

**PERFIL TOXINOLÓGICO DEL VENENO DE LA VÍBORA BOCA DE
SAPO *Bothrocophias campbelli* [FREIRE LASCANO, 1991] DEL
DEPARTAMENTO DE NARIÑO, COLOMBIA**

MARÍA JOSÉ SEVILLA SÁNCHEZ

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2019**

**PERFIL TOXINOLÓGICO DEL VENENO DE LA VÍBORA BOCA DE
SAPO *Bothrocophias campbelli* [FREIRE LASCANO, 1991] DEL
DEPARTAMENTO DE NARIÑO, COLOMBIA**

MARÍA JOSÉ SEVILLA SÁNCHEZ

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

Directora:

Diana Lorena Mora Obando
MSc. en Ciencias Biomédicas con énfasis en Bioquímica y Fisiología Celular

Asesor interno:

Jhon Jairo Calderón Leytón
MSc. en Ciencias Biológicas

Asesores externos:

Jimmy Alexander Guerrero Vargas
PhD en Biología Animal

Santiago Ayerbe González
MD. Toxinólogo del Centro de Estudio de Venenos y Animales Venenosos (CEVAP)

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2019**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

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

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

Todos los derechos reservados.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Diana Lorena Mora Obando

DIRECTORA

Jhon Jairo Calderón Leytón
Jimmy Alexander Guerrero Vargas
Santiago Ayerbe González

ASESORES

Fernando Castro Herrera

JURADO

Leonel Ives Montealegre Sánchez

JURADO

San Juan de Pasto, 16 de Julio de 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales de la Universidad de Nariño por la financiación del proyecto por medio de la “Convocatoria de Trabajos de Grado 2018”

Al Centro de Investigaciones Biomédicas-Bioterio (CIBUC) y a los laboratorios del programa de biología y del Museo de Historia Natural de la Universidad del Cauca, al laboratorio LABBIO-Bioterio de la Facultad de Salud y el laboratorio de Histología del Departamento de Morfología de la Universidad del Valle - Sede San Fernando, por la prestación de servicios, las actividades desarrolladas en sus instalaciones y permitirme aprender de su equipo de trabajo.

A la Universidad de Nariño, por permitirme crecer y formarme a nivel personal, creer en metas difíciles de alcanzar, pero posibles con convicción y darme la oportunidad de conocer personas a nivel interdisciplinar de las cuales agradezco todo lo aprendido. Al programa de Biología, por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y permitirme encontrar un campo de la biología que día a día me motiva conocer y aprender más.

A la Reserva Natural Río Ñambí por las tarifas especiales brindadas como estudiante investigador, además de, facilitar el ingreso a sus instalaciones, conocer un maravilloso lugar y personas cálidas.

A mi directora Diana Lorena Mora Obando, por su amistad, enseñanzas, orientaciones y valiosa asesoría, además de motivarme a seguir adelante en este campo, convirtiéndose en un gran ejemplo personal e investigativo. A mi asesor interno Jhon Jairo Calderón Leytón por el acompañamiento y enseñanzas, así como también por su amistad incondicional, creer en mí y haberme involucrado en la toxinología. A mis asesores externos Jimmy Alexander Guerrero Vargas y Santiago Ayerbe González por todas sus enseñanzas, valiosos aportes y por mostrarme que la toxinología es un maravilloso campo donde siempre habrá mucho por aprender. Al Doctor Fernando Castro Herrera y Leonel Ives Montealegre Sánchez, por sus aportes, sugerencias y recomendaciones realizadas. En general, a todos por motivarme y darme ánimo durante toda la investigación a pesar de todas las adversidades.

Al cuerpo humano de la Universidad del Valle - Sede San Fernando y a la Doctora María Carolina Pustovrh Ramos por facilitar el desarrollo de los experimentos bajo las instalaciones a su cargo, a la Doctora Sirsa Aleida Hidalgo, por su apoyo desinteresado y constante durante el desarrollo de la fase experimental y a la Profesional Nhora Holguín A. por su acompañamiento y enseñanzas en histología y morfología. A la profesional de la Universidad Antonio Nariño – Sede Popayán, la Doctora Ana Alicia Acosta Jurado, médico veterinario por sus aportes en anatomopatología veterinaria.

Al Grupo de Investigación en Ecología Evolutiva (GIEE) de la Universidad de Nariño por permitirme aprender que la biología es un campo integral y por los compañeros conocidos durante los diferentes procesos. Al Grupo de Investigaciones Toxinológicas y Herpetológicas de la Universidad del Cauca (GIHT) por su apoyo en la ejecución del presente trabajo.

A mis compañeros de la Universidad de Nariño Lorena Erazo Ordoñez por su apoyo en la fase de capo en la Reserva Natural Río Ñambí y a Diego Fernando Bastidas Terán por su apoyo, acompañamiento y constante motivación. A mis compañeros de la Universidad del Cauca Yulisa Moreno García por brindarme su amistad y su incansable apoyo y acompañamiento en la fase experimental, así como también a Erly Yicela Mera, Malory Anacona, Juan Camilo Viveros y Andrés Felipe Olaya por su acompañamiento durante las diferentes actividades del trabajo.

A mi madre Luz Marina Sánchez por ser quien me motiva a salir adelante cada día y enseñarme que el conocimiento es lo único que tendremos para siempre, a mi padre Wilson Coral García por adoptarme como hija y brindarme los más valiosos consejos durante mi formación y crecimiento personal. A mi hermana María Fernanda Coral Sánchez por ser una mujer incansable que cada día me enseña a ser mejor. A mi sobrina Gabriela Valeria Pantoja Coral por ser esa persona que inspira mi deseo de ser un ejemplo. A todos en general por estar en los momentos difíciles y por no dejarme desfallecer.

DEDICATORIA

A mi madre Luz Marina Sánchez por mostrarme las cosas buenas de la vida sin ocultar que las dificultades existen, enseñándome que con tenacidad siempre se superan.

RESUMEN

Los accidentes bothrópicos son los más frecuentemente reportados entre los accidentes ofídicos de Colombia. Éstos se caracterizan por desencadenar síntomas locales y sistémicos que afectan procesos fisiológicos generando secuelas permanentes en las víctimas como reducción en la movilidad de la(s) extremidad(es), amputaciones e incluso la muerte. *Bothrocophias campbelli* es una especie bothrópica, con distribución restringida al departamento de Nariño, en Colombia. Actualmente, el único estudio conocido sobre su veneno se limita al realizado con especímenes procedentes de Ecuador, el cual determinó que el veneno es rico en fosfolipasas A₂ miotóxicas, asociadas a una de las secuelas más graves, la mionecrosis. Teniendo en cuenta los antecedentes de variación geográfica entre venenos de especies relacionadas filogenética y geográficamente, es de relevancia conocer el perfil toxinológico de los venenos locales. Por ello, se determinó la dosis letal (DL₅₀), así como las dosis mínimas de las actividades: Coagulante en plasma humano; Hemorrágica empleando herramientas computacionales y análisis de imagen; Edematizante, estimada con el aumento en el grosor de la almohadilla plantar; Miotóxica, establecida bajo cuantificación de la actividad de la enzima creatina quinasa; y análisis histopatológico. Se estableció la toxicidad en 142.68 µg de veneno / ratón (111.42 – 179.77 µg/ratón) y se determinaron leves efectos hemorrágicos (12.71 ± 2.32 µg) y coagulantes (12.3 ± 0.5 µg) y una fuerte actividad edematizante (1.0 ± 0.3 µg) y miotóxica (3.9 ± 2.5 µg), siendo estas dos últimas determinadas por primera vez para *Bothrocophias campbelli*. Adicionalmente, en los análisis histopatológicos se evidencia daño en las miofibrillas, desorganización, infiltrado inflamatorio y mionecrosis en un 75% del músculo. Esto sugiere que el cuadro clínico de envenenamiento podría caracterizarse por hemorragia escasa, leves trastornos en la cascada de coagulación y, por el contrario, mionecrosis y edema fuertes que podrían dar lugar a síndrome compartimental y gangrena.

PALABRAS CLAVE: Envenenamiento, serpientes, departamento de Nariño, *Bothrocophias campbelli*, perfil toxinológico.

ABSTRACT

Bothropic accidents are the most frequently reported within the snakebites in Colombia. These are characterized by local and systemic symptoms affecting physiological development and causing permanent injuries in the victims such as reduced mobility of the limb(s), amputations and even death. *Bothrocophias campbelli*, is a bothropic species, with distribution restricted to the department of Nariño, in Colombia. Actually, the only known study about its venom is limited to that carried out with specimens from Ecuador, which determined that the venom is rich in myotoxic A₂ phospholipases, associated with serious myonecrosis. According to geographic variation of venoms in phylogenetically and geographically related species, it is of relevance to know the toxinological profile of the local venoms. Therefore, lethal dose (DL₅₀) as well as the minimum doses of the activities: Coagulant in human plasma, Hemorrhagic dose using computational tools and image analysis, Edema-forming activity, estimated with the increase in the thickness of the plantar cushion, Myotoxic dose, established by creatine kinase enzyme activity quantification and histopathological analysis. Toxicity was established in 142.68 µg (111.42 – 179.77 µg) of venom and slight hemorrhagic effects (12.71 ± 2.32 µg), and coagulants (12.3 ± 0.5 µg), and a strong edematic (1.0 ± 0.3 µg) and myotoxic (3.9 ± 2.5 µg) activity, the latter two being determined for the first time for *Bothrocophias campbelli* species. Additionally, the histopathological analyses revealed damages in the myofibrils, disorganization, inflammatory infiltrations and myonecrosis evidenced in 75% of the muscle. This suggests that the clinical picture of envenoming could be characterized by scarce hemorrhage, slight disorders in the coagulation cascade but strong myonecrosis and edema that could lead to compartment syndrome and gangrene.

KEY WORDS: Poisoning, snakes, department of Nariño, *Bothrocophias campbelli*, toxinological profile.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	18
OBJETIVOS	20
1.1 Objetivo general.....	20
1.2 Objetivos específicos	20
2. ANTECEDENTES.....	21
3. MARCO TEÓRICO	22
3.1 Serpientes venenosas.....	22
3.1.1 Envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae.....	23
3.1.2 El veneno de las serpientes	28
3.2 Generalidades del género <i>Bothrocophias</i>	32
3.2.1 <i>Bothrocophias campbelli</i> [Freire Lascano, 1991].....	32
3.3 Perfil toxinológico	35
3.3.1 Dosis letal 50 (DL ₅₀)	36
3.3.2 Actividad coagulante	36
3.3.3 Actividades edematizante, miotóxica y hemorrágica	36
3.4 Modelo biológico: <i>Mus musculus</i>	37
4. MATERIALES Y MÉTODOS	38
4.1 Área de estudio.....	38
4.2 Trabajo de Campo	39
4.3 Trabajo de Laboratorio.....	39
4.3.1 Veneno.....	39
4.3.2 Animales de experimentación.....	40
4.3.3 Consideraciones éticas	40
4.3.4 Actividades biológicas.....	40
4.3.5 Determinación de la dosis letal cincuenta (DL ₅₀).....	41
4.3.6 Determinación de la actividad coagulante	42
4.3.7 Determinación de la actividad edematizante	42
4.3.8 Determinación de la actividad miotóxica	43
4.3.9 Determinación de la actividad hemorrágica local	44
4.4 Análisis estadístico	45
4.4.1 Dosis letal cincuenta (DL ₅₀)	45

4.4.2	Actividad coagulante	45
4.4.3	Actividad edematizante	46
4.4.4	Actividad miotóxica	46
4.4.5	Actividad hemorrágica local.....	46
5.	RESULTADOS	47
5.1	Dosis letal cincuenta (DL₅₀)	48
5.2	Actividad coagulante.....	49
5.3	Actividad edematizante	51
5.4	Actividad miotóxica	53
5.5	Actividad hemorrágica	57
6.	DISCUSIÓN.....	59
6.1	Dosis letal cincuenta (DL₅₀)	59
6.2	Actividad coagulante.....	62
6.3	Actividad edematizante	64
6.4	Actividad miotóxica	66
6.5	Actividad hemorrágica	69
	CONCLUSIONES.....	72
	RECOMENDACIONES	73
	REFERENCIAS.....	74
	ANEXOS	86

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<p>Figura 1. Especies asociadas a ofidiotoxicosis bothrópica. A. <i>Bothrops rhombeatus</i>, B. <i>Bothrops ayerbei</i>, C. <i>Bothriechis schlegelii</i>, D. <i>Bothrops asper</i> (Fotografías: Sevilla - Sánchez, MJ., 2019), E. <i>Bothrops pulchra</i> (Fotografía: Ramírez, F. n.d), F. <i>Bothrops punctatus</i> (Fotografía: Sevilla - Sánchez, MJ., 2019), G. <i>Porthidium nasutum</i> (Fotografía: Ayerbe, n.d), H. <i>Bothrocophias campbelli</i> (Fotografía: Mora-Obando, 2010).</p>	26
<p>Figura 2. Síndrome compartimental ocasionado por <i>B. asper</i>. Gangrena y flictenas. Cortesía: Hospital Universitario San José[®], Popayán, Cauca. (Fotografía: Ayerbe, 2008).....</p>	27
<p>Figura 3. Síndrome compartimental ocasionado por <i>B. asper</i>. Gangrena. Cortesía: Hospital Universitario San José[®], Popayán, Cauca. (Fotografía: Ayerbe, 2008).....</p>	27
<p>Figura 4. Hemorragia gingival ocasionada por <i>B. ayerbei</i>. Cortesía: Hospital Universitario San José[®], Popayán, Cauca. (Fotografía: Ayerbe, 2008).....</p>	27
<p>Figura 5. <i>Bothrocophias campbelli</i>, espécimen de la Reserva Natural Río Ñambí, (Fotografía: Mora-Obando, 2010).</p>	33
<p>Figura 6. Distribución de <i>Bothrocophias campbelli</i> bajo modelamiento de nicho ecológico. Puntos amarillos: Datos de ocurrencia, Área de color azul: Distribución potencial (Modificado por: Sevilla – Sánchez, MJ., 2019 de: Vaca Guerrero, 2012).</p>	34
<p>Figura 7. Proteoma del veneno de <i>Bothrocophias campbelli</i>. PLA₂: fosfolipasas A₂; SVPM: metaloproteinasas; SP: serina proteasas; PEP: péptidos de bajo peso molecular; LAO: L-aminoácido oxidasas; DIS: desintegrinas; CTL: proteínas tipo lectina / lectina tipo C; 5'-NU: 5'-nucleotidasas; UNK: desconocido / no identificado; CRISP: proteínas secretoras ricas en cisteína; TRF: transferrina. (Fuente: Salazar-Valenzuela, et al., 2014).</p>	35
<p>Figura 8. Ubicación geográfica Reserva Natural Río Ñambí, vereda El Barro, municipio de Barbacoas, Departamento de Nariño. (Elaborado por: Sevilla - Sánchez, MJ.,2019).....</p>	38
<p>Figura 9. Reserva Natural Río Ñambí. A. Interior de Bosque, B. Borde de Bosque. (Fotografías: Sevilla - Sánchez, MJ., 2018).</p>	39

Figura 10. Caja de luz para el registro fotográfico de la hemorragia producida por cada dosis del veneno de *Bothrocophias campbelli* (Modificado por: Sevilla – Sánchez, MJ., 2019 de: Escalante et al., 2011). 44

Figura 11. Hábitats y microhábitats donde se efectuaron búsquedas de individuos de *Bothrocophias campbelli* en la Reserva Natural Río Ñambí. **A, B.** Cuevas formadas por vegetación leñosa, **C.** Troncos, **D.** Hojarasca, **E.** Borde de bosque y senderos, **F.** Interior de bosque, **G.** Ríos y vegetación ribereña (Fotografías: Sevilla - Sánchez, MJ., 2018). 47

Figura 12. Representación gráfica de la Dosis Letal 50 producida por el veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, Colombia. La línea punteada representa la curva de regresión logarítmica para calcular la DL_{50} . En el eje de las abscisas el Log_{10} de la concentración del veneno y en el eje de las ordenadas la respuesta (%) ($n=4$). (Fuente: Esta investigación) 48

Figura 13. Signos de toxicidad registrados durante el ensayo de letalidad del veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, Colombia. **A.** Aislamiento y postración, **B.** Opistótonos, **C.** Incontinencia intestinal, **D.** Parálisis flácida de las extremidades posteriores, **E.** Piloerección y **F.** Secreción ocular. (Fotografías: Sevilla-Sánchez, MJ., 2019)..... 49

Figura 14. Actividad coagulante producida por diferentes dosis del veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, Colombia. La línea punteada representa la curva de regresión potencial obtenida para calcular la DCM ($R^2 = 0,957$). En el eje de las abscisas la concentración del veneno y en el eje de las ordenadas se muestra el tiempo en segundos + desviación estándar ($n=5$) (Fuente: Esta investigación)..... 50

Figura 15. Comparación de la dosis coagulante mínima (DCM) de *B. campbelli* del Ecuador (E) respecto a *B. campbelli* de Nariño, Colombia (N, C) (Fuente: Esta investigación). 50

Figura 16. Actividad edematizante a un tiempo de 60 minutos producida por diferentes dosis del veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, Colombia. La línea punteada representa la curva de regresión logarítmica obtenida para calcular la DEM ($R^2 = 0,837$). En el eje de las abscisas la concentración del veneno y en el eje de las ordenadas se muestra el porcentaje de edema + desviación estándar ($n=4$) (Fuente: Esta investigación). 51

Figura 17. Actividad edematizante producida por diferentes dosis del veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, Colombia. Cada línea representa las réplicas realizadas. En el eje de las abscisas el tiempo en horas y en el eje de las ordenadas

se muestra el porcentaje de edema + desviación estándar (n=4) (Fuente: Esta investigación).
..... 52

Figura 18. Edema en almohadilla plantar producido por diferentes dosis del veneno de *Bothrocophias campbelli* en modelos murinos. **A.** Control negativo (PBS), **B.** 0.625 µg/ratón **C.** 1.25 µg/ratón **D.** 2.5 µg/ratón **E.** 5 µg/ratón (círculo rojo mostrando formación de ampolla), y **F.** 10 µg/ratón (mionecrosis) (Fotografías: Sevilla – Sánchez, MJ., 2019)..... 52

Figura 19. Actividad mitotóxica producida por diferentes dosis del veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, Colombia. La línea punteada representa la curva de regresión logarítmica obtenida para calcular la DMM ($R^2 = 0,786$). En el eje de las abscisas la concentración del veneno y en el eje de las ordenadas se muestra la enzima Creatina quinasa en suero + desviación estándar (n=4). **PBS:** control negativo (Fuente: Esta investigación)..... 53

Figura 20. Análisis histológico del gastrocnemio de *Mus musculus* (corte transversal) inoculado con diferentes dosis de veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, Colombia. **A.** Control negativo (PBS), **B.** 1.25 µg/ratón, **C.** 2.5 µg/ratón **D.** 5 µg/ratón, **E.** 10 µg/ratón y **F.** 20 µg/ratón. Las muestras fueron tomadas 3 horas después de la inyección local. Aumento 100x. Escala 200 µm (Fotografías: Sevilla – Sánchez, MJ., 2019). 54

Figura 21. Análisis histológico del gastrocnemio de *Mus musculus* (corte transversal) inoculado con diferentes dosis de veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, Colombia. **A.** Control negativo (PBS), **B.** 1.25 µg/ratón, **C.** 2.5 µg/ratón **D.** 5 µg/ratón, **E.** 10 µg/ratón y **F.** 20 µg/ratón. Las muestras fueron tomadas 3 horas después de la inyección local de 50 µg de veneno. Aumento 400x. Escala 10 µm (Fotografías: Sevilla – Sánchez, MJ., 2019)..... 55

Figura 22. Focos de daño muscular ocasionados por diferentes dosis de veneno de *Bothrocophias campbelli* **A.** Desorganización de miofibrillas musculares (actina y miosina), **B.** miocitos necróticos con cariólisis y pérdida eusínfila (flecha izquierda) e hializada (flecha derecha) **C.** Foco extenso de necrosis **D.** hipercontracción de fibras musculares (corte longitudinal) **E.** Foco extenso de necrosis y presencia de células satélite **F.** Bandas de contracción (Fotografías: Sevilla – Sánchez, MJ., 2019)..... 56

Figura 23. Actividad hemorrágica producida por diferentes dosis del veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, Colombia. La línea punteada representa la regresión lineal obtenida para calcular la DHM ($R^2 = 0,975$). En el eje de las

abscisas la concentración del veneno y en el eje de las ordenadas se muestra las unidades hemorrágicas (HaU) + desviación estándar (n=4) (Fuente: Esta investigación)..... 57

Figura 24. Lesiones hemorrágicas (áreas: mm² y unidades hemorrágicas: HaU) producidas por diferentes dosis del veneno de *Bothrocophias campbelli* en modelos murinos. **A.** 96 µg/ratón, **B.** 48 µg/ratón, **C.** 24 µg/ratón, **D.** 12 µg/ratón, **E.** 6 µg/ratón, **F.** 3 µg/ratón y **G.** Control PBS (Elaborado por: Sevilla – Sánchez, MJ., 2018)..... 58

Figura 25. Comparación de la dosis hemorrágica mínima (DHM) de *B. campbelli* del Ecuador (E) respecto a *B. campbelli* de Nariño, Colombia (N, C). Las metodologías utilizadas para determinar esta actividad biológica con los venenos de la especie en Ecuador y Colombia fueron diferentes (Fuente: Esta investigación). 59

Figura 26. Formación de edema por acción del veneno de serpientes. La homeostasis se ve alterada por daño en las células endoteliales (**C.E**) como resultado de la acción de fosfolipasas A₂ (**PLA₂**), proteínas del sistema del complemento (**P.sc**), polipéptidos liberadores de kininas (**P.L.K**), enzimas proteolíticas similares a tripsina (**E.P.T**), serina proteasas (**SP**) y metaloproteinasas tipo P-I (**SVMP(P-I)**), esta pérdida de estabilidad celular ocasiona un desequilibrio en el intercambio de fluidos entre el espacio intra y extracelular (**E.E**) y como consecuencia se desarrolla el edema (Elaborado por: Sevilla – Sanchez, MJ., 2019) 66

Figura 27. Mecanismo de acción de las PLA₂s Lys49 (**K49**) y Asp49 (**D49**). Cada tipo de PLA₂ tiene la capacidad de causar citotoxicidad *in vitro* o mionecrosis *in vivo* de forma independiente como resultado del daño ocasionado a la membrana. Las miotoxinas Asp49 desestabilizan la membrana por hidrólisis enzimática de los fosfolípidos (**PL**) y la consiguiente producción de lisofosfolípidos (**liso-PL**) y ácidos grasos (**FA**), mientras que las toxinas Lys49 ejercen un mecanismo de permeabilización directa a través de su región **C** y **N-terminal** por medio de interacciones electrostáticas (Θ) (Modificado por: Sevilla – Sánchez, MJ., 2019 de: Mora-Obando et al., 2014). 67

Figura 28. Modelo de dos pasos para explicar el mecanismo de acción de las SVMPs hemorrágicas en el escenario microvascular (Modificado por: Sevilla – Sánchez, MJ., 2019 de: Escalante, et al., 2011)..... 71

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Dosis teóricas tomadas como referencia para determinar los niveles a probar en las actividades biológicas locales y sistémicas.	41
Tabla 2. Diseño experimental. Niveles probados para la determinación de las actividades biológicas del veneno de <i>B. campbelli</i> del departamento de Nariño.	41
Tabla 3. Análisis comparativo estructural de músculo (gastrocnemio) sometido a diferentes dosis de veneno de <i>Bothrocophias campbelli</i> del departamento de Nariño, Colombia.	53
Tabla 4 Dosis letal 50 del veneno de <i>Bothrocophias campbelli</i> comparada con DL ₅₀ de otros vipéridos. Vía de inoculación: intraperitoneal (IP).	60
Tabla 5 Dosis coagulante mínima del veneno de <i>Bothrocophias campbelli</i> comparada con DCMs de otros vipéridos.	63
Tabla 6. Dosis edematizante mínima del veneno de <i>Bothrocophias campbelli</i> comparada con la DEM de otros vipéridos. Vía de inoculación: subcutánea almohadilla plantar (S.C)	64
Tabla 7. Efecto mionecrótico del veneno de <i>Bothrocophias campbelli</i> comparada con el efecto producido por otros vipéridos.	68
Tabla 8. Dosis hemorrágica mínima del veneno de <i>Bothrocophias campbelli</i> comparada con DHMs de otros vipéridos. Vía de inoculación: intradérmica (ID).	70

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Formulario de consentimiento informado diseñado por María José Sevilla Sánchez para donantes de sangre periférica y aprobado por comité de ética de la Universidad de Nariño.....	86
Anexo B. Requisitos aceptados para investigaciones biomédicas con animales.	89
Anexo C. Convenio institucional entre Universidad de Nariño y Universidad del Cauca. .	90
Anexo D. Permiso para la realización del proyecto en el Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBUC) de la Universidad del Cauca.....	92
Anexo E. Determinación de la Dosis letal 50 del veneno de <i>Bothrocophias campbelli</i> del departamento de Nariño.	93
Anexo F. Determinación de la Dosis Coagulante Mínima (DCM) del veneno de <i>Bothrocophias campbelli</i> del departamento de Nariño.....	95
Anexo G Determinación de la Dosis Edematizante Mínima (DEM) del veneno de <i>Bothrocophias campbelli</i> del departamento de Nariño.....	96
Anexo H. Determinación de la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) del veneno de <i>Bothrocophias campbelli</i> del departamento de Nariño.....	97

INTRODUCCIÓN

Los envenenamientos ocasionados por serpientes (accidentes ofídicos), se han convertido en un relevante problema de salud pública en muchos países del mundo, especialmente en los latinoamericanos (Gutiérrez, 2002; Gutiérrez et al., 2010). Mundialmente, se estima que cerca de cinco millones de personas han sido víctimas de accidentes por ofidios venenosos o no, cuya intoxicación puede resultar en alteraciones fisiopatológicas, locales o sistémicas, con graves secuelas que pueden tener repercusiones sociales y económicas (OMS, 2013). Esta cifra podría estar subestimada, ya que muchos pacientes no alcanzan a ser atendidos por centros de salud, debido a la distancia a la que se encuentran o porque se niegan a recibir un tratamiento médico (Gutiérrez et al., 2010; Valderrama, 2010).

El accidente ofídico ha vuelto a ser catalogado como una enfermedad desatendida y por lo tanto, es considerado una de las problemáticas sanitarias prioritarias de la Organización Mundial de la Salud (Global Snakebite Initiative, 2018). Desde 1950, se han realizado algunas aproximaciones estadísticas para estimar la tasa del accidente ofídico en el mundo (Swaroop & Grab, 1954; Chippaux et al., 1991; Kasturiratne et al., 2008). Sin embargo, no existe un estudio epidemiológico completo que permita dimensionar la magnitud del problema. A la fecha, se conoce que la incidencia de las mordeduras por serpientes venenosas es elevada en el Sudeste asiático, países africanos y latinoamericanos (Kasturiratne et al., 2008).

A nivel mundial se han reportado 3763 especies de serpientes, distribuidas en 516 géneros y de 20 a 30 familias (Franco, 2003; Uetz & Hallermann, 2019). Colombia, al ser un país tropical con gran diversidad ecosistémica alberga aproximadamente 319 especies de serpientes agrupadas en 8 familias, de las cuales, Viperidae y Elapidae son las de mayor importancia clínica, con 20 y 31 especies respectivamente (Campbell & Lamar, 2004; Lynch, 2012; Uetz & Hallermann, 2019), siendo las especies de los géneros *Bothriechis*, *Bothrocophias*, *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Porthidium*, *Micrurus* e *Hydrophis* las principales responsables de los accidentes ofídicos (Ayerbe-González, 2009).

Lo anterior a posicionado a Colombia, como el tercer país en América Latina, después de México y Brasil en presentar el mayor número de casos de envenenamientos por serpientes (Cuellar-Gordo et al., 2015). Por lo cual, este evento es de notificación obligatoria ante el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA), desde octubre del 2004, en la Circular 092 del Ministerio de Salud y Protección Social. No obstante, solo hasta el año 2007, los casos comenzaron a notificarse de manera consistente (Rodríguez-Vargas, 2012).

Estudios epidemiológicos disponibles, muestran que en nuestro país ocurrían entre 2000 y 3500 accidentes cada año. Actualmente se presentan entre 4000 a 5000, con una incidencia que varía de 6.2 casos/100000 habitantes en las regiones menos pobladas, a 20 casos/100000 habitantes en las zonas más densamente habitadas, y una mortalidad que oscila igualmente entre el 0.04 al 7.6% según las diferentes regiones del país (Otero et al., 1992; Carrasco et al., 2012; Otero-Patiño, 2014; León Nuñez, 2015). En el año 2016 se presentaron 4704 casos

con una incidencia nacional de 9.5 casos por cada 100000 habitantes, en el año 2017 se reportaron 4978 casos con una incidencia de 10.35 casos por cada 100000 habitantes y en el año 2018 se registraron un total de 5434 casos con una incidencia de 10.9 casos por cada 100000 habitantes y una letalidad del 0.5% a la semana 46 (INS, 2015, 2016, 2017, 2018a, 2018b).

Estudios epidemiológicos nacionales realizados en Antioquia, Chocó (Otero et al., 1992), Sucre (Cuellar-Gordo et al., 2015), Magdalena (Márquez Gómez & Gómez Díaz, 2015), Cauca (Ayerbe-González & Latorre-Ledezma, 2009), Valle del Cauca (Cañas Dávila, 2013) y Nariño (Sevilla-Sánchez et al., 2019) reportan que el accidente ofídico más frecuente es el bothrópico. Este tipo de envenenamiento, también conocido como ofidiotoxicosis bothrópica, es ocasionado por la mordedura de serpientes de la familia Viperidae de los géneros *Bothriechis*, *Bothrocophias*, *Bothrops* y *Porthidium* (clasificación taxonómica según Carrasco et al., 2012), en el cual los pacientes presentan un cuadro clínico caracterizado por síntomas locales como dolor, hemorragia, edema, flictenas, necrosis tisular, equimosis, e isquemia; y síntomas sistémicos que reflejan esencialmente alteraciones hemostáticas (Ayerbe González & Rodríguez Buitrago, n.d.). La sintomatología puede variar por factores intrínsecos del paciente, localización y número de mordeduras, vía de penetración, cantidad del veneno inoculado, tiempo transcurrido desde el accidente, tamaño y especie de serpiente implicada (Chippaux et al., 1991).

Bothrocophias campbelli se distribuye en Colombia y Ecuador (Castro et al., 2005), y bajo modelamiento de nicho ecológico hasta Perú (Vaca Guerrero, 2012). En Colombia se encuentra sobre la vertiente del Pacífico en los Andes septentrionales, con registros únicos en los bosques húmedos de la Reserva Natural río Nambí del municipio de Barbacoas en el departamento de Nariño, lo que la convierte en una especie poco común y de distribución restringida, ya que difícilmente supera los 50 km de amplitud (Castro et al., 2005). Esta especie ha sido escasamente estudiada en diferentes aspectos biológicos (Vaca Guerrero, 2012), y se conoce poco sobre su veneno (Salazar-Valenzuela et al., 2014).

La caracterización proteómica y funcional del veneno de *B. campbelli* del Ecuador muestra una elevada abundancia de fosfolipasas A₂ (43.1%), y un bajo porcentaje de metaloproteinasas (15.8%), en comparación con otros venenos bothrópicos, lo que explica el elevado efecto miotóxico y pobre efecto hemorrágico en modelos biológicos (Salazar-Valenzuela et al., 2014). Aunque estos resultados dan una noción de las alteraciones más prominentes que se podrían observar en los pacientes, se desconoce el cuadro clínico, por lo que los envenenamientos son tratados indistintamente a los ocasionados por otros vipéridos (Campbell & Lamar, 2004; D. A. Warrell, 2004). En este sentido, el desconocimiento de la sintomatología y la falta de un tratamiento oportuno, pueden generar secuelas permanentes en las víctimas de accidente ofídico, tales como la reducción en la movilidad de la(s) extremidad(es) afectada(s), amputaciones e incluso podría conllevar a la muerte.

