

Capítulo 3

Asesinos por naturaleza: Revisión de los caminos evolutivos de las víboras colombianas

Sergio D. Cubides-Cubillos, Mónica M. Saldarriaga-Córdoba, Jaime A. Pereañez, Teddy Angarita-Sierra

Resumen: Históricamente, las víboras conocidas comúnmente como mapaná, cascabel, verrugoso y patoco, han recibido mucha atención debido a su importancia médica, así como a la notable diversidad de sus venenos, formas y anatomía (p. ej., fosetas loreales con detección infrarroja, cascabeles y toxinas letales). Cientos de artículos y libros han sido publicados sobre las víboras del hemisferio occidental, consolidado un amplio y robusto marco conceptual que ha permitido comprenderlas. Sin embargo, la mayoría de estas contribuciones se han centrado en especies que habitan las zonas templadas del continente o en países tropicales como Brasil, Costa Rica y México. Esta disparidad ha limitado nuestra comprensión de la diversidad y endemismos de las víboras que habitan en regiones geográficamente complejas de América tropical, como lo es Colombia. Las víboras colombianas cuentan con fascinantes historias evolutivas, así como una asombrosa diversidad morfológica e intrincados patrones de distribución geográfica, que aún aguardan por ser comprendidos a profundidad. Actualmente, el veneno de las víboras colombianas y sus diversas formas tienen una importancia científica considerable, convirtiéndose en sistemas modelo que permiten explorar los principios de la biología evolutiva, desde los genes, individuos y poblaciones, hasta contextos macroevolutivos. Con base en una revisión detallada de la información disponible, así como a partir de la generación de nueva evidencia, en este capítulo revisamos y discutimos los linajes evolutivos, venómica y actividades biológicas de los venenos de los vipéridos presentes en Colombia.

Palabras clave: Diversidad biológica, colmillos, serpientes venenosas, mordedura de serpiente, región neotropical.



Citación: Cubides-Cubillos, SD; Saldarriaga-Córdoba, MM; Pereañez, JA; Angarita-Sierra, T. Capítulo 3. Asesinos por naturaleza: Revisión de los caminos evolutivos de las víboras colombianas. En el libro: *Mordeduras, venenos y serpientes venenosas de Colombia*; Angarita-Sierra, T., Ruiz-Gómez, FJ, Eds.; Instituto Nacional de Salud: Bogotá DC, Colombia, 2024; pp. 125-178. doi:10.33610/145478txfjyn



Copyright: © 2024 por los autores. Publicación de acceso abierto bajo los términos y condiciones de licenciamiento Creative Commons Atribución (CC BY-NC-ND 4.0) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Ilustraciones por:
Oscar A. Ramírez Ruiz

1. Depredadores de emboscada: Víboras alrededor del mundo

El veneno, es un rasgo biológico sorprendente que ha evolucionado de forma independiente en numerosos organismos en nuestro planeta. No obstante, este rasgo, que caracteriza algunos grupos de serpientes, culturalmente genera reacciones y actitudes encontradas, al evocar al mismo tiempo miedo, fascinación y respeto, haciendo que las serpientes sobresalgan sobre todas las especies del reino animal como un animal de poder [1]. Sin embargo, en todo el mundo, sólo un puñado de especies de serpientes posee un veneno con la potencia necesaria y un sofisticado mecanismo de administración que sea capaz de representar una amenaza real para la vida de sus presas, o personas (ver Capítulo 5). Aproximadamente, el 10% de todas las serpientes existentes actualmente pertenecen a la familia Viperidae, las cuales son comúnmente conocidas como víboras [2,3]. Esta familia se divide taxonómica y filogenéticamente en tres subfamilias: Azemiopinae (víboras de Fea), Crotalinae (víboras con foseta termorreceptora) y Viperinae («víboras verdaderas» o «víboras sin fosas»).

Actualmente, se reconocen alrededor de 383 especies de vipéridos, agrupadas en 37 géneros [4]. Trece de estos géneros se distribuyen en el neotrópico americano: *Agkistrodon* [5], *Atropoides* [6], *Bothriechis* [7], *Bothrocophias* [8], *Bothrops* [9], *Cerrophidion* [10], *Crotalus* [11], *Lachesis* [12], *Metlapilcoatlus* [13], *Mixcoatlus* [14], *Ophryacus* [15], *Porthidium* [16], *Sistrurus* [17]; 24 géneros se distribuyen a lo largo de los continentes asiático, europeo y africano: *Atheris* [18], *Azemiops* [19], *Bitis* [20], *Calloselasma* [21], *Causus* [22], *Cerastes* [11], *Craspedocephalus* [23], *Daboia* [20], *Deinagkistrodon* [24], *Echis* [25], *Eristicophis* [26], *Garthius* [27], *Gloydus* [28], *Hypnale* [29], *Macropviper* [30], *Montatheris* [31], *Montiviper* [32], *Ovophis* [33], *Proatheris* [31], *Protobothrops* [34], *Pseudocerastes* [35], *Trimeresurus* [36], *Tropidolaemus* [22], y *Vipera* [37].

