solvente A = ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% en agua; B = 100% acetonitrilo preparado en 0,1% TFA y se fraccionaron dos miligramos en una columna C18 y se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo. La detección de los componentes proteicos se realizó mediante lectura espectrofotométrico una longitud de onda de 215 nm.

Obtenidos los perfiles proteicos para las 14 muestras, se identificó la presencia de familias de proteínas como: Desintegrinas, Metaloproteasas, Serina-Proteasas y Fosfolipasas como los principales componentes de los venenos para las tres especies. Se encontró un mayor porcentaje de similitud (coincidencia de picos y bandas) en comparación con las diferencias, a nivel intraespecífico para *L. acrochorda* de la región Pacífica (Figura 17) y *B. asper* dentro



de cada ecorregión (Figura 18, Figura 21, Figura 22). Para *B. schlegelii* se evidenció un alto grado de similitud entre ecorregiones (Pacífica y Occidental).

El grado de similitud a nivel intraespecífico en el fraccionamiento de los componentes de los venenos obtenido por RP-HPLC permitió la formación de cuatro pools, uno de *L. acrochorda* (Figura 23) y tres para *B. asper*: región Occidental, región Pacífica y Gorgona, en este se reflejan las diferencias en el perfil cromatográfico a nivel ecorregional (Figura 24). Para la formación de cada pool, se usó 2.2 mg de veneno por individuo, posterior a esto, se realizó nuevamente HPLC para cada uno de los pools formados con el fin de obtener un perfil proteico para cada especie por ecorregión. Para *B. schlegelii* se obtuvo un alto grado de similitud pese a que correspondían a dos eco-regiones diferentes. Sin embargo, no se pudo generar un pool de estos dos venenos debido a que la cantidad de muestra de uno de los individuos no fue suficiente para continuar los análisis.

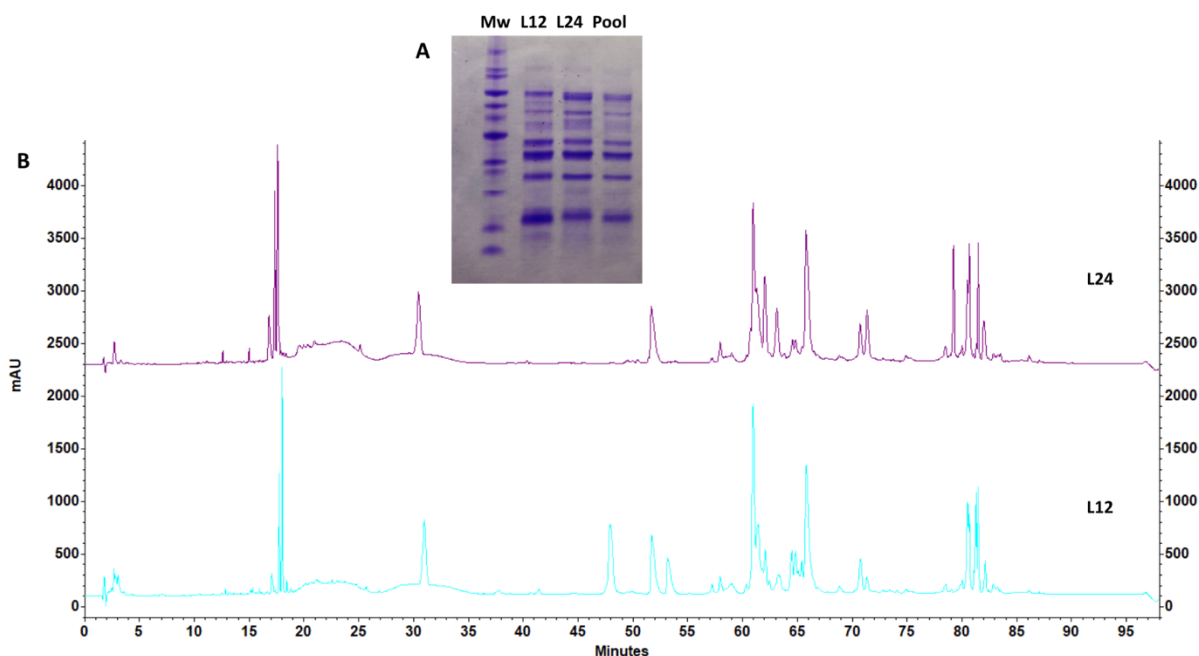


Figura 19. Perfiles de proteínas de venenos de *Lachesis acrochorda* obtenidos de individuos de la región del Pacífica. (A) perfiles SDS-PAGE de venenos individuales y combinados (20  $\mu$ g) en condiciones reductoras en geles al 12% que se tiñeron con azul de Coomassie R-250. Los marcadores de masa molecular (Mw) se indican a la izquierda, en kDa. (B) Perfiles de RP-HPLC de los dos venenos individuales. Se fraccionaron dos miligramos en una columna C18 y se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo a 215 nm, como se describe en Materiales y métodos. Las líneas púrpura y azul claro indican los perfiles de elución del veneno de los dos individuos de la región del Pacífica, respectivamente.

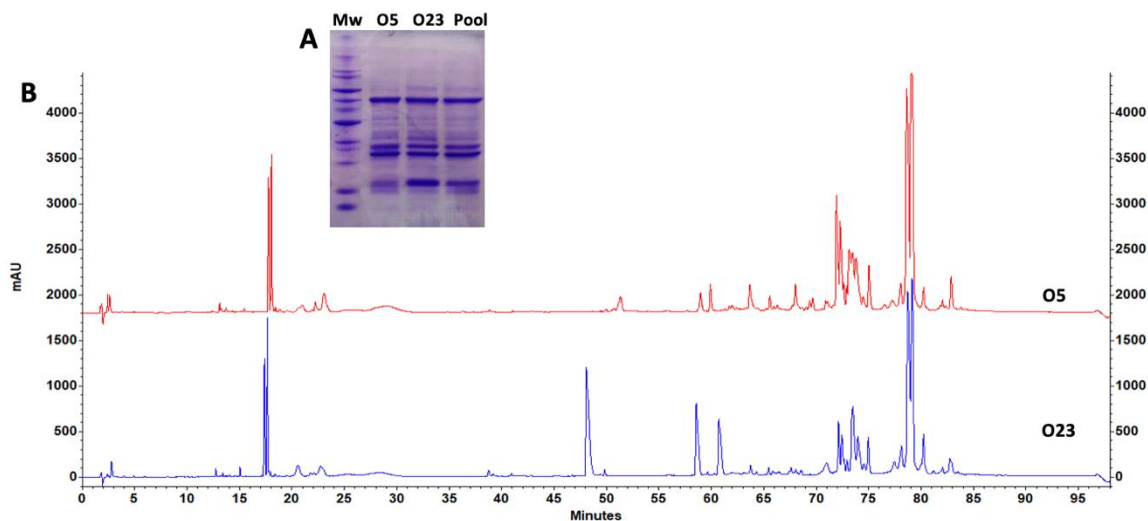


Figura 20. Perfiles de proteínas de venenos de *Bothrops asper* obtenidos de individuos de la región del Occidental. (A) Se generaron perfiles de SDS-PAGE de venenos individuales y combinados (20  $\mu$ g) en condiciones reductoras en geles al 12% que se tiñeron con azul de Coomassie R-250. Los marcadores de masa molecular (Mw) se indican a la izquierda, en kDa. (B) Perfiles de RP-HPLC de los dos venenos. Se fraccionaron dos miligramos en una columna  $C_{18}$  y se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo a 215 nm.

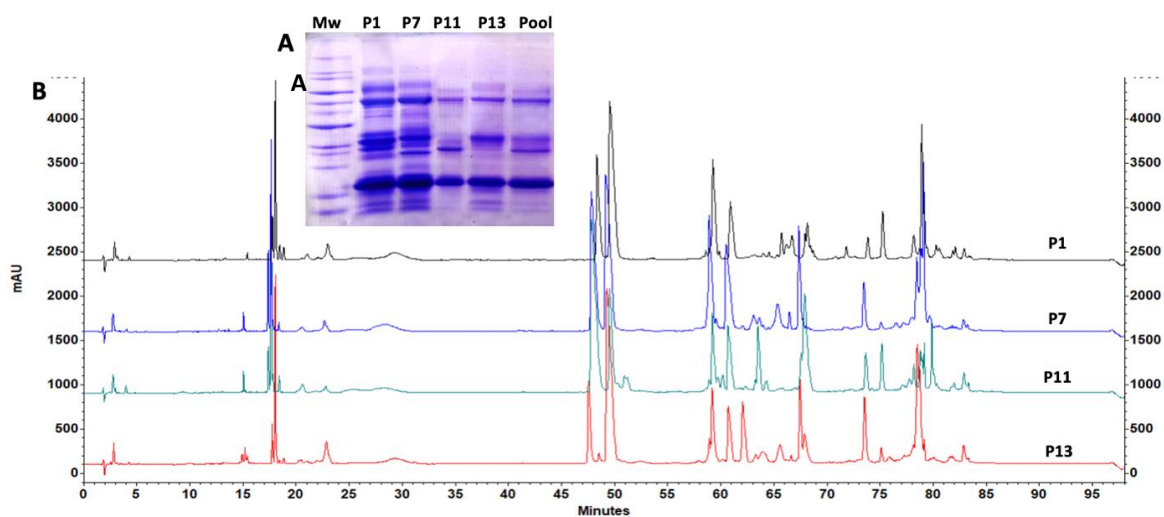


Figura 21. Perfiles de proteínas de venenos de *Bothrops asper* obtenidos de individuos de la región Pacífica. (A) Se generaron perfiles de SDS-PAGE de venenos individuales y combinados (20  $\mu$ g) en condiciones reductoras en geles al 12% que se tiñeron con azul de Coomassie R-250. Los marcadores de masa molecular (Mw) se indican a la izquierda, en kDa. (B) Perfiles de RP-HPLC de los cuatro venenos. Se fraccionaron dos miligramos en una columna  $C_{18}$  y se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo a 215 nm.

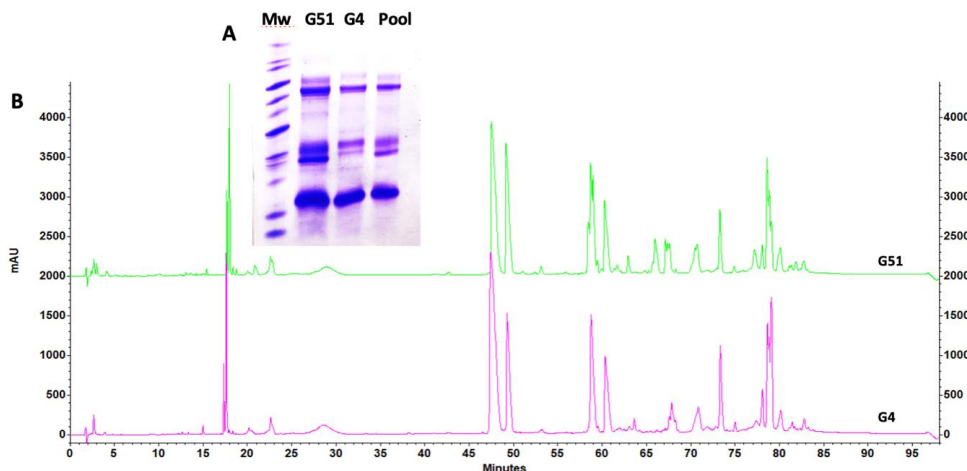


Figura 22. Perfiles de proteínas de venenos de *Bothrops asper* obtenidos de individuos de la Isla Gorgona. (A) Se generaron perfiles de SDS-PAGE de venenos individuales y combinados (20  $\mu$ g) en condiciones reductoras en geles al 12% que se tiñeron con azul de Coomassie R-250. Los marcadores de masa molecular (Mw) se indican a la izquierda, en kDa. (B) Perfiles de RP-HPLC de los dos venenos. Se fraccionaron dos miligramos en una columna C<sub>18</sub> y se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo a 215 nm.

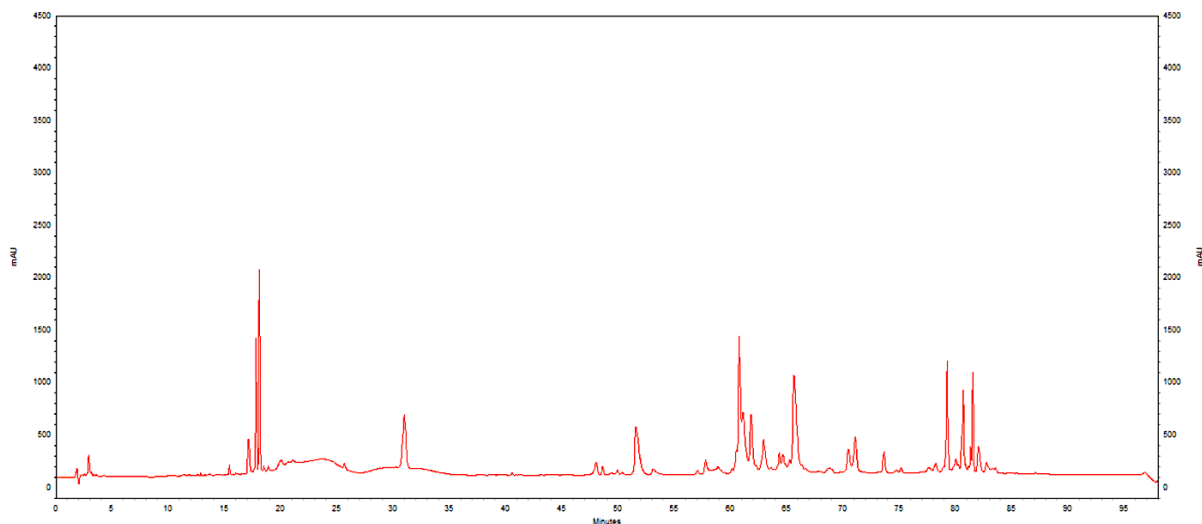


Figura 23. Perfil de proteínas del pool de veneno de serpiente *Lachesis acrochorda* obtenido de la región del Pacífica mediante RP-HPLC. Se fraccionaron dos miligramos en una columna C<sub>18</sub> y se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo a 215 nm.

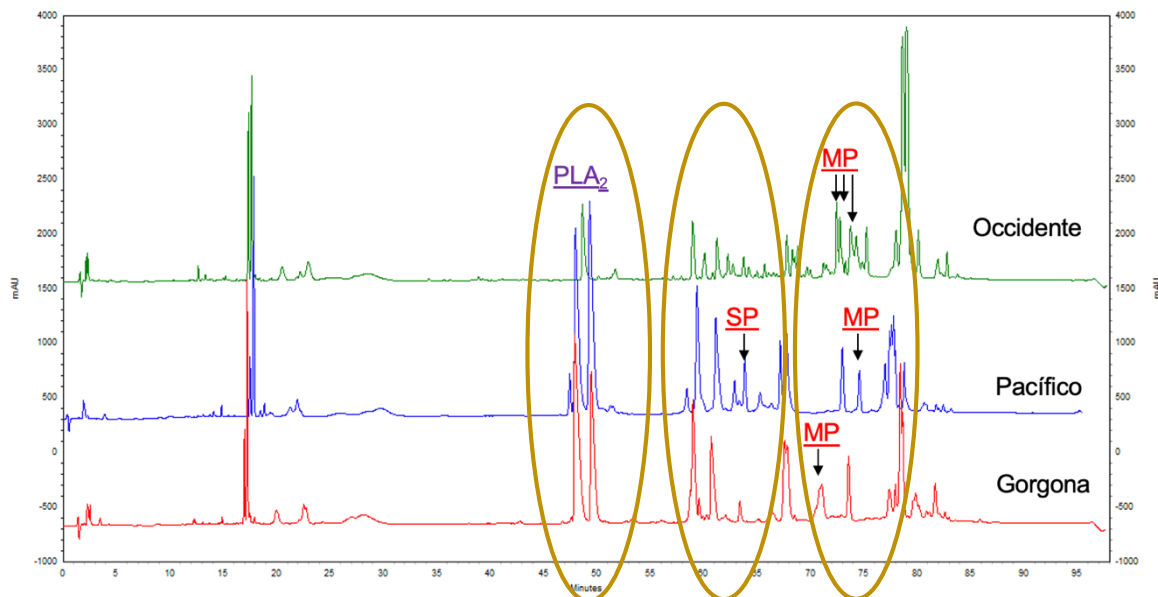


Figura 24. Comparación del perfil cromatográfico de los venenos de *B. asper* de las tres ecorregiones. Perfiles de elución de proteínas RP-HPLC en una columna  $C_{18}$ . La región del cromatograma, indicada por óvalos amarillos, muestra las principales diferencias entre las tres muestras de veneno de grupo. **PLA<sub>2</sub>**: Fosfolipasa A<sub>2</sub>, **SP**: Serina proteasa, **MP**: metaloproteasas.

Teniendo en cuenta que los resultados de la cromatografía individual y del combinado de *B. asper* (la especie que genera más del 80% de los accidentes ofídicos en el Valle del Cauca) sugieren que pueden existir diferencias en los tipos de proteínas presentes, se procedió a realizar una identificación de familias de proteínas de las tres ecorregiones empleando espectrofotometría de masas. Se encontró que aunque la mayoría de familias se encuentran presentes en los venenos de las tres ecorregiones, las nucleotidasas solo se encuentran en los venenos de serpientes de la región Pacífica (Tabla 3). Lo que podría estar sugiriendo que las serpientes de las regiones Occidental y Gorgona han modificado su perfil proteico porque no requieren indispensablemente de esta familia de proteínas y/o porque las otras proteínas que contienen pueden suplir la actividad que esta genera. La familia de las nucleotidasas tienen

la capacidad de generar purinas, principalmente adenosina que como reacción final provocan inmovilización de la presa.

De igual forma, para *L. acrochorda* se realizó la identificación de familias de proteínas presentes en el veneno. En este caso, se comparó el perfil proteico hallado, con el reportado por Madrigal et al. (2012), para individuos de la misma especie distribuidos en otro departamento. Los resultados fueron bastante interesantes pues se observan diferencias en la presencia/ausencia en cinco familias de proteínas (Tabla 4). Esto implica que se observen variaciones en las manifestaciones clínicas provocadas por las mordeduras de esta especie en cada departamento y por lo tanto, variaciones en los tratamientos.

Tabla 3. Identificación de familias de proteínas de las tres ecorregiones de *Bothrops asper*, empleando espectrofotometría de masas

<i>Ecorregión</i>	<i>*MP</i>	<i>PLA<sub>2</sub></i>	<i>CRiSP</i>	<i>LAAO</i>	<i>NGF</i>	<i>SP</i>	<i>CTL</i>	<i>NUC</i>	<i>Total</i> N°
<i>Occidente</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	(-)	7
<i>Pacífica</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	8
<i>Gorgona</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	(-)	7
<i>% de familias</i> <i>identificadas</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	33%	

\* Abreviación: **MP**: metaloproteasas; **PLA<sub>2</sub>**: Fosfolipasa A<sub>2</sub>; **CRiSP**: Proteínas secretorias ricas en cisteínas; **LAAO**: L-amino oxidasas; **NGF**: Factor de crecimiento nervioso; **SP**: serina proteasa; **CTL**: Proteínas de lectina tipo C; **NUC**: nucleotidasa. ✓: detectado; (-) no detectado.



Tabla 4. Identificación de familias de proteínas del veneno de *Lachesis acrochorda* comparado con lo reportado por Madrigal et al. 2012. Se empleó espectrofotometría de masas.

	*MP	PLA	LAAO	NGF	SP	CTL	NUC	VEGF	CRiSP	VAP	Total N°
											2
<b>Presente estudio</b>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	(-)	(-)	(-)	7
<b>Madrigal et al. 2012</b>	✓	✓	✓	(-)	✓	✓	(-)	✓	✓	✓	8

\* Abreviación: **MP**: metaloproteasas; **PLA<sub>2</sub>**: Fosfolipasa A<sub>2</sub>; **LAAO**: L-amino oxidasas; **NGF**: Factor de crecimiento nervioso; **SP**: serina proteasa; **CTL**: Proteínas de lectina tipo C; **NUC**: nucleotidasa. **VEGF**: factor de crecimiento vascular endotelial; **CRiSP**: Proteínas secretorias ricas en cisteínas; **VAP**: péptidos vasoactivos (péptidos potenciadores de bradiginina, BPP y péptido natriurético de tipo C, C-NP). ✓: detectado; (-) no detectado.