Aunque el veneno de *B. campbelli* de Nariño podría presentar una composición similar al del Ecuador, desde el punto de vista clínico, es importante conocer los efectos que produce,

teniendo en cuenta los antecedentes de variación inter e intraespecífica de los venenos y de esta manera, comprender y manejar apropiadamente el cuadro clínico presentado por los pacientes (Chippaux et. al, 1991, Restrepo-Hamid & Peña-Acevedo, 2011). Por lo tanto, esta investigación caracterizó a nivel toxinológico el veneno de *B. campbelli* de Nariño a través del análisis de actividades biológicas locales y sistémicas en *Mus musculus* como modelo biológico, con el fin de aportar información respecto a la sintomatología reactiva del veneno en ensayos preclínicos y extrapolación inicial a lo esperado durante el envenenamiento en humanos, inferir la presencia de proteínas asociadas (las cuales idealmente deben confirmarse con estudios proteómicos), y reconocer la variación frente a los efectos producidos por especies del mismo género o géneros relacionados filogenéticamente, que de manera general suelen ser atribuidos al género *Bothrops*.

OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Evaluar la toxicidad y las actividades biológicas locales y sistémicas producidas por el veneno de *Bothrocophias campbelli* del piedemonte Andino Pacífico del departamento de Nariño.

1.2 Objetivos específicos

1. Determinar la dosis letal 50 del veneno de *B. campbelli* en *Mus musculus*.
2. Establecer la dosis mínima de la actividad coagulante (sistémica) sobre plasma humano.
3. Estipular las dosis mínimas de las actividades edematizante, miotóxica y hemorrágica (locales) producidas por el veneno de *Bothrocophias campbelli* en *Mus musculus*.

2. ANTECEDENTES

A la fecha, el único estudio reportado con el veneno de *B. campbelli* es el de Salazar-Valenzuela y colaboradores (2014). A continuación se describen algunas investigaciones relacionadas con la determinación de la toxicidad y las actividades biológicas (locales y sistémicas) de venenos de especies relacionadas filogenéticamente (Otero et al., 2002; Ayerbe-González & Latorre-Ledezma, 2009; Fenwick et al., 2009; Fenker Antunes, 2012):

Gutiérrez y Chaves (1979) evaluaron los efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis* en *Mus musculus*. Los resultados muestran que los efectos proteolíticos pueden ser mayores o menores dependiendo de la especie; *Atropoides picadoi* ocasionó el efecto hemorrágico más alto y la mionecrosis de mayor intensidad la produjeron los venenos de *B. asper* y *Bothriechis schlegelii*. Todos los venenos desencadenaron procesos inflamatorios, caracterizados por un exudado fibrinoso rico en neutrófilos polimorfonucleares, con presencia de angionecrosis y la formación de trombos.

Gutiérrez y colaboradores (1986) determinaron la actividad edematizante producida por los venenos de *Atropoides nummifer*, *A. picadoi*, *Bothrops asper*, *Bothriechis schlegelii*, *Bothriechis lateralis*, *Cerrophidion godmani*, *Lachesis muta* y *Porthidium nasutum*, en almohadilla plantar de *Mus musculus*, probando además su neutralización. Encontraron que los venenos que inducen mayor actividad edematizante corresponden a *B. lateralis* y *A. picadoi* a una concentración de 2.5 µg cada uno y el veneno con menor actividad fue el de *Atropoides nummifer* (18µg). Manifiestan que la efectividad en la neutralización del edema no supera el 50% en todos los casos y depende de la vía de inoculación del veneno.

Sanjuán-Galindez y colaboradores (2012) realizaron un estudio dosis- respuesta con el fin de determinar la DL₅₀ de *B. atrox* en *Mus musculus* a partir de tres pruebas: gruesa, fina y superfina. Comprobaron que existe una relación directamente proporcional entre la concentración de la dosis de veneno y los efectos que esta causa y estimaron las DL₅₀ en 78.3, 72.86 y 64.98 µg de veneno por ratón para las pruebas gruesa, fina y superfina respectivamente. Teniendo en cuenta el mejor ajuste de la regresión Probit y una menor desviación estándar, establecieron una DL₅₀ final de 64.98 µg/ratón o 3.61 mg/kg.

Sánchez y colaboradores (2014), realizaron una caracterización bioquímica y biológica del veneno de *Bothrops venezuelensis* en *Oryctolagus cuniculus* y en *Mus musculus* cepa INH. Determinaron que el veneno tiene una DL₅₀ de 6.39 mg/kg y está conformado principalmente por proteínas ácidas que oscilan entre 7 y 70 kDa. Posterior al fraccionamiento del veneno por cromatografía líquida de alto rendimiento demostraron que la mayoría de las fracciones presentaron actividad hemorrágica, proteolítica, procoagulante y fibrinolítica y cuatro de las doce fracciones inhibieron la función plaquetaria.

Mora-Obando y colaboradores (2014) realizaron un análisis proteómico y funcional comparativo del veneno de *B. ayerbei* con el veneno de *B. asper* de una región geográfica

cercana. Las proteínas más abundantes fueron las metaloproteinasas (53,7%), seguidas de las lectinas tipo C (10,1%) y las serina proteasas (9,3%), mientras que las fosfolipasas A₂ solo representaron el 0,7% del total del veneno, una condición raramente observada entre los venenos bothrópicos. El perfil proteómico del veneno de *B. ayerbei* se correlacionó con su alta actividad hemorrágica (local y sistémica), alta letalidad y bajas actividades miotóxica y PLA₂. En contraste, el veneno de *B. asper* de El Tambo (Cauca) presentó abundantes PLA₂s tipo Asp49 y Lys49 y altas actividades miotóxica, procoagulante y desfibrinante. Esta caracterización proteómica y toxinológica reveló una notable variación interespecífica entre los venenos de las dos especies, la cual concuerda con la descripción de los cuadros clínicos que presentan los pacientes durante el envenenamiento (Ayerbe, S. comunicación personal).

Salazar-Valenzuela y colaboradores (2014), reportaron el primer perfil proteómico y toxinológico del veneno de *Bothrocophias campbelli* del Ecuador utilizando como modelo biológico la cepa CD-1 de *Mus musculus*. La dosis letal media del veneno fue de 150 µg/ratón por vía intraperitoneal, una potencia más baja que la reportada para *B. asper* del Cauca en Colombia. El veneno está conformado principalmente por fosfolipasas A₂ (43.1%), serina proteasas (21.3%) y metaloproteinasas (15.8%), lo que explica el elevado efecto miotóxico, alteraciones hemostáticas moderadas y escasa hemorragia observadas *in vivo*. Los ensayos de neutralización sugieren que el suero antiofídico polivalente producido por el Instituto Clodomiro Picado podría neutralizar efectivamente los efectos esencialmente miotóxicos ocasionados por este veneno.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Serpientes venenosas

Las serpientes pertenecen a la clase Reptilia, orden Squamata y suborden Serpentes (Campbell & Lamar, 2004). Se distribuyen en casi todos los continentes y son animales con una gran capacidad de adaptación, por lo que habitan diversos tipos de terrenos, pisos térmicos y ecosistemas (Cuellar-Gordo et al., 2015). Estos animales han sufrido grandes cambios morfológicos y fisiológicos durante su evolución, además de presentar una peculiar forma de alimentación en la cual su cráneo y mandíbula cumplen un papel fundamental, lo que les permite ingerir presas de un tamaño incluso superior al de su cabeza (Mendoza Roldán, 2015).

Este grupo tiene un rol fundamental en los ecosistemas, ya que regulan la densidad poblacional de sus presas, conservando la dinámica de las comunidades biológicas (Lynch, 2012). Como depredadores han desarrollado diferentes estrategias para la captura de presas, una de ellas es la constricción, la cual es catalogada como la más antigua, a través de la cual interrumpen el flujo sanguíneo normal de su presa causando un paro cardíaco (Boback et al., 2015). La estrategia más reciente es la muerte e inmovilización por inoculación de veneno, producto de la evolución de un aparato venenoso sofisticado con un cambio de una glándulas

salivales en productores de toxinas, esto ocurrió hace unos 60 u 80 millones de años y es una de las estrategias más avanzadas de este grupo, en el cual las modificaciones del hueso maxilar y aparición de colmillos acanalados unidos a glándulas y unidades musculosas que secretan veneno son los cambios más importantes (Hargreaves et al., 2014). Las serpientes venenosas a nivel mundial *sensu stricto* están agrupadas en tres familias: Atractaspididae, Elapidae y Viperidae (Campbell & Lamar, 2004). En Colombia, se encuentran representadas por especies que habitan principalmente en los climas cálidos y templados y hacen parte de las familias Viperidae (vipéridos) y Elapidae (elápidos) (Campbell & Lamar, 2004). La familia Viperidae incluye las víboras verdaderas, con alrededor de 20 especies de los géneros *Bothriechis*, *Bothrocophias*, *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* y *Porthidium*, los cuales son los principales responsables de los accidentes ofídicos (Ayerbe-González, 2009). La familia Elapidae agrupa a las serpientes de coral o coralillos, con aproximadamente 30 especies del género *Micrurus* y la subfamilia Hydrophiinae incluye a la especie *Hydrophis platurus*, implicada en accidentes ofídicos poco frecuentes (Lynch, 2012; Uetz, 2018). Por otro lado, las familias Colubridae (colúbridos) y Dipsadinae, conformadas principalmente por serpientes no venenosas (no letales) y con una gran diversidad en el país, incluye especies de posible importancia en la salud pública, pertenecientes a los géneros *Apostolepis*, *Helicops*, *Leptodeira*, *Leptophis*, *Oxyrhopus*, *Oxybelis*, *Philodryas*, *Stenorrhina*, *Thamnodynastes* y *Xenodon*, distribuidas por debajo de los 500 o hasta 1.000 msnm (Lynch, 2012), las cuales causan cerca del 15% de las mordeduras y generan cuadros clínicos con síntomas locales y sistémicos leves sin dejar secuelas (Ayerbe-González, 2008; Sevilla-Sánchez et al., 2019).

La familia Viperidae agrupa serpientes con tamaños corporales variables, desde los 50 cm hasta los 4 metros de largo, su cabeza es ancha y triangular, su cuerpo es ancho y tienen colas delgadas y cortas, presentan escamación quillada y pupilas elípticas. En la subfamilia Crotalinae las serpientes tienen además fosetas termo-receptoras, donde se incluyen las cascabeles (e.g., *Crotalus durissus*), verrugosas (e.g., *Lachesis acrochorda*, *L. muta*), equis (e.g., *Bothrops asper*, *B. atrox*, *Bothrocophias colombianus*, *B. campbelli*), patocos (e.g., *Porthidium lansbergii*, *P. nasutum*), entre otras. Se distribuyen sobre casi toda la extensión terrestre del país por debajo de los 2.600 msnm, se pueden encontrar en zonas transformadas, tienen hábitos arborícolas (desde la base del árbol o arbusto hasta el dosel) o terrestres y actividad nocturna (Lynch, 2012).

3.1.1 Envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae

Los envenenamientos ocasionados por serpientes, conocido también como accidente ofídico, ofidiotoxicosis, ofitoxemia o simplemente mordedura de serpiente, se han convertido en un relevante problema de salud pública debido a que causan un importante número de envenenamientos en muchos países del mundo, principalmente en los trópicos rurales (Kasturiratne et al., 2008) y en países latinoamericanos (Gutiérrez, 2002; Gutiérrez et al., 2010). Las poblaciones de estas regiones, debido a un deficiente e ineficiente servicio de salud, evidenciado en una escasa cobertura del mismo en zonas rurales, y en ocasiones a una insolvencia de antiveneno, experimentan una alta morbilidad y mortalidad, donde las

víctimas generalmente presentan secuelas físicas y psicológicas permanentes, las cuales generan un impacto económico considerable ya que en su mayoría los afectados son jóvenes (Hansdak et al., 1998)

Las estimaciones estadísticas del accidente ofídico a nivel mundial son inexactas, algunos autores plantean que existen alrededor de 5.4 millones de ocurrencias, de las cuales 2.5 millones resultan en envenenamientos y cerca de 125000 muertes; otros manifiestan que ocurren más de 3 millones de accidentes resultantes en 150000 muertes; o simplemente se afirma que se presentan “varios millones de picaduras y envenenamientos anuales con decenas de miles de muertes” (Kasturiratne et al., 2008; OMS, 2013). En Colombia, aunque hace aproximadamente 15 años, el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) incluyó al ofidismo como un evento de notificación obligatoria (Circular 092 del Ministerio de Salud), solo hace 10 años los casos comenzaron a notificarse de manera consistente. Lo anterior, ha permitido una mejor aproximación a las cifras reales de los envenenamientos (Ministerio de la Protección Social, 2004; Rodríguez-Vargas, 2012), sin que la subestimación de los mismos no deje de ser un problema que le hace frente a este evento (Gutiérrez et al., 2010; Valderrama, 2010).

Esta preocupación está fundamentada en que Colombia al ser un país tropical con gran diversidad ecosistémica, es el tercer país de América Latina en reportar el mayor número de accidentes ofídicos (Cuellar-Gordo et al., 2015), los cuales oscilan entre 2000 y 5000 cada año, con tasas de incidencia y mortalidad que varían según la densidad poblacional en las diferentes regiones del país (Otero et al., 1992; León Nuñez, 2015). De acuerdo con los reportes del Instituto Nacional de Salud de Colombia a través del SIVIGILA, esta enfermedad desatendida ha incrementado en los últimos años, pues se han reportado 4201, 4704, 4978 y 5434 casos en 2015, 2016, 2017 y 2018 respectivamente. Además, cabe resaltar que el departamento de Nariño se destaca como uno de los departamentos donde se han registrado defunciones (INS, 2015, 2016, 2017, 2018b; Sevilla-Sánchez et al., 2019).

En general, los envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae se caracterizan por causar un daño prominente al tejido local como resultado de la mionecrosis, hemorragia y edema que producen en los pacientes (Gutiérrez & Lomonte, 1989; Otero, Tobón, et al., 1992). La necrosis de músculo (mionecrosis) es uno de los efectos más importantes, con el potencial de ocasionar secuelas graves, como pérdida de tejido y discapacidad (Ayerbe-González, 2008). A nivel sistémico, las coagulopatías constituyen uno de los hallazgos más comunes en los envenenamientos por vipéridos (Ayerbe-González, 2009a), lo que se refleja en la alteración del tiempo de protrombina y el tiempo de coagulación sanguínea. Otro efecto fisiopatológico importante es el daño renal agudo, que puede manifestarse como oliguria o anuria, usualmente 6 horas después de la mordedura. La nefrotoxicidad, junto con las alteraciones cardiovasculares sistémicas (hipotensión y choque) causadas por los venenos de vipéridos, constituyen las principales causas de muerte (Otero et al., 1992; Ayerbe-González & Latorre-Ledezma, 2009).

3.1.1.1 Accidente ofídico bothrópico

Se conoce como accidente ofídico bothrópico u ofidiotoxicosis bothrópica, al cuadro clínico característico producido por la acción y los efectos de las toxinas inoculadas en un organismo por la mordedura de una serpiente venenosa del pertenecientes a la subfamilia Crotalinae de los géneros *Bothriechis*, *Bothrocophias*, *Bothrops* y *Porthidium*, cuyas especies son las de mayor importancia epidemiológica en el país, causando alrededor del 80% o más de los envenenamientos (figura 1) (Ayerbe-González, 2008, 2009b).

La gravedad de la ofidiotoxicosis bothrópica puede ser leve, moderada o grave con efectos locales y sistémicos característicos (Ayerbe-González, 2009b). Entre las manifestaciones locales están: dolor intenso y edema progresivos, equimosis, flictenas (figura 2), sangrado, linfadenitis regional, parestesias, hipotermia, síndrome compartimental (figuras 2 y 3), necrosis tisular, abscesos y gangrena dejando como consecuencia la pérdida funcional o anatómica del miembro afectado. Por otra parte, las manifestaciones sistémicas incluyen: coagulopatías severas, hemorragias como gingivorragias (figura 4), hematuria, hematochesis y hematemesis, síntomas neurológicos secundarios a causa de hemorragia intracraneal, epistaxis, hipotensión, shock mixto, ictericia, septicemia, convulsiones, oliguria o anuria, colapso cardiovascular, microtrombosis masiva capilar pulmonar y/o mesentérica, falla orgánica multisistémica (FOMS), síndrome compartimental, necrosis y gangrena, donde cualquiera de estos síntomas puede llevar a la muerte del paciente (Castro et al., 1999; Ayerbe-González, 2009b). Adicionalmente, se pueden presentar síntomas generales como náuseas, vómito, lipotimia, cefalea, fiebre y sudor (Sevilla-Sánchez et al., 2019)



Figura 1. Especies asociadas a ofidiotoxicosis bothrópica. **A.** *Bothrops rhombeatus*, **B.** *Bothrops ayerbei*, **C.** *Bothriechis schlegelii*, **D.** *Bothrops asper* (Fotografías: Sevilla - Sánchez, MJ., 2019), **E.** *Bothrops pulchra* (Fotografía: Ramírez, F. n.d), **F.** *Bothrops punctatus* (Fotografía: Sevilla - Sánchez, MJ., 2019), **G.** *Porthidium nasutum* (Fotografía: Ayerbe, n.d), **H.** *Bothrocophias campbelli* (Fotografía: Mora-Obando, 2010).



Figura 2. Síndrome compartimental ocasionado por *B. asper*. Gangrena y flictenas. Cortesía: Hospital Universitario San José®, Popayán, Cauca. (Fotografía: Ayerbe, 2008).



Figura 3. Síndrome compartimental ocasionado por *B. asper*. Gangrena. Cortesía: Hospital Universitario San José®, Popayán, Cauca. (Fotografía: Ayerbe, 2008).



Figura 4. Hemorragia gingival ocasionada por *B. ayerbeii*. Cortesía: Hospital Universitario San José®, Popayán, Cauca. (Fotografía: Ayerbe, 2008).

3.1.2 El veneno de las serpientes

Los venenos de las serpientes son un coctel proteico con propiedades bioquímicas y farmacológicas únicas, producido en glándulas exocrinas especializadas, las cuales evolucionaron a partir de las glándulas salivares modificadas o de Duvernoy presentes en los colúbridos; se caracterizan por ser líquidos turbios, viscosos, incoloros, amarillos o verdes dependiendo de la especie (Pastrana et al., 2003; Ayerbe-González, 2009; Hargreaves et al., 2014). Están compuestos esencialmente por proteínas (90 a 95% del peso seco) con masas moleculares que en su mayoría son menores a 30 kDa, cuya función biológica radica en la defensa y alimentación, por medio de la inmovilización, muerte y digestión de las presas (Chippaux et al., 1991; Markland, 1998).

Los estudios sobre el origen y evolución de las toxinas de los venenos de elápidos y vipéridos indican que muchos de los genes de las familias de proteínas encontradas actualmente en los venenos, fueron reclutados tempranamente, y procesos como la evolución acelerada, que involucran la duplicación de genes comunes en el tejido pancreático y salival de los vertebrados terrestres y el *splicing* alternativo, habrían dado lugar a la expresión de nuevos genes con funciones tóxicas (neofuncionalización), esto resultó en una alta diversidad toxinológica y por ende farmacológica de los venenos (Fry & Wüster, 2004; Hargreaves et al., 2014).

Diferentes componentes hacen parte del veneno de las serpientes, entre los que se destacan las fosfolipasas A₂, implicadas en los efectos proteolítico, hemolítico y miotóxico del veneno; las proteínas activadoras del complejo de quinina asociadas a alteraciones neurotóxicas, las cuales han sido poco descritas en mordeduras de vipéridos (Pastrana et al., 2003); las metaloproteinasas relacionadas con efectos sobre la coagulación sanguínea por alteración en la agregación plaquetaria; las desintegrinas, que actúan principalmente como inhibidores de la agregación plaquetaria y neurotoxinas, citotoxinas y cardiotoxinas que actúan sobre los canales de potasio para ejercer su actividad (Markland, 1998). El veneno también puede contener fosfomonoesterasas, fosfodiesterasas, L-aminoácido oxidasas, acetilcolinesterasas, NAD nucleosidasas, hialuronidasas y toxinas poliproteicas (Markland, 1998; Lakhota et al., 2002; Maruñak et al., 2006).

Estas moléculas son inoculadas en la víctima por medio de colmillos acanalados en cantidades variables, aproximadamente entre 0.1 y 1.5 ml en especies de la familia Viperidae, con capacidad de producir hasta 5 ml; cabe resaltar que pueden presentarse mordeduras en las cuales no existe una inyección de veneno (Pastrana et al., 2003). La cantidad de veneno a inocular está regulada por la contracción de los músculos masticadores, que causan un vaciado rápido del contenido glandular, y la inyección del veneno es más común por vía intramuscular, cutánea, cutánea-mucosa, intravenosa y en casos poco frecuentes, por vía digestiva cuando se presenta ingesta de presas envenenadas (Pastrana, et al., 2003).

Los venenos se clasifican según el mecanismo de acción en proteolíticos, coagulantes, hemolíticos, miotóxicos, vasculotóxicos, neurotóxicos, necrotóxicos, hepatotóxicos y

nefrotóxicos (Navarrete Samora, et al., 2010). No obstante, algunos venenos pueden presentar una combinación de estos mecanismos. La acción proteolítica, generada especialmente por venenos de especies de las subfamilias Crotalinae y Viperinae, se manifiesta con la degradación de los componentes proteicos de la membrana basal de la microvasculatura y como efecto secundario se genera disrupción de células endoteliales, lo cual se traduce en hemorragias (Rucavado et al., 1995; Aguilar et al., 2001; Gutiérrez et al., 2005). Este efecto hemorrágico, no solo ocurre en el sitio de la mordedura sino también a nivel sistémico (Warrell, 2009).

Así mismo, la acción coagulante, propia de venenos bothrópicos y en general de la subfamilia Crotalinae, se produce por componentes procoagulantes y anticoagulantes presentes en los venenos, los cuales causan una variedad de alteraciones sobre la cascada de la coagulación (Theakston & Reid, 1983). En estos venenos, las proteinasas tipo trombina, así como activadores del factor X y/o activadores de protrombina, desencadenan dichas alteraciones que se corresponden con las actividades fibrinolítica y fibrino(geno)lítica producidas durante el envenenamiento (Maruñak et al., 2006).

Las actividades hemolíticas y miotóxicas son comunes en los venenos de la subfamilia Crotalinae y Viperinae, en especial en algunas especies del género *Crotalus* y *Bothrops*; estas actividades se caracterizan por causar efectos locales como dolor, edema, equimosis, flictenas, hemorragia y necrosis del tejido muscular y son producidas por miotoxinas que lesionan las fibras musculares y hemorraginas que alteran la microvasculatura local y sistémica, así como otras sustancias que generan edema con incremento de la presión tisular local (Ayerbe-González, 2008; Markland, 1998).

La acción vasculotóxica, propia de los géneros *Crotalus*, *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Porthidium* y *Lachesis*, se desencadena por presencia de metaloproteasas, hemorraginas y cofactores como el calcio, zinc y magnesio, que ocasionan la destrucción proteolítica de la membrana basal de los vasos capilares generando hemorragia e isquemia (Ayerbe-González, 2008; Manrique Chicoma, 2000).

La neurotoxicidad es típica de los géneros *Crotalus*, *Micrurus* y *Pelamis* y esta mediada en su mayoría por neurotoxinas presinápticas, las cuales, al actuar sobre el axón terminal de la neurona producen ruptura de vesículas sinápticas, daño al axón y cese de la descarga de acetilcolina, bloqueando completamente la transmisión neuromuscular y produciendo parálisis flácida (Ayerbe-González, 2008; Markland, 1998).

La acción necrotóxica se ha reportado en la mordedura de serpientes marinas en animales de experimentación (Maldonado Martinez et al., 1993) y en especies del género *Bothrops* causando diferentes eventos sintomatológicos (Manrique Chicoma, 2000). La acción hepatotóxica es poco común y se ha descrito para venenos crotálicos como el de *Crotalus durissus terrificus* (Barraviera et al., 1995), este tipo de acción genera degeneración

hidrónica, además de daño mitocondrial a nivel hepático por la liberación de citocinas (interleukina-6) desde el hepatocito (Manrique Chicoma, 2000).

La acción nefrotóxica se considera propia de los venenos crotálicos y bothrónicos, como resultado de la acción directa de los componentes del veneno sobre los túbulos renales, el endotelio vascular renal o por efectos secundarios (Manrique Chicoma, 2000).

3.1.2.1 Venenos bothrónicos

Los venenos bothrónicos contienen componentes proteicos y no proteicos, estos últimos clasificados en inorgánicos y orgánicos; entre los componentes inorgánicos están: el zinc, calcio, magnesio, potasio, fósforo, sodio, hierro, cobalto, níquel, sulfatos, cloratos y fosfatos; el zinc por ejemplo, es cofactor de las metaloproteinasas y está implicado en la actividad anticolinesterasa y el calcio es cofactor de las fosfolipasas A₂ esencial en la actividad enzimática. Entre los componentes orgánicos están los aminoácidos como la histidina, aspartato, glicina, glutamato, serina, alanina, así como péptidos ricos en prolina, glicoproteínas, fosfatidil colina y aminas biogénicas (histamina, bradicinina, serotonina y acetilcolina) las cuales son responsables del dolor agudo, aparición de edema, efectos inflamatorios y la disminución en la tensión arterial (Soler & Rodríguez, 2006; Peña et al., 2010). Los péptidos potenciadores de bradicinina y las citocinas están asociados a procesos edematizantes e inflamatorios por la participación del infiltrado celular, y además pueden producir cuadros de hiperalgesia (Gutiérrez, 2002)

Los componentes proteicos de los venenos bothrónicos se clasifican en flavoenzimas, proteínas no-enzimáticas y proteínas con actividad enzimática. Las flavoenzimas como la L-aminoácido-oxidasa le confiere el color amarillo al veneno y cataliza la desaminación oxidativa de un amplio número de L-aminoácidos como el L- α -amino y α -hidroxiácidos, además es la causante de que los aminoácidos libres se conviertan en α -cetoácido (Guo et al., 2012; Munuera Mora, 2016). Entre las proteínas no-enzimáticas están los inhibidores de proteasas tipo Kunitz, las cuales son toxinas inhibitoras de serina proteasas, las proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP), las lectinas de unión a galactosa (GBL) y el factor de crecimiento de nervio (NGF) cuyo rol no es bien definido, aunque se conoce que potencian la permeabilidad celular, lo que podría favorecer la difusión del veneno (Sunagar et al., 2013).

Entre las proteínas con actividad enzimática más abundantes se encuentran las metaloproteasas, las fosfolipasas y las serina proteasas (Gutiérrez, 2002). Las metaloproteasas incluyen enzimas coagulantes y procoagulantes que activan los factores X y II de la cascada de coagulación; estos componentes poseen una alta especificidad por sustratos del tejido conectivo y la membrana basal de los vasos capilares y vénulas causando aumento en la permeabilidad y pérdida de la integridad del tejido, lo cual conduce a ruptura de los capilares, cuadros de desfibrinación, coagulación intravascular diseminada,

trombocitopenia y hemorragia (Furukawa & Hayashi, 1977; Gutiérrez, 2002; Mora-Obando, 2014).

Las fosfolipasas A₂ son de masa molecular pequeña (14 - 18 kDa) (Dennis, 1997), su acción se basa en la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana en la posición 2 del enlace éster de los glicerofosfolípidos liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos insaturados, su función es esencialmente digestiva y pueden presentar variadas actividades biológicas como neurotoxicidad, miotoxicidad, estimulación o inhibición de la agregación plaquetaria, acción hemolítica, anticoagulante, hipotensora, cardiotoxica, edemática, bactericida, entre otros (Dennis, 1994; Buitrago & Gómez Marín, 2002; Valdés Rodríguez et al., 2002).

Las proteínas con actividad enzimática menos abundantes corresponden a las hialuronidasas, que favorecen la difusión del veneno en los tejidos por catálisis de glucósidos como los ácidos mucopolisacáridos generando disminución de la viscosidad del tejido conectivo (Soler & Rodríguez, 2006), fosfolipasas B, endonucleasas (ADNasas y ARNasas), exonucleasas (fosfodiesterasas) y nucleotidasas que catalizan la ruptura de proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y nucleótidos de los tejidos afectados y generan una marcada destrucción tisular por hemorragia, necrosis y edema (Boldrini-França et al., 2017; Guo et al., 2012; J. M. Gutiérrez, 2002; Soler & Rodríguez, 2006).

La diversa gama de componentes en los venenos bothrópicos está sujeta a variación inter o intraespecífica. Entre los factores que determinan esta variación se encuentran: el aislamiento geográfico, la edad del espécimen (ontogénicos), hábitos alimenticios, estado de madurez, ciclo fisiológico, sexo y hábitos estacionales, todos atribuidos a un nivel genético (Chippaux et al., 1991; Pastrana et al., 2003). Dicha variación se refleja en los síntomas fisiopatológicos locales y/o sistémicos observados durante el envenenamiento (Chippaux et al., 1991; Alape-Girón et al., 2008), por lo cual es importante tenerlos en cuenta para el manejo de los pacientes (Quintana et al., 2000) y durante la producción de antivenenos con el fin de mejorar su efectividad (Chippaux et al., 1991).

Se desconocen estudios de variación intraespecífica a nivel geográfico del veneno de *Bothrocophias campbelli*; sin embargo Salazar-Valenzuela y colaboradores (2014) compararon los perfiles cromatográficos de tres ejemplares de *B. campbelli* del Ecuador, dos machos de la misma localidad y una hembra de una localidad diferente; los tres ejemplares se caracterizaron por presentar gran abundancia de fosfolipasas A₂ Lys⁴⁹ y observaron sutiles diferencias respecto a la abundancia de serina proteasas y metaloproteasas.

A nivel del género *Bothrocophias*, el estudio de Salazar-Valenzuela y colaboradores (2014) es el primer análisis proteómico y funcional del veneno. Para la especie *Bothrocophias microphthalmus* solamente se menciona que “su veneno es bastante tóxico pudiendo causar necrosis; además, parece ser poco neutralizado por antídotos comerciales” (Rodríguez-Guerra, 2010b). Pese a que no existen soportes experimentales de esta afirmación, el efecto es similar al producido por el veneno de *B. campbelli* del Ecuador, el cual es un veneno altamente miotóxico; no obstante, ensayos de inmunogenicidad demuestran similitud antigénica con los venenos bothrópicos usados para la producción de sueros polivalentes, y

experimentos preliminares de neutralización evidencian que los envenenamientos ocasionados por *B. campbelli* podrían ser tratados con este tipo de sueros, aspecto en el que disciernen con *B. microphthalmus*. Lo anterior sugiere una posible variación proteica entre estas dos especies, reafirmando la importancia de análisis comparativos entre los venenos de las especies del género (Salazar-Valenzuela et al., 2014).

3.2 Generalidades del género *Bothrocophias*

Bothrocophias es un género perteneciente a los vipéridos neotropicales; las 6 especies del género se distribuyen en la región noroccidental de América del Sur, en bosques húmedos tropicales y subtropicales andinos (Cisneros-Heredia et al., 2006). Perteneció a un linaje monofilético de origen sudamericano y se considera grupo hermano de *Bothrops* y *Bothriopsis*, este género está clasificado en este clado como resultado de análisis morfológicos y filogenéticos a partir de ADN mitocondrial (Fenwick et al., 2009; Vaca Guerrero, 2012).

El género está conformado por 6 especies: *B. campbelli* descrita en 1991 (Freire Lascano), *B. myersi* en el 2001 (Gutberlet & Campbell), *B. microphthalmus* en 1875 (Cope), *B. andianus* en 1923 (Amaral), *B. hyoprora* en 1935 (Amaral) y *B. colombianus* en 1940 (Rendahl & Vestergren), las 4 últimas fueron descritas inicialmente como especies de los géneros *Bothrops* o *Porthidium* (Uetz, 2018) y recategorizadas en estudios posteriores. Los procesos de especiación se atribuyen al aislamiento genético entre las poblaciones de *Bothrocophias* del Chocó y de la Amazonía como resultado del levantamiento de los Andes y una segregación altitudinal (Vaca Guerrero, 2012).