Entre todas las serpientes venenosas, el sistema de administración de veneno de los vipéridos es el más especializado. Se caracteriza por la presencia de colmillos frontales, largos y tubulares (canal interno), ensamblados sobre un hueso maxilar móvil, y conductos que transportan el veneno [38] (ver Capítulo 5). Los colmillos desarrollados por los vipéridos representan uno de los rasgos funcionales más notables en la naturaleza, estando directamente relacionados con su historia de vida y estrategia de alimentación. Las víboras son principalmente depredadores de emboscada, siendo especies sedentarias que consumen principalmente presas de «sangre caliente» (endotermos) durante su edad adulta [38,39]. Como consecuencia de la evolución, su eficiente y sofisticado mecanismo de inoculación de venenos para la captura de presas, disuasión y defensa ante depredadores, las víboras son agentes biológicos de importancia médica debido a la elevada incidencia anual de mordeduras (accidentes ofídicos; ver Capítulo 9).

En estos cazadores de emboscada, la composición del veneno limita la selección de presas; de ahí que su dieta tenga notorias adaptaciones y especificidades. Por ejemplo, los venenos de las serpientes recién na-

cidas o juveniles exhiben una mayor letalidad (DL_{50}) que la observada en los adultos [40], indicando que existen diferencias bioquímicas relacionadas con los cambios en la dieta y desarrollo de los individuos. De hecho, estudios proteómicos han revelado que la variación ontogenética en la composición del veneno es un indicador importante para comprender la dinámica y las actividades biológicas de las toxinas de dos las víboras colombianas con mayor importancia médica: *Bothrops atrox* [41] y *Bothrops asper* [42,43].

Para comprender cómo evolucionaron las estrategias de alimentación en las serpientes, desde el proceso mecánico para dominar la presa (constricción) hasta el uso de un arsenal químico (inyección de veneno), es imperativo comprender primero los numerosos procesos a través de los cuales la selección natural ha favorecido la armonía entre divergencia y adaptación [44]. Este equilibrio ha permitido el surgimiento de una gran heterogeneidad en la composición, función y acción de las toxinas de los venenos de las víboras. En este capítulo presentamos una breve descripción de los últimos 50 años de investigación sobre la historia evolutiva y natural de las especies de víboras que habitan los ecosistemas tropicales de Colombia, enfocándose en las especies de serpientes de mayor importancia médica.

2. Perspectivas evolutivas y geográficas de la colonización y diversificación de las víboras en el trópico suramericano

El trabajo pionero realizado por William L. Burger [45], constituye uno de los grandes aportes en la comprensión de la sistemática y biología de las víboras suramericanas. Burger [45] aclaró la delimitación de varios grupos de víboras y generó la descripción de nuevos caracteres de uso taxonómico para la familia Viperidae. Su trabajo propuso la división del género *Bothrops* en cinco géneros morfológicamente divergentes: *Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Bothrops*, *Ophryacus* y *Porthidium*. Hoy en día, la validez de *Bothriopsis* como un género divergente de *Bothrops* es controvertida, aunque históricamente algunos autores consideraron a *Bothriopsis* como un género válido, actualmente numerosos estudios filogenéticos han cuestionado su distinción del género *Bothrops*. No obstante, el trabajo de Burger [45] fue crucial porque desencadenó una serie de reordenamientos nomenclaturales que permitieron describir géneros derivados de *Porthidium*, como son los géneros *Atropoides* [6] y *Cerrophidion* [10].

Posteriormente, Avise [46] publicó uno de los estudios pioneros que examinaron hipótesis filogenéticas y filogeográficas de las víboras americanas, a partir del uso de marcadores moleculares. Avise, estudió las relaciones ancestrales que no se ven afectadas por la selección convergente mediante la evaluación de marcadores moleculares de origen mitocondrial, usándolos como evidencia independiente, y asumiendo que es poco probable que estos rasgos se vean influenciados por las mismas presiones selectivas que actúan sobre los rasgos morfológicos [47]. En consecuencia, a partir de 1990, las secuencias de ADN se han venido

utilizado para inferir las líneas de tiempo histórico en las que diferentes clados (=linajes) de vipéridos divergieron, ayudando a comprender la diversificación morfológica en un contexto biogeográfico [48]. Por lo tanto, estos estudios iniciales que examinaron el valor evolutivo de los genes mitocondriales, revelaron, por ejemplo, que genes como el citocromo *b* y NADH son predictores adecuados de las relaciones filogenéticas, en gran parte, debido a la evolución más lenta en comparación con los genes de las unidades ribosomales 12s y 16s [49].