## Letalidad del veneno

Durante estos ensayos se evaluó la capacidad que tenían los venenos para matar al 50% de una población de ratones. Para el caso de *B. asper* se observó que posterior a las 48 h de inyectar diferentes concentraciones de los venenos, los ratones asociados a las serpientes de la región Occidental morían en mayor proporción, es decir, se requería menor concentración de veneno para matar mayor cantidad de individuos; en comparación con los venenos de las regiones Pacífica y Gorgona, las cuales presentaron mayor similitud entre sí (Tabla 5).

No obstante, analizando estos resultados mediante herramientas estadísticas se determinó que la diferencia no es significativa como para concluir que efectivamente los venenos de la región Occidental son más letales (Figura 25). Para el caso de *L. acrochorda* la dosis letal 50 fue de 290 µg/ratón (Tabla 6), lo cual representa el doble de la concentración arrojada para *B. asper*, soportando la gravedad de las mordeduras causadas por esta última especie.

Tabla 5. Dosis letal<sub>50</sub> de los venenos de *B. asper* de tres ecorregiones

Dosis letal <sub>50</sub> (48h post envenenamiento)			
<i>Bothrops asper</i>			
Dosis (µg)	Occidente	Pacífica	Gorgona
200	4/4	4/4	4/4
140	4/4	4/4	3/4
120	2/4	3/4	2/4
98	2/4	0/4	1/4
69	0/4	0/4	0/4

Nota: Muertos/Total de ratones

Ecorregión	LD50
Occidente	106,15 µg/ratón (70,93-130,92)
Pacífica	112,81 µg/Ratón (96,6-129,62)
Gorgona	118,17 µg/Ratón (86,49-158)

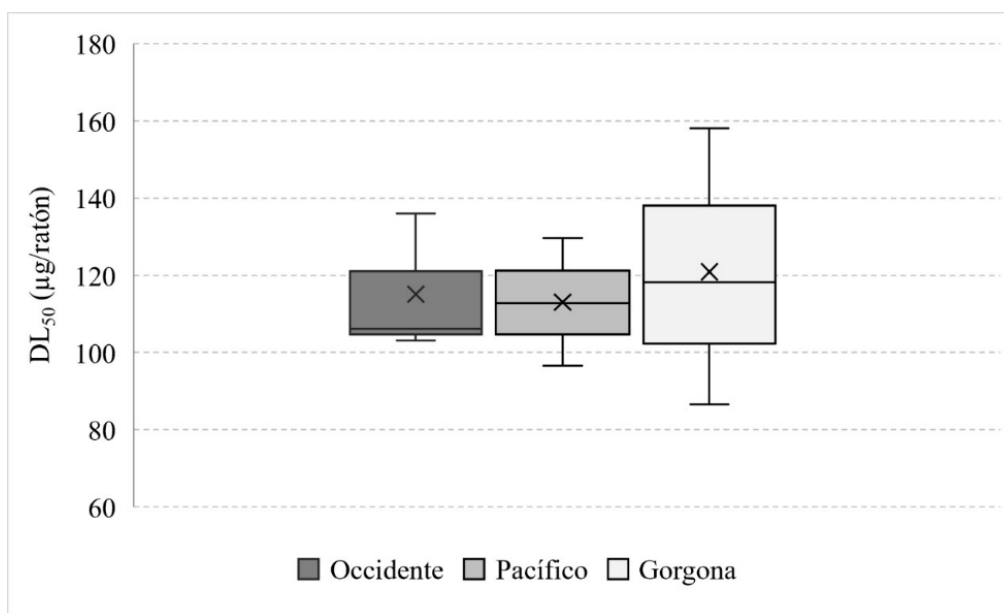


Figura 25. Diagrama de cajas comparando las medias de la dosis letal<sub>50</sub> de los venenos de *B. asper* de tres ecorregiones.

Tabla 6. Dosis letal<sub>50</sub> del veneno de *Lachesis acrochorda*.

Dosis letal <sub>50</sub> (48h post envenenamiento)	
Dosis (µg)	<i>Lachesis acrochorda</i>
410	4/4
290	2/4
200	0/4
140	0/4
120	0/4

Nota: Muertos/Total de ratones

## LD50

290 µg/ratón (260,03-323,42)

## Actividad miotóxica y hemorrágica

La actividad miotóxica se refiere a la capacidad que tiene el veneno de generar daño en el músculo de la presa y se evaluó mediante la cuantificación de creatinina, la cual en condiciones normales se encuentra en la parte interna de las células pero cuando se presenta un daño en la matriz extracelular, causado en esta oportunidad por los componentes del veneno de serpiente, se encuentra libre en el plasma. *B. asper* evidenció una alta actividad miotóxica en los venenos de serpientes de la región Pacífica y Gorgona, respectivamente;

con concentraciones de creatinina en suero superiores a 3000 U/L (Figura 26). Una tendencia diferente se halló en el veneno de serpientes de la región Occidental, con una creatinina en suero inferior a los 2500 U/L. Estos resultados son consistentes con el pico de concentración de fosfolipasas que presentan los venenos de serpientes de la región Pacífica y Gorgona (Figura 24). La actividad hemorrágica por su parte, aunque preserva la tendencia de resultados inferiores para la región Occidental, los análisis indican que la diferencia no es estadísticamente significativa (Figura 27).

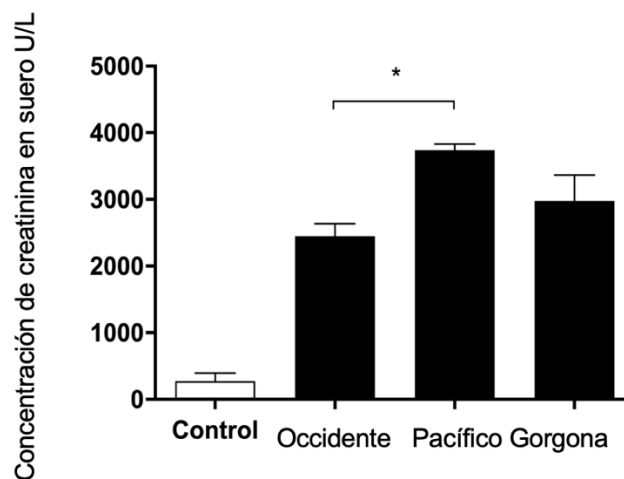


Figura 26. Actividad miotóxica de los venenos de *Bothrops asper* de las tres ecorregiones del Valle del Cauca. La actividad de la creatina quinasa plasmática (CK) se determinó después de 3 h de la inyección i.m (50 µg / 50 µL PBS) en ratones CFW. Las barras representan la media ± DE (n = 4), y fueron estadísticamente significativa (\*p < 0.05) según la prueba t de Student.

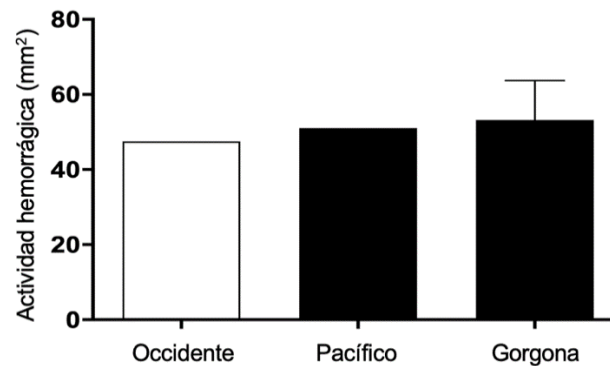


Figura 27. Comparación de la actividad hemorrágica de los venenos de *B. asper* ( $3 \mu\text{g}$ ) después de inyección i.d en ratones CFW. El área hemorrágica se dibujó sobre una película transparente y se midió en  $\text{mm}^2$ . Las barras representan la media  $\pm$  DE ( $n = 5$ ).

Con el objetivo de presentar una comparación para los resultados de *L. acrochorda* en la evidencia gráfica de las actividades miotóxica y hemorrágica se incluyen los datos de *B. asper*. La concentración de creatinina en suero observada para *L. acrochorda* fue inferior a los 3000 U/L (Figura 28), y la actividad hemorrágica por el contrario evidenció un halo de área tres veces mayor para *L. acrochorda* que lo encontrado anteriormente para *B. asper*, lo cual es consistente con la sintomatología de las mordeduras de esta primera especie (Figura 29).

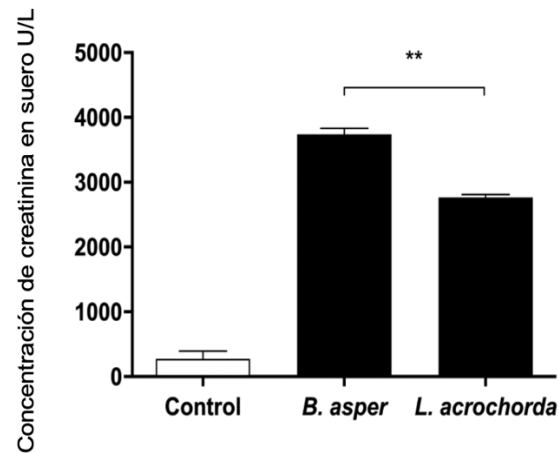


Figura 28. Actividad miotóxica de los venenos de *Lachesis acrochorda* del Valle del Cauca. La actividad de la creatina quinasa plasmática (CK) se determinó después de 3 h de la inyección *i.m* (50  $\mu$ g / 50  $\mu$ L PBS) en ratones CFW. Las barras representan la media  $\pm$  DE ( $n = 4$ ), y fueron estadísticamente significativa (\* $p < 0.05$ ) según la prueba *t* de Student.

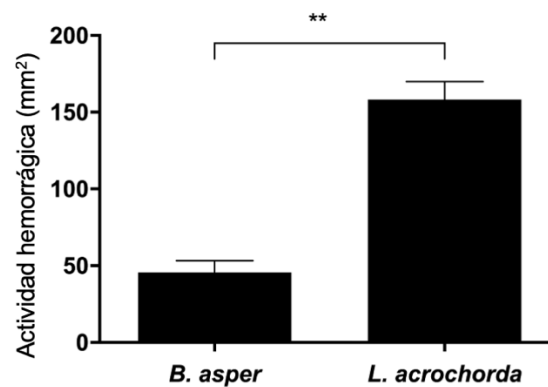


Figura 29. Comparación de la actividad hemorrágica del veneno de *Lachesis acrochorda* (3  $\mu$ g) después de inyección *i.d* en ratones CFW. El área hemorrágica se dibujó sobre una película transparente y se midió en mm<sup>2</sup>. Las barras representan la media  $\pm$  DE ( $n = 5$ ).

Teniendo en cuenta que una de las manifestaciones más comunes en la mordedura de serpientes es el edema, se realizaron ensayos para evaluar esta actividad en los venenos de *B. asper*. Se inocularon 3  $\mu$ g de veneno en la almohadilla plantar de ratones y se observó el



grosor del edema. Como control se empleó solución salina. Los resultados arrojaron que el veneno de las serpientes de la región Occidental presenta una tendencia a generar edemas de mayor tamaño, pero la diferencia no se considera estadísticamente significativa en comparación con los edemas generados por los venenos de las otras regiones (Figura 30).

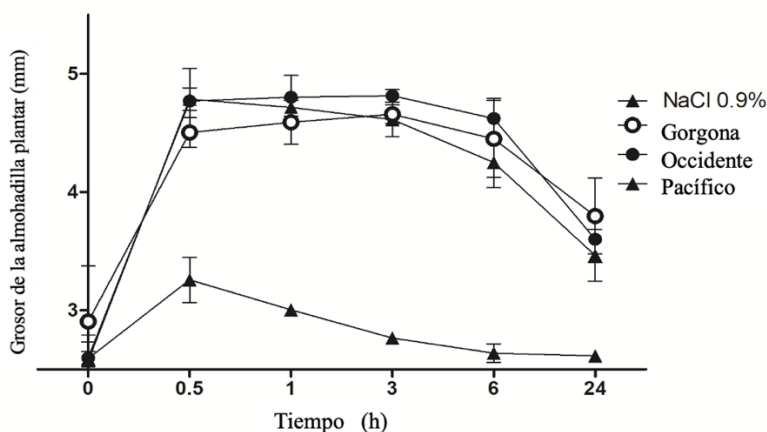


Figura 30. Actividad edemática de los venenos de *Bothrops asper* de las tres ecorregiones del Valle del Cauca. Los ratones recibieron una inyección subplantar que contenía 3  $\mu\text{g}$  de VEGF en 30  $\mu\text{L}$  de PBS, en la almohadilla plantar de la pata izquierda. La almohadilla derecha recibió el mismo volumen, pero de PBS. El grosor de la almohadilla plantar se midió en diferentes momentos. Cada punto representa la media  $\pm$  DE ( $n = 4$ ). Las diferencias entre VEGF y PBS fueron estadísticamente significativas (\*\* $p < 0.05$ ) a 0.5, 1 y 3 horas.

### Actividad de fosfolipasa A2, proteolítica y coagulante

La caracterización de los perfiles proteicos realizados anteriormente indicaron que los venenos de serpientes de *B. asper* de la región Pacífica y Gorgona presentaron concentraciones más altas de PLA<sub>2</sub> respecto a los venenos de la región Occidental, y que a su vez, esta última región presentaba mayores concentraciones de metaloproteasas. Estos resultados se corroboraron mediante ensayos in vitro. La actividad de PLA<sub>2</sub> fue evaluada en monodisperso sintético ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzoico, y lo observado fue

consistente con una mayor actividad de este compuesto para los venenos de la región Pacífica y Gorgona (Figura 31). Así mismo, y mediante un ensayo de actividad proteolítica en sustrato de azocaseína, la cual será mayor con el incremento de metaloproteasas, se confirmó que los venenos de serpientes de la región Occidental presentan mayores cantidades de dicho compuesto (Figura 32). Respecto a *L. acrochorda* se encontró que la actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> y la proteolítica es menor que la estimada para *B. asper*, siendo significativamente mayor para el primer caso (Figura 33, Figura 34).

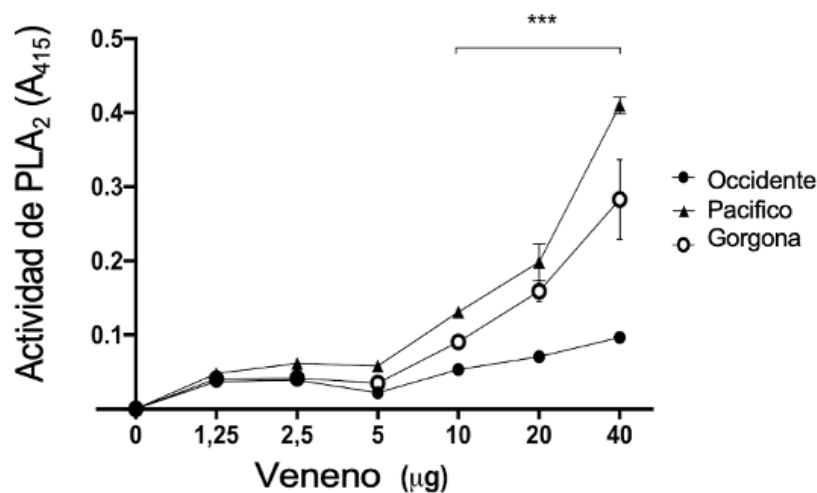


Figura 31. Actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> de los venenos de *Bothrops asper* de las tres ecorregiones del Valle del Cauca. Evaluada en ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzoico, un sustrato monodisperso sintético. Cada punto representa la media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). Las diferencias entre las dosis de veneno a 10, 20 y 40  $\mu\text{g}$  fueron estadísticamente significativas (\*\*\*)  $p < 0,001$

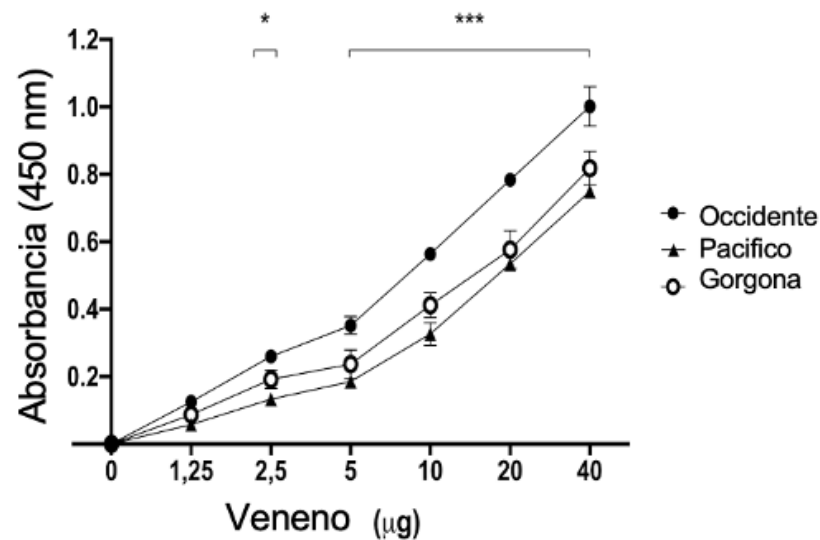


Figura 32. Actividad proteolítica en el sustrato de azocaseína para los venenos de *Bothrops asper* de las tres ecorregiones. Cada punto representa la media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). Las diferencias entre las ecorregiones a 2.5, 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{g}$  son estadísticamente significativas (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

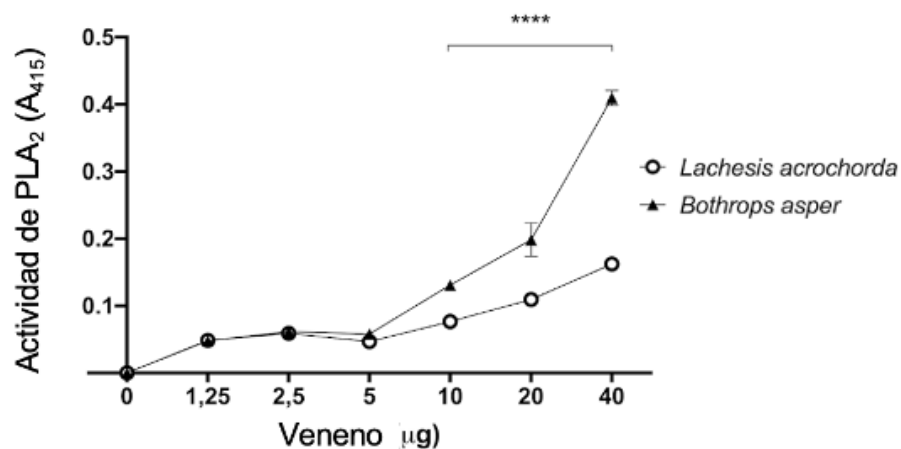


Figura 33. Actividad de fosfolipasa  $A_2$  del veneno de *Lachesis acrochorda* del Valle del Cauca. Evaluada en ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzoico, un sustrato monodisperso sintético. Cada punto representa la media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). Las diferencias entre las dosis de veneno a 10, 20 y 40  $\mu\text{g}$  fueron estadísticamente significativas (\*\*\*\*  $p < 0,001$ ).