En general, las especies del género se reportan en hábitats terrestres como bosques primarios, bosques secundarios maduros y frecuentemente en bosques de ribera, incluso en áreas cultivadas, en las tierras altas y bajas de la región Andina, Pacífica y Amazónica, donde son evidentes procesos de simpatría con *B. hyoprora* y *B. microphthalmus* (Cisneros-Heredia et al., 2006). Presentan hábitos nocturnos y crepusculares; su dieta se compone principalmente por roedores de los cuales se han descrito 14 géneros y 22 especies para el choco biogeográfico (Muñoz-Saba & Alberico, 2004), entre estos algunos didélfidos (marsupiales) como *Marmosops noctivagus* y en otros casos algunas especies de reptiles y anfibios (Campbell & Lamar, 2004; Cisneros-Heredia et al., 2006; Silva de Oliveira et al., 2018).

3.2.1 *Bothrocophias campbelli* [Freire Lascano, 1991]

Esta especie se originó por la separación de la especie *Bothrops pulcher* y debido a su evidente variación fue recategorizada por Freire-Lascano en 1991 como *Bothrocophias campbelli*. Inicialmente la especie comprendía una distribución extensa en Ecuador (Campbell & Lamar, 2004), pero a partir de su recategorización y con base en investigaciones posteriores, se ha ampliado su rango de distribución sobre los límites con Perú y Colombia (Castro et al., 2005; Vaca Guerrero, 2012). Cabe mencionar que esta es una especie

categorizada en peligro de extinción (por la lista roja de Carrillo y anteriormente incluida en lista roja de especies amenazadas de la UICN, debido a que cumple con más de uno de los criterios establecidos “reducción en el tamaño de la población”, “distribución geográfica de la población, extensión de la presencia, área de ocupación o ambas”, “tamaño de la población estimada”, “tamaño de la población restringida”, “análisis cuantitativo” (Carrillo et al., 2005; Rodríguez-Guerra, 2010a).

En cuanto a sus características morfológicas, son serpientes de tamaño relativamente mediano, con alrededor de 123 cm de longitud total. Dorsalmente tiene una coloración que varía de café oscuro a negro, con o sin huellas de bandas angostas y plateadas en patrones de “V” demarcadas por bandas más claras, ventralmente presenta áreas amarillas en cada borde externo posterior y en ocasiones las escamas ventrales tienen un área amarilla adicional en el centro, los pigmentos oscuros decrecen a pequeños puntos y flecos hacia la cola tendiendo a desaparecer, la región ventral de la cabeza es negra excepto por dos puntos amarillos, líneas en el centro o en la hilera de escamas anterior o posterior de las escamas infralabiales. Presenta una franja oscura detrás del ojo, rara vez presenta una mancha oscura entre las infralabiales 6-8, presenta una escama lacunolabial, tiene entre 152 y 177 escamas ventrales y 23 hileras de escamas dorsales (figura 5) (Campbell & Lamar, 2004; Rodríguez-Guerra, 2010a).



Figura 5. *Bothrocophias campbelli*, espécimen de la Reserva Natural Río Ñambí, (Fotografía: Mora-Obando, 2010).

De acuerdo con el modelo de nicho ecológico propuesto por Vaca Guerrero (2012), *Bothrocophias campbelli* se extiende en dos ecoregiones andinas importantes, la *Northwestern Andean Montane Forests* considerada como la región más diversa y con mayor registro de especies endémicas de flora y fauna y la *Eastern Cordillera Real Montane Forests* conocida como el más grande filtro geológico-topográfico que afecta la migración biótica y la especiación andina en los Andes Centrales (figura 6). Se distribuye altitudinalmente entre los 800 y 2200 msnm, existiendo registros entre los 1300 y 2000 msnm sobre las

estribaciones occidentales de los Andes de Ecuador (Campbell & Lamar, 2004; Cisneros-Heredia et al., 2006) y entre los 1000 y 1500 msnm en el área de la Reserva Natural Río Ñambí, Nariño, Colombia (Castro et al., 2005; Vaca Guerrero, 2012). Habita principalmente bosques montanos al igual que *B. microphthalmus* en el Ecuador, bosques húmedos montanos bajos y bosques de neblina de la cordillera occidental de los Andes del Ecuador y Colombia (Vaca Guerrero, 2012).

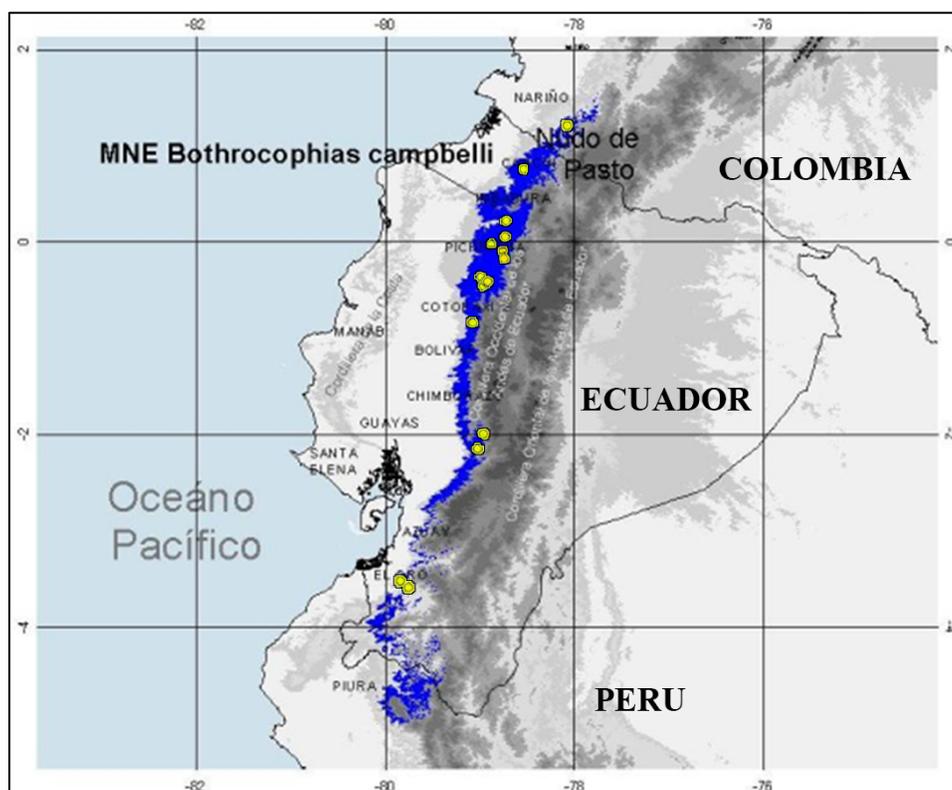


Figura 6. Distribución de *Bothrocophias campbelli* bajo modelamiento de nicho ecológico. Puntos amarillos: Datos de ocurrencia, Área de color azul: Distribución potencial (Modificado por: Sevilla – Sánchez, MJ., 2019 de: Vaca Guerrero, 2012).

3.2.1.1 Venómica y perfil toxinológico del veneno de *B. campbelli*

El veneno de esta especie presenta una composición simple en comparación con otras especies de la subfamilia Crotalinae. Contiene un elevado porcentaje (43.1%) de fosfolipasas, alrededor del 21.3% de serina proteasas posiblemente diferentes a las de tipo trombina, y baja abundancia (15.8%) de metaloproteinasas, esto se correlaciona con un elevado efecto miotóxico, un efecto coagulante moderado y un bajo efecto hemorrágico; la dosis mínima coagulante fue de 19.4 µg y la dosis mínima hemorrágica de 12 µg, dosis considerablemente menores a las reportadas para *Bothrops asper* (figura 7) (Salazar-Valenzuela et al., 2014).

Aunque la composición proteica de su veneno es similar a la de otras especies de la subfamilia Crotalinae, se observan variaciones tanto en la proporción del contenido de SVMP, principalmente con respecto a los géneros *Bothrops*, *Bothropoides*, *Cerrophidion*, *Porthidium* y *Atropoides*, así como en la potencia letal media, la cual se estima en 150 µg/ratón, indicando una potencia más débil que *Bothrops asper*. A nivel proteómico, la fosfolipasa más abundante fue la del tipo PLA₂ Lys⁴⁹, miotoxina que desempeña un rol trófico importante en la digestión de presas con gran cantidad de masa muscular (figura 7). Este análisis proteómico y funcional sugiere que el cuadro clínico durante un evento de envenenamiento ocasionado por *B. campbelli* se puede caracterizar por bajos efectos hemorrágicos, algunas alteraciones hemostáticas y elevados efectos miotóxicos en los pacientes (Salazar-Valenzuela et al., 2014).

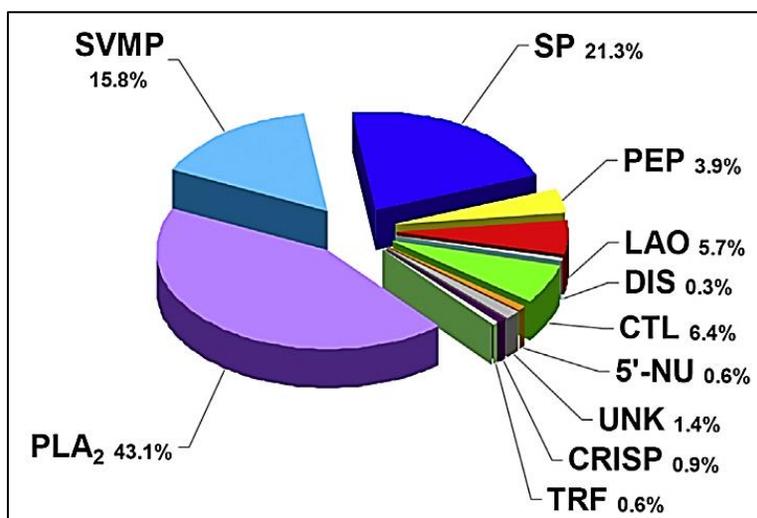


Figura 7. Proteoma del veneno de *Bothrocophias campbelli*. PLA₂: fosfolipasas A₂; SVMP: metaloproteinasas; SP: serina proteasas; PEP: péptidos de bajo peso molecular; LAO: L-aminoácido oxidasas; DIS: desintegrinas; CTL: proteínas tipo lectina / lectina tipo C; 5'-NU: 5'-nucleotidasas; UNK: desconocido / no identificado; CRISP: proteínas secretoras ricas en cisteína; TRF: transferrina. (Fuente: Salazar-Valenzuela, et al., 2014).

3.3 Perfil toxinológico

El perfil toxinológico está definido por actividades biológicas tanto locales como sistémicas que reflejan la acción de los componentes del veneno y permite comprender los efectos fisiopatológicos producidos durante un envenenamiento.

3.3.1 Dosis letal 50 (DL₅₀)

La Dosis letal 50 o actividad letal 50 es uno de los efectos toxicológicos más comunes al momento de estudiar un veneno producto de un organismo vivo; en los vipéridos esta actividad biológica depende de diversos componentes del veneno: metaloproteinasas, fosfolipasas A₂, serina proteasas, entre otros. Esta dosis es estimada por medio de un análisis de supervivencia, en el cual se registran las muertes y está definida como la mínima cantidad de veneno que es capaz de producir la muerte del 50% de la población del modelo biológico en un periodo de tiempo determinado (Gutiérrez et al., 2015).

3.3.2 Actividad coagulante

En los envenenamientos causados por serpientes, esta actividad sistémica es la más compleja en el momento de determinar un tratamiento adecuado, desencadena hipotensión o shock, hemorragia, cambios en las células sanguíneas, defibrinogénación e incluso efectos neurológicos, en los cuales el grado de severidad es variable (WHO, 1981). Está asociada esencialmente a la presencia de serina proteasas de tipo trombina y metaloproteasas que actúan sobre los factores de la cascada de coagulación. Se expresa como dosis coagulante mínima (DCM), definida como la cantidad o concentración mínima de veneno que induce la coagulación del plasma humano citratado (DCM-P) en 60 segundos, aunque es posible medirla también en una solución de fibrinógeno (DCM-F) (Theakston & Reid, 1983; Gené, et al., 1989).

3.3.3 Actividades edematizante, miotóxica y hemorrágica

De manera general los venenos de las serpientes generan efectos significativos locales, entre los que se destaca el edema, que puede ser local o masivo y se debe a la exudación capilar de plasma o sangre completa, presumiblemente a partir de una acción citotóxica sobre el endotelio vascular. Aunque existen envenenamientos que no generan edema prominente, los envenenamientos bothrópicos, en general, producen una actividad edematizante fuerte que puede dar lugar a mionecrosis, una de las manifestaciones locales más graves, causante de incapacidad prolongada y en ocasiones, permanente (WHO, 1981). La actividad edematizante se evidencia con el volumen líquido del espacio intersticial y se expresa como dosis edematizante mínima (DEM), definida como la cantidad de veneno que induce un edema del 30% respecto al control; se recomienda cuantificar una hora después de la inoculación del veneno, tiempo en el cual la actividad es más notable (Gutiérrez, et al., 1986).

La actividad miotóxica, asociada esencialmente a la acción de PLA₂ miotóxicas, es evaluada por cuantificación de la enzima creatina quinasa (CK), la cual es liberada al fluido extracelular y a la sangre cuando ocurre lesión muscular; debido a que la abundancia

predominante (95%) de CK es la que proviene de los miocitos (CK-MM) se convierte en un buen marcador para determinar la miotoxicidad (Nakada, et al.,1984). La actividad hemorrágica resulta de la acción de metaloproteinasas sobre la membrana basal de capilares y vénulas generando extravasación; esta actividad se expresa como dosis hemorrágica mínima (DHM), entendida como la cantidad de veneno que induce un área hemorrágica de 10 mm de diámetro, adicionalmente se puede determinar la intensidad de la extravasación con la extracción de la hemoglobina presente en el área hemorrágica y su respectiva cuantificación a 540 nm (Kondo, et al., 1960; Gutiérrez, et al., 2016).

3.4 Modelo biológico: *Mus musculus*

Los modelos biológicos se implementaron desde 1908, donde Ignatowskil aportó la primera evidencia al trabajar con conejos en sus experimentos (Santos-gallego, Badimon, & Ibáñez, 2013); desde ese momento hasta la actualidad se considera que trabajar con un modelo biológico mamífero, particularmente ratones (*Mus musculus*), tiene varias ventajas importantes debido a que gran parte de los procesos bioquímicos son similares al hombre, presentan un tiempo generacional más corto y se adaptan fácilmente a la vida en bioterios, esto permite controlar distintas variables ambientales y experimentales. Adicionalmente, es una de las especies de mamíferos mejor estudiadas desde el punto de vista genético, existe una gran cantidad de líneas genéticamente definidas, tanto consanguíneas y congénicas, como una cantidad considerable de mutaciones y rearrreglos cromosómicos disponibles, además de presentar sistemas eficientes de cultivo de células embrionarias pluripotenciales para generar quimeras, lo que permite la realización de mutaciones dirigidas o condicionales (Benavides & Guenet, 2001). Todo lo anterior convierte a este modelo en un modelo ideal para trabajar en diferentes investigaciones biológicas.

La cepa CFW de ratones es Carworth Farms White con ascendencia suiza (SW). Es una cepa, de color blanco (albino) y lleva un gen agouti negro detrás de su gen albino, es no consanguínea-exogámica lo que significa que son poblaciones mantenidas por selección sexual mediante cruzamientos al azar, característica que hace que estas poblaciones sean más resistentes y fáciles de criar, sufrió un cuello de botella poblacional por lo que se redujo a un solo par y la progenie se superpuso a partir de ese punto y probablemente de la deriva genética de la colonia suiza original (Chia et al., 2005; River, 2008). Es utilizada como modelo multipropósito general, para pruebas de seguridad y eficacia donde se requieren animales vigorosos y las consideraciones de genotipo específico son de menor importancia (Porcelli & Modlin, 1999). Los individuos son morfológicamente similares pero genéticamente distintos, esto genera semejanza a cualquier población humana o animal tomada al azar, por lo que es una cepa ideal para estudios toxicológicos, además la variabilidad favorece en gran medida la manifestación de los efectos secundarios (Miján de la Torre et al., 2002).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de estudio

La reserva Natural Río Ñambí, constituida por la fundación Ecológica los colibríes de Altaquer, tiene un área aproximada de 1500 ha de bosque pluvial premontano. Se ubica en la vereda El Barro, corregimiento de Altaquer, municipio de Barbacoas, departamento de Nariño, al sur-occidente de Colombia (figura 8). Esta reserva se sitúa en el Nudo de los Pastos de la cordillera de los Andes, entre los 1100 y los 1900 msnm sobre la vertiente pacífica en la ecorregión del Chocó Biogeográfico, convirtiéndose en un ecotono entre bosque húmedo tropical el cual está por debajo de 1000 m y bosque montano el cual se encuentra por encima de 1800 m (figura 9) (Gutiérrez Zamora et al., 2004; Gutiérrez & Bacca, 2013).

Presenta una alta precipitación durante todo el año superando los 7160 mm anuales, los picos de lluvias se presentan en los meses de mayo (951 mm) y octubre (721 mm) y hacia los meses de febrero, julio, agosto y septiembre existe una disminución en la precipitación por debajo del promedio mensual (Salaman, 2001). Su temperatura promedio anual es de 19°C, con una mínima de 17.1°C en noviembre y una máxima de 19.7°C en septiembre (Gutiérrez Zamora et al., 2004).

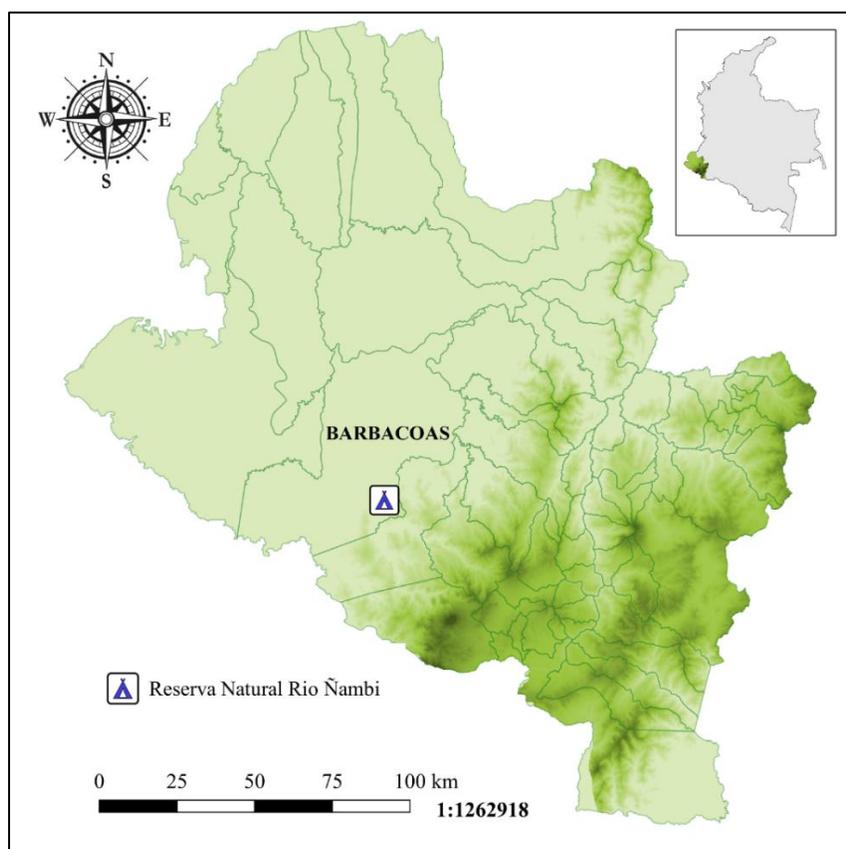


Figura 8. Ubicación geográfica Reserva Natural Río Ñambí, vereda El Barro, municipio de Barbacoas, Departamento de Nariño. (Elaborado por: Sevilla - Sánchez, MJ.,2019).

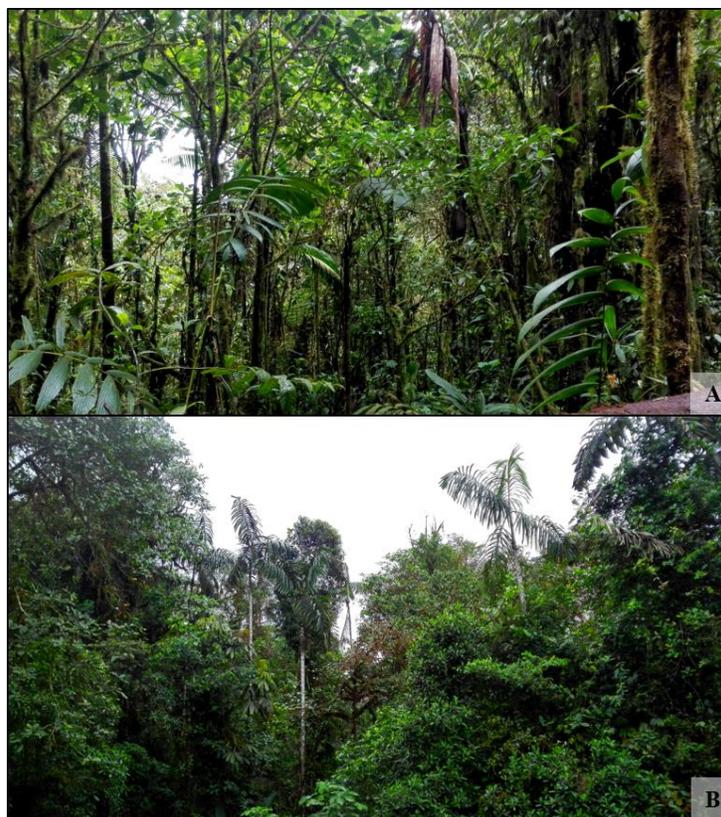


Figura 9. Reserva Natural Río Ñambí. **A.** Interior de Bosque, **B.** Borde de Bosque. (Fotografías: Sevilla - Sánchez, MJ., 2018).

4.2 Trabajo de Campo

Se realizó una salida de campo exploratoria a la Reserva Natural Río Ñambí. Durante 8 días, se buscaron individuos de *Bothrocophias campbelli* con un intenso muestreo crepuscular y matinal (20:00 h – 3:00h), empleando rastrillos, ganchos herpetológicos y bolsas de tela (Scrocchi & Kretzschmar, 1996). La especie sería corroborada en campo, con base en la lepidosis descrita por Castro y colaboradores (2005) y las observaciones morfológicas de Rodríguez-Guerra (2010a).

4.3 Trabajo de Laboratorio

4.3.1 Veneno

Se utilizó el veneno de un ejemplar (hembra adulta) de *Bothrocophias campbelli* de la Reserva Natural Río Ñambí, el cual fue extraído en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC) el 19 de abril de 2010 y se conservó liofilizado a -

20°C desde la fecha. La extracción se realizó bajo condiciones asépticas inmovilizando la serpiente con la ayuda de ganchos (sencillos o de presión); se hizo morder a la serpiente en una membrana (Parafilm) dispuesta sobre un embudo de vidrio unido a su vez a un tubo Eppendorf, una vez la serpiente mordió la membrana se masajeó la región de las glándulas del veneno para estimular su producción (Mora-Obando, 2010).

4.3.2 Animales de experimentación

Las actividades biológicas se realizaron con ratones blancos (*Mus musculus*) cepa Swiss Webster (CFW), sin distinción de sexo. Se pesaron y distribuyeron en jaulas en grupos de 4 animales. Se mantuvieron en condiciones ambientales apropiadas (temperatura entre 18-22 °C y porcentaje de humedad relativa entre 70-80%), con disponibilidad de alimento autoclavable LabDiet 5010 y agua (*ad libitum*) constante, durante todo el experimento, lo que garantiza la validez de las pruebas (Monje Belmonte, 2007; Mora-Obando, 2014). Las cepas procedieron del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC) y del laboratorio LABBIO de la Universidad del Valle – Sede San Fernando.

4.3.3 Consideraciones éticas

La investigación se realizó bajo las consideraciones del reglamento del comité de ética en investigaciones con animales de experimentación de la universidad de Nariño, constituido bajo el acuerdo No. 1 de 2011, y se rigió por los artículos 23,24 y 25 de La ley 84 de 1989 y la Ley 1774 de 2016, así como también se garantizó las medidas de seguridad establecidas en el artículo 93 de la resolución 8430 de 1993 considerando el decreto 1608 de 1978, según lo pertinente. El veneno fue empleado estrictamente para los objetivos planteados en esta propuesta, la cual pretende ser un estudio de impacto positivo que aborda una problemática de salud pública sin fines comerciales, amparada bajo el Decreto 1376 de 2013 por el cual se reglamenta el permiso de recolección de especímenes silvestres de la diversidad biológica y sus derivados con fines de investigación científica no comercial y la resolución número 0068 de enero de 2002 en la cual se define el permiso de estudio con fines de investigación científica.

4.3.4 Actividades biológicas

El diseño experimental de las actividades biológicas se elaboró a partir de las dosis mínimas reportadas para la especie o especies cercanas filogenéticamente (tabla 1) (*B. asper*) (Mora-Obando, 2014; Salazar-Valenzuela et al., 2014; Renjifo-Rios, 2017). La tabla 2 muestra el diseño de los niveles que se probaron en cada uno de los ensayos biológicos.

Tabla 1. Dosis teóricas tomadas como referencia para determinar los niveles a probar en las actividades biológicas locales y sistémicas.

Especie	DL ₅₀ (µg/ratón)	DCM (µg)	DEM (µg)	DMM (µg)	DHM (µg)
<i>B. campbelli</i> (Ecuador)	150 ⁽¹⁾	19.4 ⁽¹⁾	-	5 ⁽¹⁾	12 ⁽¹⁾
<i>B. asper</i> (Cauca)	100.9 ⁽²⁾	0.37 ⁽²⁾	-	-	1.44 ⁽²⁾

DL₅₀: Dosis letal cincuenta, DCM: Dosis mínima coagulante, DEM: Dosis mínima edemática, DMM: Dosis mínima mitotóxica, DHM: Dosis hemorrágica (local) mínima. ⁽¹⁾ Salazar-Valenzuela et al., 2014, ⁽²⁾ Mora-Obando, 2014.

Tabla 2. Diseño experimental. Niveles probados para la determinación de las actividades biológicas del veneno de *B. campbelli* del departamento de Nariño.

Niveles	DL ₅₀ (µg/ratón)	DCM (µg)	DEM (µg)	DMM (µg)	DHM (µg)
1	234.375	160	5	20	96
2	187.5	80	2.5	10	48
3	150	40	1.25	5	24
4	120	20	0.625	2,5	12
5	96	10		1,25	6
6		5			3
7		2.5			
8		1.25			
Total µg	787.875	319.375	9.375	38.75	189

DL₅₀: Dosis letal cincuenta, DCM: Dosis mínima coagulante, DEM: Dosis mínima edematizante, DMM: Dosis mínima mitotóxica, DHM: Dosis hemorrágica (local) mínima. Las celdas grises corresponden a las dosis teóricas aproximadas de la tabla 1. Los niveles se construyeron multiplicando o dividiendo por un factor que osciló entre 1.25 y 2 (Monje, 2007). Para calcular el total de microgramos usados en cada nivel se multiplicó por el número de réplicas (3 o 5) en cada ensayo de acuerdo con la descripción metodológica de la actividad. Para cada ensayo se realizaron controles en paralelo.

4.3.5 Determinación de la dosis letal cincuenta (DL₅₀)

La DL₅₀ se determinó mediante un análisis de supervivencia Probit aplicando el método paramétrico propuesto por Finney, método aceptado por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2017). Para ello, grupos de 4 ratones entre 16 y 18 gr de peso corporal se inyectaron vía intraperitoneal (I.P), la cual es una vía de inoculación de rápida absorción, alta susceptibilidad y permite realizar comparaciones con otras investigaciones debido a su uso frecuente (Mora-Obando, 2010).

Teniendo en cuenta la dosis letal 50 reportada para *B. campbelli* del Ecuador (150 µg/ratón), se prepararon varias dosis de veneno entre 90 y 250 µg (tablas 1 y 2) en un volumen final de

0.5 ml de buffer fosfato salino (PBS) preparado en las siguientes condiciones: Na_2HPO_4 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, NaCl 0.1 N y pH 7.2 (NaOH / HCl). Posteriormente se registró el número de ratones muertos en cada dosis de veneno durante 48 horas (Mora-Obando, 2010; Salazar-Valenzuela et al., 2014). Los animales sobrevivientes se sacrificaron por sobredosis ketamina-xilacina (Centro de Investigación. Hospital General Universitario de Valencia, 1990; Schoell et al., 2009).

4.3.6 Determinación de la actividad coagulante

Esta actividad se determinó en plasma humano a partir de la sangre de un voluntario bajo consentimiento informado (Anexo A), a quien se le extrajeron 18 ml de sangre en 4 tubos con sistema de vacío BD Vacutainer de 4.5 ml los cuales contenían 3.5 % de citrato de sodio. Las muestras se centrifugaron a 4500 rpm por 10 min, se colectó el plasma y se descartó el pellet. 200 μl de plasma citratado en tubos de vidrio se incubaron a 37°C entre 3 y 5 min a baño María (Gutiérrez et al., 2015). Post incubación se adicionó 0.1 ml de varias dosis de veneno entre 1.25 y 160 μg (tablas 1 y 2) disueltas en buffer fosfato salino (PBS) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, NaOH 0.02 N y pH 7.2 (Salazar-Valenzuela et al., 2014). Cada dosis de veneno se trabajó por quintuplicado y en paralelo se realizó un control negativo con 0.1 ml de PBS. Los tiempos de formación del coágulo se midieron con un cronómetro y la actividad coagulante se expresó como dosis coagulante mínima en plasma (DCM-P), la cual se define como la menor cantidad de veneno que induce coagulación del plasma en 60 segundos (Theakston & Reid, 1983).

4.3.7 Determinación de la actividad edematizante

Grupos de 4 ratones con pesos entre 18 y 20 gr, se inyectaron en la almohadilla plantar posterior derecha con dosis entre 0.6 y 10 μg (tablas 1 y 2) en un volumen final de 50 μL de buffer fosfato salino (PBS) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, NaOH 0.02 N y pH 7.2 (NaOH / HCl). Como control negativo se inyectaron 50 μL de PBS en la almohadilla plantar contra lateral izquierda en idénticas condiciones (Gutiérrez, et al. 1986; Instituto Clodomiro Picado, 2007).

El grosor de la almohadilla plantar de ambas extremidades se midió antes y después de la inyección con un caliper digital (Fisher Scientific, Traceable ISO 12025). La evolución del edema fue monitoreada a las 0.5, 1, 6, 9, 12 y 24 horas garantizando que la medición se realizara en el mismo sitio anatómico de la almohadilla plantar. A partir del grosor se estimó la magnitud del edema en porcentaje y se determinó la dosis edematizante mínima, que corresponde a la mínima cantidad de veneno capaz de incrementar el grosor (mm) en un 30% con respecto al grosor inicial (Gutiérrez, et al., 1986; Lomonte et al., 1993; Gutiérrez et al., 2015). Los animales sobrevivientes se sacrificaron por sobredosis de una mezcla de

ketamina–xilacina (Centro de Investigación. Hospital General Universitario de Valencia, 1990; Schoell et al., 2009).

4.3.8 Determinación de la actividad miotóxica

Se inyectaron dosis entre 0.6 y 10 μg de veneno disuelto en 50 μL de buffer fosfato salino (PBS) Na_2HPO_4 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, NaOH 0.1 N y pH 7.2, vía intramuscular (I.M) a grupos de 4 ratones, con pesos entre 18 y 20 gr en el gastrocnemio derecho. Como control negativo se inyectó un grupo con el mismo volumen de PBS. Tres horas después, los ratones fueron anestesiados vía intraperitoneal con solución de xilacina/ketamina (0.1 ml/20 g) y se procedió a extraer muestras de sangre por punción cardiaca (0.5 mL). Cada muestra se depositó en un tubo microtainer con activador Clot en gel, se centrifugó a 4000 rpm a 4°C por 10 min, el suero fue separado en tubos Eppendorf y se congeló a -20°C. La cuantificación de la actividad enzima CK fue realizada por un laboratorio clínico por medio de pruebas cinéticas usando el método de espectrofotometría. La actividad se expresó en unidades internacionales por litro (U/L) y la actividad miotóxica mínima correspondió a la menor dosis de veneno capaz de incrementar 4 veces la actividad CK del plasma de los ratones del grupo control.