Los trabajos de Parkinson et al. [50] y Gutberlet Jr., et al. [51] identificaron y sugirieron la existencia de dos grupos monofiléticos de víboras en América: un clado de especies norteamericanas que agrupa los géneros *Agkistrodon*, *Atropoides*, *Cerrophidion*, *Crotalus*, *Metlapilcoatlus*, *Ophryacus* y *Sistrurus*, y un segundo clado que agrupa a los demás géneros ubicados en la región Neotropical. Un primer análisis recuperó los vipéridos del continente americano como un grupo monofilético [50], pero sin una identificación adecuada de su grupo hermano, dejando dudas sobre cómo se dio la colonización de América del Norte y la divergencia posterior entre el norte templado y el sur tropical. Además, este estudio [50] advirtió que la especie reconocida en ese momento como *Porthidium hyoprora* correspondía a un linaje más estrechamente relacionado con el género *Bothrops* (coincidiendo con la primera descripción de *Bothrops hyoprora*) [52], que años más tarde sería la base para la descripción de un nuevo género denominado *Bothrocophias*. Actualmente, este nuevo grupo incluye otras especies que anteriormente también estuvieron agrupadas con el género *Bothrops*; como: *B. campbelli*, *B. hyoprora*, *B. microphthalmus*, y *B. myersi* [8].

En Colombia, la prominente elevación de las tres Cordilleras de los Andes jugó un papel fundamental en la cladogénesis de numerosas especies de víboras, como las especies del grupo *Bothrops*, un grupo en el que sus dos linajes principales están distribuidas alopátricamente [53]. Geológicamente, la Cordillera de los Andes alcanzó su elevación máxima de más del 40% hasta la era Neógena, lo que dio lugar a una formación montañosa significativa sólo durante el Mioceno tardío, y especialmente, durante el Plioceno, cuando el proceso orogénico se aceleró rápidamente [54]. Por lo tanto, se infiere que la división inicial entre los grupos interandinos de víboras en el norte de Suramérica se atribuye a un evento de dispersión desde el Caribe mesoamericano, que determinó la historia biogeografía de las especies en esta región.

Por consiguiente, los estudios moleculares de las víboras se han centrado principalmente en la región neotropical, procurando examinar varias hipótesis que podrían explicar la asombrosa diversidad de la subfamilia Crotalinae [55–57]. Las reconstrucciones filogenéticas, son la herramienta principal empleada para explicar las trayectorias evolutivas que dan origen a los diferentes tipos de plantas y animales que actualmente coexisten con los seres humanos. A través de estas hipótesis de relación histórica, se han postulado diferentes teorías que intentan explicar la diversidad de organismos durante escalas de tiempo geológicas (p. ej., durante los

importantes períodos como Plioceno y Mioceno), relacionando los hitos geológicos como la orogenia andina o el levantamiento del Istmo de Panamá, con las distribuciones geográficas actuales de varias especies.

El levantamiento de los Andes en Suramérica es uno de los procesos geológicos más significativos en la evolución de numerosas especies de vertebrados [58,59]. Por ejemplo, algunos autores utilizaron el análisis de migración histórica en poblaciones de mapanás (*B. asper*) para examinar sus recientes eventos de diversificación en Suramérica [60]. Salazar et al. [60] emplearon esta aproximación, incluyendo además, un análisis de múltiples procesos demográficos de divergencia que no son factibles de inferir utilizando únicamente métodos basados en la reconstrucción de árboles filogenéticos [61,62].

De hecho, las especies de mapanás han demostrado que el impacto de la diversidad del hábitat está correlacionado con la variabilidad fenotípica, un fenómeno biológico inherente a las diferentes especies del género *Bothrops* [63,64]. Además, la ausencia de otros potenciales competidores/adversarios al inicio de la dispersión de la especie ancestral sobre las distintas regiones del norte de Suramérica, puede haber contribuido a la propagación de las mapanás en la mayoría de las regiones geográficas de Colombia. No obstante, es imperativo resaltar que ciertos géneros como *Porthidium* (*P. nasutum* y *P. lansbergii*) y *Lachesis* (*L. acrochorda* y *L. muta*) exhiben convergencia geográfica con *B. asper* y *B. atrox* en algunas ecoregiones y localidades. Sin embargo, las especies de *Porthidium* también exhiben una distribución amplia en la zona occidental y suroccidental del Pacífico colombiano [65], así como en toda la región del Caribe [66], lo que las convierte en especies simpátricas con *B. asper*.