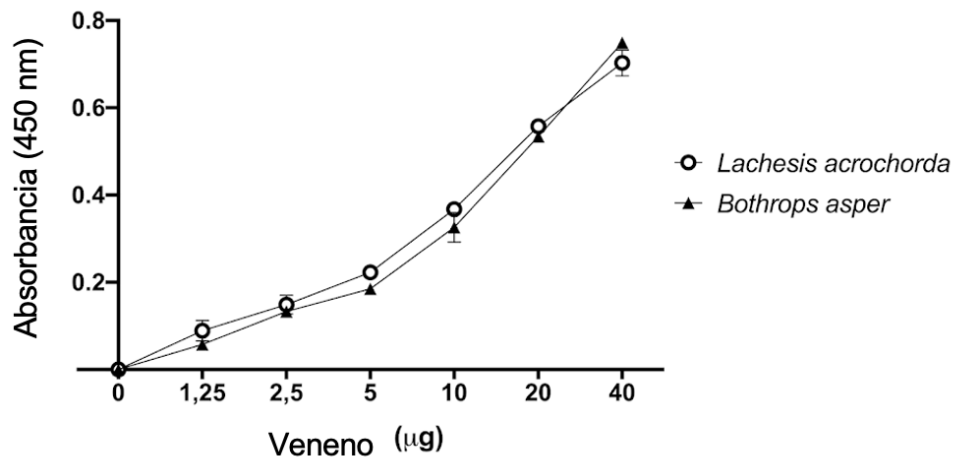


Figura 34. Actividad proteolítica en el sustrato de azocaseína para el veneno de *Lachesis acrochorda*. Cada punto representa la media  $\pm$  DE ( $n = 3$ ). Sin diferencias estadísticamente significativas.

La actividad coagulante se llevó a cabo sobre plasma sanguíneo humano y se determinó el tiempo de coagulación en segundos. En los venenos de *B. asper* de todas las ecorregiones se observó una rápida coagulación sanguínea ( $\pm 7$  s), sin diferencias interespecíficas (Figura 35). Para *L. acrochorda* el tiempo de coagulación fue mayor que para *B. asper*, con tiempos de  $\sim 9$  s., no obstante, esta diferencia no presenta relevancia estadística (Figura 36).

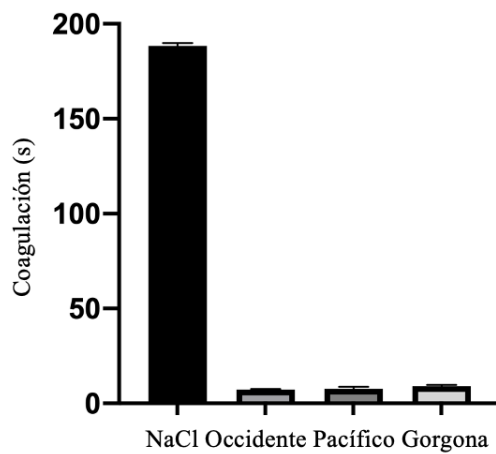


Figura 35. Actividad de coagulación en plasma sanguíneo humano de los venenos de *Bothrops asper* de las tres ecorregiones.

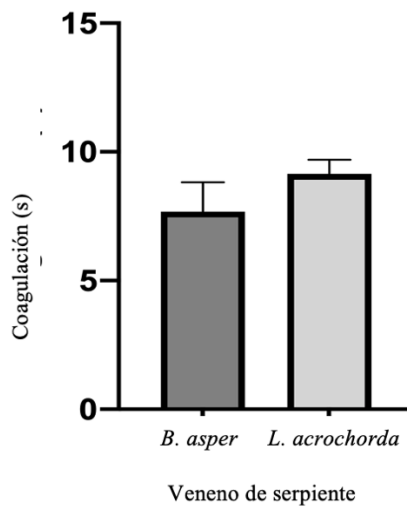


Figura 36. Actividad de coagulación en plasma sanguíneo humano del veneno de *Lachesis acrochorda*.

## Antivenómica

La evaluación mediante la electroforesis SDS-PAGE de los antivenenos comerciales disponibles en Colombia, INS y Probiol, evidenciaron que el contenido del primero tiene altas concentraciones de IgG (principal tipo de anticuerpo que se encuentra en la sangre y el líquido extracelular), mientras que el antiveneno de Probiol presentó bajo porcentaje de proteínas IgG y un alto contenido de proteínas no IgG que podría afectar el reconocimiento de la mayoría de las proteínas presentes en los venenos de las tres ecorregiones (Figura 37). De igual forma y dadas las características anteriormente mencionadas sobre los antivenenos, se sugiere que se requieren más ampollas de Probiol que de INS para neutralizar la misma concentración de veneno en un accidente ofídico. Actualmente, estos antivenenos disponibles actúan de manera efectiva frente al ofidismo en el Valle del Cauca. No obstante, las diferencias en los perfiles proteicos que aquí se reportan, sugieren que en el futuro las manifestaciones y por ende el tratamiento de la mordedura por *B. asper* puede variar entre las regiones del departamento y el país.

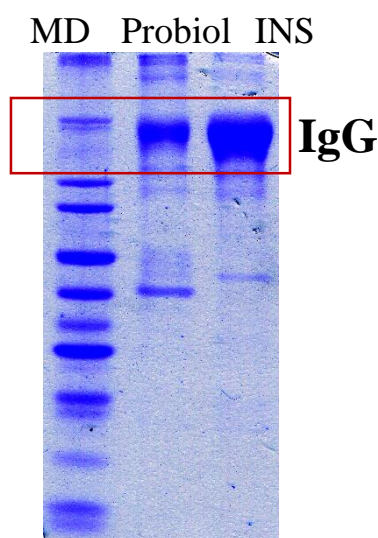


Figura 37. SDS-PAGE de los antivenenos de Probiol e INS. En un gel de poliacrilamida al 12.5 % se sembraron 10  $\mu\text{g}$  de cada antiveneno y se corrió a 110 V por una hora. Luego, el gel se tiñó con azul de Coomassie R-250 y se identificó la proteína IgG mediante peso molecular, usando un marcador de peso de la marca Bio-Rad.

## 5.2 BIONOMIA

### Presas potenciales

#### *Levantamiento de información primaria*

Durante las jornadas de campo se registraron 59 especies de presas potenciales (Anexo 1) de las cuales el 29 (49.2%) corresponden a la clase Amphibia (Anura: 47.5%, Caudata: 1.7%), 24 (40.7%) a la clase Reptilia, 2 (3.4%) a la clase Aves y 4 (6.8%) a la clase Mammalia (Didelphimorphia: 3.4%, Rodentia y Chiroptera: 1.7% c/u).

### Revisión de información secundaria

#### *Dieta Viperidae*

De acuerdo con lo encontrado en la literatura sobre las especies de Vipéridos con distribución en el Valle del Cauca, la información de las preferencias dietarias de las especies *Bothrops punctatus*, *Bothrocophias myersi* y *Lachesis acrochorda* es limitada. Para *B. punctatus* solo se reporta que es una especie generalista (Ospina-L 2017) y para *Lachesis acrochorda* no se encontró ningún tipo de información, sin embargo, para su congénere *L. muta* se reporta que incluye en su dieta mamíferos de los órdenes Rodentia y Didelphimorphia (Díaz-Ricaurte et al. 2017). Respecto a *Botrocophias myersi*, la información disponible se asocia a sus congéneres, *Botrocophias campbelli*, *Botrocophias hyoprora* y *Botrocophias microphthalmus* cuyas dietas incluyen presas de los órdenes Anura, Gymnophiona y Squamata (Carrillo de Espinoza 1983, Prado y Hoge 1948, Freire y Kuch 2000, Rojas-Rivera et al. 2013.).



En contraste, las dietas más documentadas son las de *B. asper*, *B.s schlegelii* y *P. nasutum*. La revisión sobre *B. asper* indicó que esta especie presenta una dieta generalista, con variaciones relacionadas a la ontogenia y al sexo (Campbell 1998, Boada et al. 2005, Sasa et al. 2009). A nivel de orden, su dieta está compuesta mayormente por Anura, Gymnophiona, Squamata, Rodentia, Didelphimorphia, Lagomorpha, Passeriformes y en una menor proporción, por los órdenes Coleoptera, Crustacea, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Myriapoda, Orthoptera, Pulmonata y Scolopendromorpha (Boada et al. 2005, Sasa et al. 2009, Mendoza y Fernández 2011, Segovia-Nuñez 2014) (Figura 38A). Respecto a *B. schlegelii* (Figura 38B) y *P.nasutum* (Figura 38C), el espectro de presas incluye una gran variedad de pequeños vertebrados de los órdenes Anura, Squamata, Didelphimorphia, Rodentia, Chiroptera, Apodiformes y Passeriformes (Gómez y Buitrago-González 2017, Paredes-Montesinos et al. 2015, Meza-Ramos et al. 2010).

### *Dieta Elapidae*

Para la familia Elapidae, la información relacionada a la historia natural y la dieta de las especies de Elápidos del Valle del Cauca, es escasa. De manera que se encontraron datos solo sobre dos de las cinco especies con distribución en el departamento. De acuerdo con la información reunida y reportada por Ríos-Soto et al. (2018) a partir de observaciones propias y de lo reportado por Ayerbe et al. (1990) y Campbell y Lamar (2004), la dieta de *M. mipartitus* está compuesta en su mayoría por el orden Squamata y en una menor proporción por especies del orden Gymnophiona (Figura 39). En cuanto a *M. ancoralis*, las especies que

se reportan como parte de su dieta, corresponden únicamente al orden Squamata (Campbell y Lamar 2004, Cisneros-Heredia 2005).

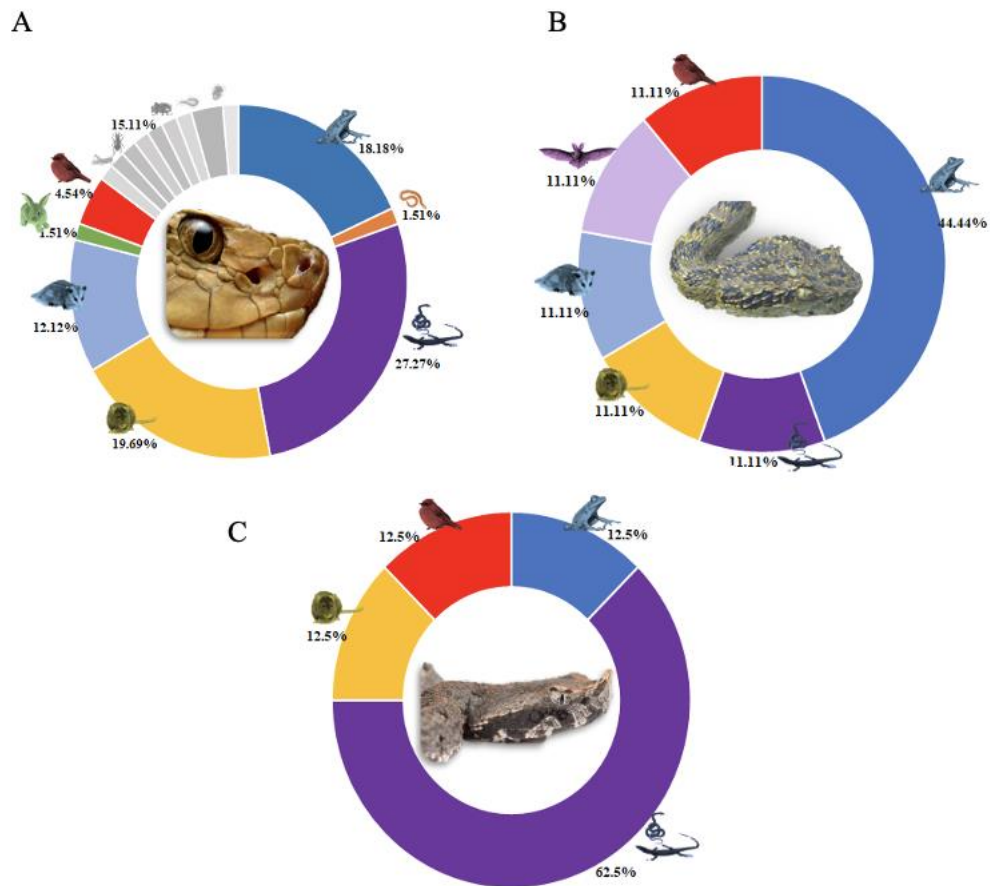


Figura 38. Gráfica porcentual de la dieta de A. *Bothrops asper*, B. *Bothriechis schlegelii* y C. *Porthidium nasutum* a nivel de orden de acuerdo con la revisión de información secundaria.



Figura 39. Gráfica porcentual de la dieta de *Micrurus mipartitus* a nivel de orden de acuerdo con la revisión de información secundaria.

### Revisión de contenido estomacal e intestinal

En la Colección de Prácticas Zoológicas de la Universidad del Valle se encontraron depositados 29 especímenes de serpientes venenosas con datos asociados, provenientes de tres de las cuatro eco-regiones del Valle del Cauca; la Región Pacífica, la Región Occidental y la Región Central. Estos individuos corresponden a cinco especies de Vipéridos (*Bothrops asper*, *Bothrops punctatus*, *Bothriechis schlegelii*, *Bothrocophias myersi*, *Lachesis acrochorda*) y a dos de Elápidos (*Micrurus mipartitus*, *Micrurus dumerilii*) (Figura 40).

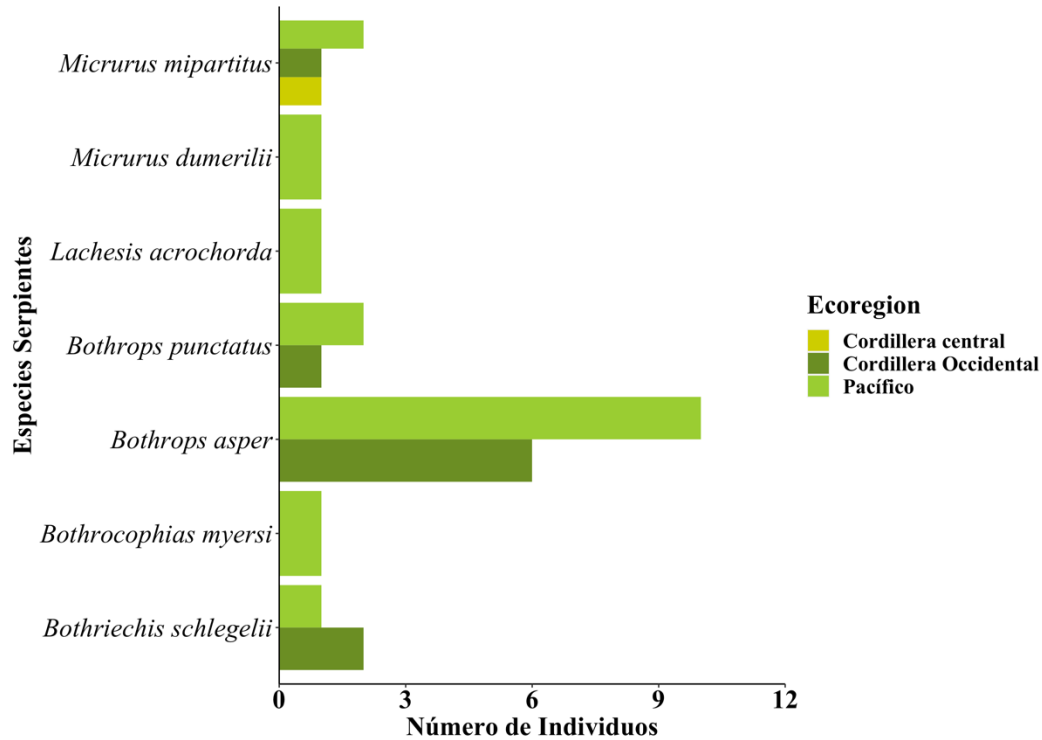


Figura 40. Número de especímenes disectados de serpientes venenosas para revisión de presas potenciales presentes en contenido estomacal, depositados en la Colección de Prácticas Zoológicas de la Universidad del Valle (CPZ-UV).

Se encontró que el 69% de los especímenes no contenía rastros de presas en sus estómagos ni en sus intestinos. En el 31% restante, representado por cinco individuos de *B. asper*, uno de *Bothrocophias myersi* y uno de *L. acrochorda*, se encontraron restos de pelos, colmillos, huesos, un cráneo e incluso, un roedor casi completo (Figura 41). Sin embargo, solo el 23.1% de los especímenes presentó realmente algún ítem alimenticio, pues, la presencia de colmillos (7.8%) en el tracto digestivo de una *B. asper* y una *B. myersi*, no se consideraron como un ítem, debido a que, por sus características, pertenecen a los mismos individuos en

dónde se encontraron y posiblemente fueron ingeridos en el momento de la ingesta de alguna presa.

En el análisis e identificación de las muestras, se encontró que los ítems alimenticios de la *B. asper* de la Región Occidental corresponden a la clase aves y gracias a las características conservadas y apreciables en la forma del cráneo, se logró su identificación taxonómica a nivel de familia, identificándolo como un Throchilidae. En contraste, para los especímenes de *B. asper* de la región Pacífica, se logró la identificación de un *Melanomys caliginosus* de la familia Cricetidae gracias a que el cráneo y la mayor parte del cuerpo estaban intactas, conservando aún características como la coloración del pelaje. De acuerdo con la orientación del roedor en el estómago de la serpiente, el animal fue ingerido por la cabeza. Finalmente, los ítems de huesos y pelos no se lograron identificar más allá de la clase Mammalia, debido al alto grado de descomposición de las muestras.

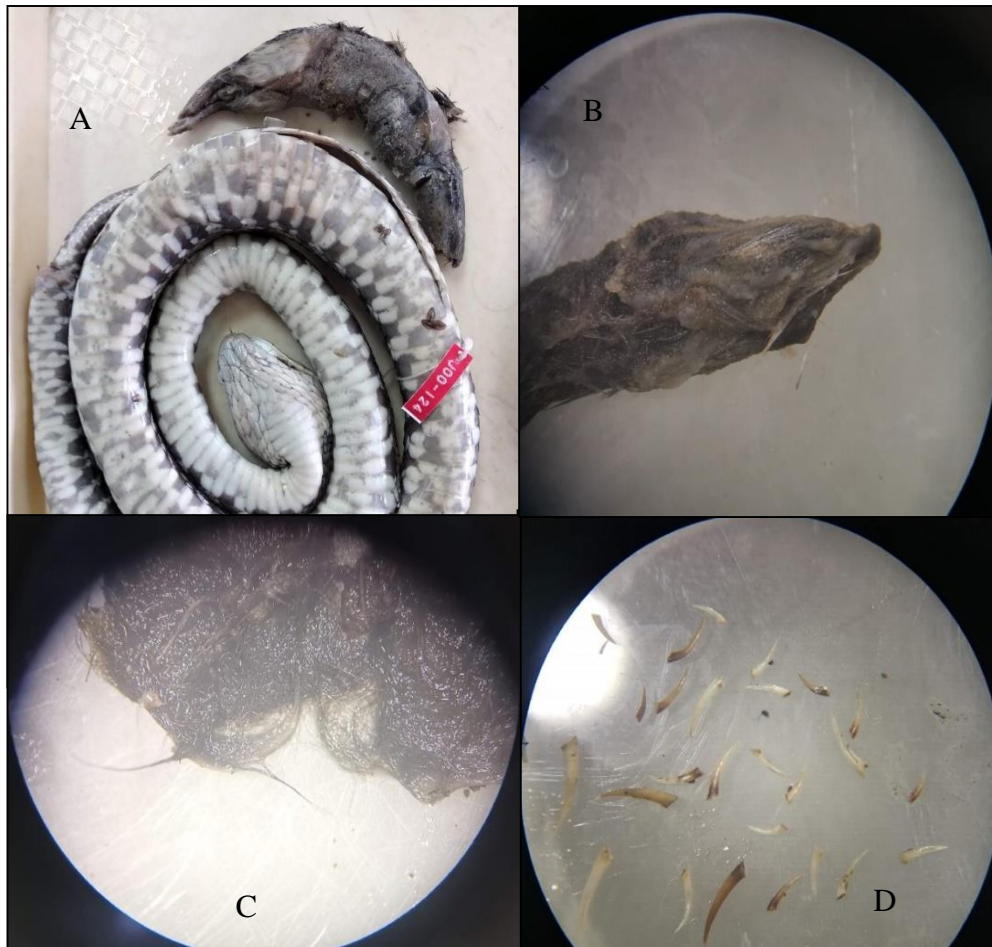


Figura 41. Ítems encontrados en la revisión de estómagos e intestinos de serpientes de la familia Viperidae depositadas en la Colección de Prácticas Zoológicas de la Universidad del Valle. A: Ratón, B: Cráneo de ave, C: Pelos, D: Colmillos.