Los animales posteriormente se sacrificaron por sobredosis ketamina–xilacina (Centro de Investigación. Hospital General Universitario de Valencia, 1990; Schoell et al., 2009). Posteriormente, se obtuvieron muestras del tejido muscular inyectado, se fijaron en formalina buferada al 10%, y se llevaron a deshidratación por 4.25 horas, aclaramiento por 1 hora e infiltración con parafina sintética semidura (Thermo scientific - Histoplast PE) por 1 hora en un procesador de tejidos marca Leica TP1020, subsiguiente a esto se realizó la formación del bloque de parafina empleando moldes de acero inoxidable en una central de inclusión (Thermo Electron Corporation Shandon Histocentre 3).

Cada bloque se colocó en un Microtomo (Protec Leica RM 2135) en el cual se procedieron hacer cortes de 4 μm , los cuales fueron sometidos a baño de flotación (45 °C) enriquecido con un 1 gr de gelatina mycosystems Nussloch GmbH por 1 minuto. Los cortes se montaron en un portaobjetos y se dejaron secar por 12 horas a temperatura ambiente y 4 en horno a 40 °C antes de hacer la tinción hematoxilina – eosina, la cual se realizó en un vaso coplin donde las muestras pasaron por Xilol (2 veces), Alcohol 100% y 95% (2 veces cada una), alcohol al 70%, lavados de agua, tinción con hematoxilina, alcohol acidificado con ácido sulfúrico, neutralizado con carbonato de litio, tinción con eosina y realizando el proceso nuevamente a la inversa para volver a diafanizar, donde finalmente se dejaron secar 24 horas antes de la observación a microscopio.

Con el fin de observar el aspecto de las fibras musculares, se tomaron fotografías a los cortes histológicos de músculo gastrocnemio en un microscopio marca Leica DM750 y una cámara incorporada Leica DFC295, las fotos tomadas en 100x se realizaron bajo una exposición de 2.91ms, ganancia de 2.1x, saturación de 0.80 y gamma de 0.77, y las de 400x se capturaron bajo una exposición de 4.09 ms, ganancia de 2.6x, saturación de 0.85 y gamma de 0.69 (Salazar-Valenzuela et al., 2014).

4.3.9 Determinación de la actividad hemorrágica local

Se prepararon dosis de veneno entre 3 y 96 μg (tablas 1 y 2) disueltas en 100 μL de buffer fosfato salino (PBS) Na_2HPO_4 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, NaCl 0.1 N y pH 7.2 (NaOH/HCl) (Salazar-Valenzuela et al., 2014). Posteriormente, se inyectó un volumen de 0.1 ml de las diferentes dosis a grupos de 4 ratones de cepa CFW sin distinción de sexo con pesos entre 18 y 20 gr por vía intradérmica (I.D.) en la región abdominal, como control negativo se inyectó un grupo de 4 ratones con 0.1 ml de PBS sin veneno. Dos horas después, los ratones fueron sacrificados por sobredosis ketamina-xilacina (Centro de Investigación. Hospital General Universitario de Valencia, 1990; Schoell et al., 2009).

Después de la eutanasia, se midió el área y la intensidad de la hemorragia por medio de herramientas computacionales con el método propuesto por Jenkins y colaboradores (2017). Se removió la piel y se realizó un registro fotográfico (RF) de cada grupo de ratones por nivel en una caja de luz, con el fin de minimizar los errores generados por los reflejos superficiales o iluminación de las muestras. La caja está recubierta tela de color blanco; en la parte interior se coloca el grupo de ratones, una escala métrica (regla) y un Pantone RGB con los colores 1895 C, 1905 C, 1915 C, 1925 C y 1935 C (figura 10) (Salazar-Valenzuela et al., 2014; Duque-Zerpa & Vargas, 2015; Jenkins et al., 2017).

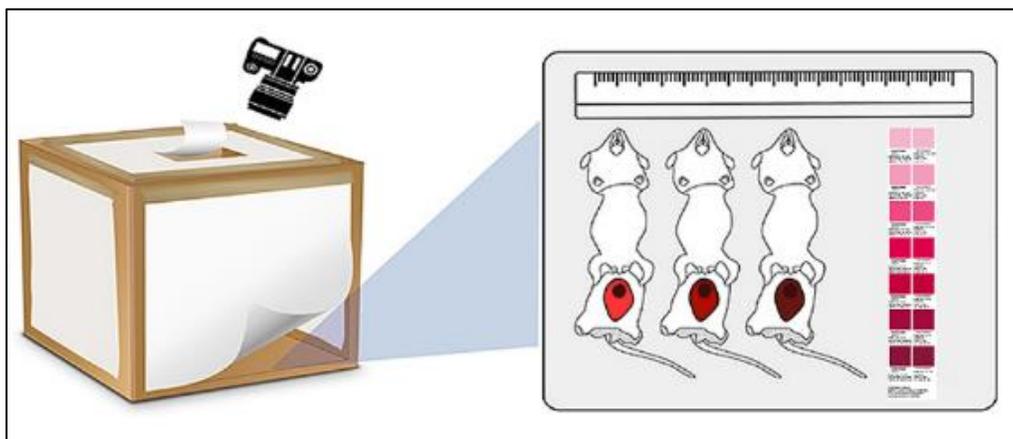


Figura 10. Caja de luz para el registro fotográfico de la hemorragia producida por cada dosis del veneno de *Bothrocophias campbelli*. (Modificado por: Sevilla – Sánchez, MJ., 2019 de: Escalante et al., 2011).

Cada RF se convirtió a PDF, formato de lectura del software libre Inkscape 0.91 y se procedió a dibujar el área hemorrágica de las réplicas por nivel. En paralelo, se extrajeron los valores RGB del Pantone y con la regla se fijó una escala equivalente a 10 mm. El contraste entre los valores RGB de la hemorragia y el Pantone permite determinar la intensidad y la escala milimétrica es útil para definir el área. La dosis hemorrágica mínima corresponde a la mínima cantidad de veneno capaz de producir un área de 10 mm o 50 unidades hemorrágicas, donde una unidad hemorrágica corresponde al área real de la hemorragia entre la luminancia verdadera (intensidad). En el caso del grupo control negativo se extrajeron los valores RGB a partir del área sin lesión hemorrágica.

4.4 Análisis estadístico

Los resultados de cada ensayo fueron representados en gráficas dosis-respuesta. A las curvas de DCM, DEM, DMM, DHM se les aplicó un análisis de regresión con el fin de obtener las ecuaciones y calcular las dosis mínimas reportadas con su desviación estándar. Para determinar la DL₅₀ se empleó un análisis de supervivencia y el resultado fue expresado con límites de confianza. Para realizar comparaciones con datos previos se aplicaron pruebas de U-Mann-Whitney. Los análisis estadísticos y figuras se realizaron en los programas Excel v. 2016, BioStat v. 5.9.8.5 2015 y Past v. 3.23 2019, partiendo de un nivel de confianza de 95% para cada una de las pruebas. A continuación, se describen con detalle los análisis realizados para cada ensayo.

4.4.1 Dosis letal cincuenta (DL₅₀)

La DL₅₀ se calculó utilizando el análisis Probit en el programa BioStat v.5.9.8.5 2015 (AnalySoft) (Finney, 1952). Este es un método para analizar la relación entre el estímulo (dosis) y la respuesta todo o nada, en este caso la supervivencia. El ensayo tiene en cuenta la probabilidad:

$$P = \frac{\text{Positivos}}{\text{Inoculados}}$$

El modelo bajo el método propuesto por Finney asume que el porcentaje de las muertes está relacionado con el logaritmo de la dosis en una distribución normal acumulativa. A partir de la ecuación se obtiene la dosis letal 50, que corresponde a los µg de veneno con los cuales muere el 50% de la población, así como los respectivos límites de confianza (Finney, 1952; Derenzo, 1977; Rodríguez Aguayo, 2010).

4.4.2 Actividad coagulante

Se construyeron curvas dosis-respuesta teniendo en cuenta las réplicas de cada nivel. En el eje de las abscisas se dispusieron los µg de veneno y en el eje de las ordenadas el tiempo de coagulación. Posteriormente se aplicó una regresión potencial a cada curva, se obtuvieron las respectivas ecuaciones y la dosis mínima coagulante en plasma (DCM-P) en 60 segundos se determinó como el promedio de las dosis calculadas con cada curva \pm la desviación estándar (Gutiérrez et al., 2015).

Con el fin de comparar los resultados obtenidos entre *B. campbelli* del departamento de Nariño, Colombia y los reportados para la especie en Ecuador por Salazar-Valenzuela y colaboradores (2014), se realizó una prueba U-Mann-Whitney en el programa Past v 3.23 (marzo 2019), α de 0.05.

4.4.3 Actividad edematizante

La magnitud del edema se expresó como porcentaje de aumento respecto a los miembros contra laterales, empleando la siguiente ecuación:

$$\left[\left(\frac{\text{Grosor de la pata derecha}}{\text{Grosor de la para izquierda}} \right) * 100 \right] - 100$$

Con base en el porcentaje de edema, 1 hora después de la inyección, se construyeron 4 curvas dosis-respuesta: μg de veneno en el eje de las abscisas y % de edema en el eje de las ordenadas empleando una escala logarítmica para la dosis de veneno y una escala milimétrica para el edema. Para cada curva se obtuvo la ecuación a partir de una regresión logarítmica y la dosis edematizante mínima (DEM) se calculó como el promedio de las dosis obtenidas con cada curva \pm la desviación estándar (Gutiérrez et al., 2015). Adicionalmente se construyeron curvas de evolución del edema con las mediciones realizadas entre las 0.5 y las 24 horas.

4.4.4 Actividad miotóxica

Se construyó una curva que representa los niveles de actividad de CK en los modelos biológicos por dosis. El eje de las abscisas presenta los μg de veneno inyectados, empleando una escala logarítmica, y el eje de las ordenadas la actividad de CK en plasma (U/L) en escala milimétrica. A partir de la regresión logarítmica respectiva se obtuvo la dosis miotóxica mínima que corresponde a la dosis de veneno que produce el aumento en 4 veces de los valores de actividad CK del grupo control (Gutiérrez et al., 2015).

4.4.5 Actividad hemorrágica local

Los datos extraídos de cada RF fueron registrados en el archivo Excel suministrado como complemento S3 (<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.005>) por Jenkins y colaboradores (2017). Se construyeron cuatro curvas dosis-respuesta teniendo en cuenta las réplicas de cada nivel: μg de veneno en el eje X y las unidades hemorrágicas en el eje Y. Las ecuaciones se obtuvieron aplicando una regresión lineal a cada curva y la dosis hemorrágica mínima (DHM) fue calculada como el promedio de las dosis obtenidas con cada curva \pm la desviación estándar.

Con el fin de comparar los resultados obtenidos entre *B. campbelli* del departamento de Nariño, Colombia y los reportados para la especie en Ecuador por Salazar-Valenzuela y colaboradores (2014), se realizó una prueba U-Mann-Whitney en el programa Past v 3.23 (marzo 2019), α de 0.05.

5. RESULTADOS

Durante la salida de campo a la Reserva Natural de Río Ñambí se realizó un esfuerzo de muestreo con un mínimo de 3 horas hombre y un máximo de 28 horas hombre por día (Scrocchi & Kretzschmar, 1996). Sin embargo, pese a la búsqueda no se encontraron ejemplares de esta especie.

Entre los hábitats y microhábitats revisados en la reserva se resaltan: cuevas formadas por vegetación leñosa (figura 10 A y B), troncos (figura 10 C), hojarasca (figura 10 D), bordes de bosque (figura 10 E), interior de bosque (figura 10 F), bordes de ríos y quebradas (figura 10 G).



Figura 11. Hábitats y microhábitats donde se efectuaron búsquedas de individuos de *Bothrocophias campbelli* en la Reserva Natural Río Ñambí. **A, B.** Cuevas formadas por vegetación leñosa, **C.** Troncos, **D.** Hojarasca, **E.** Borde de bosque y senderos, **F.** Interior de bosque, **G.** Ríos y vegetación ribereña (Fotografías: Sevilla - Sánchez, MJ., 2018).

5.1 Dosis letal cincuenta (DL₅₀)

La dosis letal 50 para *Bothrocophias campbelli* de Nariño, Colombia fue de 142.68 µg/ratón (111.42 – 179.77 µg/ratón). El anexo E muestra los cálculos (distribución log normal, percentiles y estadísticos de la regresión) realizados por el programa para determinar la DL₅₀ usando el Método de Finney. La figura 12 representa el análisis Probit, donde la dosis letal se interpreta como la cantidad de veneno que ocasiona la muerte del 50% de la población de ratones.

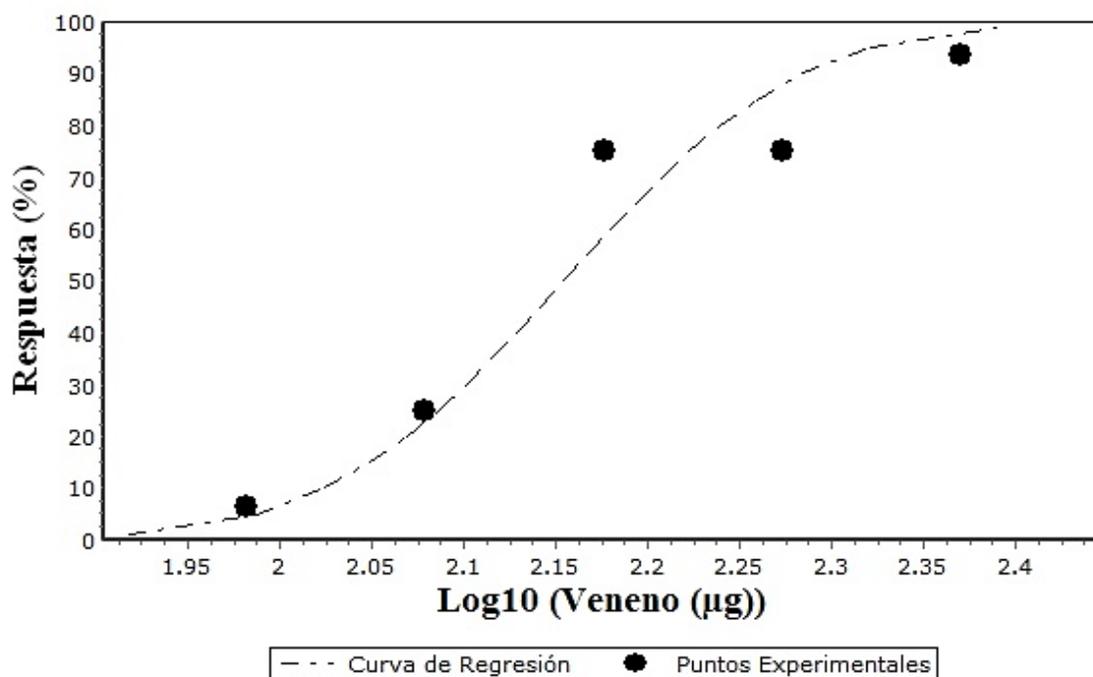


Figura 12. Representación gráfica de la Dosis Letal 50 producida por el veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, Colombia. La línea punteada representa la curva de regresión logarítmica para calcular la DL₅₀. En el eje de las abscisas el Log₁₀ de la concentración del veneno y en el eje de las ordenadas la respuesta (%) (n=4). (Fuente: Esta investigación)

Adicionalmente, durante el ensayo de la actividad letal se registraron signos de toxicidad como: contractura en extremidades anteriores, parálisis flácida de las extremidades posteriores, convulsiones clónicas, piloerección, aislamiento, incontinencia intestinal, secreción ocular, ataxia, rotación intermitente sobre el eje del cuerpo, opistótonos, taquipnea, hipoactividad y postración; los 3 últimos signos se presentaron en el 100% de los casos (figura 13).



Figura 13. Signos de toxicidad registrados durante el ensayo de letalidad del veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, Colombia. **A.** Aislamiento y postración, **B.** Opistótonos, **C.** Incontinencia intestinal, **D.** Parálisis flácida de las extremidades posteriores, **E.** Piloerección y **F.** Secreción ocular. (Fotografías: Sevilla-Sánchez, MJ., 2019)

5.2 Actividad coagulante

La dosis coagulante mínima en plasma citratado (DCM-P) para *Bothrocophias campbelli* de Nariño, Colombia fue de $12.3 \pm 0.5 \mu\text{g}$ de veneno. La curva dosis-respuesta se aproxima a una línea de tendencia potencial, representada en un coeficiente de determinación altamente significativo 0.957 (figura 14). El anexo F presenta las curvas a partir de las cuales se obtuvo la curva promedio y los cálculos respectivos.

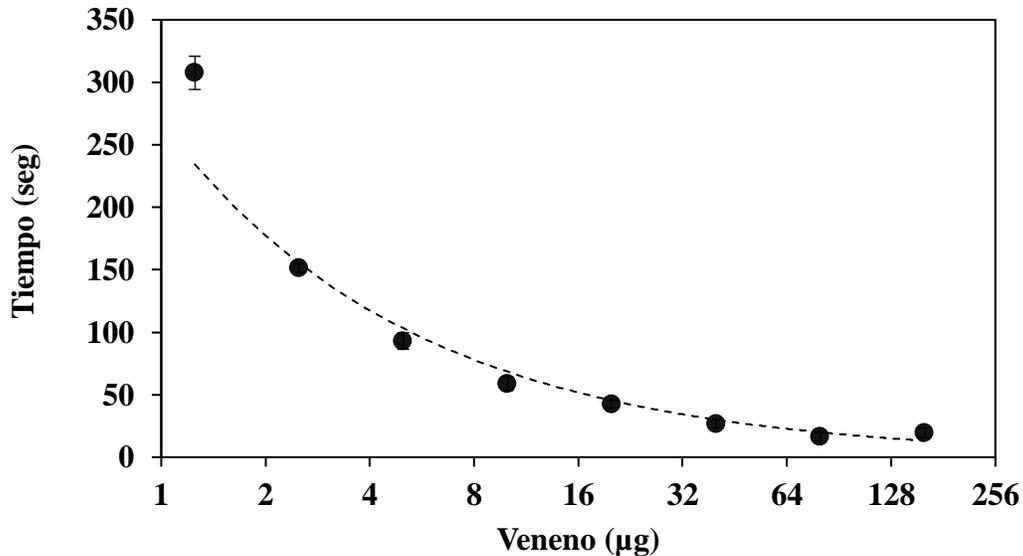


Figura 14. Actividad coagulante producida por diferentes dosis del veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, Colombia. La línea punteada representa la curva de regresión potencial obtenida para calcular la DCM ($R^2 = 0,957$). En el eje de las abscisas la concentración del veneno y en el eje de las ordenadas se muestra el tiempo en segundos \pm desviación estándar ($n=5$) (Fuente: Esta investigación).

La dosis coagulante mínima de *B. campbelli* del departamento de Nariño fue menor que la reportada para *B. campbelli* de Ecuador, lo cual significa que presentó una actividad coagulante más alta en plasma humano citratado a un tiempo de 60 segundos (figura 15) (Salazar-Valenzuela, et al., 2014). Se observan diferencias estadísticamente significativas entre las dosis coagulantes mínimas ($p = 0.037$, 95% de confianza).

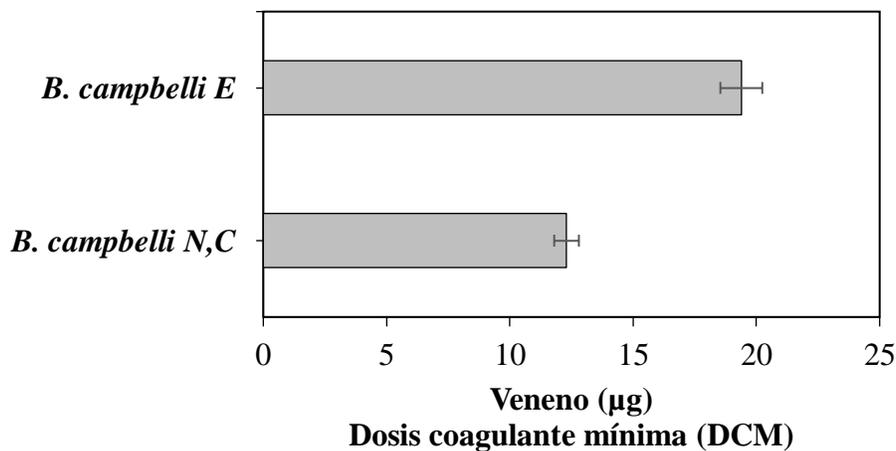


Figura 15. Comparación de la dosis coagulante mínima (DCM) de *B. campbelli* del Ecuador (E) respecto a *B. campbelli* de Nariño, Colombia (N, C) (Fuente: Esta investigación).

5.3 Actividad edematizante

La dosis edematizante mínima (DEM) para *Bothrocophias campbelli* de Nariño (Colombia) fue de $1.0 \pm 0.3 \mu\text{g}$ de veneno. La curva dosis-respuesta se aproxima a una línea de tendencia logarítmica, representada en un coeficiente de determinación significativo 0.837 (figura 16). El anexo G presenta las curvas a partir de las cuales se obtuvo la curva promedio y los cálculos respectivos.

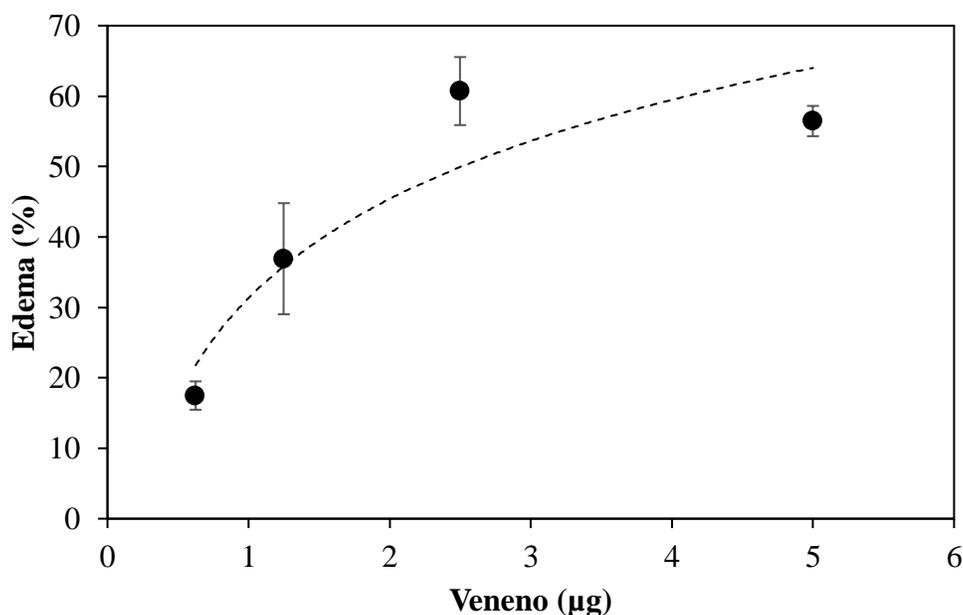


Figura 16. Actividad edematizante a un tiempo de 60 minutos producida por diferentes dosis del veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, Colombia. La línea punteada representa la curva de regresión logarítmica obtenida para calcular la DEM ($R^2 = 0,837$). En el eje de las abscisas la concentración del veneno y en el eje de las ordenadas se muestra el porcentaje de edema \pm desviación estándar ($n=4$) (Fuente: Esta investigación).

El porcentaje máximo de edema se registró entre las 0.5 a 3 horas después de la inyección, siendo el pico máximo a los 30 minutos de suministrar cada dosis. Entre las 24 y 48 horas post-inyección, el grosor de la almohadilla fue similar al de los controles negativos (almohadilla inyectada con PBS) (figura 17). La figura 18 muestra el edema en la almohadilla plantar del modelo biológico en cada una de las dosis probadas. Con una dosis de $5 \mu\text{g}$ se observó formación de ampollas en la almohadilla plantar inyectada (figura 18 E.) y a una dosis de $20 \mu\text{g}$ de veneno se observó necrosis (figura 18 B); esta última dosis no se incluyó en la curva de actividad edematizante ya que la necrosis podría generar un efecto aditivo en la formación del edema.

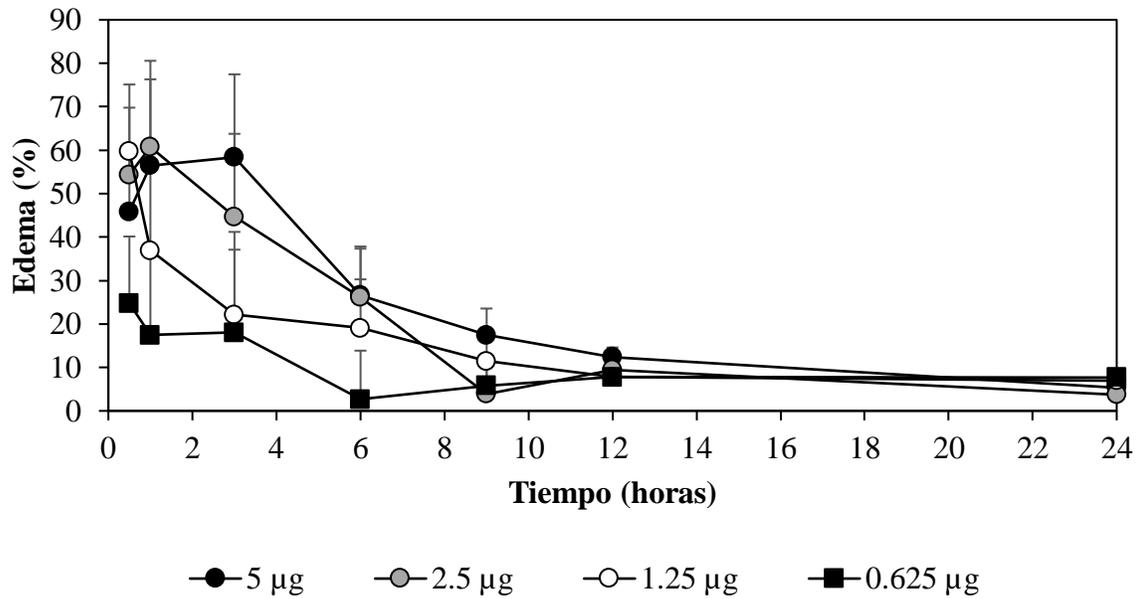


Figura 17. Actividad edematizante producida por diferentes dosis del veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, Colombia. Cada línea representa las réplicas realizadas. En el eje de las abscisas el tiempo en horas y en el eje de las ordenadas se muestra el porcentaje de edema \pm desviación estándar (n=4) (Fuente: Esta investigación).

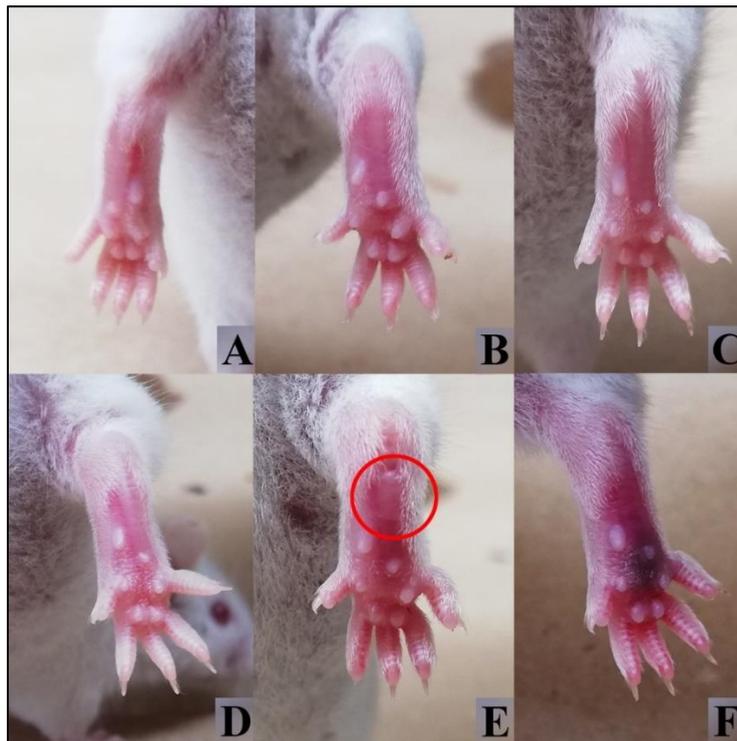


Figura 18. Edema en almohadilla plantar producido por diferentes dosis del veneno de *Bothrocophias campbelli* en modelos murinos. **A.** Control negativo (PBS), **B.** 0.625 µg/ratón **C.** 1.25 µg/ratón **D.** 2.5 µg/ratón **E.** 5 µg/ratón (círculo rojo mostrando formación de ampolla), y **F.** 10 µg/ratón (mionecrosis) (Fotografías: Sevilla – Sánchez, MJ., 2019).

5.4 Actividad miotóxica

La dosis miotóxica mínima (DMM) para *Bothrocophias campbelli* de Nariño, Colombia fue de 3.9 ± 2.5 μg de veneno. La curva dosis-respuesta se aproxima a una línea de tendencia logarítmica, representada en un coeficiente de determinación significativo 0.786 (figura 19).

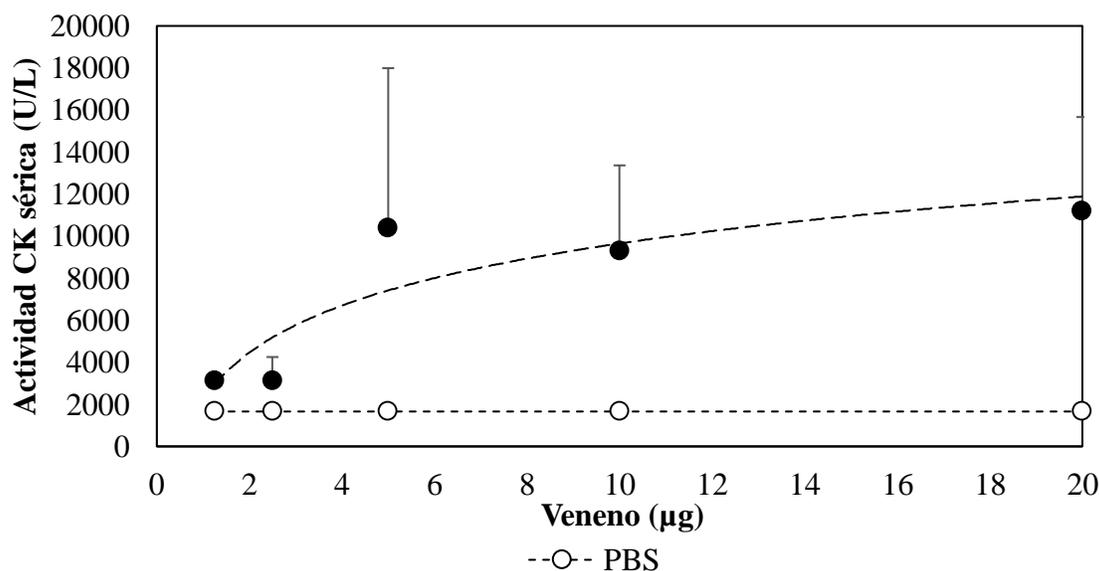


Figura 19. Actividad miotóxica producida por diferentes dosis del veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, Colombia. La línea punteada representa la curva de regresión logarítmica obtenida para calcular la DMM ($R^2 = 0,786$). En el eje de las abscisas la concentración del veneno y en el eje de las ordenadas se muestra la enzima Creatina quinasa en suero \pm desviación estándar ($n=4$). **PBS:** control negativo (Fuente: Esta investigación).

El análisis histológico confirmó la acción miotóxica del veneno. Se observaron alteraciones y daño en las fibras musculares, en comparación con el control negativo (PBS), la severidad y distribución del daño en el músculo fue directamente proporcional a la dosis de veneno suministrada (tabla 3; figuras 20 y 21).

Tabla 3. Análisis comparativo estructural de músculo (gastrocnemio) sometido a diferentes dosis de veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, Colombia.