Actualmente, los métodos bioinformáticos han permitido el análisis de extensos conjuntos de datos (datos genómicos), permitiendo la evaluación de intrincados procesos históricos de dispersión con una alta resolución [67–69]. Los análisis genómicos han demostrado ser especialmente útiles debido a la exactitud y precisión con la que se estiman los diferentes parámetros a nivel genético [70–72]. Asimismo, las incertidumbres sistemáticas en ciertos estudios de víboras durante la última década sugieren que es necesario el uso de la taxonomía integrativa. Esta herramienta usa varias líneas de evidencia de forma conjugada pero independiente, entre, por ejemplo, características morfológicas, comportamentales, análisis de divergencia genética, filogenias moleculares y coalescentes, para la delimitación de especies y comprensión de eventos de aislamiento geográfico y otros procesos ecológicos [73–75].

2.1 Comprendiendo cómo los eventos de diversificación afectan la diversidad de las especies de víboras colombianas

Se han propuesto numerosas hipótesis sobre la diversificación de las serpientes neotropicales, incluida la especiación alopátrica y el desplazamiento ecológico a través de cadenas montañosas, ríos que actuaron como barreras precigóticas o la fragmentación del hábitat causada por

el cambio climático durante el Pleistoceno [58,76]. La deriva continental de Suramérica y el levantamiento de los Andes dieron como resultado la dinámica evolutiva que sustenta la base de la diversidad en numerosas ecorregiones del Neotrópico [77–79]. Estos fenómenos orogénicos han planteado numerosas interrogantes sobre, cómo y cuántos grupos taxonómicos colonizaron la región Andina; cómo estos grupos ancestrales consiguieron diferenciarse para habitar miles de años más tarde las tierras bajas y el piedemonte de la Cordillera Oriental de Colombia, una vez que los Andes alcanzaron sus elevaciones actuales [80]. Por lo tanto, es importante entender cómo la diversidad de las víboras suramericanas está relacionada con el intercambio biótico entre Norte y Centro América a lo largo del período Terciario, especialmente después de la aparición del Istmo de Panamá [81].

La mayoría de los eventos de especiación en las regiones tropicales están influenciados por el aislamiento inducido por la alteración del paisaje (p. ej., vicarianza) el cual está intrínsecamente ligado a una gama más amplia de procesos biológicos y geológicos [60]. A pesar de esto, las hipótesis filogeográficas actuales propuestas para la mayoría de las especies de víboras suramericanas no han considerado la influencia de los procesos demográficos [55,57,60,82]. De hecho, al examinar los patrones filogeográficos de distintas especies con rangos superpuestos o parcialmente superpuestos, puede revelar como eventos comunes pueden tener un impacto similar en los patrones evolutivos de numerosos taxones [83]. Sin embargo, lo anterior también sugiere inconsistencias entre taxones simpátricos debido a la formación de linajes, la variación en el tamaño efectivo de la población, la extinción, dispersión, o la baja sensibilidad ante eventos vicariantes [84–86].

En contraste, la explicación dada por procesos de especiación parapátrica a lo largo del eje vertical montañoso de los Andes, podría explicar las adaptaciones específicas en algunas especies que presentan características asociadas con gradientes ecológicos [87]. En consecuencia, la capacidad de algunas especies de expandirse hacia nuevos nichos ecológicos que aparecieron durante un tiempo específico pudo jugar un rol fundamental en la diversificación de las víboras interandinas pertenecientes a los géneros *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Bothriechis*, *Lachesis* y *Porthidium*.

Por lo tanto, se ha sugerido que la rápida divergencia de especies de vipéridos a partir de un ancestro común (con fosetas termosensibles), representa un hito evolutivo importante que permitió la diversificación exitosa de esta familia de serpientes [3]. Así, desde un punto de vista ecológico, estos linajes consiguieron colonizar diversos ambientes y hábitats, que van desde bosques tropicales de tierras bajas en Centroamérica, la selva húmeda tropical del Amazonas, logrando alcanzar las áreas abiertas al sur de los Andes y la Patagonia [2,55]. Sin embargo, la taxonomía, historia natural y relaciones filogenéticas de numerosas especies en Suramérica aún son pobremente conocidas [2,28,57,88]. Esto ocasiona que varios grupos de víboras muestran patrones aparentemente endémicos (p. ej., *Bothrocophias colombianus*); o se consideran complejos de especies que

requieren una reevaluación taxonómica y una mejor resolución de sus patrones filogenéticos (ver Capítulo 1).

Uno de los desafíos importantes que enfrenta la herpetología en Colombia es el número limitado de marcadores moleculares que se han examinado, así como el bajo número de individuos o poblaciones analizadas en varias especies de vipéridos. Además, el conocimiento limitado sobre las tasas de evolución molecular de grupos de genes nucleares en serpientes, impide un examen filogeográfico e histórico exhaustivo de las víboras encontradas en el norte de Suramérica.