Consolidada la información primaria y secundaria para las presas potenciales para las especies de serpientes objeto de estudio. se logró la consolidación de una lista con 31 géneros potenciales como parte de la dieta de los géneros *Bothrops*, *Bothriechis*, *Bothrocophias*, *Porthidium*, *Lachesis* y *Micrurus* y su respectiva distribución en del Valle del Cauca (Tabla 7).

Tabla 7. Géneros de presas potenciales de los géneros de serpientes de la familia Viperidae y Elapidae del Valle del Cauca y su distribución dentro del departamento. RP: Región Pacífico, CO: Región Occidental, VI: Valle Interandino, CC: Región Central.

Familia	Género serpiente	Género presa	Ecorregión	Referencia
VIPERIDAE	<i>Bothrops</i>	<i>Anolis</i>	RP, CO, VI, CC	Sasa et al. 2009, Boada y Salazar 2005
		<i>Atractus</i>	RP, CO, VI, CC	Mendoza y Fernández 2011
		<i>Bothrops</i>	RP, CO, VI, CC	Buttenhoff y Vogt 1995, Mendoza y Fernández 2011, Sasa et al. 2009, Tyron 1985
		<i>Caluromys</i>	RP, CO, VI, CC	Sasa et al. 2009, Voss 2013, Hirth 1964
		<i>Coendu</i>	CC, CO	Segovia-Nuñez et al. 2014
		<i>Craugastor</i>	RP	Sasa et al. 2009
		<i>Dasyprocta</i>	RP, CO, VI, CC	Cadena-Ortiz et al. 2017 en Orellana-Vásquez y Díaz 2019
		<i>Didelphis</i>	RP, CO, VI, CC	Sasa et al. 2009, Voss 2013, Greene 1898



<i>Erythrolamprus</i>	RP, CO, VI, CC	Sasa et al. 2009, Solorzano 2004 en Orellana-Vasquez y Díaz 2019
<i>Gonatodes</i>	RP, CO, VI	Sasa et al. 2009
<i>ys</i>	RP, CO, VI, CC	Sasa et al. 2009, Campbell 1998
<i>Holcosus</i>	RP	Sasa unpublisch en Sasa et al. 2009
<i>Leptodactylus</i>	RP, VI	Sasa et al. 2009
<i>Leptodeira</i>	RP, CO, VI, CC	Mendoza y Fernández 2011
<i>Lithobates</i>	RP, VI	Sasa et al. 2009, Boada y Salazar 2005
<i>Melanomys</i>	RP, CO, VI, CC	Sasa et al. 2009, Orellana- Vásquez y Díaz 2019
<i>Mus</i>	RP, CO, VI, CC	Sasa et al. 2009
<i>Ninia</i>	RP, CO	Mendoza y Fernández 2011, Sasa et al. 2009, Murphy 1997 en Orellana y Díaz 2019
<i>Oligoryzomys</i>	RP, CO, VI	Sasa et al. 2009
<i>Oryzomys</i>	RP, CO, VI, CC	Sasa et al. 2009



<i>Philander</i>	RP, CO, VI, CC	Sasa et al. 2009, Voss 2013, Campbell 1998
<i>Porthidium</i>	RP	Mendoza y Fernández 2011
<i>Pristimantis</i>	RP, CO, VI, CC	Sasa et al. 2009, Boada et al. 2005
<i>Proechimys</i>	RP	Boada et al. 2015, Segovia- Núñez 2014, Sasa et al. 2009, Greene 1997
<i>Rattus</i>	RP, CO, VI, CC	Orellana-Vásquez y Díaz 2019, Valencia et al. 2016, Sasa et al. 2009, Buttenhoffand Vogt 1995
<i>Rhinella</i>	RP, CO, VI, CC	Sasa et al. 2009, Boada et al. 2005
<i>Sigmodon</i>	RP, CO	Valencia et al. 2016, Kuch et al. 2004
<i>Smilisca</i>	RP	Sasa et al. 2009
<i>Sylvilagus</i>	CO, VI, CC	Sasa et al. 2009, Greene y Hardy 1898
<i>Tantilla</i>	RP, CO, VI, CC	Mendoza y Fernández 2011

	<i>Volatinia</i>	RP, CO, VI, CC	Sasa et al. 2009
	<i>Amazilia</i>	RP, CO, VI, CC	Meza-Ramos et al. 2010
	<i>Anolis</i>	RP, CO, VI, CC	Meza-Ramos et al. 2010
	<i>Boana</i>	RP, VI	Meza-Ramos et al. 2010
	<i>Carollia</i>	RP, CO, VI, CC	Meza-Ramos et al. 2010
<i>Bothriechis</i>	<i>Craugastor</i>	RP	Voss 2013, Meza-Ramos et al. 2010
	<i>Marmosops</i>	RP, CO, CC	Voss 2013
	<i>Oryzomys</i>	RP, CO, VI, CC	Meza-Ramos et al. 2010
	<i>Pristimantis</i>	RP, CO, VI, CC	Meza-Ramos et al. 2010
	<i>Marmosops</i>	RP, CO, CC	Cisneros-Heredia et al. 2006
<i>Bothrocophias</i>	<i>Atractus</i>	RP, CO, VI, CC	Freire y Kuch 2000
	<i>Urotheca</i>	RP, CO	Rojas-Riviera et al. 2013
<i>Porthidium</i>	<i>Anolis</i>	RP, CO, VI, CC	Álvarez de Toro 1983 en Paredes-Montesinos et al, 2015

	<i>Craugastor</i>	RP	Savage 2002 en Paredes-Montesinos et al, 2015
	<i>Glyphorynchus</i>	RP	Greene 1997 en Paredes-Montesinos et al, 2015
	<i>Heteromys</i>	RP, CO, VI, CC	Greene 1997 en Paredes-Montesinos et al, 2015
	<i>Holcosus</i>	RP	Greene 1997 en Paredes-Montesinos et al, 2015
	<i>Porthidium</i>	RP	Ospina-L 2017
<i>Lachesis</i>	<i>Philander</i>	RP, CO, VI, CC	Atramentowicz 1986 en Voss 2013
	<i>Amphisbaena</i>	RP	Rios-Soto et al. 2018; Campbell y Lamar 2004 en Henao y Nuñez 2016
<b>ELAPIDAE</b>	<i>Micrurus</i>	<i>Atractus</i>	Rios-Soto et al. 2018; Campbell y Lamar 2004 en Henao y Nuñez 2016, Arevalo-Paez 2015
	<i>Caecilia</i>	RP, CO, VI, CC	Rios-Soto et al. 2018; Campbell y Lamar 2004; Ayerbe et al. 1990
	<i>Dendrophidion</i>	RP, CO, VI	Ayerbe et al. 1990

<i>Erythrolamprus</i>	RP, CO, VI, CC	Ríos-Soto et al. 2018
<i>Lepidoblepharis</i>	RP, CO, CC	Ríos-Soto et al. 2018
<i>Leptodeira</i>	RP, CO, VI, CC	Arevalo-Paéz 2015
<i>Leptophis</i>	RP, CO, VI	Ayerbe et al. 1990

### Librería de referencia

A partir del levantamiento de información primaria y secundaria, se logró la elaboración de un listado con 120 especies de presas potenciales para las serpientes venenosas del Valle del Cauca (Anexo 1), conformado por 61 especies de anfibios (Anura: 58, Caudata: 2, Gymnophiona: 1), 43 especies de reptiles (Serpentes: 21), 6 de aves y 10 de mamíferos. El 20% de las especies del listado se obtuvo exclusivamente en las salidas de campo, el 12.5% con la revisión de información secundaria, el 37.5% con la base de datos de la CPZ-UV y el 30% restante se obtuvo a partir de la integración de los métodos empleados. Es importante mencionar que solo 72 especies (60%) del total del listado, tenían disponible la secuencia del gen 16S en el GenBank.

### Extracción del gen 16S de las presas potenciales y amplificación PCR

Se logró la obtención y extracción de ADN de tejidos correspondientes a 37 de las 48 especies sin disponibilidad de la secuencia del gen 16S en el GenBank; el 43.24% de estas muestras

estuvieron representadas por la clase Amphibia y el 56.75% por la clase Reptilia. No se procesaron muestras de las clases Aves y Mammalia debido a que no se contó con disposición de material genético para hacerlo. El tejido del que se obtuvo mayor concentración de ADN (ng/μl) fue del reptil *Enyalioides heterolepis* con 326,1 ng/μl, mientras que el menor valor obtenido fue para la especie *Anolis antonii* con 2.36 ng/μl. Por otra parte, al organizar esta información por las eco-regiones de interés se identificó que las especies *Basiliscus galeritus* y *Lepidoblepharis duolepis* se obtuvieron dos muestras por la localidad en donde se recogieron, garantizando la representatividad de los individuos en la región Occidental y la región Pacífica.

Al realizar la PCR se logró la amplificación de ADN para 34 de las 37 especies procesadas (Tabla 8). El ADN no amplificado fue el extraído de las especies *Echinosaura palmeri*, *Imantodes inornatus* y *Pristimantis ptochus*. El éxito de las amplificaciones se observó en los geles de agarosa como bandas de color blanco e intensidad brillante (Figura 42Figura 42), en el caso contrario, no se observó ninguna banda en el carril en que fue sembrada la muestra. El 43.24% del ADN extraído y amplificado con éxito correspondió a la clase Amphibia y el 56.75% a la clase Reptilia. Con estos resultados se logró la consolidación de la información genética del 88.33% del total de las presas potenciales de las serpientes venenosas del Valle del Cauca.

Tabla 8. Especies cuyo tejido fue amplificado y enviado a secuenciación para la construcción de la librería de referencia.

Clase	Orden	Familia	Especie
Amphibia	Anura	Bufonidae	<i>Rhinella paraguas</i>
		Centrolenidae	<i>Nymphargus ignotus</i>
			<i>Nymphargus ruizi</i>
			<i>Niceforonia mantipus</i>
			<i>Pristimantis gracilis</i>
			<i>Pristimantis hybotragus</i>
			<i>Pristimantis latidiscus</i>
			<i>Pristimantis molybrignus</i>
		Craugastoridae	<i>Pristimantis roseus</i>
			<i>Strabomantis ruizi</i>
			Eleutherodactylidae
		Hylidae	<i>Diasporus tinker</i>
			<i>Boana rosenbergi</i>
			<i>Dendropsophus columbianus</i>
Caudata	Plethodontidae		<i>Bolitoglossa walkeri</i>
Reptilia	Squamata	Corytophanidae	<i>Basiliscus galeritus</i>
		Dactyloidae	<i>Anolis anchicayae</i>
			<i>Anolis antonii</i>
			<i>Anolis eulaemus</i>



	<i>Anolis macrolepis</i>
	<i>Anolis maculiventris</i>
	<i>Anolis notopholis</i>
	<i>Anolis ventrimaculatus</i>
	<i>Loxopholis southi</i>
Gymnophthalmidae	<i>Ptychoglossus stenolepis</i>
	<i>Ptychoglossus vallensis</i>
Hoplocercidae	<i>Enyalioides heterolepis</i>
Sphaerodactylidae	<i>Lepidoblepharis duolepis</i>
Teiidae	<i>Holcosus festivus</i>
	<i>Dendrophidion clarkii</i>
Colubridae	<i>Oxybelis brevirostris</i>
	<i>Atractus clarki</i>
Dipsadidae	<i>Atractus melas</i>
	<i>Urotheca lateristriga</i>

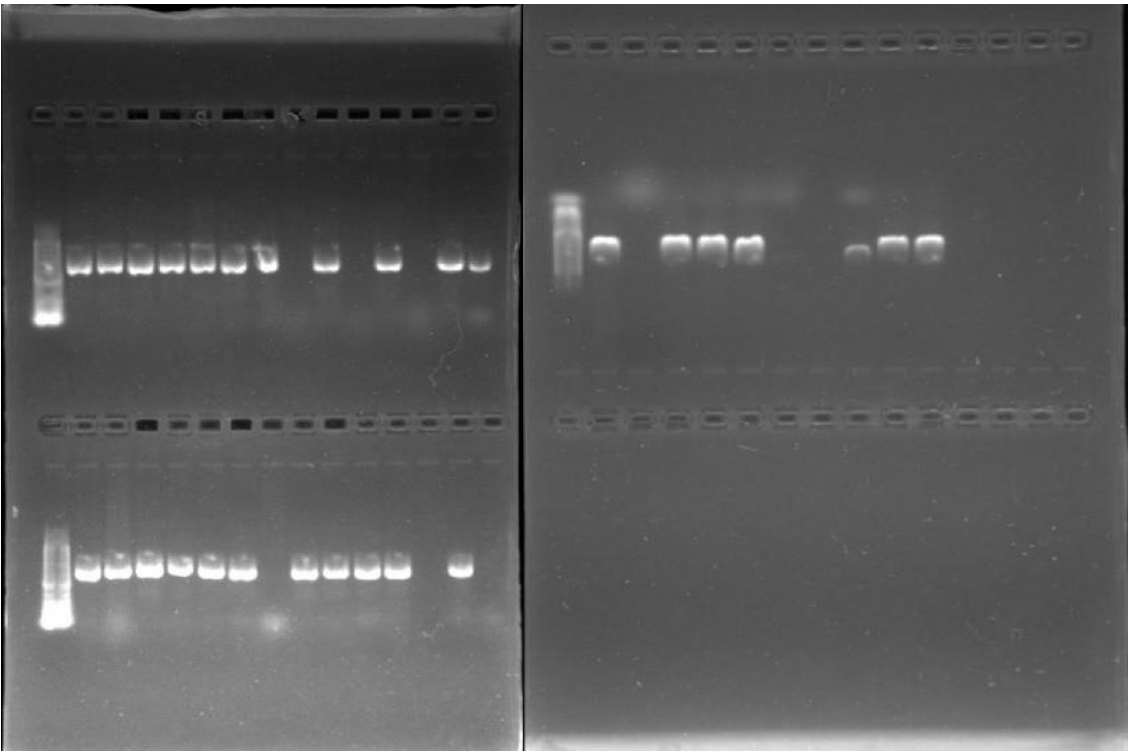


Figura 42. Amplificación del gen 16S del ADN mitocondrial de tejidos de las clases Amphibia y Reptilia correspondientes a presas potenciales. Carril 1: Marcador de peso molecular (50-1000 pb).

En cuanto al ADN obtenido a partir de tejidos de la colección de docencia y de las localidades, en la Figura 43 se observa que se extrajo ADN de individuos pertenecientes a grupos de anuros, lagartos y serpientes; además la concentración de ADN que se obtuvo a partir de las extracciones, cuya concentración más alta correspondió a un individuo de *Enyaloides heterolepis*, seguido por *Boana rosemergi* y *Nymphargus ruizi*. En los casos de *Basiliscus galeritus* y *Lepidoblepharis duolepis* se observan dos muestras por la localidad en donde se recogieron, garantizando la representatividad de los individuos en las dos bioregiones.

Para la pureza de las extracciones, se tiene en cuenta el valor de la proporción 260/280 (relación de absorbancia de la cantidad de ADN medida a 260 nm sobre la cantidad de proteína medida a 280 nm) (Figura 44/Figura 42), donde valores entre 1.6 - 2.2 se consideran óptimos para el ADN.

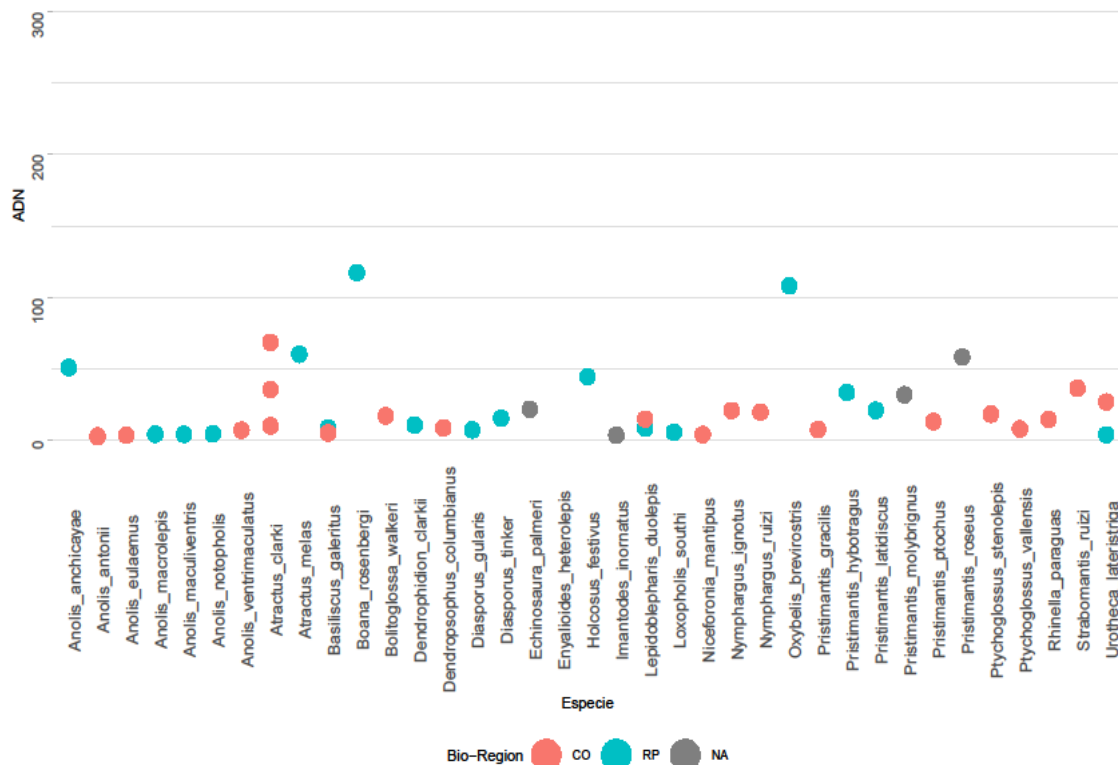


Figura 43. Resultados de la extracción de ADN de posibles presas. Los colores indican la bioregión a la que pertenecen las muestras: Región Occidental (CO), Región Pacífica (RP) y no aplica (NA) para tejidos de los cuales se hizo extracción, pero no fue posible amplificar. En el eje Y se muestra la concentración de ADN obtenida a partir de la extracción (ng/μl).

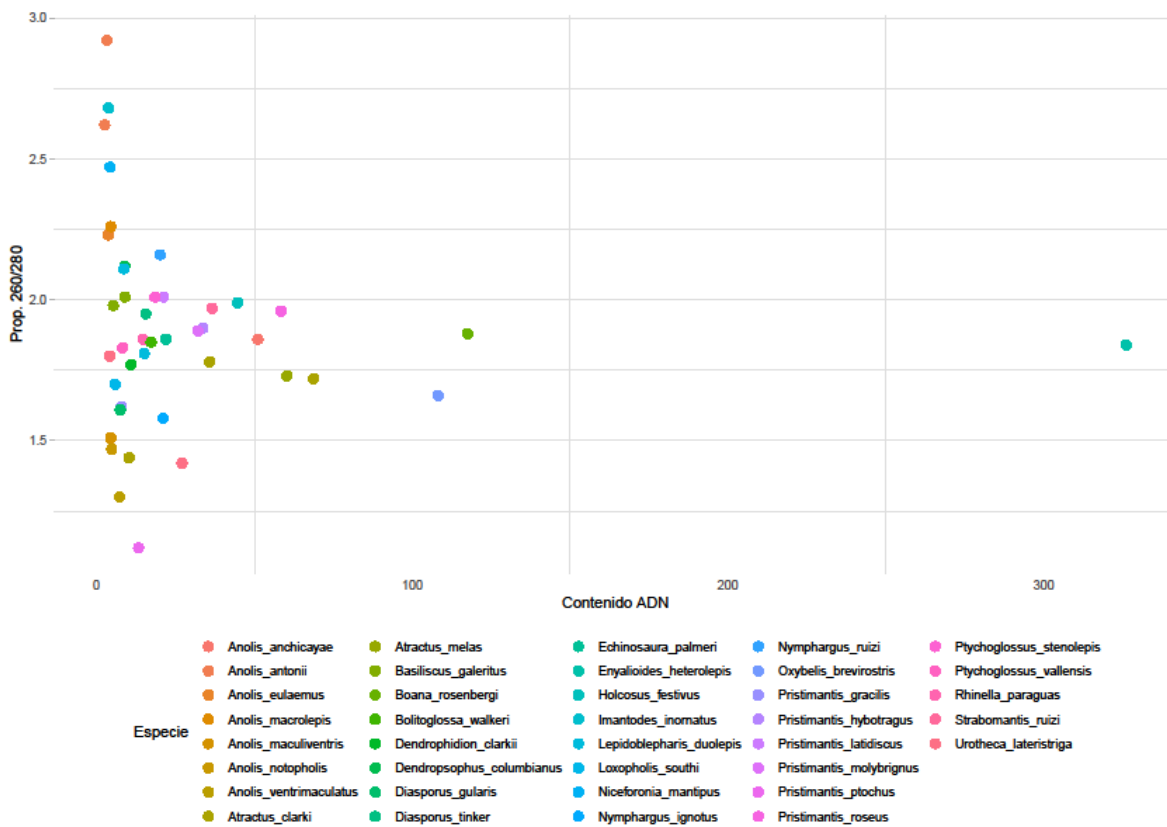


Figura 44. Pureza de las muestras de ADN extraído a partir de tejido de colecciones y campo, medido a través de la proporción 260/280.