Dosis ($\mu\text{g}/\text{ratón}$)	V.S /Arteriolas		Cambios circulatorios		Hemorragia		Infiltrado inflamatorio		Necrosis	
	Con	Dis	Sev	Dis	Sev	Dis	Sev	Dis	Sev	Dis
PBS	1	2	2	2	-	-	2	2	-	-
1.25	2	2	2	2	2	2	3	2	1	1
2.5	2	2	2	2	1	2	3	2	3	1
5	2	2	3	2	2	2	3	4	3	3
10	3	2	3	2	3	2	3	4	4	3
20	3	2	3	2	3	2	3	4	4	3

V.S: Vaso sanguíneo, **Con:** Congestión, **Sev:** Severidad de la afección en el campo visual. **1:** Muy leve, **2:** Leve, **3:** Moderado y **4:** Agudo, **Dis:** Distribución de la afección en el campo visual. **1:** Focal, **2:** Multifocal, **3:** Foco extenso y **4:** Difuso. - Sin cambios.

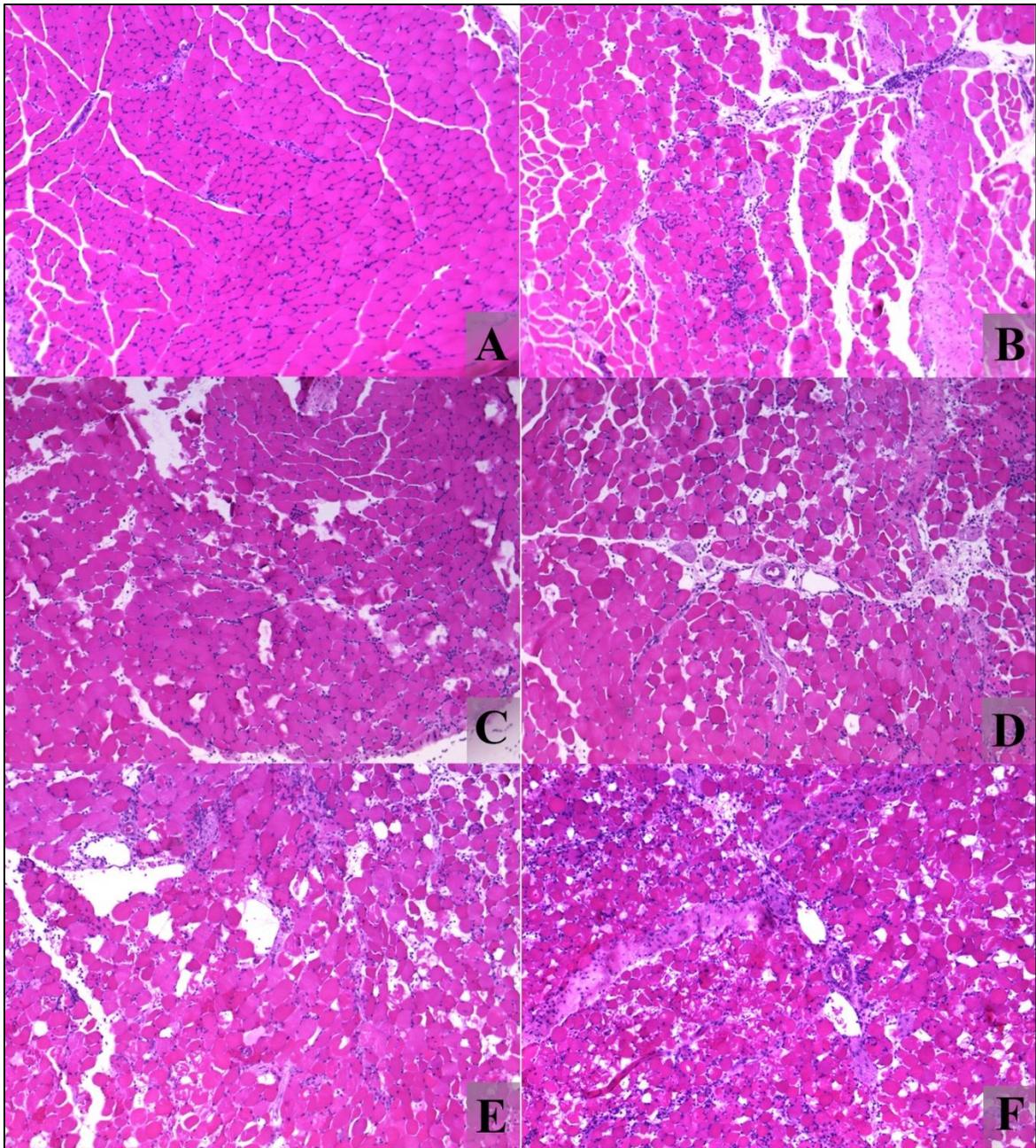


Figura 20. Análisis histológico del gastrocnemio de *Mus musculus* (corte transversal) inoculado con diferentes dosis de veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, Colombia. **A.** Control negativo (PBS), **B.** 1.25 µg/ratón, **C.** 2.5 µg/ratón **D.** 5 µg/ratón, **E.** 10 µg/ratón y **F.** 20 µg/ratón. Las muestras fueron tomadas 3 horas después de la inyección local. Aumento 100x. Escala 200 µm (Fotografías: Sevilla – Sánchez, MJ., 2019).

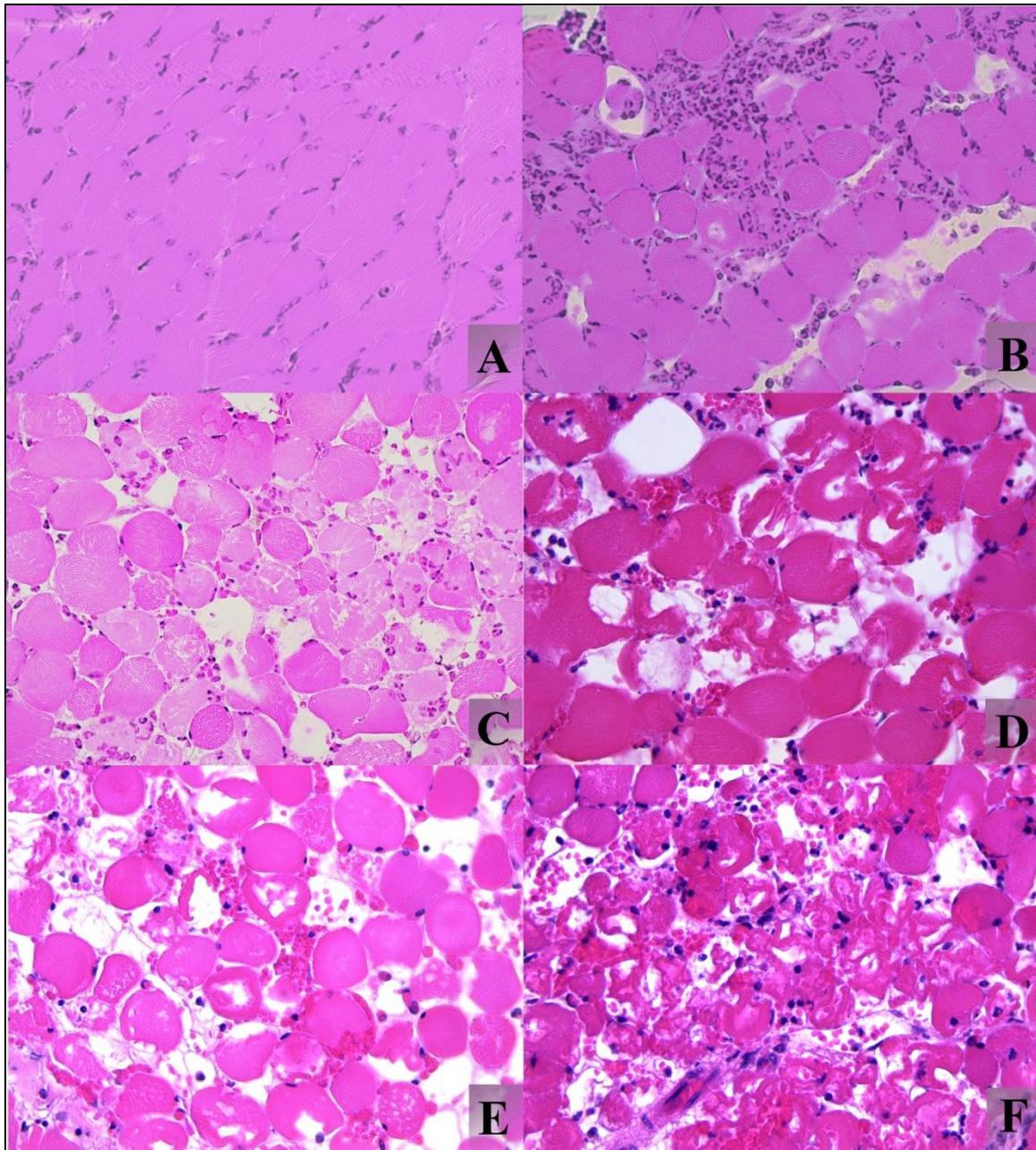


Figura 21. Análisis histológico del gastrocnemio de *Mus musculus* (corte transversal) inoculado con diferentes dosis de veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, Colombia. **A.** Control negativo (PBS), **B.** 1.25 µg/ratón, **C.** 2.5 µg/ratón **D.** 5 µg/ratón, **E.** 10 µg/ratón y **F.** 20 µg/ratón. Las muestras fueron tomadas 3 horas después de la inyección local de 50 µg de veneno. Aumento 400x. Escala 10 µm (Fotografías: Sevilla – Sánchez, MJ., 2019).

A nivel histológico el grupo control presentó infiltrado inflamatorio en epimisio y escasas células en perimisio, permaneciendo en la periferia del músculo. En la dosis 1.25 µg/ratón se presentaron leves focos de desorganización de las miofibrillas (Dmf) musculares (figura 23 A), con infiltrado inflamatorio (Iif) en epimisio y miocitos, pequeños focos necróticos con

núcleos picnóticos y cariolisados, rompimiento leve de fibras. En la dosis 2.5 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ existe Dmf, Iif polimorfonuclear neutrófilo y cambios circulatorios congestivos, desorganización en fibras (Df), se aprecian miocitos necróticos con cariólisis y pérdida eosinofila e hializada (figuras 22 B. y C.). En la dosis 5 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ adicional a lo anterior, se aprecia rompimiento de las fibras por hipercontracción (figura 22 D.) y focos necróticos con cariorexis. En la dosis 10 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ sumado a lo anterior se observan bandas de contracción (figuras 22 E. y F.) con un 55% de lesión degenerativa y mionecrosis. En la dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ adicionalmente se detalla edema asociado a vasos sanguíneos y arteriolas, con una lesión del musculo del 70 - 75% con escasos focos sin cambios degenerativos.

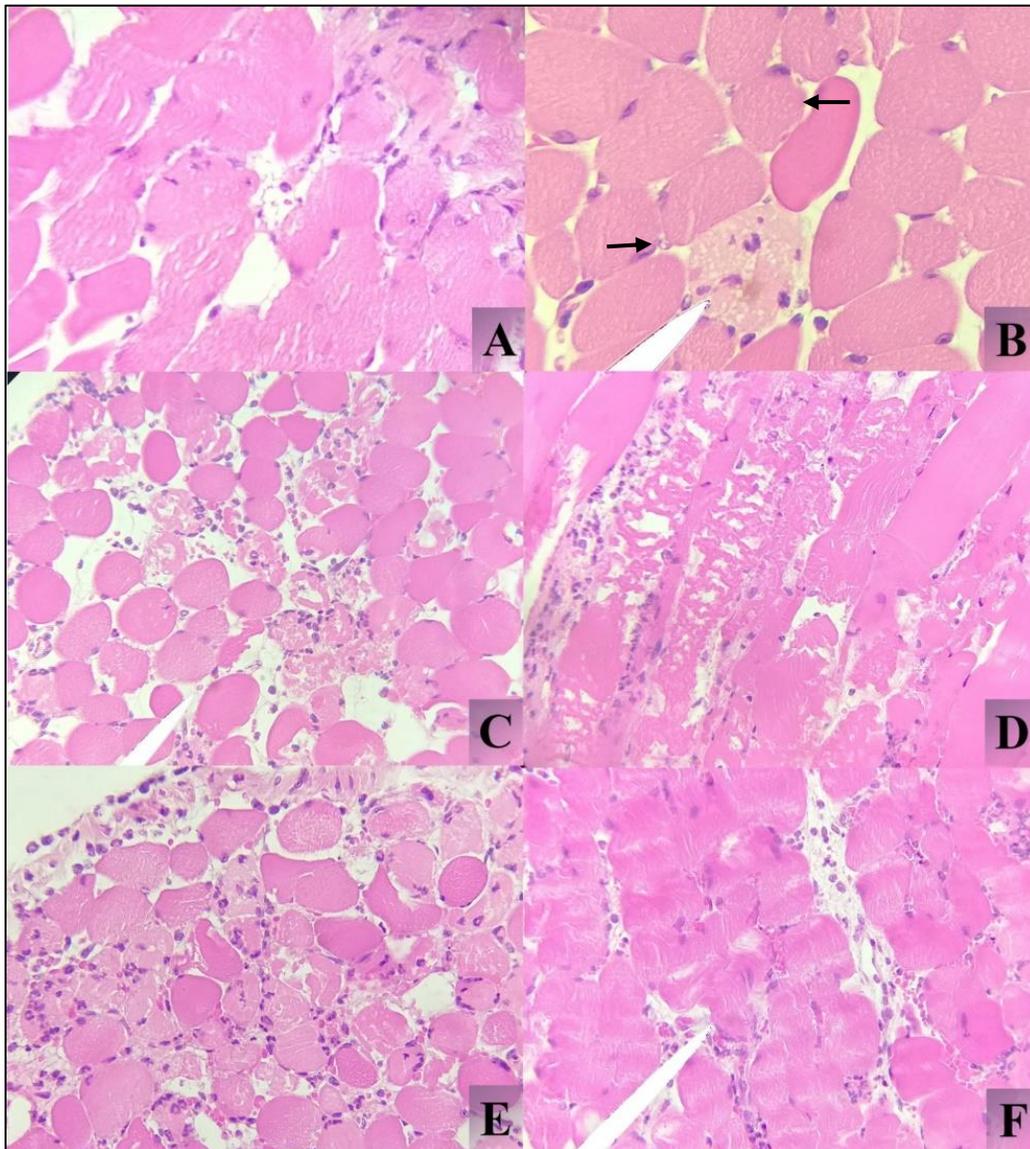


Figura 22. Focos de daño muscular ocasionados por diferentes dosis de veneno de *Bothrocophias campbelli* **A.** Desorganización de miofibrillas musculares (actina y miosina), **B.** miocitos necróticos con cariólisis y pérdida eosinofila (flecha izquierda) e hializada (flecha derecha) **C.** Foco extenso de necrosis **D.** hipercontracción de fibras musculares (corte longitudinal) **E.** Foco extenso de necrosis y presencia de células satélite **F.** Bandas de contracción (Fotografías: Sevilla – Sánchez, MJ., 2019).

5.5 Actividad hemorrágica

La dosis hemorrágica mínima en piel (DHM) fue de $12.71 \pm 2.32 \mu\text{g}$ de veneno. La curva dosis-respuesta se aproxima a una línea de tendencia lineal, representada en un coeficiente de determinación altamente significativo 0.975 (figura 23). La figura 24 muestra el registro fotográfico de las lesiones hemorrágicas producidas por diferentes dosis del veneno de *B. campbelli* de Nariño con las que se determinó la DHM. El anexo H muestra las curvas a partir de las cuales se obtuvo la curva promedio y los cálculos respectivos.

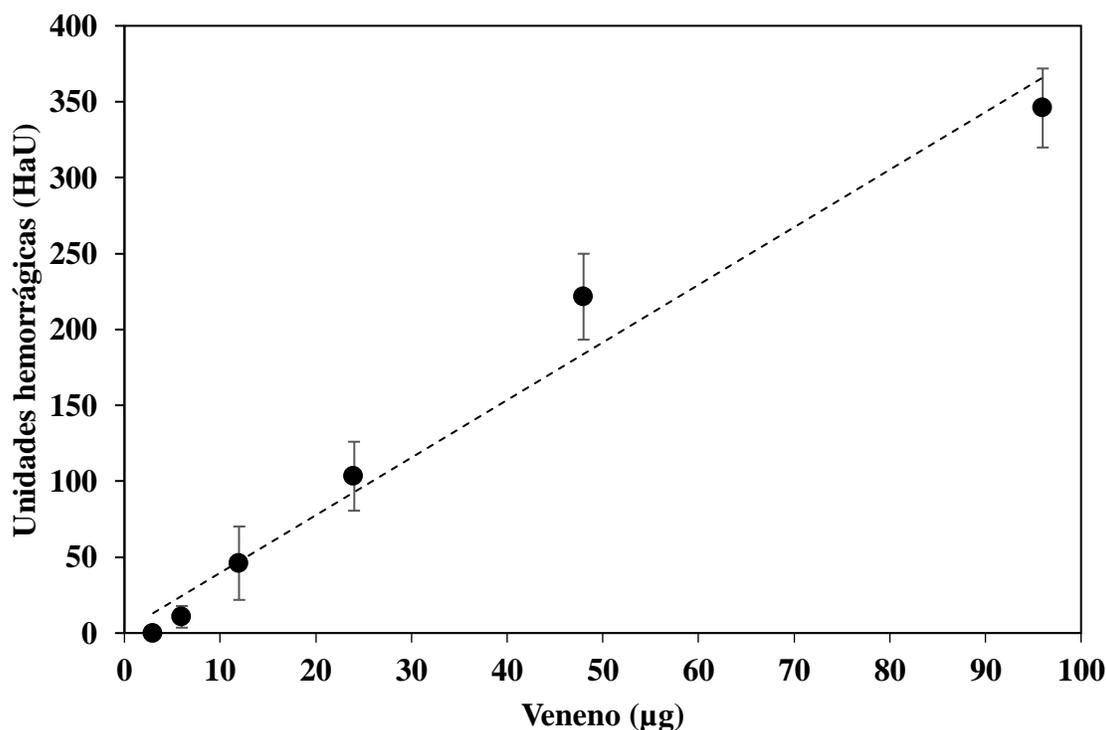


Figura 23. Actividad hemorrágica producida por diferentes dosis del veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, Colombia. La línea punteada representa la regresión lineal obtenida para calcular la DHM ($R^2 = 0,975$). En el eje de las abscisas la concentración del veneno y en el eje de las ordenadas se muestra las unidades hemorrágicas (HaU) \pm desviación estándar ($n=4$) (Fuente: Esta investigación).

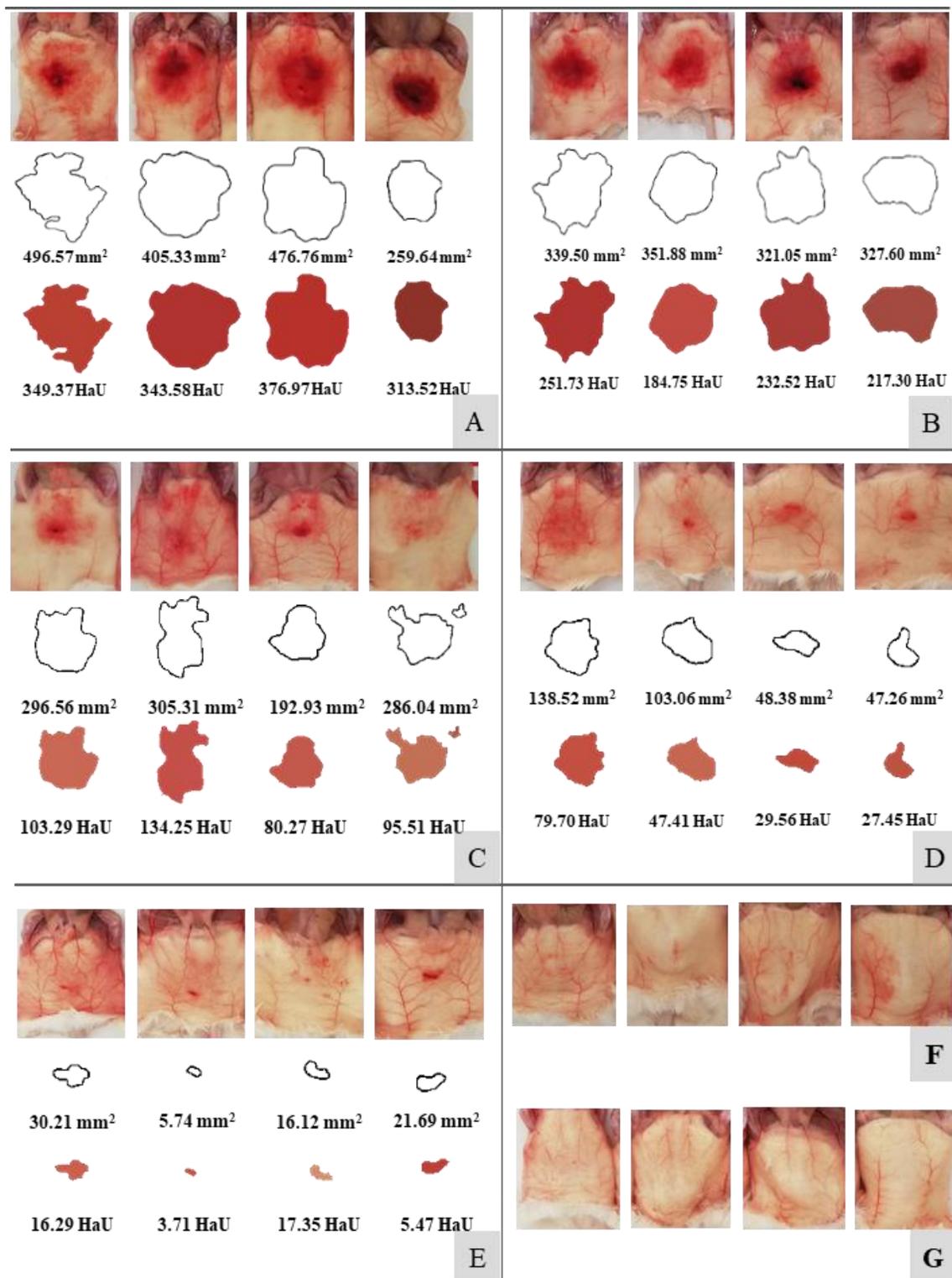


Figura 24. Lesiones hemorrágicas (áreas: mm² y unidades hemorrágicas: HaU) producidas por diferentes dosis del veneno de *Bothrocophias campbelli* en modelos murinos. **A.** 96 µg/ratón, **B.** 48 µg/ratón, **C.** 24 µg/ratón, **D.** 12 µg/ratón, **E.** 6 µg/ratón, **F.** 3 µg/ratón y **G.** Control PBS (Elaborado por: Sevilla – Sánchez, MJ., 2018).

El veneno de *B. campbelli* del departamento de Nariño ($12.71 \pm 2.32 \mu\text{g}/\text{ratón}$) presentó una actividad hemorrágica mínima similar a la determinada para *B. campbelli* de Ecuador ($12 \mu\text{g}/\text{ratón}$) (figura 25) (Salazar-Valenzuela, et al., 2014).

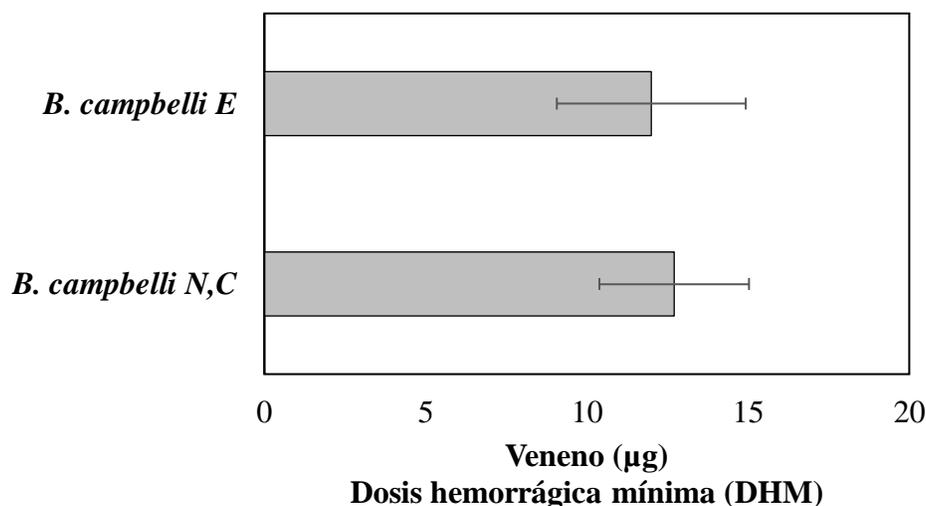


Figura 25. Comparación de la dosis hemorrágica mínima (DHM) de *B. campbelli* del Ecuador (E) respecto a *B. campbelli* de Nariño, Colombia (N, C). Las metodologías utilizadas para determinar esta actividad biológica con los venenos de la especie en Ecuador y Colombia fueron diferentes (Fuente: Esta investigación).

Los resultados encontrados en esta investigación y los reportados por Salazar-Valenzuela y colaboradores (2014) no reflejan diferencias estadísticamente significativas entre las dosis hemorrágicas ($p = 0.377$, 95% de confianza).

6. DISCUSIÓN

6.1 Dosis letal cincuenta (DL_{50})

La “capacidad letal” del veneno depende de la interacción de sus componentes con el organismo y las condiciones ambientales en las que la especie se desarrolla generando multiplicidad de acciones fisiopatológicas tóxicas y letales en sangre, órganos y diferentes sistemas (Jiménez Porras, 1963). Si una serpiente ha desarrollado un veneno especializado para la caza de un grupo zoológico en particular o en un tipo de sustrato, tendrá características que le garanticen efectividad específica, pero con limitaciones durante un descenso poblacional de sus presas. Por el contrario, si la especie está dotada de veneno multifactorial (efectividad para cazar diversos tipos de presa y/o en sustratos variados), las posibilidades de supervivencia en un ecosistema cambiante y la adaptación aumentan considerablemente.

Esto hace que la letalidad y toxicidad de los venenos dependa del medio donde habita y las condiciones ambientales que la rodean (*comp. pers.* Fernando Castro).

El veneno de *B. campbelli* del departamento de Nariño tiene una dosis letal (DL₅₀) de 142.7 µg/ratón, similar a la reportada para la misma especie en Ecuador (150 µg/ratón). La letalidad de este veneno también es similar a la de *Bothrocophias microphthalmus*, *Bothrops colombiensis*, *Bothrops venezuelensis*, *Bothriechis schlegelii* y *Lachesis muta*, y en contraste, tiene una potencia más débil que el veneno *Bothrops asper*, *B. ayerbei*, *B. atrox*, *B. punctatus* y *Porthidium nasutum* (tabla 4) (Salazar-Valenzuela et al., 2014). Aunque las diferencias a nivel de letalidad se explican esencialmente por la variación intra en interespecífica de los venenos, también se deben considerar las variaciones inherentes a cada diseño experimental relacionadas con la vía de inyección y el biomodelo experimental (Méndez A. & Moreno R., 2009).

Tabla 4 Dosis letal 50 del veneno de *Bothrocophias campbelli* comparada con DL₅₀ de otros vipéridos. Vía de inoculación: intraperitoneal (IP).

Especie	Procedencia	DL ₅₀ (µg/ratón)	Autor
<i>Bothrocophias campbelli</i>	Nariño, Colombia	142.7(111.4-179.8)	Esta investigación
	Pichincha y Esmeraldas, Ecuador	150 (132.9-169.3)	Salazar-Valenzuela et al. (2014)
<i>Bothrocophias microphthalmus</i>	Bomboiza/Morona Santiago, Ecuador	225 (192-262)	(Terán & Lomonte, 2016)
<i>Bothrops asper</i>	Tambo, Cauca	100.9 (83.2-122.8)	Mora-Obando (2010)
<i>Bothrops ayerbei</i>	Valle del Patía, Cauca	50.07 (37.4-58.3)	
<i>Bothrops atrox</i>	Urabá, Colombia	65.0 (53-81)	Otero et al. (1992)
	Bajo Cauca, Colombia	69.0 (53-89)	
	Costa Pacífica, Colombia	58.0 (43-79)	
	Magdalena medio, Colombia	62.0 (51-74)	
<i>Bothrops colombiensis</i>	El Guapo, Venezuela	197.2	Girón et al. (2008)
	Caucagua, Venezuela	98.6	Duque-Zerpa y Vargas (2015)
	Paracotos, Venezuela	83.54 ± 2.72	Méndez A. y Moreno R. (2009)
	Venezuela	304.3 (302.3-320.6)	
<i>Bothrops venezuelensis</i>	Venezuela	254.8 (241.7-264.9)	Méndez A. y Moreno R. (2009)
<i>Bothrops punctatus</i>	Costa Pacífica, Colombia	47.0 (36-61)	Otero et al. (1992)
<i>Porthidium nasutum</i>	Urabá, Colombia	82.0 (68-99)	
	Magdalena medio, Colombia	62.0 (51-74)	
<i>Lachesis muta</i>	Costa Pacífica, Colombia	130.0 (106-160)	
<i>Bothriechis schlegelii</i>	Antioquia, Colombia	206.0 (158-268)	

La similitud encontrada en la dosis letal (DL₅₀) de *Bothrocophias campbelli* con *Bothrops colombiensis* y *Bothriechis schlegelii*, se puede atribuir a la semejanza en composición y abundancia de algunas proteínas descritas para estas especies. En estos venenos también predominan las PLA₂s con 44.3% y 43.8% respectivamente, frente a un 43.1% de PLA₂s en el veneno de *B. campbelli*, de igual manera tienen una abundancia similar de L-aminoácido oxidasas, entre otras (figura 7) (Lomonte et al., 2008; Calvete et al., 2009). La similitud con la DL₅₀ de *Bothrops venezuelensis* puede explicarse por la cercanía filogenética entre ambas especies, ya que se encuentran posicionadas dentro del mismo clado (Clado *Bothrocophias*) según el filograma consenso realizado con 2343 pb mitocondrial y 85 caracteres morfológicos, siendo consideradas especies hermanas (Fenwick et al., 2009). La semejanza de las DL₅₀ de *B. campbelli* y *Bothrocophias microphthalmus*, también puede atribuirse a que son especies con caracteres evolutivos relacionados pertenecientes al mismo clado (Alencar et al., 2016), estas dos especies se encuentran en hábitat y altitud comparables en la región de los Andes en Colombia, Ecuador y Perú, por lo que su dieta está estrechamente relacionada (Cisneros-Heredia et al., 2006; Kuch, 2000; Vaca Guerrero, 2012).

Respecto a los signos clínicos observados post-inyección por el veneno de *B. campbelli* se destacan la taquipnea, postración e hipoactividad en el 100% de los modelos, datos similares a los reportados para *Bothrops colombiensis* y *Bothrops venezuelensis* los cuales son adjudicados generalmente al dolor local, principal manifestación en los cuadros clínicos de envenenamiento, en especial de tipo bothrópico. Este signo local, en el departamento de Nariño, se presenta entre el 76 y 91% de los casos (Méndez A. & Moreno R., 2009; Sevilla-Sánchez et al., 2019). En modelos murinos también se han registrado efectos similares a los detallados para el veneno de *B. campbelli*, causados por venenos de *Bothrops colombiensis* y *Bothrops venezuelensis* como alteraciones respiratorias en periodos prolongados de taquipnea, los cuales evolucionan a respiraciones lentas superficiales y entrecortadas y periodos de apnea aproximadamente entre el 50 y 95 % de los ratones, así como ataxia del tren posterior en el 80% y mioclonias entre el 36 y 67 %, signos que normalmente se atribuyen a afección a nivel neurológico (Méndez A. & Moreno R., 2009).

La leve acción de los venenos bothróticos sobre las estructuras encefálicas resalta la importancia de la barrera hematoencefálica como elemento de protección para la difusión de los componentes del veneno desde el espacio vascular local hacia el tejido nervioso, por lo que estos signos aparentemente neurológicos, se pueden atribuir de manera indirecta a la isquemia y las hemorragias producidas generalmente en envenenamientos por vipéridos (Méndez A. & Moreno R., 2009; Rodríguez-Acosta et al., 2003). Los síntomas reportados en modelos murinos para *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, son equivalentes a los observados en modelos aviares con venenos bothróticos de *B. jararacussu*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. asper*, *B. moojeni* y *B. neuwiedi* (Zamunér et al., 2004; Duque-Zerpa & Vargas, 2015), también son similares a los reportados en accidentes ofídicos en el área de distribución de *B. campbelli* (Sevilla-Sánchez et al., 2019), y áreas geográficamente relacionadas (Ayerbe-González, 2009a).