2.2 Una familia con diferentes complejos de especies

En Colombia, así como en todos los ecosistemas andinos, los factores ambientales más importantes que afectan la distribución de los siete géneros conocidos de víboras son la elevación y la complejidad orográfica. Estos factores se proponen como algunos de los principales impulsores de las complejas relaciones filogenéticas y alta diversidad venómica en varias especies de vipéridos. Por ejemplo, un grupo reducido de especies de víboras colombianas alcanzan elevaciones entre los 1.500 a 3.600 metros sobre el nivel del mar (en adelante msnm), siendo 1.500 msnm el límite superior para la mayoría de las especies de víboras que habitan en las tierras bajas; 3.600 msnm es el límite superior para las especies altoandinas (como *Bothrocophias tulitoi*, *B. myrringae*, *Bothriechis schlegelii* y ciertas poblaciones del complejo *B. atrox*) [2,75].

Dentro de las diversas regiones biogeográficas del norte de Suramérica, la proporción de especies venenosas puede oscilar entre el 9% y el 14% [89]. Por lo tanto, las zonas de distribución geográfica de la mayoría de las especies de víboras colombianas confluyen en la tierras bajas en las que se presenta una alta concentración de poblaciones humanas [90]. Como resultado, la dispersión de las víboras colombianas está asociada con áreas boscosas primarias, áreas boscosas secundarias, áreas destinadas a la agricultura a diferentes elevaciones, y cada vez más, con áreas urbanas (generalmente en expansión). En consecuencia, y debido a su amplio rango de distribución geográfica en Colombia, *B. asper* y *B. atrox* son las especies de serpientes venenosas de mayor importancia médica [64,91].

Históricamente, los géneros *Bothrops* y *Porthidium* han sido foco de un número significativo de revisiones y trabajos taxonómicos que han revelado una diversidad de linajes que no ha sido reconocida previamente a nivel de especie [63,92–97]. De hecho, durante las últimas dos décadas, algunas especies pertenecientes al género *Bothrops* han sido objeto de numerosos estudios filogenéticos y enfoques biogeográficos relacionados con su diversificación al norte de Suramérica [3,38,55,98,99]. Estas aproximaciones han revelado una intrincada delimitación taxonómica, principalmente, dentro del complejo de especies *Bothrops asper-atrox*.

En general, la mayoría de las investigaciones realizadas sobre las víboras presentes en Colombia indican que varias especies presentan una

diversidad críptica, ya que sus relaciones filogenéticas y biogeográficas exhiben claras diferencias entre sus poblaciones, mientras que sus caracteres morfológicos conocidos presentan una baja variabilidad. A estos grupos de serpientes se les denomina complejos de especies, una categoría que describe la complejidad en su delimitación taxonómica (ver Capítulo 1) [53,63,75, 92–95]. Esta dificultad para distinguir especies morfológicamente (especies crípticas), y que a veces pueden presentar linajes genéticamente divergentes, se ha convertido en uno de los puntos más discutidos en trabajos publicados en sistemática molecular y en procesos de definición de especies en la actualidad.

Uno de los objetivos de esta sección es describir algunas de las investigaciones pioneras sobre la sistemática, los venenos y la evolución de las víboras colombianas. Con base en los datos publicados durante las últimas tres décadas, creemos que es necesario aumentar los estudios filogeográficos para poder analizar con robustez la diversidad críptica de taxones ya reconocidos [48,83,94,96]. Esta información podría servir como una herramienta importante para determinar los esfuerzos de conservación destinados a mantener las poblaciones viables de linajes que aún están por descubrir [83].

Con base en la revisión de los principales trabajos que consolidan el conocimiento de las serpientes neotropicales, a continuación, presentamos un análisis sistemático y descriptivo de los principales grupos y complejos de especies de víboras de importancia médica en Colombia. Esta breve reseña busca mostrar no sólo la complejidad filogenética de los dos grupos principales (*Bothrops* y *Porthidium*), sino también, informar sobre las especies y los linajes con vacíos de información genética y proteómica.

Las mapanás colombianas de mayor importancia médica: el complejo *Bothrops asper-atrox*

El género *Bothrops* exhibe una mayor divergencia genética en comparación con las otras víboras suramericanas. De hecho, las especies *Bothrops* exhiben linajes parafiléticos en relación con las especies encontradas en Centroamérica. La diversificación del género probablemente tuvo lugar en Suramérica [60]. Esta hipótesis sugiere que el ancestro común de todas las especies de *Bothrops* fue el primer vipérido que colonizó Suramérica en algún momento durante el Mioceno, hace unos 10 millones de años [63]. Como resultado, solo un linaje de especies de *Bothrops* (*B. asper*) se extendió por Centroamérica, desde Panamá hasta México. Sin embargo, existen registros de distribución geográfica de una segunda especie de *Bothrops* (*B. punctatus*) en la región oriental de Panamá.