## Extracción ADN muestras fecales serpientes

### Librería de metagenómica

Se obtuvieron muestras de heces de 17 serpientes venenosas de las registradas en el proyecto (Figura 45). Para las otras 10 serpientes restantes no se obtuvo muestra pese a que se esperó 72 horas a que evacuaran de manera natural y a que a cada individuo se le realizó un masaje ventral con el propósito de estimular el movimiento intestinal e inducir la expulsión de la materia fecal. La cantidad de muestra colectada por individuo varió respecto al tamaño de las

deposiciones, por lo que, la cantidad osciló entre uno y tres ependorf permitiendo de esta manera la obtención de replicas para algunos individuos.

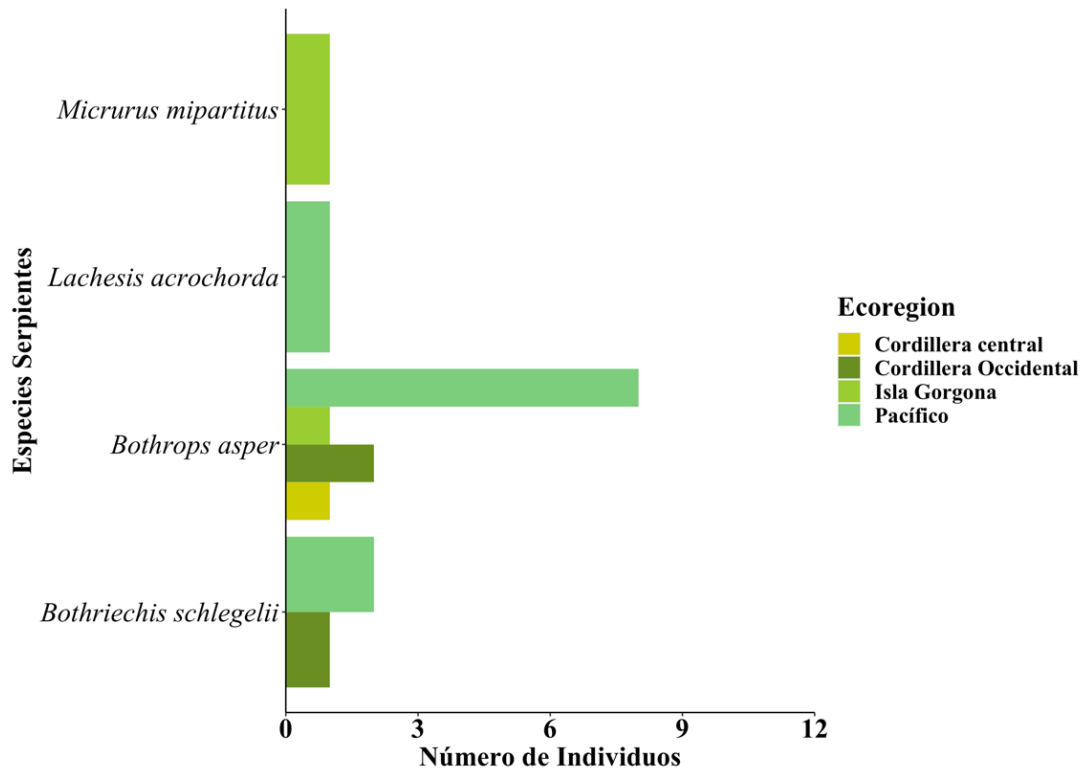


Figura 45. Número de individuos de *Bothrops asper*, *Bothriechis schlegelii*, *Lachesis acrochorda* y *Micrurus mipartitus* de los que se obtuvo muestra fecal.

### Extracción de ADN y amplificación en PCR

Todas las muestras de heces se procesaron de manera que se logró extraer ADN de las especies *B. asper*, *B. schlegelii*, *L. acrochorda* y *M. mipartitus*. En cuanto a la extracción de ADN a partir de heces, se logró amplificar ADN de 13 muestras, una *M. mipartitus* de la Isla Gorgona, seis *Bothrops asper* de la región pacífica, una para la región central y una para la región occidental; dos *B. schlegelii* para la región pacífica y una para la región occidental y, finalmente, una *Lachesis acrochorda* para la región pacífica (Figura 46, Figura 47).

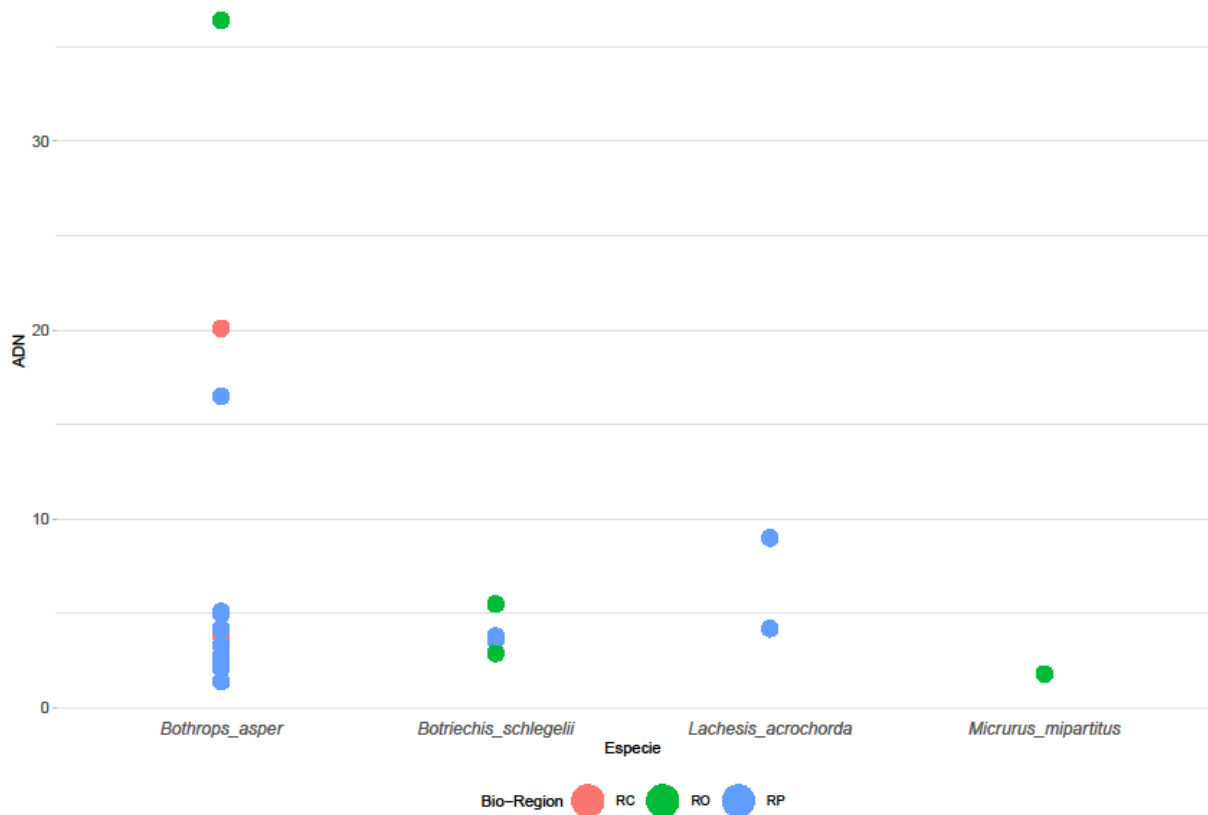


Figura 46. Concentración de ADN (ng/μl) obtenido a partir de muestras fecales de serpientes venenosas y discriminado por las bioregiones de interés: Región Central (RC), Región Occidental (RO) y Región Pacífica (RP).

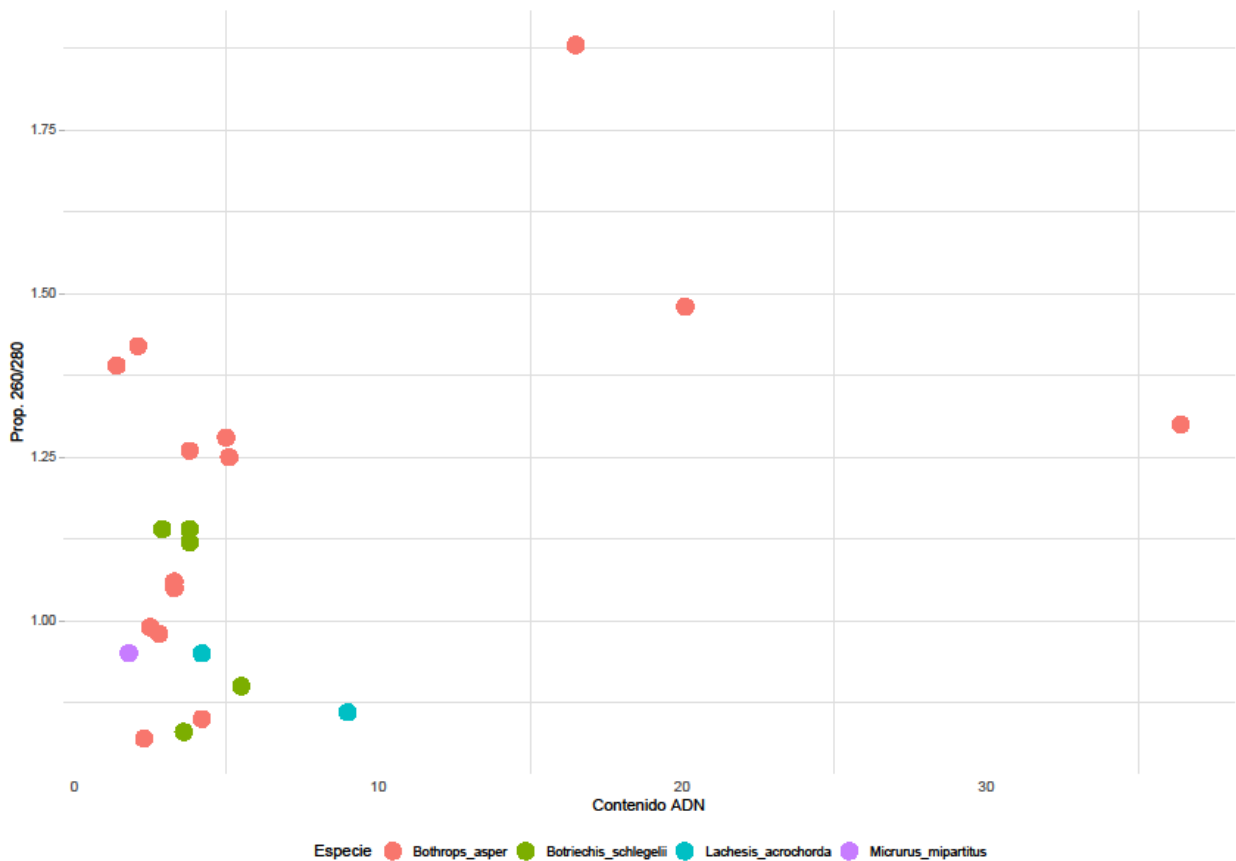


Figura 47. Concentración (ng/μl) y pureza del ADN obtenido a partir de muestras fecales de serpientes venenosas.

La información molecular fue validada al contrastar los datos moleculares con los bibliográficos por medio del índice de similitud de matrices presencia/ausencia con nivel taxonómico de familia ( $RV_{adj}=0.4811$ ). El espectro de presas se determinó a partir de la asignación de lecturas a cada presa y posteriormente a cada familia de organismos.

Después del proceso bioinformático se encontraron coincidencias y nuevos reportes de consumo para las especies estudiadas. En particular, para *B. asper* se reportan como nuevas



presas adicionales a las anteriormente conocidas, a individuos de las familias Gymnophthalmidae y Hoplocercidae. Para *B. schlegelii*, Plethodontidae, Gymnophthalmidae, Bufonidae, Dendrobatidae, Centrolenidae, Hoplocercidae, Corytophanidae, Sphaerodactylidae y Sciuroidae. Para *L. acrochorda*, se reporta como nuevas familias en su espectro dietario, las familias Craugastoridae, Hilydae, Dendrobatidae, Centrolenidae, Hoplocercidae, Dactyloidae, Corytophanidae, Sphaerodactylidae y Critecidae. Para *M. mipartitus*, los nuevos reportes abarcan las familias Hoplocercidae, Dactyloidae, Alopoglossidae, Teiidae (Figura 48). Las cuatro especies estudiadas están alimentándose en mayor proporción de animales pertenecientes a la taxa Amphibia (*B. asper*: 46.71%, *B. schlegelii*: 52.13%, *L. acrochorda*: 58.69%, *M. mipartitus*: 56.08%) (Figura 49).

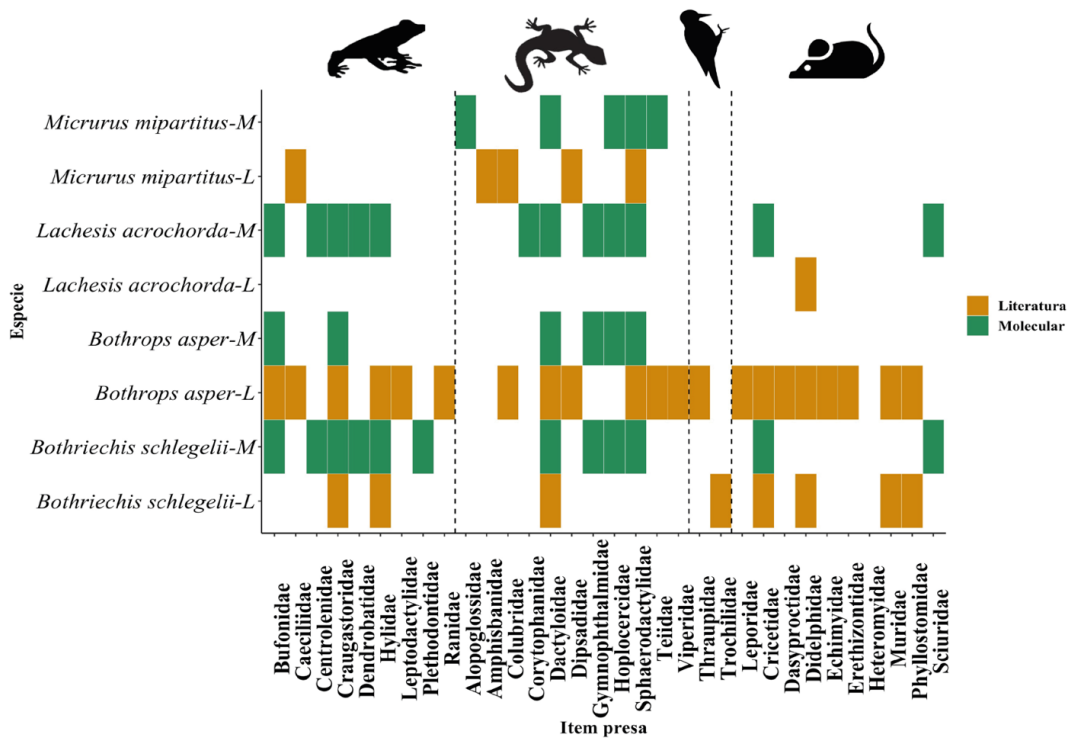
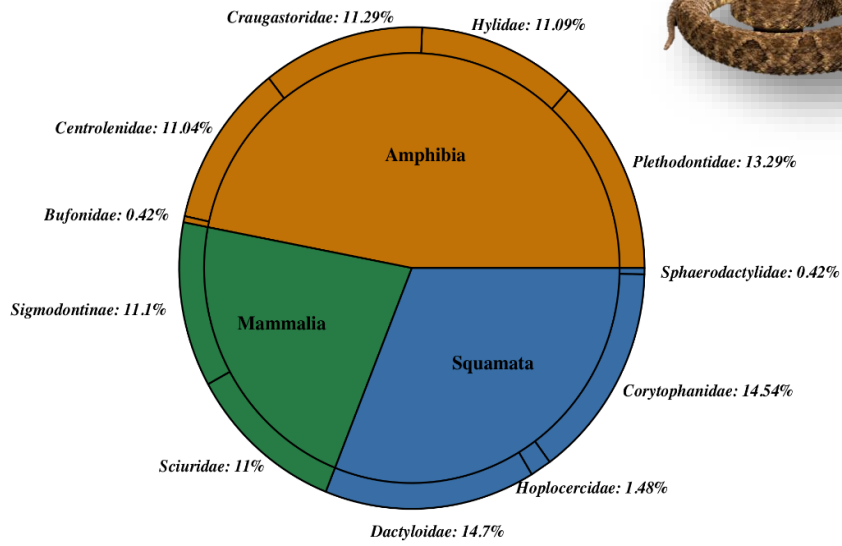
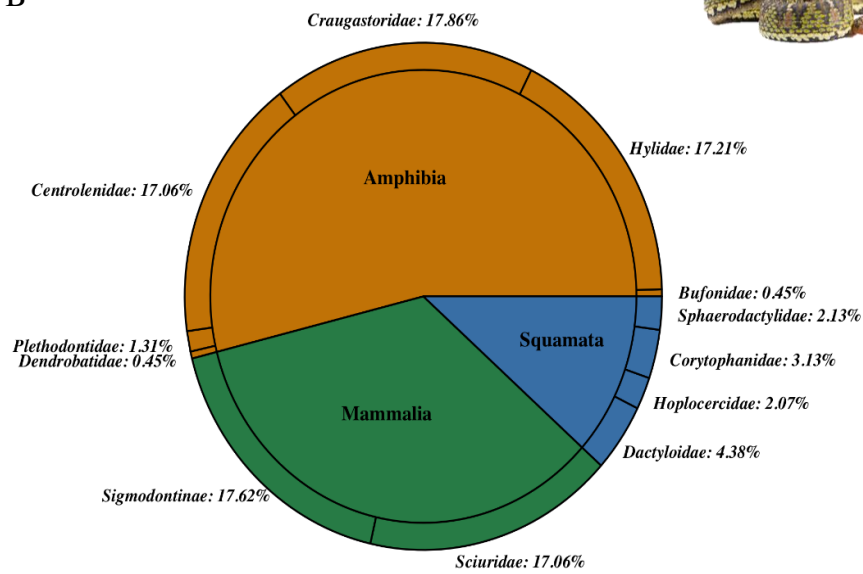


Figura 48. Reportes bibliográficos y moleculares para la dieta de cuatro especies de serpientes venenosas. En color amarillo, los reportes de literatura y en color verdes los reportes moleculares de este estudio.