6.2 Actividad coagulante

La hemotoxicidad es una de las principales características de los envenenamientos por vipéridos, sus venenos contienen proteínas que causan la activación inadecuada o exagerada de diferentes factores de la coagulación provocando alteraciones en el sistema hemostático que conducen a desfibrinación, coagulación intravascular diseminada (CID) y trombocitopenia (Pizzuto, et al., 1978; Bergillos-Gasi3n & Rivas-Fern3ndez, 2013). Estas proteínas son principalmente coagulantes y procoagulantes como algunas metaloproteinasas, las cuales presentan una fuerte acci3n coagulante *in vitro* y consumen el fibrin3geno *in vivo*, y las serina proteasas tipo trombina, que realizan clivajes semejantes a la trombina generando co3gulos de fibrina inestables con liberaci3n de fibrinop3ptidos A, B o AB (Bergillos-Gasi3n & Rivas-Fern3ndez, 2013, Castro et al., 2004).

Las serina proteasas generan inestabilidad y susceptibilidad a la degradaci3n por plasmina, lo que dificulta la determinaci3n de s3ntomas causados por su acci3n metab3lica tales como trombosis microcirculatoria y macrocirculatoria, tiempo de protrombina (PT), tiempos parciales de tromboplastina (TPT), y reducci3n del nivel de fibrin3geno, el cual puede ser indetectable en las v3ctimas (Castro et al., 2004; Fry et al., 2009). Tambi3n desencadenan actividades biol3gicas poco frecuentes como episodios temporales de opist3tonos y un r3pido giro alrededor del eje largo el cual ha sido detectado en animales de laboratorio (Castro et al., 2004).

El veneno de *B. campbelli* del departamento de Nari3o present3 una dosis coagulante m3nima de 12.3 ± 0.5 $\mu\text{g}/\text{rat3n}$, similar a la de otros venenos bothr3picos como *Bothrops atrox* (Ucayali, Per3 1), *Bothrops colombiensis* (Caucagua, Venezuela) y *Bothriechis schlegelii*. Es considerablemente menor a las reportadas para el veneno de *B. asper* y m3s alta que la determinada para la misma especie en Ecuador (19.4 $\mu\text{g}/\text{rat3n}$), para algunas poblaciones de *Bothrops atrox* (Jun3n, Per3 2) y *Cerrophidion godmani* (Costa Rica) (tabla 5).

En general, el veneno de *B. campbelli* tiene una actividad coagulante d3bil en comparaci3n con el veneno de diferentes vip3ridos (tabla 5). Esta actividad se explicari3 por la baja abundancia de serina proteasas tipo trombina pese a que en su totalidad las serina proteasas representan el 21.3% de los componentes del veneno (Salazar-Valenzuela y colaboradores, 2014). El proteoma de *B. campbelli* evidencia que algunas de las prote3nas, identificadas por homologi3 con las bases de datos, corresponden a serina proteasas con potencial para actuar en el sistema hemost3tico y metaloproteinasas que activan el factor X de la coagulaci3n (Salazar-Valenzuela et al., 2014).

Tabla 5 Dosis coagulante mínima del veneno de *Bothrocophias campbelli* comparada con DCMs de otros vipéridos.

Especie	Procedencia	DCM (μg de veneno)	Autor
<i>Bothrocophias campbelli</i>	Nariño, Colombia	12.3 \pm 0.5	Esta investigación
	Pichincha y Esmeraldas, Ecuador	19.4	Salazar-Valenzuela et al. (2014)
<i>Bothrops asper</i>	Atlántico, Costa Rica	1.63 \pm 0.07	Mora-Obando (2010)
	Pacífico, Costa Rica	1.76 \pm 0.03	
	El Tambo, Cauca, Colombia	0.37 \pm 0.05	
	Valle del Patía, Colombia	0.96 \pm 0.1	
<i>Bothrops atrox</i>	Amazonas, Perú 1	2.6	Ortiz et al. (2012)
	Amazonas, Perú 2	1.5	
	Amazonas, Perú 3	2.1	
	Junín, Perú 1	6.3	
	Junín, Perú 2	61.1	
	Ucayali, Perú 1	13.8	
	Ucayali, Perú 2	2.7	
	Ucayali, Perú 3	2.6	
<i>Bothrops colombiensis</i>	Caucagua, Venezuela	11.0 \pm 0.7	Rodríguez-Acosta et al. (2016) (Ortiz et al., 2012)(Ortiz et al., 2012)
	El Guapo, Venezuela	18.0 \pm 1.2	
<i>Atropoides nummifer</i>	Costa Rica	33.56 \pm 0.60	Ortiz et al. (2012)
<i>Cerrophidion godmani</i>	Costa Rica	64.50 \pm 0.83	
<i>Bothriechis schlegelii</i>	Costa Rica	12.85 \pm 0.33	
<i>Lachesis stenophrys</i>	Costa Rica	9.86 \pm 0.10	
<i>Crotalus durissus durissus</i>	Costa Rica	26.9 \pm 0.17	

Las variaciones observadas entre las dosis coagulantes mínimas determinadas para *B. campbelli* de Nariño y Ecuador son producto de la variación intraespecífica reportada también para otras especies de vipéridos. Por ejemplo, las DCMs de los venenos de *Bothrops colombiensis* de Cauca (11.0 \pm 0.7) y El Guapo (18.0 \pm 1.2) en Venezuela, así como también las de *Bothrops atrox* de Perú procedentes de tres zonas geográficas distintas, reflejan este tipo de variación (tabla 5) (Rodríguez-Acosta y colaboradores, 2016; Ortiz y colaboradores, 2012).

6.3 Actividad edematizante

Uno de los signos más comunes en los envenenamientos por vipéridos es el edema, el cual se manifiesta en un 95% de los casos. Este síntoma generalmente se presenta en los primeros 5 minutos y tiene un pico máximo a los 60 minutos tras la mordedura. Se produce por acción mixta de proteinasas y fosfolipasas como resultado de la actividad proteolítica de los venenos. Estos componentes inician la liberación de sustancias vasoactivas (bradiquinina e histamina) y prostaglandinas, las cuales inducen la dilatación venulo-capilar y formación de coágulos de fibrina (Bergillos Gasi6n & Rivas Fern6ndez, 2013).

La DEM de *B. campbelli* fue de 1.0 ± 0.3 μg , dosis semejante a las reportadas para venenos de especies de los g6neros *Bothrops* (*B. asper* y *B. atrox*) y *Porthidium* (*P. nasutum*) en Colombia y a *Bothrops colombiensis* de Venezuela (tabla 6). La fuerte actividad edematizante producida por el veneno de *B. campbelli* se debe a la alta abundancia de fosfolipasas A_2 (43.1%), principalmente del tipo Lys49 y diferentes isoformas de estas prote6nas, las cuales causan por permeabilizaci6n directa da6o en las membranas celulares ocasionando procesos inflamatorios y las de tipo Asp49, por su parte, producen efectos edematog6nicos como consecuencia de la liberaci6n de 6cidos grasos (Duque Osorio et al., 2007; Salazar-Valenzuela et al., 2014).

Tabla 6. Dosis edematizante m6nima del veneno de *Bothrocophias campbelli* comparada con la DEM de otros vip6ridos. V6a de inoculaci6n: subcut6nea almohadilla plantar (S.C)

Especie	Procedencia	DEM (μg de veneno)	Autor
<i>Bothrocophias campbelli</i>	Nari6o, Colombia	1.0 ± 0.3	Esta investigaci6n
<i>Bothrops asper</i>	Antioquia y Choc6, Colombia	1.2 ± 0.06	Otero et al. (2002)
<i>Bothrops atrox</i>	Urab6, Colombia	2.1 ± 0.8	Otero et al. (1992)
	Bajo Cauca, Colombia Costa Pac6fica, Colombia	1.3 ± 0.5 0.5 ± 0.4	
<i>Bothrops colombiensis</i>	Paracotos, Venezuela	0.62 ± 0.04	Duque-Zerpa y Vargas (2015)
<i>Bothrops neuwiedi</i>	Argentina	2.05	Acosta de P6rez et al. (1998)
<i>Bothrops punctatus</i>	Costa Pac6fica, Colombia	0.7 ± 0.3	Otero et al. (1992)
<i>Porthidium nasutum</i>	Urab6, Colombia	2.4 ± 0.9	Otero et al. (1992)
	Magdalena medio, Colombia	1.0 ± 0.2	Otero et al. (1992)
<i>Lachesis muta</i>	Costa Pac6fica, Colombia	2.1 ± 0.8	Otero et al. (1992)
<i>Bothriechis schlegelii</i>	Antioquia, Colombia	10.3 ± 1.9	Otero et al. (1992)

La similitud encontrada entre las DEMs de *Bothrocophias campbelli* con *Bothrops colombiensis*, *B. asper* y *B. atrox*, se puede atribuir a la presencia y abundancia de prote6nas que participan procesos inflamatorios, tal es el caso de las PLA₂s con abundancias del 44.3%,

45.1% (*B. asper* del pacífico) y 24.1% respectivamente, entre otras proteínas que también contribuyen con la generación de edema (figura 7) (Alape-Girón et al., 2008; Calvete et al., 2009; Núñez et al., 2009).

Entre los factores proteicos asociados a la formación de edema se encuentran: sustancias liberadoras de bradiquininas e histamina (eutacoides liberados durante el envenenamiento), las kininogenasas ó polipéptidos liberadores de kininas, los cuales incrementan la permeabilidad de la membrana vascular sin destruirla, enzimas proteolíticas similares a tripsina, proteínas del sistema del complemento (anafilotoxinas) y las PLA₂, las cuales generan la pérdida en la estabilidad de la membrana celular por acción directa sobre los fosfolípidos de membrana y/o por la acumulación de productos de hidrólisis como los lisofosfolípidos y ácidos grasos, entre los que se destaca el ácido araquidónico, uno de los mensajeros esenciales en los procesos inflamatorios (figura 26) (Martínez-Vargas, 1990).

La acción de las serina proteasas y metaloproteinasas hemorrágicas de los venenos de serpientes también contribuye con la actividad edematogénica. Las SVMP tipo P-I ocasionan daños prominentes en los tejidos locales que provocan hemorragia y mionecrosis indirecta, ejerciendo una actividad proinflamatoria y predominando la formación de edema y ampollas, efectos que concuerdan con los observado en esta investigación (figura 26) (Rucavado et al., 1995).

El edema se caracteriza por tener un aspecto duro, de color eritematoso y posteriormente equimótico, constante en las 24 horas posteriores al envenenamiento, con presencia de dolor que suele ser de moderado a agudo y resolución lenta que puede durar varios días, lo cual concuerda con lo observado. Dependiendo de los segmentos corporales afectados, la severidad del edema se clasifica en: leve cuando afecta un solo segmento de una extremidad (no flictenas, no mionecrosis), moderado cuando afecta de 2 a 4 segmentos (si, flictenas, no mionecrosis) y grave más de 4 segmentos afectados (si, flictenas, si mionecrosis). A partir de este patrón y la categorización de la severidad, es posible señalar que las dosis de 5 y 10 µg del veneno de *B. campelli* de Nariño causaron una severidad entre moderada y grave en la almohadilla plantar del ratón (figuras 19 E. y F.) (Bergillos Gasión & Rivas Fernández, 2013).

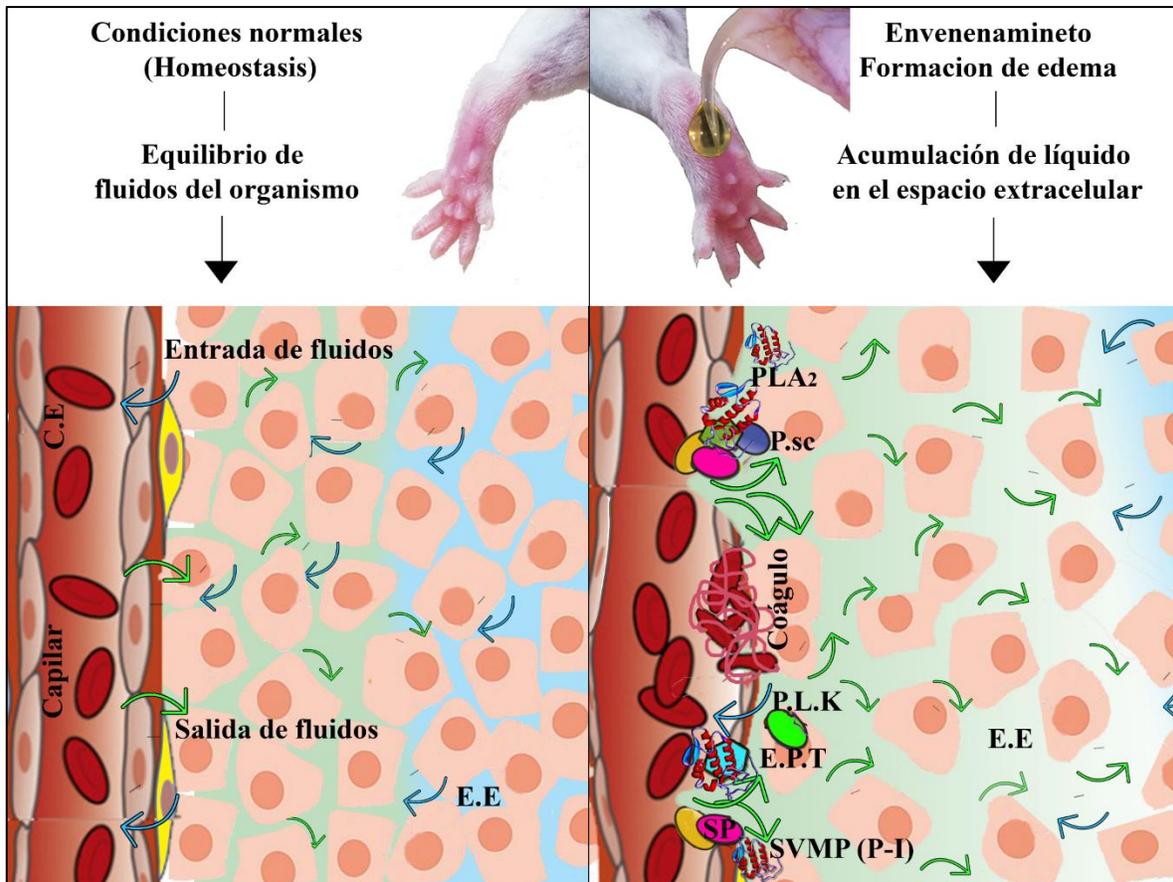


Figura 26. Formación de edema por acción del veneno de serpientes. La homeostasis se ve alterada por daño en las células endoteliales (C.E) como resultado de la acción de fosfolipasas A₂ (PLA₂), proteínas del sistema del complemento (P.sc), polipéptidos liberadores de kininas (P.L.K), enzimas proteolíticas similares a tripsina (E.P.T), serina proteasas (SP) y metaloproteinasas tipo P-I (SVMP(P-I)), esta pérdida de estabilidad celular ocasiona un desequilibrio en el intercambio de fluidos entre el espacio intra y extracelular (E.E) y como consecuencia se desarrolla el edema (Elaborado por: Sevilla – Sanchez, MJ., 2019)

6.4 Actividad miotóxica

En general, los venenos bothrópicos producen cuadros clínicos con efectos mionecróticos prominentes, con algunas excepciones (e.g. *B. ayerbei*). Esta capacidad de ocasionar alteraciones en músculo, resultante en daño a fibras musculares esqueléticas, es atribuido a las miotoxinas, presentes en gran parte de los venenos de vipéridos, clasificadas principalmente en 3 grupos: miotoxinas de bajo peso molecular (crotamina), cardiotoxinas, y miotoxinas con actividad fosfolipasa A₂ (Martínez-Vargas, 1990; Lomonte et al., 2003;).

La DMM de *B. campbelli* fue de 3.9 ± 2.5 µg de veneno, dosis que es similar a las reportadas para venenos bothrópicos. Debido a variaciones metodológicas, modelo biológico utilizado método de cuantificación de CK no se incluyen comparaciones con otros estudios. La fuerte

actividad miotóxica producida por el veneno de *B. campbelli* se debe a la alta abundancia de fosfolipasas A₂ (43.1%), principalmente del tipo Lys49, las cuales producen mionecrosis local por daño directo de la membrana celular de los miocitos (Lomonte et al., 2003; Salazar-Valenzuela et al., 2014)

El mecanismo de acción de las PLA₂s de tipo Lys49 se basa en la interacción directa de las regiones C y N-terminal de la proteína con la membrana celular de los miocitos. La región N-terminal participa en el reconocimiento interfacial entre la PLA₂ y los sitios aniónicos de la membrana (fosfolípidos cargados negativamente), formando una estructura anfifílica, catiónica-hidrofóbica con los residuos 115-129. A diferencia de las PLA₂s del tipo Asp49, estas miotoxinas carecen de actividad fosfolipolítica intrínseca, por lo que el daño muscular es resultado de la interacción electrostática entre la proteína y los componentes de la membrana de la célula muscular, además se ha demostrado que la coexistencia de los dos tipos de PLA₂ en los venenos ocasiona un sinergismo y potencia el daño celular, causando un mayor efecto citotóxico y miotóxico (figura 27) (Lomonte et al., 2003; Mora-Obando et al., 2014).

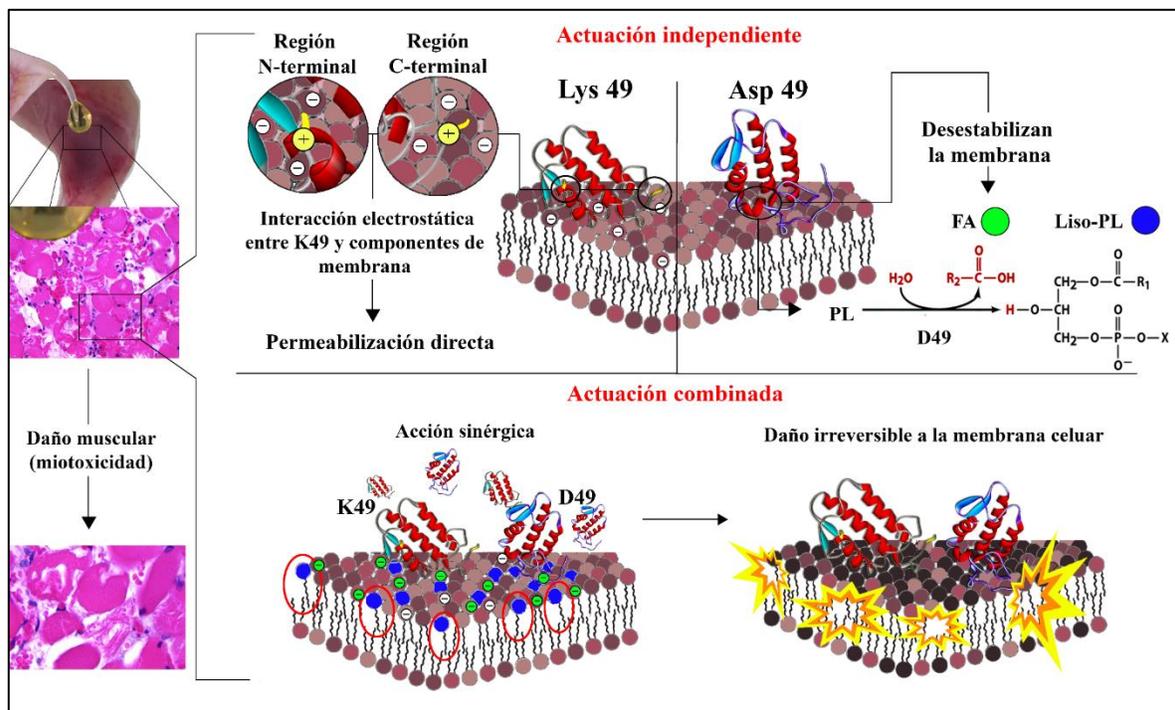


Figura 27. Mecanismo de acción de las PLA₂s Lys49 (**K49**) y Asp49 (**D49**). Cada tipo de PLA₂ tiene la capacidad de causar citotoxicidad *in vitro* o mionecrosis *in vivo* de forma independiente como resultado del daño ocasionado a la membrana. Las miotoxinas Asp49 desestabilizan la membrana por hidrólisis enzimática de los fosfolípidos (PL) y la consiguiente producción de lisofosfolípidos (**liso-PL**) y ácidos grasos (**FA**), mientras que las toxinas Lys49 ejercen un mecanismo de permeabilización directa a través de su región **C y N-terminal** por medio de interacciones electrostáticas (⊖) (Modificado por: Sevilla – Sánchez, MJ., 2019 de: Mora-Obando et al., 2014).

El ensayo biológico de miotoxicidad *in vivo*, permite determinar el daño a nivel muscular por cuantificación de la actividad de la enzima creatina quinasa en sangre; esta enzima se encuentra en músculo, corazón y cerebro, donde favorece la generación de ATP a partir de fosfocreatina y es liberada a la sangre cuando ocurre daño celular (Wallimann et al., 1992). Durante un envenenamiento por mordedura de serpiente, si el veneno contiene fosfolipasas miotóxicas, la CK alcanza valores elevados respecto a los valores basales normales, incluso antes que la evolución completa del cuadro histológico, por lo que se recomienda utilizar la cuantificación de la actividad de esta enzima para predecir la severidad de este tipo de envenenamiento (Martínez-Vargas, 1990).

A nivel histológico, el daño en células musculares causado por el veneno de *B. campbelli* osciló entre el 55 – 75% en las dosis más altas del veneno y fue evidente desde dosis inferiores. Este resultado es consistente con la abundancia de PLA₂s determinada para el veneno de *B. campbelli* de Ecuador y el ensayo de miotoxicidad, tal como se ha reportado para algunas poblaciones de *Bothrops asper* y *B. neuwedii*. Contrario a otros venenos bothrópicos, como el de *Bothrops ayerbei*, *B. alternatus*, otras poblaciones de *Bothrops asper*, *Porthidium lansbergii lansbergii*, *Porthidium nasutum* y *Atropoides picadoi*, los cuales histológicamente evidencian infiltración de glóbulos rojos entre las fibras musculares la cual oscila entre moderada a severa, este veneno no genera hemorragia intensa, lo que concuerda con la baja abundancia de metaloproteasas (15.8%) establecidas para el veneno de la especie en Ecuador y el ensayo de actividad hemorrágica realizado en este estudio (tabla 7) (Gutiérrez & Chaves, 1979; Acosta de Pérez et al., 1998; Mora-Obando, 2014; Mora-Obando et al., 2014; Jiménez-Charris et al., 2015).

Tabla 7. Efecto mionecrótico del veneno de *Bothrocophias campbelli* comparada con el efecto producido por otros vipéridos.

Espece	Procedencia	Efecto mionecrótico	Autor
<i>Bothrocophias campbelli</i>	Nariño, Colombia	Severo	Esta investigación
<i>Bothrops asper</i>	Atlántico, Costa Rica	Severo	Gutiérrez y Chaves (1979)
	Pacífico, Costa Rica	Severo	
<i>Atropoides picadoi</i>		Moderado	
<i>Atropoides nummifer</i>		Moderado	
<i>Bothriechis lateralis</i>	Costa Rica	Leve	
<i>Bothriechis schlegelii</i>		Severo	
<i>Cerrophidion godmani</i>		Moderado	
<i>Porthidium nasutum</i>	Costa Rica	Moderado	
	Atlántico, Colombia	Moderado	
<i>Porthidium lansbergii lansbergii</i>	Atlántico, Colombia	Moderado	
<i>Porthidium ophryomegas</i>		Moderado	Gutiérrez y Chaves (1979)
<i>Lachesis muta</i>	Costa Rica	Leve	
<i>Crotalus durissus</i>		Leve	

El infiltrado inflamatorio polimorfonuclear neutrófilo observado en el tejido muscular del gastrocnemio de *Mus musculus* también es un indicador de daño. Estos leucocitos se caracterizan por ser el componente más abundante en la sangre, los cuales representan alrededor del 60% y se activan al aumentar la liberación de calcio intracelular como resultado del daño provocado por los componentes del veneno. A su vez, los cambios vasculares favorecen la invasión de neutrófilos en el músculo donde desbridan el tejido dañado por medio de fagocitosis. Dependiendo de la magnitud de la invasión es posible predecir si la mionecrosis es leve, moderada o aguda, por lo tanto a mayor daño, mayor presencia de infiltrado inflamatorio en la zona y mayor área de infiltración; así, el daño mionecrótico y la pérdida de la arquitectura muscular ocasionados por el veneno de *B. campbelli* del departamento de Nariño presentó una fuerte acción miotóxica (figuras 23, 24 y 25; tabla 3) (Pascual Guárdia, 2015).

6.5 Actividad hemorrágica

Los envenenamientos de la familia Viperidae, se caracterizan por una sobresaliente hemorragia local y sistémica, esta actividad constituye uno de los problemas más relevantes dentro de la compleja fisiopatología que desencadenan estos accidentes (Bergillos-Gasi6n & Rivas-Fernández, 2013). El efecto hemorrágico, además de producir una pérdida masiva de sangre sistémica que conduce a trastornos hemodinámicos, genera daño tisular local, una pobre regeneración muscular y shock cardiovascular (Pizzuto et al., 1978; Warrell, 2010; Bergillos-Gasi6n & Rivas-Fernández, 2013; Guti6rrez et al., 2016).

La DHM de *B. campbelli* del departamento de Nariño fue de $12.71 \pm 2.32 \mu\text{g}$, similar a la reportada para la misma especie en Ecuador ($12 \mu\text{g}$). Al compararla con DHMs de otras especies de vipéridos, es similar a la de algunas poblaciones de *Bothrops colombiensis* (Caucagua, Venezuela) y menor a las reportadas para los venenos de especies colombianas como *Bothrops asper*, *Bothrops atrox*, *Lachesis muta* entre otras (tabla 8). Por lo tanto, al igual que el veneno de *B. campbelli* del Ecuador, el veneno de la misma especie en Nariño tiene una débil actividad hemorrágica local, atribuida a la baja abundancia de metaloproteinasas (15.8%), las cuales en su mayoría presentan actividad trombolítica, hemorrágica y actúan como inhibidores de la agregación plaquetaria (Salazar-Valenzuela y colaboradores, 2014)

El método usado para determinar la actividad hemorrágica mínima en este estudio fue el de Jenkins et al (2017), por lo que las diferencias observadas en comparación con dosis previamente reportadas podrían ser inherentes al método utilizado (figura 24). El método tradicional considera únicamente el área hemorrágica, mientras que el de Jenkins et al. (2017), además del área, tiene en cuenta la intensidad del área hemorrágica la cual está estrechamente relacionada con la cantidad de hemoglobina extravasada presente en la muestra. Se ha demostrado que la actividad hemorrágica calculada a partir del análisis de imagen por medio del software Inskape, es congruente con la actividad obtenida por cuantificación de hemoglobina extravasada (Jenkins et al., 2017).

Tabla 8. Dosis hemorrágica mínima del veneno de *Bothrocophias campbelli* comparada con DHMs de otros vipéridos. Vía de inoculación: intradérmica (ID).

Especie	Procedencia	DHM (µg de veneno)	Autor
<i>Bothrocophias campbelli</i>	Nariño, Colombia	12.71 ± 2.32	Esta investigación
	Pichincha y Esmeraldas, Ecuador	12	Salazar-Valenzuela et al. (2014)
<i>Bothrops asper</i>	Tambo, Cauca	1.44 ± 0.2	Mora-Obando (2010)
<i>Bothrops ayerbei</i>	Valle del Patía, Cauca	0.24 ± 0.04 µg	
<i>Bothrops atrox</i>	Urabá, Colombia	1.7 ± 0.6	Otero et al. (1992)
	Bajo Cauca, Colombia	4.3 ± 0.6	
	Costa Pacífica, Colombia	3.3 ± 0.7	
	Perú	6.45 ± 0.43	
<i>Bothrops colombiensis</i>	El Guapo, Venezuela	5.3	Duque-Zerpa y Vargas (2015)
	Caucagua, Venezuela	11.6	
	Paracotos, Venezuela	34.62 ± 6.25	
<i>Bothrops neuwiedi</i>	Bolivia	7.0 ± 1.9	
<i>Bothrops punctatus</i>	Costa Pacífica, Colombia	0.7 ± 0.1	
<i>Porthidium nasutum</i>	Urabá, Colombia	3.4 ± 0.8	Otero et al. (1992)
	Magdalena medio, Colombia	0.5 ± 0.2	
<i>Lachesis muta</i>	Costa Pacífica, Colombia	2.4 ± 0.4	
<i>Bothriechis schlegelii</i>	Antioquia, Colombia	20.4 ± 0.5	

Las lesiones hemorrágicas a nivel dérmico se producen en dos pasos: 1) lesión o daño de porciones del endotelio generado por mediadores inflamatorios (como la histamina y la serotonina) liberados por toxinas hemorrágicas en las uniones de células endoteliales intercelulares y 2) extravasación de hematíes por daño endotelial, debido a la inflamación local, la contracción de las células endoteliales y el ensanchamiento de las uniones intercelulares en las vénulas, facilitando así la extravasación por rexis (mecanismo predominante) o por diapédesis (Gutiérrez et al., 2005).

Estos pasos causan las lesiones hemorrágicas observadas en el modelo murino utilizado (figuras 24 y 28) producto de la hidrólisis de sustratos claves en la estabilidad mecánica de las células endoteliales de la membrana basal (MB) de los capilares. Las SVMP hemorrágicas son capaces de hidrolizar laminina, colágeno tipo IV, VI y XV, nidógeno y perlecan, proteínas presentes en la MB y la matriz extracelular, esto debilita la MB por pérdida de su integridad y aumenta la distensibilidad de la pared de los microvasos, afectando la hemodinámica y alterando las fuerzas que operan en la microcirculación (fuerza hidrostática y hemodinámicas), lo que culmina en extravasación de los diferentes componentes de la sangre (figura 26 y 28) (Ohsaka, 1979; Martínez-Vargas, 1990; Escalante, et al., 2011; Gutiérrez et al., 2016).

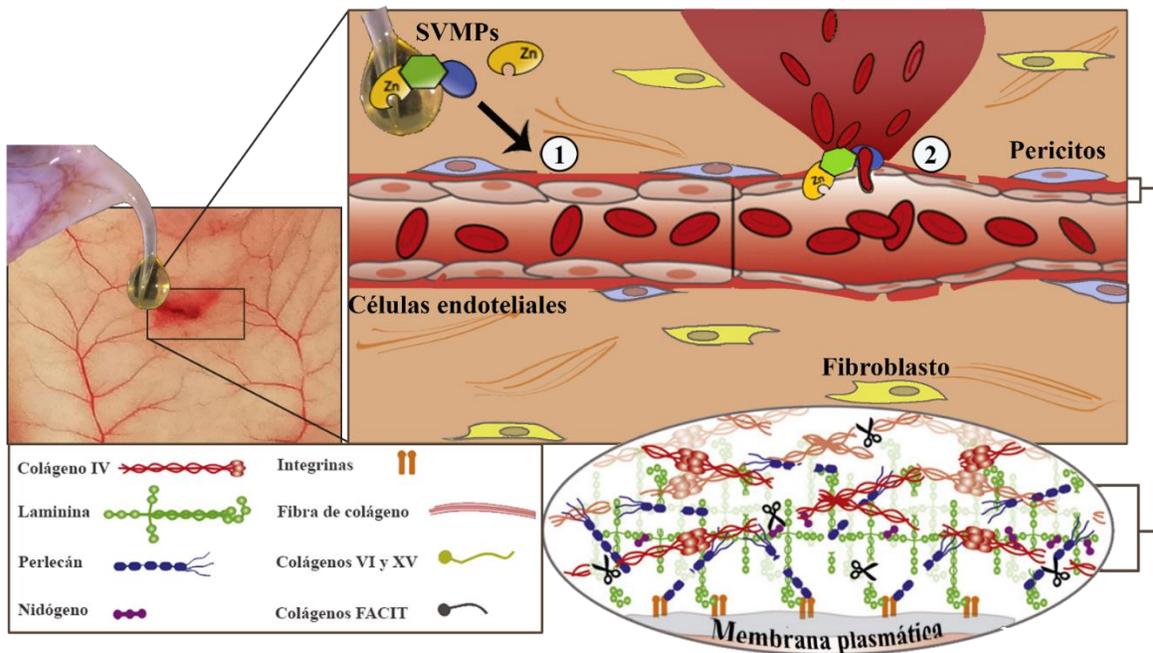


Figura 28. Modelo de dos pasos para explicar el mecanismo de acción de las SVMPs hemorrágicas en el escenario microvascular (Modificado por: Sevilla – Sánchez, MJ., 2019 de: Escalante, et al., 2011).