Campbell y Lamar [2] sugirieron que las poblaciones colombianas de *B. asper* y *B. atrox* tienen distribuciones alopátricas. De hecho, *B. asper* (Figura 1 superior) se distribuye a lo largo de las regiones biogeográficas del Chocó y el Valle del Magdalena, así como a través de la región Caribe y valles interandinos de la macrocuenca Magdalena-Cauca [64,91]. Por su lado, *Bothrops atrox* (Figura 1 inferior) se encuentra en la región oriental de Colombia, sobre los grandes biomas de la Orinoquía y la Amazonia.

Esta distribución concuerda con la hipótesis de dispersión ancestral de *B. atrox*, que propone la preexistencia de poblaciones que habitaron los bosques ubicados al norte del Amazonas, que posteriormente colonizaron gradualmente las diferentes regiones que bordean el río Amazonas [97].

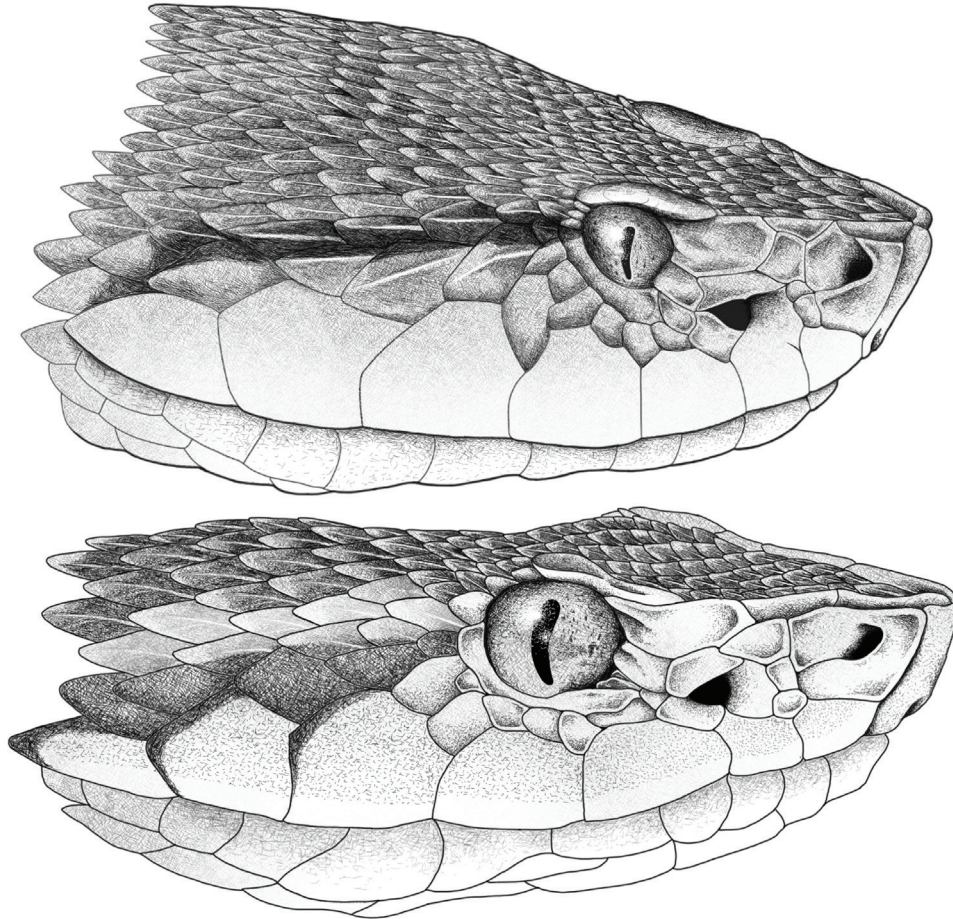


Figura 1. Ilustraciones de la cabeza del complejo *Bothrops asper - atrox*. (Superior) cabeza en vista lateral de *Bothrops asper* de Melgar, Tolima, Colombia (INSZ 138). (Inferior) Cabeza en vista lateral de *Bothrops atrox* de Puerto Carreño; Vichada (BOTATR00061). Ilustraciones por Oscar A. Ramírez Ruiz.

No obstante, existe la presencia de linajes relacionados con *B. asper* y *B. atrox* en regiones geográficas simpátricas de los Andes orientales y occidentales de Colombia, ubicadas en departamentos como Boyacá, Cundinamarca, y Norte de Santander. Varios estudios han demostrado que ambas especies muestran una diferenciación filogenética reciente relacionada con la diversidad de su hábitat y con gradientes altitudinales [53,60,92,97].