A



B



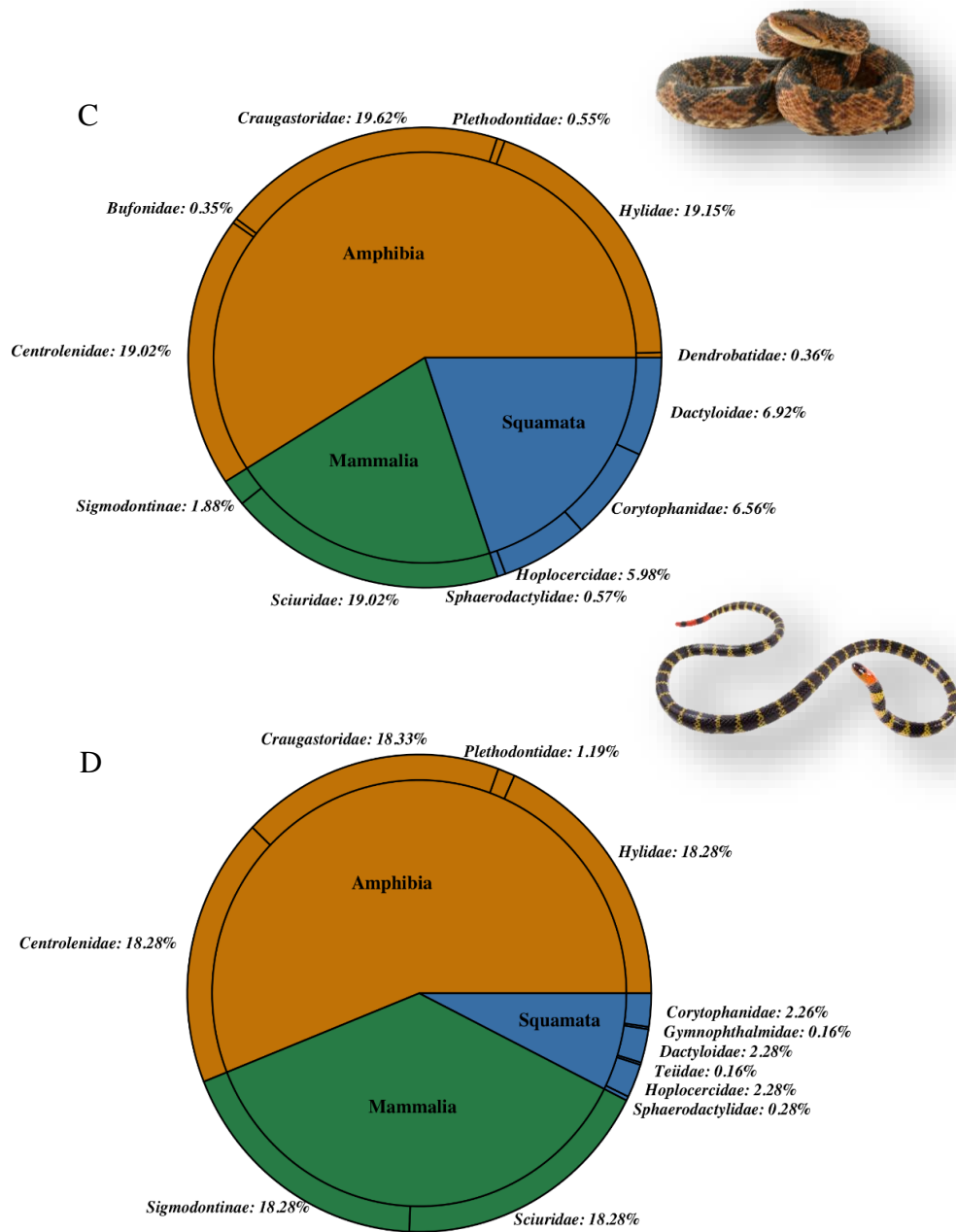


Figura 49. Repartición de nicho alimenticio y proporciones de consumo de ítems a nivel de clase y familias para A. *Bothrops asper*, B. *Bothriechis schlegelii*, C. *Lachesis acrochorda* y D. *Micrurus mipartitus*

Las técnicas de genética molecular, permiten identificar taxones de presas en el contenido estomacal, intestinal y fecal con una mayor resolución de la que se podría obtener mediante la observación directa de ítems. Por consiguiente, la información molecular contribuye a un nuevo nivel de precisión en los estudios de ecología trófica para serpientes (Kartinen et al. 2010) este tipo de herramientas, facilitan la elaboración de perfiles de dieta y reducen la interacción y el daño que puede ocasionarse en la manipulación de los organismos (Pompanon et al. 2012). Además de las ventajas que confiere sobre la ecología trófica en especies difíciles de observar mientras se alimentan (Kartzinel y Pringle 2014), como es el caso de la mayoría de especies de interés clínico para el Valle del Cauca. Diferentes investigaciones, han determinado para algunas especies de Viperidae y Elapidae variaciones geográficas y ontogénicas en la dieta, mientras que otras registran ítems alimenticios similares a través de su rango de distribución (Mociño-Deloya 2016). En esta investigación, no fue posible evaluar estos posibles cambios entre las eco-regiones del Valle del Cauca; consecuencia del número de muestras de heces efectivas de las especies de interés. Sin embargo, se estableció un relación entre la amplitud del nicho y la disponibilidad de presas.

La construcción de una librería de referencia fue vital en el proceso de identificación de las presas. En primer lugar, porque en la búsqueda de los individuos presa por medio de literatura, se encontró que la base de datos del GenBank® (Benson et al. 2005) no contaba con secuencias de todas las especies presumidas de la localidad del estudio. En segundo lugar, para evitar perder información dietaria al no contar al menos con una secuencia de

cualquier organismo dentro del espectro de presas potenciales y, en tercer lugar, porque los procesos bioinformáticos tardan mayor tiempo si la base de datos es muy grande.

Para este caso, se planeaba utilizar la base de datos del 16s, que incluye muestras de ADN para todos los grupos vertebrados, invertebrados e incluso microorganismos como bacterias y hongos; sin embargo tal como lo describe Rueda y colaboradores (*in prep*) se necesita un alto poder de resolución para hacer la identificación dietaria por medio de tecnologías de secuenciación de nueva generación, esta resolución es dada por la especificidad en la recolección de ADN de presas en cada localidad donde se hagan este tipo de estudios, pues se sabe que genéticamente pueden existir y, dependiendo del marcador, inserciones o deleciones que pueden dar lugar a confusiones en la identificación (Hoogendoorn y Heimpel, 2001).

Según Vences et al. (2016) el primer fue diseñado para amplificar ADN de fragmentos de 250 pb que permitían la identificación de presas en todo el espectro de los vertebrados; pero esa posibilidad se traduce en primers degenerados que pueden dar origen a amplificaciones de fragmentos que no corresponden a presas ni depredadores. Se convierten, además, en un producto contaminante que se trató de eliminar por purificación en gel, pero hubo casos en los que no era posible eliminarlos sin perder ADN; por lo que se decidió secuenciar y eliminar esa secuencia en el momento de filtrar la calidad de los reads; no obstante, este proceso comprometió la calidad de algunas muestras por lo que no fue posible identificar la dieta de todas las serpientes a las que se les colectó muestra fecal.

Las lecturas faltantes se asignaron al taxón familia; ya que si se identificaba sólo por especie y por el valor en porcentaje (sólo se tomaron valores por encima del 90%) se corrían sesgos de identificación, por lo que se tuvo en cuenta, además, el valor del e-value y el de hits o cubrimiento de la longitud de la secuencia. Aun así, todavía es posible hacer inferencias con la información obtenida, pues se representa en porcentaje de familias como se está particionando el nicho dietario (Rueda *et al.*, *in prep*). Este estudio representa el primero en tratar dietas de serpientes venenosas en el Valle del Cauca a partir de datos metagenómicos.

El gen 16S está ampliamente conservado dentro de los grupos de organismos (Simon et al. 2006) y aunque se tuvieron en cuenta valores de hits, e-value y porcentaje de identidad para asignar una identidad a los MOTUs, no sería prudente asignar una identidad a nivel de especie por los pocos cambios que puede tener el gen entre las especies, ya que la tasa de sustitución entre nucleótidos es baja (Mueller 2006). Pero una ventaja del marcador es que las células epiteliales que hacen parte del intestino de los depredadores poseen cientos de copias del genoma mitocondrial (Hoy, 1994); entonces, tener cientos de copias incrementa la sensibilidad de la detección y aumenta la probabilidad de amplificar ADN de la presa (King et al. 2008).

Se entiende que la amplificación no es un proceso fácil en el tipo de tejido (en este estudio se hicieron aproximadamente 110 PCRs entre estandarización, amplificación y ligación de barcodes) por lo cual, Krehenwinkel y colaboradores (2017) sugieren hacer un enriquecimiento del ADN antes de empezar las amplificaciones. El cual, puede ser dejando



las muestras en lisis por un tiempo mayor al estimado por el fabricante (en el rango de horas). En este estudio se dejaron las muestras en lisis por 12 horas, pero también, se hizo la concentración de algunas alícuotas de ADN en speedvac. Adicionalmente, sugerimos colectar todo el material fecal posible y extraerlo como réplicas para luego tener una mayor cantidad de ADN y hasta garantizar mayor concentración de ADN por individuo.

Otra ventaja de usar las herramientas moleculares es que permiten recuperar taxones que antes no se conocían como presas, tal vez por considerarse raros, escasos o sin reportes observacionales; contribuyendo a ampliar el espectro conocido de presas. En este estudio se reportan nuevas presas encontradas a través de procesos moleculares (*Bothrops asper* familias Gymnophthalmidae y Hoplocercidae. Para *Bothriechis schlegelii*, Plethodontidae, Gymnophthalmidae, Bufonidae, Dendrobatidae, Centrolenidae, Hoplocercidae, Corytophanidae, Sphaerodactylidae y Sciuroidae. Para *Lachesis acrochorda*, se reporta como nuevas familias en su espectro dietario, las familias Craugastoridae, Hilyidae, Dendrobatidae, Centrolenidae, Hoplocercidae, Dactyloidae, Corytophanidae, Sphaerodactylidae y Critecidae. Para *Micrurus mipartitus*, Hoplocercidae, Dactyloidae, Alopoglossidae, Teiidae). Los ítems alimenticios reportados, sugieren un rango alimenticio más amplio del establecido para algunas especies; son los casos de *Micrurus mipartitus* con el consumo de Hoplocercidae y Teiidae, en estos grupos los individuos presentan proporciones corporales que sobrepasan la capacidad de expansión mandibular de *Micrurus*; esto sugiere que la presencia de estas dos familias en la dieta, es posible, relacionarla al consumo de huevos o neo-natos.

Caso relativamente contrario, ocurrió con *Lachesis acrochorda*, las muestras obtenidas para esta especie, correspondieron a un individuo adulto ( $> 2m$ ); se esperaba que los ítems alimenticios, abarcaran presas de tallas medianas a grandes. Sin embargo, se estableció una mayor proporción de consumo de anfibios y lagartos; esto se puede relacionar con la cantidad de lecturas asociadas a estos dos grupos (mayor presencia en la librería de referencia) o a la disponibilidad de estas especies como recursos alimenticio en el área de distribución de *L. acrochorda*.

En algunos organismos no se encontraron las presas normalmente conocidas o reportadas por la comunidad científica, cuando se esperaba que tuvieran un componente importante dentro de la dieta, como, por ejemplo, mamíferos y aves como presas (Boada et al. 2005, Sasa et al. 2009, Mendoza y Fernández 2011, Segovia-Nuñez 2014). Este estudio no pudo reportar presas como aves por no tener secuencias adecuadas del gen de interés (16S); mientras que para los mamíferos, las secuencias disponibles que correspondieran a organismos que compartían localidad fueron muy poca, en nuestro caso dos familias (Sciuridae y Sigmodontidae); sin embargo, aún es posible decir que el espectro de consumo corresponde a lo observado en la naturaleza, primero, por la validación estadística y segundo, porque el porcentaje de no hits (secuencias que no correspondieron a ninguno de los organismos de la librería de referencia) fue muy bajo (6%). Además de los anterior, también es posible que no se encuentren presas previamente reportadas por dos tipos de condiciones: problemas de tasas de digestión de presas (varía depende del tamaño de la presa, el metabolismo del depredador,

etc.) (King et al. 2008) o a problemas en los procesos moleculares (inhibición de PCR, calidad del ADN, depredación secundaria, etc) (Pompanon et al. 2012).

## 6. CONCLUSIONES

Los venenos de *Bothrops asper* de las ecorregiones Pacífica, Occidente y Gorgona presentaron un perfil proteico complejo indicado tanto por SDS-PAGE como por RP-HPLC. Las ecorregiones del pacífico y Gorgona evidenciaron unos perfiles cromatográficos muy similares y discreparon en su perfil con la ecorregión Occidental. Al llevar a cabo el análisis proteómico de las tres ecorregiones estudiadas, se identificaron ocho (8) familias de proteínas tales como: **MP** - metaloproteasas; **PLA<sub>2</sub>** - Fosfolipasa A<sub>2</sub>; **CRiSP** - Proteínas secretorias ricas en cisteínas; **LAAO** - L-amino oxidasas; **NGF** - Factor de crecimiento nervioso; **SP** - serina proteasa; **CTL** - Proteínas de lectina tipo C y **NUC**- nucleotidasa.

El envenenamiento ofídico generado por los venenos de *B. asper* de las tres ecorregiones en un biomodelo animal se caracterizó por presentar efectos locales y sistémicos. Dentro de los efectos locales se encontró hemorragia y edema en los primeros minutos de inoculación. Dentro de los efectos sistémicos se logró observar un proceso de anticoagulación, posiblemente por la presencia de proteínas serina proteasas, en sinergismo con las diferentes proteínas presentes en el veneno de serpiente. Por lo tanto, se considera que el principal mecanismo de inmovilización de la presa por la serpiente *B. asper* podría ser: sangrado, permeabilidad vascular y extravasación tanto en sitios locales y sistémicos que conlleva a un estado hipovolémico del biomodelo y por ende lo conduce a un shock hipovolémico cardiovascular.

El veneno de *Lachesis acrochorda* presentó un perfil proteico con siete (7) familias: **MP**: metaloproteasas; **PLA<sub>2</sub>**: Fosfolipasa A<sub>2</sub>; **LAAO**: L-amino oxidasas; **NGF**: Factor de crecimiento nervioso; **SP**: serina proteasa; **CTL**: Proteínas de lectina tipo C; **NUC**: nucleotidasa. Dicho perfil difirió significativamente del reportado por Madrigal et al. (2012) para individuos de la misma especie distribuidos en otra región. Lo cual sugiere que las manifestaciones clínicas provocadas por mordeduras de estas especies de diferentes regiones podrían variar significativamente y con ello, su tratamiento. En relación con los análisis funcionales, se encontró que las estimaciones de la dosis letal<sub>50</sub>, la actividad hemorrágica y la actividad coagulante es mayor para esta especie que para *B. asper*. Contrariamente, la actividad miotóxica, la actividad PLA<sub>2</sub>, la actividad coagulante y la actividad proteolítica es más elevada para *B. asper*.

Al evaluar los antivenenos comerciales INS y Probiol, se encontró que el antiveneno del INS presentó un alto contenido de IgG, a diferencia de Probiol que mostró un porcentaje bajo de proteínas IgG y un alto contenido de proteínas no IgG que podría afectar el reconocimiento de la mayoría de las proteínas presentes en los venenos de las tres ecorregiones. El perfil proteico de los antivenenos estudiados, sugiere que se requerirá una mayor cantidad de ampollas del antiveneno Probiol para inhibir los efectos de los venenos de serpiente. Para confirmar dicha hipótesis, se recomienda llevar a cabo ensayos de neutralización en ratones para conocer las cantidad de antiveneno mínimo necesario.

En la actualidad, estos antivenenos disponibles actúan de manera efectiva frente al ofidismo en el Valle del Cauca. No obstante, las diferencias en los perfiles proteicos que aquí se reportan, sugieren que en el futuro las manifestaciones y por ende el tratamiento de la mordedura por *B. asper* puede variar entre las regiones del departamento.

El método de detección de presas de manera molecular a partir de tejido no invasivo es válido para identificar presas hasta la categoría taxonómica de familia, sin embargo, hay que resaltar que la técnica se complementó con los datos de ecología clásica por lo que lo ideal sigue siendo integrar los dos tipos de datos para obtener y aprovechar mejor la información disponible. Este método también brinda oportunidades de detectar presas antes no conocidas, pero es fundamental tener una colección de secuencias de las posibles presas o animales que habitan la zona de estudio. Esta investigación es la primera en estudiar dieta de serpientes venenosas en el Valle del Cauca, desde una aproximación molecular y metagenómica.

## 7. LITERATURA CITADA

Aguilar, I., Guerrero, B., Salazar, A. M., Girón, M. E., Pérez, J. C., Sánchez, E. E. and Rodríguez-Acosta, A. (2007). “Individual venom variability in the South American rattlesnake *Crotalus durissus cumanensis*”. *Toxicon*, 50(2), 214-224.

Agudelo, Y. (2005). *Actualización en accidente ofídico*. En: Medicina que aprende para enseñar y enseña para aprender. Memorias 5° curso de actualización en conocimientos médicos generales. ANIR. Medellín, pp. 255-266.

Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., y Calvete, J. J. (2008). Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *Journal of proteome research*, 7(8), 3556-3571.

Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., Madrigal, M., Escolano, J., Sasa, M. and Calvete, J. J. (2009). “Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: perspectives and applications”. *Toxicon*, 54(7), 938-948.

Amazonas, D. R., Portes-Junior, J. A., Nishiyama-Jr, M. Y., Nicolau, C. A., Chalkidis, H. M., Mourão, R. H. and Junqueira-de-Azevedo, I. L. (2018). “Molecular mechanisms underlying intraspecific variation in snake venom”. *Journal of proteomics*, 181, 60-72.

Amazonas, D. R., Freitas-de-Sousa, L. A., Orefice, D. P., Sousa, L. F. D., Martinez, M. G., Mourão, R. H. and Moura-da-Silva, A. M. (2019). “Evidence for Snake Venom Plasticity in a Long-Term Study with Individual Captive *Bothrops atrox*”. *Toxins*, 11(5), 294.

Araújo, AL y Radvanyi, F. (1987). Determinación de la actividad de la fosfolipasa A2 mediante un ensayo colorimétrico utilizando un indicador de pH. *Toxicon: revista oficial de la Sociedad Internacional de Toxinología*, 25 11 , 1181-8

Arnold, S.J. (2001). Foraging theory and prey size-predator size relations in snakes. In R.A. Seigel y J.Y. Collins (eds), *Ins Snakes: Ecology and Behavior*. Pp. 87-115. The Blackburn Press., Caldwell, New Jersey. Reprint of first edition 1993.

Ávila-Villegas, H., Martins, M. y Arnaud, G. (2007). Feeding ecology of the endemic rattleless rattlesnake, *Crotalus catalinensis*, of Santa Catalina Island, Gulf of California, Mexico. *Copeia* (2007): 80-84

Ayerbe, S., Tidwell, M.A. y Tidwell, M. (1990). Observaciones sobre la biología y comportamiento de la serpiente coral “rabo de ají” (*Micrurus mipartitus*): Descripción de una subespecie nueva. *Museo de historia natural de la Universidad del Cauca*, 2, 30-41.

Benavides, M., Molina, R.A., Beitia, P. y García, M.A (2012). Conocimiento del manejo del accidente ofídico en instituciones hospitalarias en el Valle del Cauca, 2012. *Ciencia y Salud*, 2(7), 27-31.

Boada, C., Salazar-V, D., Lascano, A. y Kuch, U. (2005). The diet of *Bothrops asper* (Garman, 1884) in the Pacific lowlands. *Herpetozoa*, 18, 77-79.

Boldrini-Franca, J., Cologna, C. T., Pucca, M. B., Bordon, K. D. C. F., Amorim, F. G., Anjolette, F. A. P. and Shibao, P. Y. T. (2017). “Minor snake venom proteins: Structure, function and potential applications”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1861(4), 824-838.

Buttenhoff, P.A. y Vogt, R.C. (1995). Natural history notes: *Bothrops asper* (Nauyaca) Cannibalism. *Herpetological Review*, 26, 146–147.