Las metaloproteinasas (SVMP), suelen ser uno de los componentes más abundantes de los venenos bothrópicos, causan áreas de extravasaciones considerables hasta el punto de formar un parche de superficie sangrante (Gutiérrez et al., 2016). El veneno de *B. campbelli* de Ecuador está conformado por SVMP tipo PI, PII y PIII. Las SVMP PI, tienen un efecto localizado ya que son inhibidas por la $\alpha 2$ -macroglobulina en sangre, actúan como factores hemodinámicos ya que degradan componentes de la membrana, inducen varios cambios degenerativos que afectan la morfología y viabilidad de las células endoteliales, por lo que la tensión del fluido y la presión hidrostática en los capilares previamente debilitados, pueden conducir a hemorragia y daño tisular local característico de estos envenenamientos. Las SVMP PII y PIII son potentes toxinas hemorrágicas por sus dominios Desintegrina, y Dis-Like (similares a desintegrinas) ricos en Cisteína respectivamente y están asociadas a hemorragia sistémica, debido a que sus dominios no son fácilmente inhibidos por $\alpha 2$ -macroglobulina (Rucavado et al., 1995).

CONCLUSIONES

Las actividades biológicas determinadas para el veneno estudiado de la especie *Bothrocophias campbelli* de Nariño (Colombia), son semejantes a las determinadas para *B. campbelli* de Ecuador. Las variaciones en las dosis mínimas de los diferentes ensayos biológicos entre estas dos poblaciones se atribuyen a la variación intraespecífica de los venenos, característica observada en diferentes especies de del género *Bothrops*.

Se confirman los leves efectos hemorrágico y coagulante y las fuertes actividades edematizante y miotóxica, los cuales se podrían explicar por una baja abundancia de metaloproteasas y serina proteasas de tipo trombina y por la alta abundancia de fosfolipasas miotóxicas respectivamente con base en el proteoma reportado para la especie en Ecuador. Esto sugiere que el cuadro clínico de envenenamiento ocasionado por *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño, podría caracterizarse por hemorragia escasa, leves trastornos en la cascada de coagulación y, por el contrario, mionecrosis y edema fuertes que podrían dar lugar a síndrome compartimental y gangrena.

Se determinó por primera vez las actividades de este estudio para la especie *Bothrocophias campbelli* en Nariño, así como la dosis edematizante mínima y la dosis miotóxica mínima para el veneno de la especie *Bothrocophias campbelli* en general dosis edematizante mínima y la dosis miotóxica mínima para el veneno de *Bothrocophias campbelli* y al igual que la mayoría de los venenos bothrópicos, principalmente del género *Bothrops*, el veneno de esta especie tiene una actividad edematizante y miotóxica muy fuerte.

Los efectos histopatológicos producidos por el veneno de *B. campbelli* en músculo estriado son coherentes con la cuantificación de actividad de CK en plasma. A bajas dosis de veneno la acción inflamatoria con infiltrados polimorfonucleares neutrófilos se hace evidente y la desorganización de miofibrillas musculares sugiere daño en la actina y miosina de las fibras.

Los signos de envenenamiento producidos por el veneno de *Bothrocophias campbelli* en los ensayos *in vivo* fueron similares a los observados en especies con características proteómicas similares como *Bothrops colombiensis* y *Bothrops venezuelensis*. Lo anterior es un ejemplo más de la congruencia entre el proteoma y los efectos locales y sistémicos producidos por los componentes del veneno en modelos murinos, lo cual permite comprender los signos y síntomas observados durante el envenenamiento y minimizar consecuencias fatales como se ha reportado para *Bothrocophias colombianus* (*comp. pers.* Santiago Ayerbe).

RECOMENDACIONES

Colectar venenos de otros individuos de *Bothrocophias campbelli*, para caracterizarlos y determinar la variación intraespecífica del veneno para la población de esta especie en el departamento Nariño (Colombia).

Es importante determinar efectos biológicos adicionales, tales como la actividad dermonecrotizante y desfibrinogenante, con el fin de profundizar y entender gran parte de los efectos locales y sistémicos producidos por el veneno de *B. campbelli* en caso de accidente ofídico.

Determinar el potencial de neutralización de los sueros antiofídicos disponibles en el Instituto departamental de Salud en Nariño para el tratamiento de envenenamientos de tipo bothrópico frente al veneno de *Bothrocophias campbelli*, con el objetivo de verificar la efectividad en el tratamiento clínico y brindar una mejor atención primaria, disminuyendo secuelas graves.

Con base en el proteoma determinado para la especie en Ecuador y con el análisis de las actividades biológicas desarrolladas en este estudio, resulta interesante comprender la acción de las PLA₂ miotóxicas sobre las membranas celulares, desarrollando investigaciones que permitan conocer los sitios de reconocimiento de estas proteínas, mecanismos de acción particulares, entre otros, que permitan aprovechar dichos mecanismos de acción a nivel biotecnológico y evaluar su potencial terapéutico.

Comparar los perfiles toxinológicos y proteómicos de *B. campbelli* con otras especies del género. Reconocer este tipo de variación interespecífica del veneno no solo aporta al entendimiento de la historia evolutiva de las especies, sino también al contexto clínico como se ha descrito en diferentes investigaciones.

REFERENCIAS

- Acosta de Pérez, O. C., Koscienczuck, P., Teibler, P., Sanchez Negrette, M., Ruiz, R., Maruñak, S., & Bogarín, G. (1998). Actividades hemorrágicas y edematizante y alteraciones histológicas en almohadilla plantar del ratón inducidas por venenos de serpientes de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* de Argentina. *Toxicon*, 36(8), 1165–1172.
- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., & Calvete, J. J. (2008). Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. *Proteome*, 3556–3571.
- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., & Calvete, J. J. (2008). Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. *Journal of Proteome Research*, 7, 3556–3571. <https://doi.org/10.1021/pr800332p>
- Alencar, L. R. V., Quental, T. B., Graziotin, F. G., Alfaro, M. L., Martins, M., Venzon, M., & Zaher, H. (2016). Diversification in vipers: Phylogenetic relationships, time of divergence and shifts in speciation rates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 105, 1–36. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.07.029>
- Ayerbe-González, S. (2008). Ofidismo en Colombia, Enfoque, Diagnostico y Tratamiento. In *Cuidado Intensivo y Trauma* (Primera ed, pp. 757–769). Editorial Medica.
- Ayerbe-González, S. (2009a). Ofidismo en Colombia, Enfoque, Diagnostico y Tratamiento. In *Cuidados Intensivos y Trauma* (Primera ed, pp. 1143–1167). Editorial Medica.
- Ayerbe-González, S. (2009b). OFIDISMO EN COLOMBIA. ENFOQUE, DIAGNOSTICO y TRATAMIENTO. In C. A. Ordóñez D., R. Ferrada, & R. Buitrago (Eds.), *Cuidado intensivo y trauma* (Segunda ed, p. 1304).
- Ayerbe-González, S., & Latorre-Ledezma, J. P. (2009). *Manual para la prevención y mejoramiento en la atención del paciente con accidente ofídico*, 1 - 39. Popayán.
- Ayerbe González, S., & Rodríguez Buitrago, J. R. (n.d.). Accidentes por Animales Venenosos y Plantas Tóxicas: Accidente Ofídico Bothrónico. Retrieved from <https://encolombia.com/medicina/guiasmed/u-toxicologicas/accidente-ofidico-bothropico/>
- Barraviera, B., Coelho Rabaello, K. Y., Curi, P. R., & Meira, D. A. (1995). Liver dysfunction in patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) snakes in Botucatu (state of Sao Paulo, Brazil). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 37(1), 63–69.
- Benavides, F., & Guenet, J.-L. (2001). MODELOS MURINOS DE ENFERMEDADES HUMANAS. *MEDICINA*, 61(2), 215–231.
- Bergillos Gasión, F., & Rivas Fernández, M. A. (2013). *Toxinología clínica. Lesiones por picaduras y mordeduras de animales*. (Bubok Publishing S.L., Ed.) (TOMO I). Barcelona, España: Impreso en España. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=BZMIWtbjav8C&printsec=frontcover&dq=TO>

XINOLOGIA+CLINICA.+LESIONES+POR+PICADURAS+Y+MORDEDURAS+D
E+ANIMALES&hl=es-
419&sa=X&ved=0ahUKEwjevH4p7rgAhVBj1kKHaqxCC0Q6AEIKTAA#v=onepa
ge&q=TOXINOLOGIA CLINICA. LESIONES POR PICADU

- Boback, S. M., McCann, K. J., Wood, K. A., McNeal, P. M., Blankenship, E. L., & Zwemer, C. F. (2015). Snake constriction rapidly induces circulatory arrest in rats. *The Company of Biologists*, 218, 2279–2288. <https://doi.org/10.1242/jeb.121384>
- Boldrini-França, J., Cologna, C. T., Pucca, M. B., Bordon, K. de C. F., Amorim, F. G., Anjolette, F. A. P., ... Arantes, E. C. (2017). Minor snake venom proteins: Structure, function and potential applications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861(4), 824–838. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.12.022>
- Buitrago, R., & Gómez Marín, J. E. (2002). Fosfolipasas A2 Y su importancia clínica, 50(1), 26–35.
- Calvete, J. J., Borges, A., Segura, Á., Flores-Díaz, M., Alape-Girón, A., Gutiérrez, J. M., ... Sanz, L. (2009). Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. *Journal of Proteomics*, 72(2), 227–240. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.005>
- Campbell, J., & Lamar, W. (2004). *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. The Herptile*. New York: Cornell University.
- Cañas Dávila, C. A. (2013). Mordeduras Por Serpientes Venenosas En El Valle Del Cauca. *CARTA de La Salud*, 203(1900–3560), 4. Retrieved from <http://www.valledellili.org/sites/default/files/files/cata-de-la-salud-junio-2013.pdf>
- Carrasco, P. A., Mattoni, C. I., Leynaud, G. C., & Scrocchi, G. J. (2012). Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zoologica Scripta*, 41(2), 109–124. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2011.00511.x>
- Carrillo, E., Aldás, S., Altamirano, M., Ayala, F., Cisneros, D., Endara, A., ... Zárate, P. (2005). *Lista roja de los reptiles del ecuador* (Edwin Carr). pp 19. Quito, Ecuador: Fundación Novum Milenium, UICN-Sur, UICN-Comité Ecuatoriano, Ministerio de Educación y Cultura. Serie Proyecto PEEPE. Quito.
- Castro, F., Ayerbe, S., Calderón, J. J., & Cepeda, B. (2005). Nuevo registro para Colombia de *Bothrocophias campbelli* y notas sobre *B . colombianus* y *B . myersi* (serpentes : Viperidae). *Novedades Colombianas*, 8(1), 1–9.
- Castro, H. C., Zingali, R. B., Albuquerque, M. G., Pujol-Luz, M., & Rodrigues, C. R. (2004). Snake venom thrombin-like enzymes: From reptilase to now. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(7–8), 843–856. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3325-z>
- Castro, O., Gutiérrez, J. M., Barrios, M., Castro, I., Romero, M., & Umaña, E. (1999). Neutralización del efecto hemorrágico inducido por venenos de *Bothrops asper*

- (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Rev. Biol. Trop.*, 47(3), 605–615.
- Centro de Investigación. Hospital General Universitario de Valencia. (1990). La Eutanasia en los Animales de Laboratorio. *Research In Surgery*, 5, 45–56.
- Chia, R., Achilli, F., Festing, M. F. W., & Fisher, E. M. C. (2005). The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nature Genetics*, 37(11), 1181–1186. <https://doi.org/10.1038/ng1665>
- Chippaux, J.-P., Williams, V., & White, J. (1991). Snake Venom Variability : Methods of Study , Results and Interpretation. *Toxicon*, 29(11), 1279–1303.
- Chippaux, J., Williams, V., & White, J. (1991). Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*. Geographic, individual, and ontogenetic variations. *Toxicon*, 29(11), 1279–1303.
- Cisneros-Heredia, D. F., Borja, M. O., Proaño, D., & Touzet, J.-M. (2006). Distribution and natural history of the Ecuadorian Toad-headed Pitvipers of the genus *Bothrocophias* (Squamata: Serpentes: Viperidae: Crotalinae). *HERPETOZOA*, 19, 17–26. Retrieved from www.biologiezentrum.at
- Cuellar-Gordo, L. C., Amador-Orozco, B., Olivares-Goenaga, G., Borré-Ortiz, Y. M., & Pinedo-Otálvaro, J. (2015). Comportamiento epidemiológico del accidente ofídico en el Departamento del Magdalena, Colombia (2009-2013). *Ciencias de La Salud*, 14(2), 161–177.
- Dennis, E. A. (1994). Diversity of Group Types, Regulation, and Function of Phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry*, 269(18), 13057–13060. <https://doi.org/8175726>
- Dennis, E. A. (1997). The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(1), 1–2. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(96\)20031-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(96)20031-3)
- Derenzo, L. (1977). *Mathematical computing* (Vol. 31). *cit in*. Rodríguez Aguayo, L. H. (2010). Métodos estadísticos en microbiología y ensayos biológicos. (COMUNICACIONES Y RR. PP. ISP, Ed.), Instituto de Salud Pública de Chile. Gobierno de Chile: Ministerio de Salud.
- Duque-Zerpa, C. T., & Vargas, A. (2015). CARACTERIZACIÓN TOXINOLÓGICA DEL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops colombiensis* DE PARACOTOS, ESTADOS MIRANDA, VENEZUELA. *Revista Científica FCV-LUZ*, XXV(3), 239–247.
- Duque Osorio, J. F., Sánchez, A., Fierro, L., Garzón, S., & Castaño, R. S. (2007). Venenos de serpientes y moléculas antiveneno. *Revista Académica Colombiana de Ciencias*, 31(118), 109–137.
- Escalante, T., Rucavado, A., Fox, J. W., & Gutiérrez, J. M. (2011). Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Journal of Proteomics*, 74(9), 1781–1794. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.03.026>

- Fenker Antunes, J. (2012). *Diversidad Filogenética, Distribución Geográfica e Prioridades de Conservación en Jararacas Sulamericanas (Serpentes: Viperidae: Bothrops e Bothrocophias)*. Universidade de Brasília.
- Fenwick, A. M., Gutberlet Jr, R. L., Evans, J. A., & Parkinson, C. L. (2009). Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers , genera Bothrops , Bothriopsis , and Bothrocophias (Serpentes : Viperidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 156, 617–640.
- Finney, D. J. (1952). *Statistical Method in Biological Assay*. Charles Griffin & Co. Ltd.
- Franco, F. (2003). Origem e Diversidade das Serpentes. En: Cardoso. Animais peçonhentos no Brasil: biologia. *Clínica e Terapêutica Dos Acidentes*, 13–32.
- Fry, B. G., & Wüster, W. (2004). Assembling an Arsenal: Origin and Evolution of the Snake Venom Proteome Inferred from Phylogenetic Analysis of Toxin Sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 21(5), 870–883. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh091>
- Fry, Bryan G., Roelant, K., Champagne, D. E., Scheib, H., Tyndall, J. D. ., King, G. F., ... Rodríguez de la Vega, R. C. (2009). The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10(1), 483–511. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164356>
- Furukawa, Y., & Hayashi, K. (1977). FACTOR X CONVERTING AND THROMBIN-LIKE ACTIVITIES OF BOTHROPS JARA RAGA SNAKE VENOM. *Toxicon*, 15, 107–114.
- Girón, M. E., Salazar, A. M., Aguilar, I., Pérez, J. C., Sánchez, E. E., Arocha-Piñango, C. L., ... Guerrero, B. (2008). Hemorrhagic, coagulant and fibrinolytic activities of crude venom and fractions from mapanare (Bothrops colombiensis) snakes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 147(1), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.09.001>
- Global Snakebite Initiative. (2018). Working to save lives in the world's poorest communities. pp. 1-300.
- Guo, C., Liu, S., Yao, Y., Zhang, Q., & Sun, M. (2012). Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase Chunmei. *Toxicon*, 60, 302–311. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.05.001>
- Gutiérrez, J. M. (2002). Comprendiendo los venenos de serpientes : 50 años de investigaciones en América Latina. *Rev. Biol. Trop.*, 50(2), 377–394.
- Gutiérrez, J. M., & Chaves, F. (1979). Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes Costarricenses de los generos Bothrops, Crotalus y Lachesis. *Toxicon*, 18, 315–321.
- Gutiérrez, J. M., Escalante, T., Rucavado, A., & Herrera, C. (2016). Hemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteinases : A Journey of Discovery and Understanding. *Toxins*, 8(93), 1–19. <https://doi.org/doi:10.3390/toxins8040093>

- Gutiérrez, J. M., & Lomonte, B. (1989). Local tissue damage induced by Bothrops snake venoms. A review. *Memorias Del Instituto Butantan*, 4(51), 211–223. Retrieved from <http://repositorio.ucr.ac.cr/handle/10669/29158>
- Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., Chaves, F., Moreno, E., & Cerdas, L. (1986). Pharmacological activities of a toxic Phospholipase A isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 84C(I), 159–164.
- Gutiérrez, J. M., Rojas, G., Lomonte, B., Gené, J. A., & Cerdas, L. (1986). Comparative study of the edema-forming activity of costa rican snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. *Camp. Biochem. Physiol*, 85c(1), 171–175.
- Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., Escalante, T., & Díaz, C. (2005). Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: Biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*, 45, 997–1011.
- Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., Solano, G., Lomonte, B., Herrera, M., Segura, Á., ... León, G. (2015). Métodos para el estudio de actividades tóxicas de venenos de serpientes. In *Estrategias y Avances en el Estudio de Toxinas de Interés para la Biomedicina* (Primera Ed, pp. 19–45). México: BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA.
- Gutiérrez, J. M., Williams, D., Fan, H. W., & Warrell, D. A. (2010). Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*, 56, 1223–1235. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.020>
- Gutiérrez, Y., & Bacca, T. (2013). Phasmatodea (insecta) de la Reserva Natural Río Ñambí, Nariño, Colombia. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 18(1), 210–221.
- Gutiérrez Zamora, A., Carrillo Chica, E., & Rojas Nossa, S. V. (2004). *Guía ilustrada de los Colibríes de la reserva Natural Río Ñambí* (Primera Ed). 1-10. Bogota, Colombia: FPAA, FELCA, ECOTONO.
- Hansdak, S. G., Lallar, K. S., Pokharel, P., Shyangwa, P., Karki, P., & Koirala, S. (1998). A clinico-epidemiological study of snake bite in Nepal. *Tropical Doctor*, 28, 223–226.
- Hargreaves, A. D., Swain, M. T., Hegarty, M. J., Logan, D. W., & Mulley, J. F. (2014). Restriction and Recruitment — Gene Duplication and the Origin and Evolution of Snake Venom Toxins. *Genome Biol. Evol*, 6(8), 2088–2095. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu166>
- INS. (2015). *Boletín Epidemiológico numero 52 de 2015. Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Instituto Nacional de Salud INS*. Retrieved from <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/BoletnEpidemiologico/2015BoletinEpidemiologicoSemana52.pdf>
- INS. (2016). *Boletín Epidemiológico numero 52 de 2015. Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública. Instituto Nacional de Salud INS* (Vol. 52).
- INS. (2017). *Boletín Epidemiológico Semanal Semana 52 2017 (Semana epi). Instituto Nacional de Salud INS*. Retrieved from <http://www.ins.gov.co/buscador->

eventos/BoletinEpidemiologico/2017 Boletín epidemiológico semana 52.pdf

- INS. (2018a). *Accidente ofídico, Semana epidemiológica 46 11 al 17 de Noviembre. de 2018.*
- INS. (2018b). *Semana epidemiológica 52 de 2018. Instituto Nacional de Salud.* Retrieved from www.ins.gov.co
- Instituto Clodomiro Picado. (2007). Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos. *Manual de Métodos de Laboratorio.* Costa Rica: Facultad de Microbiología, pp 1 -28. Universidad de Costa Rica.
- Jenkins, T. P., Sánchez, A., Segura, Á., Vargas, M., Herrera, M., Stewart, T. K., ... Gutiérrez, J. M. (2017). An improved technique for the assessment of venom-induced haemorrhage in a murine model. *Toxicon*, *139*, 87–93.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.005>
- Jiménez-Charris, E., Montealegre-Sanchez, L., Solano-Redondo, L., Mora-Obando, D., Camacho, E., Castro-Herrera, F., ... Lomonte, B. (2015). Proteomic and functional analyses of the venom of *Porthidium lansbergii lansbergii* (Lansberg's hognose viper) from the Atlantic Department of Colombia. *Journal of Proteomics*, *114*, 287–299.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.11.016>
- Jiménez Porras, J. M. (1963). *Bioquímica, Farmacología y fisiopatología de los venenos de serpientes.* Catedrático de la Universidad de Costa Rica y Director del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina.
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A. R., De Silva, N., Gunawardena, N. K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., ... De Silva, H. J. (2008). The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Medicine*, *5*(11), 1591–1604.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050218>
- Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H., & Murata, R. (1960). Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. *Jap. J. M. Sc. & Biol.*, *13*, 43–51.
- Kuch, U. (2000). *Bothrops campbelli* (Campbell's Lancehead). Diet and reproduction. *Herpetological Review*, *31*(1), pag: 45.
- Lakhotia, M., Kothari, D., Choudhary, D. R., Sharma, S., & Jain, P. (2002). A Case of Saw Scale Viper Snakebite Presenting as. *Indian Academy of Clinical Medicine*, *3*(4), 392–394.
- León Nuñez, L. J. (2015). *Informe final del evento accidente ofídico, Colombia, 2015.* Instituto Nacional de Salud.
- Lomonte, B., Angulo, Y., & Calderón, L. (2003). An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*, *42*(8), 885–901.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.008>

- Lomonte, B., Escolano, J., Fernández, J., Sanz, L., Angulo, Y., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2008). Snake venomomics and antivenomics of the arboreal neotropical pitvipers *Bothriechis lateralis* and *Bothriechis schlegelii*. *Journal of Proteomics*, *114*(6), 2445–2457. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.11.011>
- Lomonte, B., Tarkowski, A., & Hanson, L. Å. (1993). Host response to *Bothrops asper* snake venom: Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation*, *17*(2), 93–105.
- Lynch, J. D. (2012). El contexto de las serpientes de Colombia con un análisis de las amenazas en contra de su conservación. *Rev Acad Colomb Cienc Exactas Fis*, *36*(140), 435–449.
- Maldonado Martinez, M., Rodicio, J. L., & Herrera Acosta, J. (1993). *Tratado de Nefrología* (Segunda). Madrid: Ediciones Norma S. L.
- Manrique Chicoma, H. A. (2000). Ofidismo. *Ministerio de Salud*. Lima. 1 -57.
- Markland, F. S. (1998). Review paper snake venoms and the hemostatic system. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *36*(12), 1749–1800.
- Márquez Gómez, M. A., & Gómez Díaz, G. M. (2015). Accidente ofídico en el departamento de Sucre , Colombia. *NOVA*, *24*, 39–46.
- Martínez-Vargas, A. Z. (1990). QUIMICA Y FARMACOLOGIA DEL VENENO DE SERPIENTES (1 PARTE). *Revista de Química*, *IV*(1), 25–46.
- Maruñak, S. L., Ruíz de Torrent, R. M., Teibler, G. P., Gay, C. C., Leiva, L., & Acosta de Pérez, O. (2006). Acción del veneno de *Bothrops jararacussu* de Argentina sobre la coagulación sanguínea. *Vet. Corrientes, Argentina*, *8*(1), 119–128.
- Méndez A., R. M., & Moreno R., M. F. (2009). *Dosis letal 50 del venen de Bothrops venezuelensis y Bothrops Colombiensis (Serpientes, Viperidae) en ratones NMRI y BALBC*. Universidad de Oriente. pp 1 -109.
- Mendoza Roldán, J. S. (2015). El reto de la conservación de serpientes en Colombia. In *Apuntes científicos uniandinos* (Universida, pp. 37–47).
- Miján de la Torre, Al., Albarracín Serra, A., Alemany Lamana, M., Alonso Franch, M., Palomo Álvarez, B., Aranceta Bartrina, J., ... Cordero Guevara, J. A. (2002). *Técnicas y métodos de investigación en nutrición humana*. (C. Manrubia, Ed.) (Miján de l) pp 1765. Editorial Glosa. Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=qGA402PCFNsC&printsec=frontcover&dq=Técnicas+y+métodos+de+investigación+en+nutrición+humana&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjKrpIR4pjaAhXR0FMKHR7LBpEQ6AEIJzAA#v=onepage&q=Técnicas+y+métodos+de+investigación+en+nutrición+huma>
- Ministerio de la Protección Social. Ministerio De La Protección Social Resolución Número 2934 De 2004, Pub. L. No. DIARIO OFICIAL NO. 45.672 DE SEPTIEMBRE 15 DE 2004, 1 (2004). Bogotá, D.C.
- Monje Belmonte, S. (2007). *Determinación de la dosis letal media (DL50) de cinco*

especies del género Micrurus en estado de cautiverio en Nilo-Cundinamarca (Colombia). Universidad de la Amazonia. pp 1 - 98.

- Monje, S. (2007). *Determinación de la Dosis Letal Media (DL50) de cinco especies del género Micrurus en estado de cautiverio en Nilo – Cundinamarca (Colombia)*. Facultad Ciencias Básicas. Programa de Biología con énfasis en Biorecursos. Universidad de la Amazonía. *cit in* Mora-Obando; D. L. (2010). ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN PROTEICA DE; BARBACOAS (NARIÑO); EL TAMBO (CAUCA); DE LA COSTA PACÍFICA Y DEL CARIBE DE COST.
- Mora-Obando. (2010). *ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN PROTEICA DE LOS VENENOS DE Bothrops asper DE LA RESERVA NATURAL DE LAS AVES EL PANGAN, BARBACOAS (NARIÑO), EL TAMBO (CAUCA), DE LA COSTA PACÍFICA Y DEL CARIBE DE COSTA RICA Y Bothrops cf. asper DEL VALLE DEL PATÍA (CAUCA)*. Universidad de Nariño. pp 1-110.
- Mora-Obando. (2014). *CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA Y BIOLÓGICA DEL VENENO DE Bothrops ayerbei DEL SUROCCIDENTE COLOMBIANO Y ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA CATÁLISIS EN LA ACCIÓN DE LAS FOSFOLIPASAS A2 MIOTÓXICAS DE VENENOS BOTRÓPICOS*. Universidad de Costa Rica. pp 1 - 98.
- Mora-Obando, D., Fernández, J., Montecucco, C., Gutiérrez, J. M., & Lomonte, B. (2014). Synergism between basic Asp49 and Lys49 phospholipase A2 myotoxins of viperid snake venom in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, 9(10), 1–11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109846>
- Mora-Obando, D., Guerrero-Vargas, J. A., Prieto-Sánchez, R., Beltrán, J., Rucavado, A., Sasa, M., ... Lomonte, B. (2014). Proteomic and functional profiling of the venom of *Bothrops ayerbei* from Cauca, Colombia, reveals striking interspecific variation with *Bothrops asper* venom. *Journal of Proteomics*, 96, 159–172.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.11.005>
- Muñoz-Saba, Y., & Alberico, M. (2004). Mamíferos en el Chocó biogeografía. *Cit in*: J.O. Rangel-Ch. (ed.), *Diversidad Biótica IV. El chocó Biogeográfico/Costa Pacífica*. Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Ciencias Naturales, Conservación Internacional. Bogotá, D.C. pp.997. Retrieved from
<https://issuu.com/diversidadbiotica/docs/name0caa14>
- Munuera Mora, J. J. (2016). *Caracterización proteómica de venenos de serpientes de interés biomédico*. pp 1-27. UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA.
- Nakada, K., Nakada, F., Ito, E., & Inoue, F. (1984). Quantification of myonecrosis and comparison of necrotic activity of snake venoms by determination of creatine phosphokinase activity in mice sera. *Toxicon*, 22(6), 921–930.
- Navarrete Samora, M. B., Silva Suárez, W. H., & Vargas Mas, E. A. (2010). Las serpientes venenosas de importancia en la salud pública del Perú – The poisonous snakes of public health importance of Peru. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 11(7), 1–17.
- Núñez, V., Cid, P., Sanz, L., De la Torre, P., Angulo, Y., Lomonte, B., ... Calvete, J. J. (2009). Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia

- and the Amazon regions of Brazil , Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. *Journal of Proteomics*, 73(1), 57–78. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.07.013>
- OMS. (2013). Mordeduras de animales. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs373/es/>
- Ortiz, C., Lazo, F., Bellido, C., Gonzales, E., & Yarlequé, A. (2012). Variaciones en las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* “Jergón”, de tres zonas geográficas del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 29(2), 198–205.
- Otero-Patiño, R. (2014). Snake Bites in Colombia. *Clinical Toxicology*, 1–42. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6288-6_41-2
- Otero, R., Núñez, V., Barona, J., Díaz, A., & Saldarriaga, M. (2002). Características bioquímicas y capacidad neutralizante de cuatro antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum* de Antioquia y Chocó. *Iatreia*, 15(1), 5–15.
- Otero, R., Osorio, R. G., Valderrama, R., & Giraldo, C. A. (1992). Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Choco (Colombia). *Toxicon*, 30(5–6), 611–620.
- Otero, R., Tobón, G. S., Gómez, L. F., Osorio, R., Valderrama, R., Hoyos, D., ... Arboleda, J. J. (1992). Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. *Acta Médica Colombiana*, 17(4), 229–249.
- Otero, R., Valderrama, R., Osorio, R. G., & Posada, L. E. (1992). Programa de atención primaria del accidente ofídico. *IATREIA*, 5(2), 96–102.
- Pascual Guàrdia, S. (2015). *Caracterización del fenotipo muscular en la EPOC y sepsis en pacientes : Estructura fibrilar , Inflamación , Estrés oxidativo y Regeneración* . Universitat Pompeu Fabra. pp 1- 80.
- Pastrana, J., Blasco, R., Erce, R., & Pinillos, M. A. (2003). Picaduras y mordeduras de animales. *ANALES*, 26(1), 225–242. Retrieved from <http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v26s1/catorce.pdf>
- Peña, L. A., Arroyave, C. L., Aristizábal, J. J., & Gómez, U. E. (2010). *Fundamentos de Medicina, Toxicología clínica* (primera). Corporación para investigaciones Biológicas pp. 375.
- Pizzuto, J., Harker, L. A., & Marder, V. (1978). *Ciclos sobre el avance continuo de la medicina. Progresos recientes en hematología*. (J. Somolinos Palencia, J. Mata Ramón, J. L. Reynoso Obregón, & S. Sapiña Renard, Eds.). Mexico: Instituto mexicano del Seguro Social, Subdirección general médica, jefatura de los servicios de Enseñanza e Investigación. pp 145.
- Porcelli, S. A., & Modlin, R. L. (1999). The CD1 System: Antigen-Presenting Molecules for T Cell Recognition of Lipids and Glycolipids. *Immunol*, 17, 297–329.