El estado taxonómico del complejo *B. asper-atrox* dentro de las poblaciones colombianas ha sido poco explorado desde una perspectiva genética, y actualmente no existe una delimitación clara entre los linajes de estas especies que permita evaluar algunas de las hipótesis taxonómicas previamente descritas con base en evidencia morfológica. En particular, las poblaciones de la vertiente oriental de la Cordillera Oriental representan un problema desafiante aún sin resolver. Por ejemplo, algunas poblaciones de *B. atrox* de montaña han sido históricamente reportadas como *Bothrops isabelae* [98] y *Bothrops colombiensis* [99]. *Bothrops isabelae* ini-

cialmente fue sinónimo de *B. atrox* en los años 90 [33,100], pero más tarde fue reconocida como especie en algunos de los trabajos pioneros sobre linajes de *Bothrops* suramericanos [92]. Análisis recientes [101] muestran a *B. isabelae* filogenéticamente cercana a *B. atrox*, y con una divergencia genética aparentemente baja. Aun así, y aunque algunos autores reconocen a *B. isabelae* como taxón válido, actualmente volvió a ser considerado sinónimo de *B. atrox* [55]. Además, Campbell y Lamar [2] consideran *B. colombiensis* como especie sinónima del complejo de especies formado por *B. asper* y *B. atrox* derivadas de poblaciones venezolanas.

Aclarar las relaciones filogenéticas entre las especies de *Bothrops* colombianas y las poblaciones de especies/linajes venezolanos nos permitirá comprender la dinámica de dispersión de estos taxones, proporcionando una alternativa al uso del concepto de especie unificada que ha sido ampliamente aplicado en análisis de complejos de especies con linajes geográficos altamente divergentes [102]. La complejidad para entender la sistemática del grupo *B. atrox* es un desafío previamente informado [63,88,103]. Algunos estudios sugieren que el linaje compuesto por las especies brasileras *B. leucurus* y *B. moojeni* es el grupo hermano de *B. atrox*; otros estudios indican que *B. atrox* tiene relaciones evolutivas más estrechas con *B. asper* y el linaje *B. isabelae* [6,94,101,104]. Sin embargo, el grupo de especies asociadas al complejo *B. atrox* distribuido entre Colombia y Brasil, requiere una revisión taxonómica detallada debido a que las hipótesis taxonómicas basadas en morfología no son concordantes con los linajes mitocondriales descritos, y además estos últimos, tampoco concuerdan con las especies taxonómicamente reconocidas [103].

Un ejemplo histórico de esta marcada complejidad taxonómica para las especies del género *Bothrops* en Colombia, fue la denominación de nuevas especies derivadas de *B. asper* propuestas por Folleco-Fernández [105]. Este autor reevaluó los límites taxonómicos dentro de *B. asper* para las poblaciones del suroeste de Colombia, proponiendo a *B. ayerbei* y *B. rhombeatus* como nuevas especies derivadas de *B. asper*. Sin embargo, esta propuesta taxonómica presentó un abordaje desprolijo e inadecuado de la descripción de las características empleadas en la delimitación *B. ayerbei* y *B. rhombeatus*. Además, los rasgos morfológicos y caracteres diagnósticos empleados son ambiguos [106], y la ausencia de un análisis filogenético impide el reconocimiento de estas poblaciones como unidades evolutivas independientes a nivel de especies (ver Capítulo 1). De hecho, en la descripción inicial realizada por García [107] no se asignó ningún ejemplar tipo ni se realizó la descripción de un nuevo taxón, convirtiendo a *B. rhombeatus* en un *nomen dubium* (ver Capítulo 1).

Otro punto importante mencionado por Ramírez-Chaves y Solari [106] es que Folleco-Fernández [105] no asignó un neotipo para *B. ayerbei* y *B. rhombeatus*, así como tampoco proporcionó datos suficientes sobre las distribuciones geográficas y simpatría entre estas especies, lo que hace aún más difícil sustentar la validez de ambos taxones, o sus posibles hibridaciones. Aunque otros trabajos han incorporado marcadores moleculares para evaluar las relaciones filogenéticas entre de las especies *B. asper* y *B. atrox*