Bolívar-García W., Gómez-Figueroa, A., Blanco-Torres, A. y Giraldo, A. (2019). Capítulo V Ecología Trófica. En, Vargas-Salinas, F., Muñoz-Avila, J.A y Morales-Puentes M.E (Coordinadores), *Biología De Los Anfibios Y Reptiles En El Bosque Seco Tropical Del Norte De Colombia*. Editorial UPTC. Tunja. 484 pp.

Buttenhoff, P.A. y Vogt, R.C. (1995). Natural history notes: *Bothrops asper* (Nauyaca) Cannibalism. *Herpetological Review*, 26, 146–147.

Calvete, J. J., Sanz, L., Pérez, A., Borges, A., Vargas, A. M., Lomonte, B. and Furtado, M. F. D. (2011a). “Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management”. *Journal of proteomics*, 74(4), 510-527.

Calvete, J. J. (2011b). “Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming”. *Expert review of proteomics*, 8(6), 739-758

Calvete, J. J. (2013). “Snake venomomics: from the inventory of toxins to biology”. *Toxicon*, 75, 44-62.

Calvete, J. J. (2017). “Venomics: integrative venom proteomics and beyond. *Biochemical Journal*, 474(5), 611-634.

Campbell, J.A. (1998). *Amphibians and Reptiles of Northern Guatemala, Yucatan, and Belize*. University of Oklahoma Press, Oklahoma, 400 pp.



Campbell, J.A. y Lamar, W. (2004). *The venomous reptiles of the western hemisphere*. Cornell University Press, Ithaca, NY. Comstock Publishing, Cornell University Press, Ithaca. 475 pp.

Cañas, D.C., Castro-Herrera, F. and Castaño, V.R.S. (2016). *Serpientes venenosas: lecciones aprendidas desde Colombia*. Fundación Clínica Valle del lili, Cali-Colombia. 256 pp.

Cardona-Botero, V. E., Viáfara-Vega, R. A., Valencia-Zuleta, A., Echeverry-Bocanegra, A., Hernández-Córdoba, O. D., Jaramillo-Martinez, A. F. and Castro-Herrera, F. (2013). “Diversidad de la herpetofauna en el Valle del Cauca (Colombia): un enfoque basado en la distribución por ecorregiones, altura y zonas de vida”. *Biota Colombiana*, 14(2).

Carreon, L. y Heath, D. (2009). Revolution in food web analysis and trophic ecology: diet analysis by DNA and stable isotope analysis. *Molecular Ecology*, 19 (1), 25-27

Carrillo de Espinoza, N. (1983). Contribución al conocimiento de las serpientes venenosas del Perú de las familias Viperidae, Elapidae e Hydrophiidae (Ophidia: Reptilia). *Publicaciones del Museo de Historia Natural. "Javier Prado", Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima; (Ser. A, Zool.)*, 30, 1-55.

Casewell, N. R., Wüster, W., Vonk, F. J., Harrison, R. A. and Fry, B. G. (2013). “Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms”. *Trends in ecology y evolution*, 28(4), 219-229.

Castrillón-Estrada, D.F., Acosta, J.G., Hernández-Ruiz, E. y Alonso, L.M. (2007). Envenenamiento ofídico. *Salud Uninorte. Barranquilla (Col.)*, 22(1), 96-111.

Charvat, R. A., Strobel, R. M., Pasternak, M. A., Klass, S. M. and Rheubert, J. L. (2018). “Analysis of snake venom composition and antimicrobial activity”. *Toxicon*, 150, 151-167.

Chippaux, J. P. (2017). “Incidence and mortality due to snakebite in the Americas”. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(6), e0005662

Chippaux, J.P., Williams, V. y White, J. (1991). Snake venom variability: methods of study, results, and interpretation. *Toxicon*, 29 (11), 1279-303.

Cisneros-Heredia, D.F. (2005). Predation upon *Amphisbaena fuliginosa* Linnaeus, 1758 by *Micrurus ancoralis*. *Herpetozoa*, 18, 93-94.

Culma, M. F., Pereanez, J. A., Rangel, V. N. and Lomonte, B. (2014). “Snake venomomics of *Bothrops punctatus*, a semiariboreal pitviper species from Antioquia, Colombia”. *PeerJ*, 2, e246.

Da Silva, N.J. y Aird, S.D. (2001). Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 128(3), 425-456.

De arco-Rodríguez, B., Montealegre-Sánchez, L., Solano-Redondo, L., Castro-Herrera, F., Ortega, J. G., Castillo, A. and Jiménez-Charris, E. (2019). “Phylogeny and toxicological assessments of two *Porthidium lansbergii* morphotypes from the caribbean region of Colombia”. *Toxicon*, 166, 56-65.

Dugan, E.A. y Hayes, W.K. (2012) Diet and feeding ecology of the red diamond rattlesnake, *Crotalus ruber* (Serpentes: Viperidae). *Herpetologica*, 68(2), 203-217

Díaz-Ricaurte, J.C., Guevara-Molina, C. y Cubides-Cubillos, S. 2017. *Lachesis muta*. Catálogo de anfibios y reptiles de Colombia, 3(2): 20-24.

Dugan, E.A. y Hayes, W.K. (2012) Diet and feeding ecology of the red diamond rattlesnake, *Crotalus ruber* (Serpentes: Viperidae). *Herpetologica*, 68(2), 203-217.

Duque, A. M. H., y Rangel, V. N. (2016). “Mantenimiento en cautiverio de la coral rabo de ají (*Micrurus mipartitus*) y evaluación en la variabilidad individual de su veneno”. *Acta Biológica Colombiana*, 21(3), 593.

Dunshea, G., Barros, N.B., Wells, R.S, Gales, N.J, Hindell, M.A. y Jarman, S.N. (2008). Pseudogenes and DNA-based diet analyses: a cautionary tale from a relatively well sampled predator-prey system. *Bulletin of Entomological Research*, 98, 239-248.

Finney DJ. (1971). *Statistical Methods in Biological Assay*. London: Charles Griffin and Company Limited.

Fonseca, A., Renjifo-Ibáñez, C., Renjifo, J. M. and Cabrera, R. (2018). “Protocol to obtain targeted transcript sequence data from snake venom samples collected in the Colombian field”. *Toxicon*, 148, 1-6.

Ford, N.B. y Hampton, P.M. (2009). Diferencias entre la genética y el sexo en la dieta de una serpiente que se alimenta activamente, *Thamnophis proximus*. *Canadian Journal of Zoology*, 87, 254-261.

Freire, A. y Kuch, U. (2000). *Bothrops campbelli* (Campbell's lancehead). Diet and reproduction. *Herpetological Review*, 31(1): 45.

Fry, B. G., Winkel, K. D., Wickramaratna, J. C., Hodgson, W. C. and Wüster, W. (2003). “Effectiveness of snake antivenom: species and regional venom variation and its clinical impact”. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 22(1), 23-34.

- Gay, C., Sanz, L., Calvete, J. and Pla, D. (2016). “Snake venomics and antivenomics of *Bothrops diporus*, a medically important pitviper in northeastern Argentina”. *Toxins*, 8(1), 9.
- Gardner, S.A. y Mendelson, J.R. (2003). Diet of the leaf-Nosed Snakes, *Phyllorhynchus* (Squamata: Colubridae): squamata-egg specialists. *The Southwestern Naturalist*, 48, 550-556.
- Gibbs, H.L. y Mackessy, S.P. (2009). Functional basis of a molecular adaptation: prey-specific toxic effects of venom from *Sistrurus rattlesnakes*. *Toxicon*, 53, 672-9.
- Girish, K. S., Jagadeesha, D. K., Rajeev, K. B. and Kemparaju, K. (2002). “Snake venom hyaluronidase: an evidence for isoforms and extracellular matrix degradation”. *Molecular and cellular biochemistry*, 240(1-2), 105-110.
- Girón, M. E., Salazar, A. M., Aguilar, I., Pérez, J. C., Sánchez, E. E., Arocha-Piñango, C. L., and Guerrero, B. (2008). “Hemorrhagic, coagulant and fibrinolytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes”. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology*, 147(1), 113-121.
- Girón, M. E., Padrón, V., Ramos, M. I., Sánchez, E. E., Guerrero, B., García, A. and Rodríguez-Acosta, A. (2018). “Intraspecies geographical variability in the South American tigrá mariposa (*Bothrops venezuelensis* Sandner 1952) snake venom activities”. *Toxicon*, 144, 23-33.
- Glaudas, X., Jezkova, T. y Rodriguez-Robles, J.A. (2008). Feeding ecology of the Great Basin Rattlesnake (*Crotalus lutosus*, Viperidae). *Canadian Journal of Zoology*, 86, 723-734.
- Gómez, C. y Buitrago-González, W. (2017), *Bothriechis schlegelii* (Berthold 1846). *Catálogo de Anfibios y Reptiles de Colombia*, 3(1), 1-11.
- Gómez, C. y Buitrago-González, W. (2017), *Bothriechis schlegelii* (Berthold 1846). *Catálogo de Anfibios y Reptiles de Colombia*, 3(1), 1-11.
- Greene, H.W. (1984). Feeding behavior and diet of the eastern coral snake, *Micrurus fulvius*. *Spec Publ Univ Kansas Mus Nat Hist*, 10, 147-62.
- Greene, H.W. y Hardy, D.L. (1989). Natural death associated with skeletal injury in the terciopelo *Bothrops asper* (Viperidae). *Copeia*, 1989, 1036-1037.
- Guércio, R. A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., López-Lozano, J. L., Paba, J., Sousa, M. V. and Ricart, C. A. (2006). “Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*”. *Proteome science*, 4(1), 11.

Gutiérrez, J., Avila, C., Camacho, Z., y Lomonte, B. (1990). “Ontogenetic changes in the venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (bushmaster) from Costa Rica”. *Toxicon*, 28(4), 419-426.

Gutiérrez, J. M., Chaves, F. and Bolaños, R. (1980). “Estudio comparativo de venenos de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*”. *Revista de Biología Tropical*, 28(2), 341-351.

Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., Cerdas, L. (1986). Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. *Toxicon*;24:885–94.

Gutierrez, J.M., Lomonte, B., León, G., Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., Angulo, Y. y Calveted, J.J. (2009a). Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *Journal of Proteomics*, 72(2009), 165-182.

Gutiérrez, J. M., Sanz, L., Flores-Díaz, M., Figueroa, L., Madrigal, M., Herrera, M. y Alape-Girón, A. (2009b). “Impact of regional variation in *Bothrops asper* snake venom on the design of antivenoms: integrating antivenomics and neutralization approaches”. *Journal of Proteome Research*, 9(1), 564-577.

Hamilton, B.T., Hart, R. y Sites, J.W. (2012). Feeding ecology of the milksnake (*Lampropeltis Triangulum*, Colubridae) in the western United States, *Journal of Herpetology* 46(4), 515-522.

Hirth, H.F. (1964). Observations of the fer-de-lance *Bothrops atrox* in coastal Costa Rica. *Copeia*, 1964, 453-454.

Hoogendoorn, M. y Heimpel, G. E. (2001). PCR-based gut content analysis of insect predators: using ribosomal ITS-1 fragments from prey to estimate predation frequency. *Molecular Ecology*, 10(8), 2059-2067.

INS: Protocolo de accidente ofídico. Ministerio de Protección Social – Instituto Nacional de Salud. Versión actualizada 2006. Cód INS 100. Available at: [https://www.minsalud.gov.co/comunicadosPrensa/Documents/ACCIDENTE\\_OFIDICO.pdf](https://www.minsalud.gov.co/comunicadosPrensa/Documents/ACCIDENTE_OFIDICO.pdf) (accessed 28 august 2019).

Jiménez-Charris, E., Montealegre-Sanchez, L., Solano-Redondo, L., Mora-Obando, D., Camacho, E., Castro-Herrera, F. and Lomonte, B. (2015). “Proteomic and functional analyses of the venom of *Porthidium lansbergii lansbergii* (Lansberg's hognose viper) from the Atlantic Department of Colombia”. *Journal of proteomics*, 114, 287-299.

Junqueira-de-Azevedo, I. L., Campos, P. F., Ching, A. T. and Mackessy, S. P. (2016). “Colubrid venom composition: an-omics perspective”. *Toxins*, 8(8), 230.

Kaartinen, R., Stone, G., Hearn, J., Lohse, K. y Roslin, T. (2010). Revealing secret liaisons: DNA barcoding changes our understanding of food webs. *Ecological Entomology*, 35(5), 623-638.

Kalil, J. and Fan, H. W. (2017). *Production and utilization of snake antivenoms in South America*. In Gopalakrishnakone, P., Cruz, L.J and Luo, S. (Eds). *Toxins and Drug Discovery*. Springer. 81-101 pp.

Kardong, K. V. and Bels, V. L. (1998). "Rattlesnake strike behavior: kinematics". *Journal of Experimental Biology*, 201(6), 837-850.

Kartzinel, T.R y Pringle, R.M. (2014). Molecular detection of invertebrate prey in vertebrate diets: trophic ecology of Caribbean Island lizards. *Molecular Ecology*, 15(4), 903-914.

Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A.R., de Silva, N., Gunawardena, N.K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D. y de Silva, H.J. (2008). The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. *PLoS Medicine*, 5, 1591-604.

King, R. A., Read, D. S., Traugott, M., y Symondson, W. (2008). INVITED REVIEW: Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. *Molecular ecology*. 17(4), 947-963.

Krehenwinkell, H., Kennedy, S., Pekár, S. y Gillespie, R.G. (2017). A cost-efficient and simple protocol to enrich prey DNA from extractions of predatory arthropods for large-scale out content analysis by Illumina sequencing. *Methods in Ecology and Evolution*, 8, 126-134.

Lillywhite, H. (2014). *How snakes work* (1st ed., pp. 3 - 37). Oxford: Oxford University Press.

Lomonte, B., Fernández, J., Sanz, L., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J. M. and Calvete, J. J. (2014a). "Venomous snakes of Costa Rica: Biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomics". *Journal of proteomics.*, 105, 323-339.

Lomonte B, Tsai WC, Ureña-Díaz JM, Sanz L, Mora-Obando D, Sánchez EE, et al. (2014b) Venomics of New World pit vipers: genus-wide comparisons of venom proteomes across Agkistrodon. *J Proteomics*; 96:103–16.

Lomonte, B., Rey-Suárez, P., Fernández, J., Sasa, M., Pla, D., Vargas, N. and Alape-Girón, A. (2016a). "Venoms of *Micrurus coral* snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses". *Toxicon*, 122, 7-25.



Lomonte, B., Sasa, M., Rey-Suárez, P., Bryan, W. and Gutiérrez, J. (2016b). “Venom of the coral snake *Micrurus clarki*: proteomic profile, toxicity, immunological cross-neutralization, and characterization of a three-finger toxin”. *Toxins*, 8(5), 138.

López-Lozano, J. L., de Sousa, M. V., Ricart, C. A. O., Chávez-Olortegui, C., Sanchez, E. F., Muniz, E. G. and Morhy, L. (2002). “Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest”. *Toxicon*, 40(7), 997-1006.

Loughran, C.L., Nowark, E.M., Schofer, J. Sullivan, K.O. y Sullivan, B.K. (2013). Lagomorphs as prey of Western Diamond-backed rattlesnakes (*Crotalus atrox*) in Arizona. *The Southwestern Naturalist*, 58(4), 502-505.

Lynch, J. D., Sierra, T. A. and Gómez, F. J. R. (2014). Programa nacional para la conservación de las serpientes presentes en Colombia. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.

Lynch, J., Angarita, T. y Ruíz-Gómez, F. J. (2016). *Programa Nacional para la Conservación de las Serpientes en Colombia, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Colombia*, Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Instituto Nacional de Salud, pp. 132.

Mackessy, S. P. (2002). “Biochemistry and pharmacology of colubrid snake venoms”. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 21(1-2), 43-8.

Mackessy, S. P., Williams, K., y Ashton, K. G. (2003). Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*: a case of venom paedomorphosis? *Copeia*, 2003(4), 769-782.

Mackessy, S. P. (2016). Handbook of venoms and toxins of reptiles. CRC press.

Madrigal, M., Pla, D., Sanz, L., Barboza, E., Arroyo-Portilla, C., Corrêa-Netto, C. and Calvete, J. J. (2017). “Cross-reactivity, antivenomics, and neutralization of toxic activities of *Lachesis* venoms by polyspecific and monospecific antivenoms”. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(8), e0005793.

Madrigal, M., Sanz, L., Flores-Díaz, M., Sasa, M., Núñez, V., Alape-Girón, A., and Calvete, J. J. (2012). “Snake venomomics across genus *Lachesis*. Ontogenetic changes in the venom composition of *Lachesis stenophrys* and comparative proteomics of the venoms of adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis acrochorda*”. *Journal of proteomics*, 77, 280-297.

Madsen, T. y Shine, R. (1993). Phenotypic plasticity in body sizes and sexual dimorphism in European grass snakes. *Evolution International journal of organic evolution*, 47(1), 321-325.

- Malague, C.A. y Gutiérrez, J.M. (2016). Snakebite Envenomation in Central and South America. *Critical Care Toxicology*, 1-22
- Marti, C.D., Korpimaki, E. y Jaksic, F.M. (1993). Trophic structure of raptor communities: a three-continent comparison and synthesis. *Current Ornithology*, 10, 47-137.
- Martins, M., Marques, O.A. y Sazima, I. (2002). Correlaciones ecológicas y filogenéticas de los hábitos alimenticios en los piojos neotropicales (género *Bothrops*). En: Schuett, G.W, Höggren, M., Douglas, M.E. y Greene, H.W, editores. Biología de las víboras. Eagle Mountain: Eagle Mountain Publishing; pp. 307-328.
- Mendoza, J.S. y Fernández, M. (2011). A prey item not previously recorded for *Bothrops asper*: a case of ophiophagy involving two sympatric pit viper species. *Herpetotropicos*, 5(2), 107-109.
- Meza-Ramos, P., Almendariz, A.L. y Yáñez-Muñoz, M.H. (2010). Datos sobre la dieta de *Bothriechis schlegelii* (Berthold, 1846) (Serpentes-Viperidae) en el Occidente del Ecuador. *Boletín Técnico, Serie Zoológica*, 6, 15-18.
- Mociño-Deloya, E. y Setser, K. (2007), *Crotalus willardi* (Ridge-nosed rattlesnake Diet. *Herpetological Review*, 38(2), 206.
- Mociño-Deloya, E. (2015). Ecología trófica de tres especies de serpientes de México: *Crotalus aquilus*, *Crotalus polystictus* y *Crotalus willardi*. Tesis doctoral, Universidad de Granada, Departamento de Zoología.
- Mociño-Deloya, E., Setser, K., Peurach, S.C. y Meik, J.M. (2008). *Crotalus aquilus* in the Mexican state of Mexico consumes a diverse summer diet. *The Herpetological Bulletin*, 105:10-12.
- Mociño-Deloya, E. (2016). “Ecología trófica de tres especies de serpientes de cascabel en México: *Crotalus aquilus*, *Crotalus polystictus* y *Crotalus willardi*”.
- Mole, R.R. (1924). The Trinidad snakes. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 1, 235-278.
- Mole, R.R. (1924). The Trinidad snakes. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 1, 235-278.
- Mueller, R. L (2006). Evolutionary rates, divergence dates, and the performance of mitochondrial genes in Bayesian phylogenetic analysis. *Systematic biology*. 55(2), 289-300
- Moulton, M.J., Song, H. y Whiting, M.F. (2009). Assessing the effects of primer specificity on eliminating numt coamplification in DNA barcoding: a case study from Orthoptera (Arthropoda: Insecta). *Molecular Ecology Resources*, 10(4), 615-627.

Murphy, J.C. (1997). *Amphibians and reptiles of Trinidad and Tobago*. Krieger, Malabar, FL, 245 pp.

Niño Pérez, R (2018). *Análisis comparativo del contenido proteico de venenos de serpientes de la familia Viperidae de diferentes regiones de Colombia mediante el empleo de cromatografía líquida y electroforesis* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá).