- Quintana, J. C., Otero, R., Núñez, V., & Toro, F. (2000). Estudio de la variabilidad en el veneno de 2 poblaciones de *Bothriechis schlegelii* del suroeste y norte de Antioquia y correlación morfométrica. *Iatreia*, 13(2) pp. 56- 58. Retrieved from <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/iatreia/article/view/3766>
- Renjifo-Rios. (2017). *Especificación de la actividad neutralizante de extracto etanólico de Piper auritum (Kunth, 1816) Contra el veneno de Bothrops asper (Serpentes:Viperidae) de la población de la cuenca del río Cauca*. Universidad del Cauca. pp. 1 - 109
- River, C. (2008). Laboratories Research Models and Services. pp 1- 79.
- Rodríguez-Acosta, A., Monterrey, F., Céspedes, G., & Finol, H. (2003). Alteraciones estructurales y ultraestructurales del encéfalo ocasionados por veneno de la serpiente mapanare (*Bothrops colombiensis*). *Revista de Toxicología*, 20(3), 199–203.
- Rodríguez-Acosta, A., Salazar, A. M., Salazar, E., Sanchez, E. E., Giron, M. E., Aguilar, I., ... Guerrero, B. (2016). SISTEMA FIBRINOLÍTICO : MÉTODOS DE ESTUDIO Y HALLAZGOS EN VENENOS DE SERPIENTES DE LOS GENEROS Bothrops , Crotalus , Micrurus EN VENEZUELA. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela*, 28(4), 666–705. Retrieved from <http://www.scielo.org.ve/pdf/saber/v28n4/art03.pdf>
- Rodríguez-Guerra, A. (2010a). *Bothrocophias campbelli*. Retrieved March 31, 2018, from <https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Bothrocophias campbelli>
- Rodríguez-Guerra, A. (2010b). *Bothrocophias microphthalmus*. Retrieved March 31, 2018, from <https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Bothrocophias microphthalmus>.
- Rodríguez-Vargas, A. L. (2012). Comportamiento general de los accidentes provocados por animales venenosos en Colombia, 2006-2010. *Revista Salud Pública*, 14(6), 1005–1013.
- Rodríguez Aguayo, L. H. (2010). *Métodos estadísticos en microbiología y ensayos biológicos*. (COMUNICACIONES Y RR. PP. ISP, Ed.), *Instituto de Salud Pública de Chile*. Gobierno de Chile: Ministerio de Salud. pp 1 - 120.
- Rucavado, A., Lomonte, B., Ovadia, M., & Gutiérrez, J. M. (1995). Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. *Experimental and Molecular Pathology*, 63, 186–199.
- Salaman, P. G. W. (2001). *The study of an understorey avifauna community in an Andean premontane pluvial forest*. Wolfson College, University of Oxford. cit in. Gutiérrez, Y., & Bacca, T. (2013). Phasmatodea (insecta) de la Reserva Natural Río Nambí, Nariño, Colombia. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 18(1), 210–221.
- Salazar-Valenzuela, D., Mora-obando, D., Fernández, M. L., Loaiza-lange, A., Gibbs, H. L., & Lomonte, B. (2014). Proteomic and toxicological profiling of the venom of *Bothrocophias campbelli*, a pitviper species from Ecuador and Colombia. *Toxicon*, 90, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.07.012>

- Sánchez, E. E., Girón, M. E., Uzcátegui, N. L., Guerrero, B., Saucedo, M., Cuevas, E., & Rodríguez-Acosta, A. (2014). Biochemical and biological characterisation of lancehead (*Bothrops venezuelensis* Sandner 1952) snake venom from the Venezuelan Central Coastal range. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental, LIV*(2), 138–149.
- Sanjuán-Galindez, J. A., Vargas, J. A., Ortiz, F. I., Gonzales-Herrera, L. G., Watanabe-Minto, B., & Granja-Salcedo, Y. T. (2012). Determinación de la DL50 del veneno de serpientes adultas de la especie *Bothrops atrox* en ratones albinos. *Momentos de Ciencia, 9*(2), 147–152.
- Santos-gallego, C. G., Badimon, J. J., & Ibáñez, B. (2013). Modelos experimentales de aterosclerosis. *Revista Española de Cardiología Suplementos, 13*(5), 3–12. [http://doi.org/10.1016/S1131-3587\(13\)70087-6](http://doi.org/10.1016/S1131-3587(13)70087-6)
- Schoell, A. R., Heyde, B. R., Weir, D. E., Chiang, P.-C., Hu, Y., & Tung, D. K. (2009). Euthanasia method for mice in rapid time-course pulmonary pharmacokinetic studies. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS, 48*(5), 506–511. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19807971> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2755020>
- Scrocchi, G., & Kretzschmar, S. (1996). Guía de métodos de captura y preparación de anfibios y reptiles para estudios científicos y manejo de colecciones herpetológicas. *Miscelanea 102*, pp 1 - 44.
- Sevilla-Sánchez, M.-J., Mora-Obando, D., Calderón-Leytón, J. J., Guerrero-Vargas, J. A., & Ayerbe-González, S. (2019). Accidente ofídico en el departamento de Nariño, Colombia: análisis retrospectivo (2008-2017). *Biomedica, 39*(4) pp 1 - 50. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i4.4830>
- Silva de Oliveira, L., Souza Araújo, I., da Costa Prudente, A. L., de Fraga, R., Pinheiro de Almeida, A., & Cordeiro Ascenso, A. (2018). New distributional records of the Toad-headed Pitviper *Bothrocophias hyoprora* (Amaral, 1935) in Brazil. *Amphibian & Reptile Conservation, 12*(1), 1–4.
- Soler, D., & Rodríguez, D. (2006). Aspectos toxinológicos y clínicos de la mordedura por serpientes venenosas en animales domésticos. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, 53*, 105–115.
- Sunagar, K., Fry, B. G., Jackson, T. N. W., Casewell, N. R., Undheim, E. A. B., Vidal, N., ... Antunes, A. (2013). Molecular Evolution of Vertebrate Neurotrophins : Co- Option of the Highly Conserved Nerve Growth Factor Gene into the Advanced Snake Venom Arsenal. *PLoS ONE, 8*(11), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081827>
- Swaroop, S., & Grab, B. (1954). Snakebite mortality in the world. *Bulletin of the World Health Organization, 10*(1), 35–76.
- Terán, M. del C., & 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.

- Theakston, R. D. G., & Reid, H. . A. (1983). Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms *. *The World Health Organization*, 61(6), 949–956.
- Uetz, P. (2018). The Reptile Database. Retrieved March 6, 2018, from <http://reptile-database.reptarium.cz/search?search=Bothrocophias&submit=Search>
- Uetz, P., & Hallermann, J. (2019). The Reptile Database. Retrieved June 24, 2018, from <http://reptile-database.reptarium.cz/>
- Vaca Guerrero, J. E. (2012). *BIOGEOGRAFÍA DEL GÉNERO BOTHROCOPHIAS (SERPENTES: VIPERIDAE: CROTALINAE), MEDIANTE MODELAMIENTOS DE NICHOS ECOLÓGICOS*. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR. pp 1- 89
- Valderrama, R. (2010). Animales ponzoñosos de Latinoamérica. *Biomédica*, 30(1), 5–9.
- Valdés Rodríguez, Y. C., Bilbao Díaz, M., León Álvarez, J. L., & Merchán González, F. (2002). Origen e Importancia de la Fosfolipasa A2 de secreción. *Rev. Cubana Farmacología*, 2(36), 121–128.
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolayt, K., & Eppenberger, H. M. (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the “phosphocreatine circuit” for cellular energy homeostasis. *Biochem. J*, 281, 21–40.
- Warrell, D. A. (2004). Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management. In: *Campbell, J.A., Lamar, W.W. (Eds.), The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Cornell University Press, Ithaca, New York, Pp. 709 - 761.*
- Warrell, D. A. (2009). Review Commissioned article : management of exotic snakebites. *Q J Med*, 102, 593–601. Retrieved from <https://academic.oup.com/qjmed/article-abstract/102/9/593/1552793>
- Warrell, David A. (2010). Snake bite. *The Lancet*, 375, 77–88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61754-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61754-2)
- WHO. (1981). Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. *World Health Organization, Geneva*(58), 1–44.
- WHO. (2017). *Annex 5. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series, No. 964. WHO Technical Report Series.* pp. 1-5
- Zamunér, S. R., Da Cruz-Höfling, M. A., Corrado, A. P., Hyslop, S., & Rodrigues-Simioni, L. (2004). Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian Bothrops venoms and their neutralization by commercial antivenom. *Toxicon*, 44(3), 259–271. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.029>

ANEXOS

Anexo A. Formulario de consentimiento informado diseñado por María José Sevilla Sánchez para donantes de sangre periférica y aprobado por comité de ética de la Universidad de Nariño.

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN ECOLOGIA EVOLUTIVA - GIEE**

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONANTES DE SANGRE PERIFERICA

Este formulario de consentimiento informado se dirige a hombres y mujeres mayores de edad que de manera voluntaria deseen donar 15 ml de sangre para evaluar la actividad coagulante del veneno de *Bothrocophias campbelli*, actividad necesaria para el desarrollo de la investigación: "PERFIL TOXINOLÓGICO DEL VENENO DE LA VÍBORA BOCA DE SAPO *Bothrocophias campbelli* [FREIRE LASCANO, 1991] DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO, COLOMBIA"

Nombre del Investigador Principal: María José Sevilla Sánchez

Nombre de los Asesores: Diana Lorena Mora Obando, Jhon Jairo Calderón Leytón, Jimmy Alexander Guerrero Vargas y Santiago Ayerbe González

Nombre de la Organización: Universidad de Nariño

Entidad Financiadora: Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales (VIPRI)

A continuación, le brindaremos un breve resumen de la propuesta (Parte I) y posteriormente encontrará el formulario de consentimiento para complementar (Parte II).

PARTE I: INFORMACIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN

Nos gustaría invitarte a participar en un estudio científico que pretende evaluar algunas actividades biológicas del veneno de la víbora boca de sapo. Esta investigación se realizará en la Universidad de Nariño en cooperación con la Universidad del Cauca y contará con apoyo científico del Grupo de Investigación en Ecología Evolutiva y el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Nariño, así como del Grupo de Investigaciones Herpetológicas y Toxinológicas y el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca.

Particularmente, este estudio pretende evaluar la toxicidad y las actividades biológicas locales y sistémicas producidas por el veneno de *Bothrocophias campbelli*; de esta manera conoceremos la sintomatología que pueden presentar los pacientes envenenados por esta serpiente y brindaremos información a las entidades de salud pública para mejorar su tratamiento, lo que a futuro contribuirá con la disminución de las secuelas más graves.

Si no entiende, tiene dudas o necesita alguna aclaración en relación a la naturaleza del estudio no dude en preguntarnos, procuraremos despejar sus inquietudes. Recuerde que tampoco tiene que decidir hoy si desea participar en esta investigación, antes de decidirse puede hablar con alguien y/o consultar sobre el tema de investigación hasta que se sienta completamente seguro(a) de participar. Recuerde que su participación es voluntaria así

que es usted quien decide participar o no en ella sin que esto traiga ninguna consecuencia adversa.

La política de tratamiento y protección de sus datos personales se realizará según lo establecido por la ley 1581 de 2012 Decreto 1377 de 2013 por la cual se dictan disposiciones generales para la protección de datos personales y las normas que la complementan, modifican o adicionan.

Si decide participar entonces:

- Un técnico de laboratorio capacitado, tomará una muestra de sangre de aproximadamente 15 ml de su brazo. En el procedimiento se desinfectará la zona de toma de muestra, se realizará un pequeño pinchazo y se extraerá la sangre en un tubo vacutainer con anticoagulante; finalmente, se limpiará nuevamente la zona del pinchazo y se hará presión sobre el para estimular la coagulación.
- La muestra obtenida de sangre será procesada inmediatamente y se harán **exclusivamente las pruebas necesarias para esta investigación**. No se almacenará la muestra ni se utilizará para ningún propósito diferente al de esta investigación.

Riesgos: Se considera que el proyecto **NO** representa mayor riesgo para la salud humana debido a que la cantidad de sangre no supera la considerada como riesgo mínimo por el Ministerio de la Protección Social en la resolución 8430 de 1993. Sin embargo, en casos extremos se podría causar una pequeña perforación venosa que podría generar un hematoma (morado), que normalmente desaparece a los pocos días de la toma de muestra. Si hubiese una complicación adicional, puede acudir a nuestro laboratorio y se remitirá a un profesional de salud que se encargue de valorarlo y medicarlo si es necesario; en estos casos los gastos correrán por cuenta del proyecto de investigación.

A nivel ambiental, el proyecto es viable y no presenta impactos negativos para la salud humana. No hay riesgo para la salud de la población, debido a la cantidad mínima de residuos generados, no se esperan efectos adversos significativos sobre la cantidad y calidad de los recursos naturales renovables, incluidos el suelo, agua y aire. Todas las muestras serán manejadas de acuerdo con las normas establecidas por el decreto No. 2676 de diciembre 22 del 2000, por el cual se reglamenta la gestión de los residuos hospitalarios y similares, con el decreto 2811 de 1974 (Código Nacional de Recursos Naturales y de Protección al Medio Ambiente) y el decreto 4741 de 2005 del Ministerio del Medio Ambiente.

Molestias: Generalmente las molestias son menores, son similares a las que se presentan al tomar una muestra de sangre para análisis de laboratorios, esto incluye el pequeño dolor durante el pinchazo de la extracción de sangre, y eventualmente la formación de un pequeño hematoma (morado) que normalmente desaparece a los pocos días de la toma de muestra.

Beneficios: Al participar estaría contribuyendo en el desarrollo de conocimiento científico sobre esta víbora, la toxicidad de su veneno y los efectos que produce en las víctimas, adicionalmente los resultados podrían contribuir a futuro para mejorar el manejo de los pacientes afectados por este envenenamiento durante el tratamiento y consecuentemente salvar su vida.

persona y que no recibiré compensación económica alguna. Se me ha proporcionado el nombre de tres investigadores que pueden ser fácilmente contactados usando la dirección, el e-mail y el teléfono, por lo cual,

DECLARO:

Que he recibido toda la información clara y concreta en forma oral y escrita, por parte de María José Sevilla Sánchez, el día _____ del mes de _____ del año _____, sobre el trabajo de investigación: "PERFIL TOXINOLÓGICO DEL VENENO DE LA VÍBORA BOCA DE SAPO *Bothrocophias campbelli* [FREIRE LASCANO, 1991] DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO, COLOMBIA".

Me han advertido que, en el proceso de investigación, en ningún momento se hará público mi nombre y/o documento de identificación, salvaguardando la confidencialidad de la información suministrada y mi privacidad, como tampoco saldrán a la luz pública hechos relacionados que puedan identificarme y sobre los cuales se guardarán siempre y en todo el estudio, todas las reservas y discrecionalidades correspondientes.

Me han explicado y he comprendido satisfactoriamente la naturaleza y propósito del estudio aludido en el que se incluirá un total de _____ investigados y de las posibles implicaciones que podría tener, especialmente que no corro ningún riesgo. He podido preguntar mis inquietudes al respecto y he recibido las respuestas y explicaciones en forma satisfactoria. También se me ha informado de mi derecho a participar voluntariamente en la investigación y la posibilidad de retirarme sin ningún tipo de consecuencias, por lo tanto,

AUTORIZO:

Para que María José Sevilla Sánchez por medio de Beatriz Elisa Piamba Ruiz técnico de laboratorio, me realice la toma de muestra de sangre requerida para la investigación cuya información detallada precede a este consentimiento. Esta autorización se concede por el término de (4 meses) a partir del día de la firma del presente consentimiento.

El grupo investigador se compromete a informarme de los resultados globales o parciales de la investigación, y/o de los que de manera positiva o negativa puedan influenciar en mi estado social o de salud.

En constancia, se firma el presente documento, en dos copias, una para el investigador y otra para el investigado, con sus anexos (si los hay) en Popayán, a los _____ días del mes de _____ del año _____.

ORIGINAL FIRMADA

Nombre del participante

Firma y cédula del participante



Huella

Anexo B. Requisitos aceptados para investigaciones biomédicas con animales.

**VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES, POSTGRADOS Y RELACIONES
INTERNACIONALES
EVALUACIÓN Y APROBACIÓN ÉTICA DE PROYECTOS
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN**

REQUISITOS ESPECIALES

DE LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA CON ANIMALES

En el caso de investigación con animales se deberá tener en cuenta la Ley 84 de 1989 y la Ley 1774 de 2016, lo siguiente:

- 1 ¿Se indica que la experimentación de animales se realiza después de estudiar su importancia para la salud humana o animal y para el avance del conocimiento biológico? Si X No
- 2 ¿Se señala que los animales seleccionados para la experimentación deben ser de una especie y calidad apropiada y que utilizará el número requerido para obtener resultados científicamente válidos y en condiciones sanitarias vigentes? Si X No
- 3 ¿Se señala que los investigadores trataran a los animales como seres sensibles, uso apropiado y evitaran o minimizaran del discomfort, la angustia y el dolor? Si X No
- 4 ¿En caso de eutanasia, se indica que se efectuará con anestésicos apropiados, aprobados por la asociación veterinaria? (si aplica) Si X No
- 5 ¿Se indica las medidas de seguridad establecidas en el Artículo 93 de la resolución 8430 de 1993? Si X No

Anexo C. Convenio institucional entre Universidad de Nariño y Universidad del Cauca.

CONVENIO DE COLABORACION ACADÉMICA, CIENTÍFICA Y CULTURAL, ENTRE LA UNIVERSIDAD DEL CAUCA Y LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO.

Entre los suscritos, HERNAN OTONIEL FERNANDEZ ORDÓÑEZ, mayor de edad, identificado con la cédula de ciudadanía número 10.513.444, expedida en Popayán, en su carácter de Rector de la Universidad del Cauca, y por lo mismo, como representante legal de este establecimiento Público Nacional de una parte, quien para efectos de este documento se denominará U.D.C. y, de otra, EFREN CORAL QUINTERO, también mayor de edad, identificado con la cédula de ciudadanía No. 5'199.650 expedida en Pasto, en su calidad de Rector de la Universidad de Nariño, y por lo mismo, representante legal de dicha institución, y que en adelante se llamará UNIVERSIDAD DE NARIÑO, celebramos el presente convenio, previas las siguientes

CONSIDERACIONES.

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

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

CLAUSULAS:

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

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

LA UNIVERSIDAD DEL CAUCA

HERNAN OTONIEL FERNANDEZ

Rector



UNIVERSIDAD DE NARIÑO

WILSON CORAL QUINERO

Rector



Anexo D. Permiso para la realización del proyecto en el Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBUC) de la Universidad del Cauca.



UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS-BIOTERIO



CIBUC-006

Popayán, 12 de junio de 2018

A QUIEN CORRESPONDA

Cordial saludo,

Por medio de la presente informo que el trabajo de grado titulado **Perfil toxinológico del veneno de la víbora boca de sapo *Bothrocophias campbelli* [Freire Lascano, 1991] del departamento de Nariño, Colombia**, a cargo de la estudiante María José Sevilla Sánchez con código estudiantil 2120951254, adscrita al programa de Biología de la Universidad de Nariño, cuenta con autorización del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca (CIBUC-Bioterio) para ejecutar toda la fase experimental en nuestras instalaciones, donde contará con la asesoría constante de profesionales idóneos.

Sin otro particular y agradeciendo la atención prestada.

Universitariamente.

Jimmy Alexander Guerrero Vargas, PhD
Profesor Departamento de Biología
Coordinador CIBUC-Bioterio
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación
Universidad del Cauca

Sede en la vereda las Guacas Facultad de Ciencias Agrarias.
Correspondencia en el sector Tulcán – Edificio Antiguo Liceo.
Departamento de Biología
Tel: +57 2 8209800 Ext. 2386
Popayán – Colombia.



I-QNet ISO 9001:2008



ISO 9001:2008



NTC OF 1000:2009

Anexo E. Determinación de la Dosis letal 50 del veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño.

Tabla 1. Distribución de Log normal obtenida para la determinación de la Dosis letal 50 del veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño. Método de Finney – Análisis Probit.

Log10[Dosis (Estímulo)]	Porcentaje Actual (%)	Porcentaje Probit (%)	N	R	E(R)	Diferencia	Chi cuadrado
1.982	0.063	0.045	4	0.25	0.1784	0.0716	0.0288
2.079	0.250	0.229	4	1	0.9155	0.0845	0.0078
2.176	0.750	0.585	4	3	2.3399	0.6601	0.1862
2.273	0.750	0.879	4	3	3.5174	-0.5174	0.0761
2.370	0.938	0.983	4	3.75	3.9335	-0.1835	0.0086
Chi cuadrado	0.307						
Grados de Libertad	3						
nivel p	0.959						

Tabla 2. Percentiles para el cálculo de la Dosis letal 50 del veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño.

Percentil	Probit (Y)	Log10[Dosis (Estímulo)]	Error Estándar	Dosis (Estímulo)	Error Estándar	LCL	UCL
1	2.67	1.92	0.18	82.94	35.73	20.94	108.00
5	3.35	1.99	0.13	97.23	30.60	35.66	120.12
10	3.72	2.02	0.11	105.83	27.20	47.15	127.75
16	4.01	2.05	0.09	113.16	24.26	58.51	134.76
20	4.16	2.07	0.08	117.26	22.67	65.46	139.02
25	4.33	2.09	0.07	121.93	20.97	73.77	144.31
30	4.48	2.10	0.07	126.27	19.57	81.81	149.81
40	4.75	2.13	0.06	134.51	17.71	97.19	162.59
50	5.00	2.15	0.05	142.68	17.46	111.42	179.77
60	5.25	2.18	0.06	151.35	19.33	124.13	204.54
70	5.52	2.21	0.06	161.22	23.86	135.51	241.57
75	5.67	2.22	0.07	166.96	27.37	140.99	267.29
80	5.84	2.24	0.08	173.60	31.99	146.60	300.70
84	5.99	2.26	0.09	179.90	36.84	151.42	336.03
90	6.28	2.28	0.11	192.37	47.42	159.95	416.43
95	6.65	2.32	0.13	209.38	63.56	170.28	549.97
99	7.33	2.39	0.18	245.44	102.76	189.57	935.92

Tabla 3. Estadísticos de la regresión en Log_{10} obtenida para el cálculo de la Dosis letal 50 del veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño.

LD50	142.6792431	LD50 Error Estándar	17.45557383
LD50 LCL	111.42	LD50 UCL	179.77
Log10[LD50]	2.154360797	Error Estándar	0.053000524
Beta	9.876846505	Intercepto	-16.27829091
Beta Error Estándar	3.572659332		

Anexo F. Determinación de la Dosis Coagulante Mínima (DCM) del veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño.

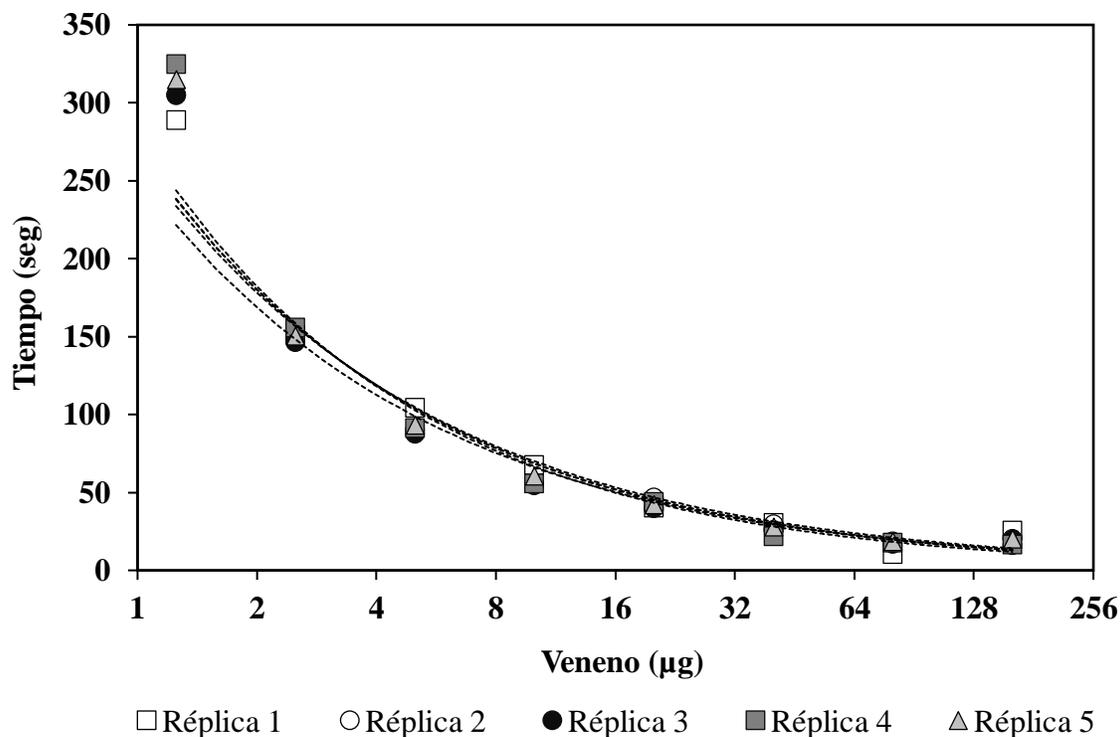


Figura 1. Curvas dosis-respuesta para la determinación de la Dosis Coagulante Mínima (DCM) de *Bothrocophias campbelli*, del departamento de Nariño. Cada marcador representa los ensayos realizados con sus respectivas líneas de tendencia. Réplica 1: $y=271.9x^{-0.597}$ $R^2=0.882$; Réplica 2: $y=252.31x^{-0.582}$ $R^2=0.947$; Réplica 3: $y=272.65x^{-0.6}$ $R^2=0.977$; Réplica 4: $y=280.24x^{-0.623}$ $R^2=0.962$; Réplica 5: $y=266.07x^{-0.58}$ $R^2=0.958$.

Tabla 1. Cálculos para determinar la dosis coagulante mínima (DCM) a partir de las ecuaciones de regresión potencial de 5 experimentos cuando $Y=60$.

Curva	m	b	Veneno (μg)
1	271.9	-0.597	12.6
2	252.31	-0.582	11.8
3	272.65	-0.6	12.5
4	280.24	-0.623	11.9
5	266.07	-0.58	13.0
Promedio			12.3
Desviación estándar			0.5

Anexo G Determinación de la Dosis Edematizante Mínima (DEM) del veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño.

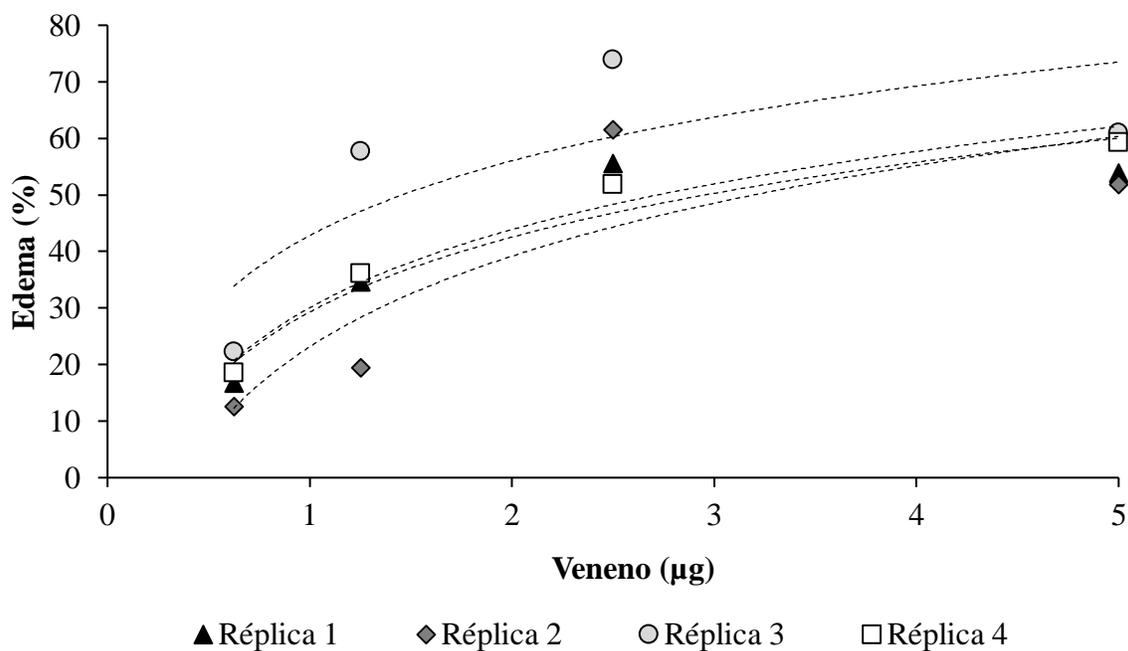


Figura 1. Curvas dosis-respuesta para la determinación de la Dosis Edematizante Mínima (DEM) del veneno *Bothrocophias campbelli*, del departamento de Nariño. Cada marcador representa los ensayos realizados con sus respectivas líneas de tendencia. Réplica 1: $y=19.113\ln(x) + 29.282$ $R^2= 0.871$; Réplica 2: $y=19.067\ln(x) + 42.811$ $R^2= 0.741$; Réplica 3: $y=23.118\ln(x) + 23.141$ $R^2= 0.5954$; Réplica 4: $y=19.92\ln(x) + 30.059$ $R^2= 0.972$.

Tabla 1. Cálculos para determinar la dosis edematizante mínima (DEM) a partir de las ecuaciones de regresión logarítmica de 5 experimentos cuando $Y=30$.

Curva	m	b	Veneno (µg)
1	19.113	29.282	1.0
2	19.067	42.811	0.5
3	23.118	23.141	1.3
4	19.921	30.059	1.0
Promedio			1.0
Desviación estándar			0.3

Anexo H. Determinación de la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) del veneno de *Bothrocophias campbelli* del departamento de Nariño.

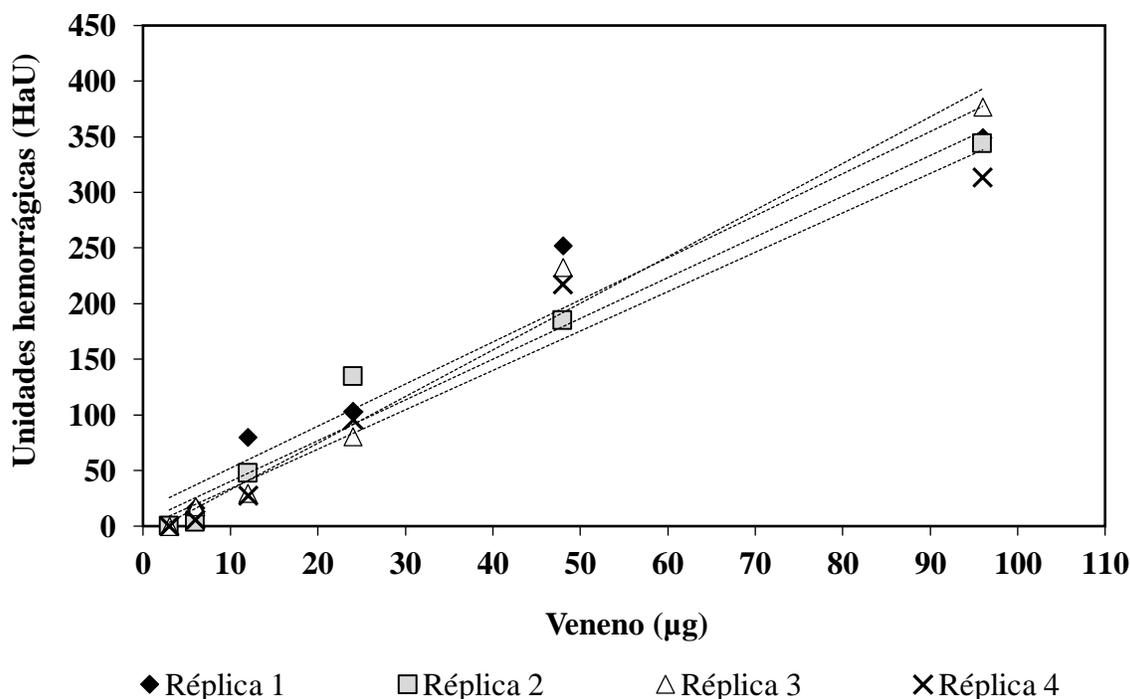


Figura 1. Curvas dosis-respuesta para la determinación de la Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) de *Bothrocophias campbelli*, del departamento de Nariño. Cada una de las rectas representa los ensayos realizados. Réplica 1: $y=3.782x + 14.274$ $R^2= 0.944$; Réplica 2: $y=4.190x - 9.212$ $R^2= 0.981$; Réplica 3: $y=3.540x - 1.646$ $R^2= 0.956$; Réplica 4: $y= 3.662x + 3.609$ $R^2= 0.969$.

Tabla 1. Cálculos para la determinación de la dosis hemorrágica mínima (DHM) con base en las ecuaciones de las rectas de los ensayos realizados con una $Y=50$ (unidad hemorrágica deseado).

Curvas	m	b	Veneno (µg)
1	3.78	14.21	9.46
2	4.19	-9.21	14.13
3	3.54	-1.65	14.59
4	3.66	3.61	12.67
Promedio			12.713
Desviación estándar			2.32