Núñez, V., Cid, P., Sanz, L., De La Torre, P., Angulo, Y., Lomonte, B. and Calvete, J. J. (2009). “Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism”. *Journal of proteomics*, 73(1), 57-78.

OMS, Organización Mundial de la Salud. (2019). Mordeduras de serpientes venenosas. Available at: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming> (accessed 20 august 2019).

Osorio, J. F. D., Sánchez, A., Fierro, L., Garzón, S. and Castaño, R. S. (2007). “Venenos de serpientes y moléculas antiveneno”. *Revista de la Academia Colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales*. 31(118), 109-138.

Ospina-L, A.M. (2017). *Bothrops punctatus* (García 1896). *Catálogo de anfibios y reptiles de Colombia*, 3(1), 25-30.

Otero, R., María de fátima, D. F., Gonçalves, L. R., Núñez, V., García, M. E., Osorio, R. G., and Gutiérrez, J. M. (1998). “Comparative study of the venoms of three subspecies of *Lachesis muta* (bushmaster) from Brazil, Colombia and Costa Rica”. *Toxicon*, 36(12), 2021-2027.

Paredes-Montesinos, R., García-Padilla, E. y Mata-Silva, V. (2015). *Porthidium nasutum* Diet. *Mesoamerican Herpetology*, 2(3), 350-351.

Pereañez, J. A., Preciado, L. M., Fernández, J., Camacho, E., Lomonte, B., Castro, F., y Castaño, S. (2020). “Snake venomomics, experimental toxic activities and clinical characteristics of human envenomation by *Bothrocophias myersi* (Serpentes: Viperidae) from Colombia”. *Journal of Proteomics*, 103758.

Perry G., Mark L., Indraneil D. (2020). Snakes, Snakebites, and Humans. In the Angelici, FM y Rossi, L. (Eds.). (2020). *Vida silvestre problemática II: Nuevos desafíos de conservación y manejo en las interacciones entre humanos y vida silvestre*. Springer Nature. doi: 10.1007 / 978-3-030-42335-3



Phuong, M. A., Mahardika, G. N., y Alfaro, M. E. (2016). Dietary breadth is positively correlated with venom complexity in cone snails. *BMC genomics*, 17(1), 401.

Pla, D., Sanz, L., Molina-Sánchez, P., Zorita, V., Madrigal, M., Flores-Díaz, M. and Calvete, J. J. (2013). “Snake venomomics of *Lachesis muta rhombeata* and genus-wide antivenomics assessment of the paraspecific immunoreactivity of two antivenoms evidence the high compositional and immunological conservation across *Lachesis*”. *Journal of proteomics*, 89, 112-123.

Pla, D., Sanz, L., Sasa, M., Acevedo, M. E., Dwyer, Q., Durban, J. and Calvete, J. J. (2017). “Proteomic analysis of venom variability and ontogeny across the arboreal palm-pitvipers (genus *Bothriechis*)”. *Journal of proteomics*, 152, 1-12.

Pineda, D. and Hernández, C. A. (2002). “Accidentes por animales venenosos. In *Accidentes por animales venenosos*”. Instituto Nacional de Salud.

Pompanon, F., Deagle, B.E, Symondson, W.O., Brown, D.S, Jarman, S.N. y Taberlet, P. Who is eating what? diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology*, 21(8): 1931-1950.

Prado, A. y Hoge, A.R. (1948): Notas ofiológicas. 21. Observações sobre serpentes do Perú. *Memórias do Instituto de Butantan (São Paulo)*, 20, 283-296.

Prezotto-Neto, J. P., Kimura, L. F., Alves, A. F., Gutiérrez, J. M., Otero, R., Suárez, A. M. and Barbaro, K. C. (2016). “Biochemical and biological characterization of *Bothriechis schlegelii* snake venoms from Colombia and Costa Rica”. *Experimental Biology and Medicine*, 241(18), 2075-2085.

Pyron, R.A. and Burbrink, F.T. (2012). “Extinction, ecological opportunity, and the origins of global snake diversity”. *Evolution*, 66:163–178.

Reeks, T. A., Fry, B. G. and Alewood, P. F. (2015). “Privileged frameworks from snake venom”. *Cellular and molecular life sciences*, 72(10), 1939-1958.

Rey-Suárez, P., Núñez, V., Gutiérrez, J. M. and Lomonte, B. (2011). “Proteomic and biological characterization of the venom of the redbtail coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica”. *Journal of proteomics*, 75(2), 655-667.

Rey-Suárez, P., Núñez, V., Fernández, J. and Lomonte, B. (2016). “Integrative characterization of the venom of the coral snake *Micrurus dumerilii* (Elapidae) from Colombia: Proteome, toxicity, and cross-neutralization by antivenom.” *Journal of proteomics*, 136, 262-273.

- Ríos-Soto, J.A., Arango-Lozano, J. y Rivera-Molina, F. (2018), *Micrurus mipartitus* (Duméril, Bibron y Duméril, 1854). *Catálogo de anfibios y reptiles de Colombia*, 4(1), 37-44.
- Rodríguez-Robles, J.A., Mulcahy, D.G. y Greene, H.W (1999). Feeding ecology of the desert nightsnake, *Hypsiglena torquata* (Colubridae). *Copeia*, 1999(1), 93-100.
- Rojas-Rivera, A., Castillo, K. y Gutiérrez-Cárdenas, P.D. (2013). *Bothrocophias campbelli* (Campbell's toad-headed pitviper, víbora boca de sapo de Campbell). Diet/ophiophagy. *Herpetological Review*, 44(3), 518.
- Rosel, P.E. y Kocher, T.D. (2002). Identificación basada en ADN de bacalao larval en el contenido estomacal de peces depredadores. *Journal of Experimental Biología Marina y Ecología*, 267, 75-88.
- Salazar, A. M., Rodríguez-Acosta, A., Girón, M. E., Aguilar, I. and Guerrero, B. (2007). “A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the snake venom (*Bothrops atrox*) from different geographical areas in Venezuela”. *Thrombosis research*, 120(1), 95-104.
- Saldarriaga, M.M., Otero, R., Núñez, V., Toro, M.F., Díaz, A. y Gutiérrez, J.M. (2003). Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon*, 42(1), 405-411.
- Sasa, M., Wasko, D. K. y Lamar, W.W. (2009). Natural history of the terciopelo *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) in Costa Rica, *Toxicon*, 54(2009), 904-922.
- Segovia- Nuñez, G. (2014). *Bothrops asper* (Terciopelo) Diet. *Herpetological Review*, 45(3), 512.
- Segura, Á., Herrera, M., Villalta, M., Vargas, M., Uscanga-Reynell, A., de León-Rosales, S. P. and León, G. (2012). “Venom of *Bothrops asper* from Mexico and Costa Rica: Intraspecific variation and cross-neutralization by antivenoms”. *Toxicon*, 59(1), 158-162.
- Shine, R. (1991). Intersexual dietary divergence and the evolution of sexual dimorphism in snakes. *American Naturalist*, 138, 103-122.
- Shine, R., Reed, R.N., Shetty, S. y Cogger, H.G. (2002). Relationships between sexual dimorphism and niche partitioning within a clade of sea-snakes (Laticaudinae). *Oecología*, 133(1), 45-53.
- Simon, C., Buckley, T. R., Frati, F., Stewart, J. B., y Beckenbach, A. T. (2006). Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved

polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 37, 545-579.

Song, H., Buhay, J.E., Whiting, M.F. y Crandall, K.A. (2008). Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105(36), 13486-13491.

Solórzano, A. (2004). Snakes of Costa Rica: Distribution, Taxonomy, and Natural History. *Copeia*, (4), 935-936.

Tasoulis, T. and Isbister, G. K. (2017). “A review and database of snake venom proteomes”. *Toxins*, 9(9), 290.

Terán, M. y Lomonte, B. (2016). Actividad letal de seis venenos de serpientes de importancia médica en el Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 37(2), 25-30.

Tryon, B.W. (1985). *Bothrops asper* (Terciopelo). Caudal Luring. *Herpetological Review*, 16, 28.

Vidal, N. and Hedges, S. B. (2009). “The molecular evolutionary tree of lizards, snakes, and amphisbaenians”. *Comptes rendus biologiques*, 332(2-3), 129-139.

Vences, M., Lyra, M. L., Perl, R. B., Bletz, M. C., Stanković, Lopes, C. M. (2016). Freshwater vertebrate metabarcoding on Illumina platforms using double-indexed primers of the mitochondrial 16S rRNA gene. *Conservation Genetics Resources*, 8(3), 323-327.

Uetz, P. (editor), The Reptile Database, <http://www.reptile-database.org>, consultado el 27 de junio de 2021

Wray, K. P., Margres, M. J., Seavy, M. and Rokyta, D. R. (2015). “Early significant ontogenetic changes in snake venoms”. *Toxicon*, 96, 74-81.

Warrel, D.A. (2004). *Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management*. En: Campbell JA, Lamar WW, editores. *The venomous reptiles of the Western Hemisphere*. New York: Cornell University Press; 2004. pp. 70915.

Warrell DA (2010). *Mordedura de serpiente*. *The Lancet*, 375 (9708), 77–88. doi: 10.1016/S0140-6736 (09) 61754-2

WHO, World Health Organization? (2007). Rabies and envenomings, a neglected public health issue, report of a Consultative Meeting. Available at: [https://www.who.int/bloodproducts/animal\\_sera/Rabies.pdf](https://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf) (accessed 28 august 2019).

Wittenberg, R.D. (2012). Foraging ecology of the Timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) in a fragmented agricultural landscape. *Herpetological Conservation and Biology*, 7(3), 449-461.

Zanetti, G., Duregotti, E., Locatelli, C. A., Giampreti, A., Lonati, D., Rossetto, O. and Pirazzini, M. (2018). “Variability in venom composition of European viper subspecies limits the cross-effectiveness of antivenoms”. *Scientific reports*, 8(1), 9818.

Zeale, M.K., Butlin, R.K., Barker, G.L., Leess, D.C. y Jhones, G. (2011). DNA Barcoding, Taxon-specific PCR for DNA barcoding arthropod prey in bat faeces. *Molecular Ecology Resources*, 11, 236-244.

## 8. ANEXOS

Anexo 1. Listado de presas potenciales para las serpientes de las familias Viperidae y Elapidae del Valle del Cauca. En la tabla se muestra la información taxonómica (especie, clase, orden suborden, familia), disponibilidad de secuencia del gen 16S en el GenBank (16S), ecorregión (RP: Región Pacífico, CO: Cordillera Occidental, VI: Valle Interandino, CC: Cordillera Central) y fuente del registro (C: información primaria, D: Diseción, CPZ: Colección de Prácticas Zoológicas, L: información secundaria) de cada presa potencial.

Especie	Clase	Orden	Familia	16S	Ecorregión	Fuente
<i>Rhaebo haematiticus</i>				Si	RP, CO	CPZ, C
<i>Rhinella margaritifera</i>			Bufonidae	Si	RP	C
<i>Rhinella horribilis</i>				Si	RP, CO, VI, CC	C, L
<i>Rhinella paraguas</i>				No	CO	CPZ
<i>Centrolene savagei</i>				Si	CO	CPZ
<i>Espadarana prosoblepon</i>	Amphibia	Anura		Si	RP, CO	CPZ, C
<i>Hyalinobatrachium aureoguttatum</i>			Centrolenidae	Si	RP, CO	C
<i>Nymphargus grandisonae</i>				Si	CO	CPZ
<i>Nymphargus ignotus</i>				No	CO	CPZ, C
<i>Nymphargus ruizi</i>				No	CO, CC	CPZ

<i>Sachatamia ilex</i>	Si	RP, CO	CPZ, C
<i>Sachatamia orejuela</i>	Si	RP	CPZ, C
<i>Craugastor fitzingeri</i>	Si	RP	CPZ, C, L
<i>Craugastor longirostris</i>	Si	RP	CPZ, L
<i>Craugastor raniformis</i>	Si	RP	CPZ, C
<i>Niceforonia mantipus</i>	No	CO, CC	CPZ
<i>Pristimantis achatinus</i>	Si	RP, CO	CPZ, C, L
<i>Pristimantis boulengeri</i>	Si	CC	CPZ
<i>Pristimantis brevifrons</i>	Si	CO	CPZ
<i>Pristimantis buckleyi</i>	Si	CC	CPZ
<i>Pristimantis calcaratus</i>	Si	CO	CPZ
Craugastoridae			
<i>Pristimantis erythropleura</i>	Si	CO, CC	CPZ, C
<i>Pristimantis gaigei</i>	Si	RP	C
<i>Pristimantis gracilis</i>	No	CO	CPZ
<i>Pristimantis hybotragus</i>	No	RP	CPZ
<i>Pristimantis juanchoi</i>	Si	CO	CPZ
<i>Pristimantis kelephas</i>	Si	CO	CPZ
<i>Pristimantis latidiscus</i>	No	RP	CPZ, C
<i>Pristimantis labiosus</i>	Si	RP	CPZ, C
<i>Pristimantis molybrignus</i>	No	CO	CPZ

<i>Pristimantis orpacobates</i>	No	CO	CPZ
<i>Pristimantis palmeri</i>	Si	CO	CPZ, C
<i>Pristimantis peraticus</i>	Si	CC	CPZ
<i>Pristimantis ptochus</i>	No	CO	CPZ, C
<i>Pristimantis quantus</i>	Si	CO	CPZ
<i>Pristimantis quicato</i>	Si	CC	CPZ
<i>Pristimantis ridens</i>	Si	RP	CPZ
<i>Pristimantis roseus</i>	No	RP	CPZ, C
<i>Pristimantis thectopternus</i>	Si	CO, CC	CPZ, C
<i>Pristimantis w-nigrum</i>	Si	CO, VI, CC	CPZ
<i>Strabomantis ruizi</i>	No	CO	CPZ
<i>Andinobates bombetes</i>	Si	CO	CPZ
<i>Andinobates minutus</i>	Si	RP	CPZ
<i>Leucosthetus fraterdanieli</i>	Dendrobatidae		
	Si	CO, VI, CC	CPZ, C
<i>Silverstoneia nubicola</i>	SI	RP	CPZ, C
<i>Diasporus gularis</i>	Eleutherodactylidae		
	No	RP	CPZ, C
<i>Diasporus tinker</i>	No	RP	CPZ, C
<i>Boana boans</i>	Hylidae		
	Si	RP	C
<i>Boana picturata</i>	Si	RP	C



<i>Boana pugnax</i>			Si	RP, VI, CC	CPZ	
<i>Boana rosenbergi</i>			No	RP	C	
<i>Dendrosophus columbianus</i>			No	RP, CO, VI, CC	CPZ	
<i>Hyloscirtus palmeri</i>			Si	RP	CPZ	
<i>Scinax ruber</i>			Si	VI, CC	CPZ	
<i>Smilisca phaeota</i>			Si	RP	CPZ, C, L	
<i>Leptodactylus colombiensis</i>		Leptodactylidae	Si	CO, VI	CPZ	
<i>Agalychnis spurrelli</i>		Phyllomedusidae	Si	RP	C	
<i>Lithobates vaillanti</i>		Ranidae	Si	RP	L	
<i>Bolitoglossa biseriata</i>		Caudata	Plethodontidae	Si	RP	CPZ, C
<i>Bolitoglossa walkeri</i>	No			RP, CO	CPZ	
<i>Caecilia guntheri</i>		Gymnophiona	Caeciliidae	No	CO	L
<i>Amphisbaena fuliginosa</i>			Amphisbaenidae	Si	CO, VI, CC	L
<i>Basiliscus galeritus</i>			Corytophanidae	No	RP, CO, VI	C
<i>Anolis anchicayae</i>	Reptilia	Squamata		No	RP	CPZ
<i>Anolis antonii</i>			Dactyloidae	No	RP, CO, VI	CPZ, C
<i>Anolis auratus</i>				Si	RP, CO, VI	CPZ
<i>Anolis eulaemus</i>			No	RP, CO	CPZ	

<i>Anolis latifrons</i>		Si	RP	C
<i>Anolis macrolepis</i>		No	RP	CPZ
<i>Anolis maculiventris</i>		No	RP	CPZ, C
<i>Anolis notopholis</i>		No	RP	C
<i>Anolis ventrimaculatus</i>		No	RP, CO	CPZ
<i>Cercosaura argulus</i>		Si	CO, CC	CPZ
<i>Echinosaura orcesi</i>		Si	RP	CPZ
<i>Echinosaura palmeri</i>		No	RP	CPZ, C
<i>Loxopholis southi</i>		No	RP	C
<i>Pholidobolus vertebralis</i>	<b>Gymnophthalmidae</b>	Si	RP, CO	CPZ, C
<i>Ptychoglossus stenolepis</i>		No	CO, CC	CPZ, C
<i>Ptychoglossus vallensis</i>		No	CO	CPZ
<i>Riama striata</i>		Si	CO, CC	CPZ
<i>Enyalioides heterolepis</i>	Hoplocercidae	No	RP	CPZ, C
<i>Lepidoblepharis duolepis</i>	Sphaerodactylidae	No	RP, CO, CC	CPZ, C
<i>Holcosus festivus</i>	Teiidae	No	RP	C, L
<i>Saphenophis tristriatus</i>		Si	RP, CO, CC	CPZ, C
<i>Dendrophidion clarkii</i>	Colubridae	No	RP	C

<i>Erythrolamprus bizona</i>		Si	RP, CO, VI	L
<i>Erythrolamprus epinephelus</i>		Si	RP, CO, VI, CC	L
<i>Leptophis depressirostris</i>		Si	RP	C
<i>Mastigodryas bifossatus</i>		Si	RP	C
<i>Ninia atrata</i>		Si	RP, CO	CPZ, L
<i>Oxybelis brevirostris</i>		NO	RP, CO	CPZ
<i>Oxyrhopus petolarius</i>		Si	RP, CO, VI, CC	C
<i>Siphlophis compressus</i>		Si	RP	C
<i>Spilotes pullatus</i>		Si	RP, CO, VI, CC	CPZ, C
<i>Stenorrhina degenhardtii</i>		Si	RP	CPZ
<i>Atractus clarki</i>		No	RP, CO	C
<i>Atractus melas</i>		No	RP, CO	C
<i>Imantodes cenchoa</i>		Si	RP, CO, VI, CC	CPZ
<i>Imantodes inornatus</i>	Dipsadidae	No	RP	C
<i>Sibon nebulatus</i>		Si	RP, CO, VI, CC	C
<i>Urotheca lateristriga</i>		No	RP, CO	CPZ
<i>Leptodeira annulata</i>		Si	RP, CO, VI, CC	C
<i>Trachyboa boulengeri</i>	Tropidophiidae	Si	RP	C
<i>Bothrops asper</i>	Viperidae	Si	RP, CO, VI, CC	CPZ, C

<i>Momotus aequatorialis</i>		Momotidae	No	RP, CO, VI, CC	C	
<i>Parula pitiayumi</i>		Parulidae	Si	RP, CO, VI, CC	CPZ	
<i>Setophaga fusca</i>			Si	CC	CPZ	
<i>Thraupis cyanocephala</i>	Aves	Thraupidae	Si	RP, CO, VI, CC	CPZ	
<i>Amazilia tzacatl</i>		Trochilidae	No	RP, CO, VI, CC	L	
<i>Florisuga mellivora</i>			No	RP, CO, VI, CC	C	
<i>Caluromys derbianus</i>			No	RP, CO, VI, CC	L	
<i>Didelphis marsupialis</i>		Didelphimorphia Didelphidae	Si	RP, CO, VI, CC	L	
<i>Marmosops caucuae</i>			No	CO, VI, CC	L	
<i>Philander opossum</i>			Si	RP, CO, VI, CC	L	
<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	Mammalia	Lagomorpha Leporidae	No	CO, VI, CC	L	
<i>Melanomys caliginosus</i>		Cricetidae	No	RP, CO, VI, CC	L, D	
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>			No	RP, CO, VI	L	
<i>Mus musculus</i>		Rodentia	Muridae	Si	RP, CO, VI, CC	L
<i>Rattus rattus</i>				Si	RP, CO, VI, CC	L
<i>Carollia cf. brevicauda</i>		Chiroptera Phyllostomidae	No	RP, CO, VI, CC	L	