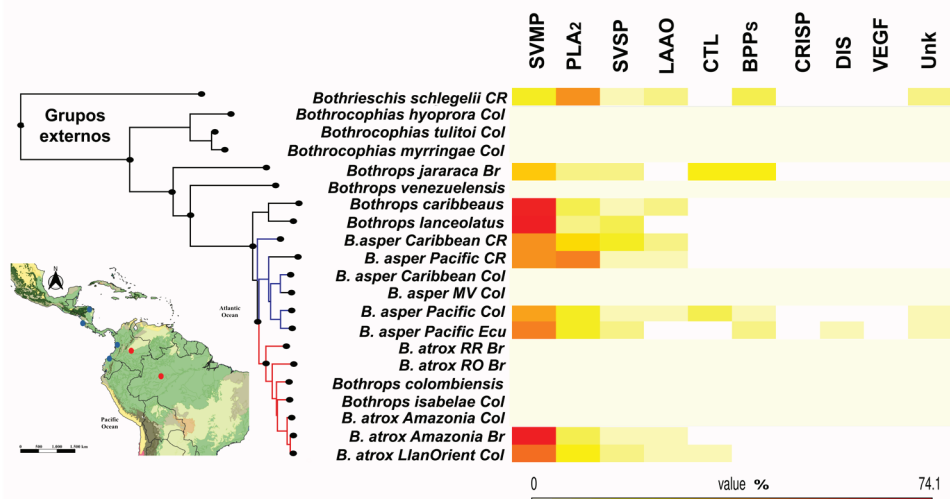
[53], actualmente no existen secuencias de DNA mitocondrial disponibles en los repositorios genéticos de datos abiertos que provean información sobre las especies *B. ayerbei* y *B. rhombeatus* propuestas por Folleco-Fernández [105]. Por lo tanto, consideramos que las poblaciones distribuidas en el suroeste de Colombia (departamentos de Cauca y Nariño) pueden ser considerados como linajes sinónimos de *Bothrops asper*, hasta que un nuevo estudio provea evidencias robustas a partir de tamaño de muestra adecuado y un abordaje riguroso empleando taxonomía integrativa [60,97].

Con el fin de evidenciar los vacíos de conocimiento sobre las relaciones históricas y la venómica de algunos linajes representativos dentro de las especies de víboras colombianas, presentamos como novedad un mapa de calor que asocia las relaciones filogenéticas de linajes del complejo *B. asper-atrox* y los proteomas publicados en las últimas dos décadas. Por lo tanto, la Figura 2 muestra el resultado de una filogenia molecular construida a partir de secuencias parciales de dos genes mitocondriales (Citocromo b y NDH4; ver Apéndice). La topología recuperada incluye terminales para diferentes poblaciones y linajes distribuidas en Colombia y Brasil, así como datos moleculares de las especies de *Bothrocophias* recientemente descritas para Colombia [75]. Utilizamos tres terminales que representan tres localidades geográficas en Brasil, incluyendo también dos terminales que representan a dos linajes actualmente sinonimizadas para la especie *B. atrox*. Utilizamos datos de ocho grupos de familias de proteínas/toxinas que han sido reportadas en estudios venómicos, y realizamos la asociación de los porcentajes de las principales toxinas principales con las hipótesis filogenéticas y su distribución geográfica.

Nuestros resultados muestran que las poblaciones colombianas de *B. asper* presentan tres linajes, geográficamente definidos y bien soportados, que divergen genéticamente entre 2,5% y 4% entre sí. De forma similar, *Bothrops atrox* presenta cuatro linajes definidos geográficamente, pero con distancias y relaciones filogenéticas que aún requieren una mejor resolución para ser considerados como linajes claramente diferenciados (poblaciones al oeste de la Cordillera Oriental - Cundinamarca vs. poblaciones al Este de la Cordillera Oriental - Meta, Vaupés y Caquetá). Además, los límites geográficos y taxonómicos con el linaje que históricamente tomó el nombre de *B. isabelae* siguen siendo un problema taxonómico por resolver. Por lo cual, consideramos que se requieren estudios futuros que ayuden a establecer con claridad si las poblaciones distribuidas en la vertiente oriental de la Cordillera Oriental, y en algunas localidades de Venezuela, corresponden a un linaje derivado *B. atrox* o pueden ser asignado al taxón históricamente conocido como *B. isabelae*.

Es importante señalar que los géneros hermano de *Bothrops* y *Bothrocophias* sólo tienen tres especies con datos genéticos y un único proteoma publicado (ver la sección 3 de este capítulo). Asimismo, no fueron incluidos en este análisis los proteomas de los linajes *B. ayerbei* y *B. rhombeatus* debido a la ausencia de datos genéticos disponibles. Finalmente, se señala aquí la ausencia de datos venómicos para dos linajes importantes dentro de *B. asper* (poblaciones de las regiones Caribe y Magdalena Medio).

Figura 2. Mapa de calor usando datos de proteomas para algunas víboras colombianas relacionadas al complejo *Bothrops asper-atrox*. Los datos proteómicos están graficados sobre una filogenia molecular que usa una matriz de genes concatenados construida a partir del método de Máxima Verosimilitud (ML) (secuencias parciales de MT-ND4 y MT-CYB, producidas por [3, 50, 53, 63, 75, 94, 96] y por Cubides-Cubillos et al. (datos aún no publicados). La inferencia filogenética recupera las especies y sus linajes más importantes (aquellos para los cuales hay información genética y proteómica disponible; ver información bibliográfica en la Sección 3). En la topología recuperada son señalados los nodos con soporte de bs > 90%. Informaciones abreviadas: linajes/poblaciones (Caribe y Pacífico CR: Costa Rica; Caribe y Pacífico Col: Colombia; Pacífico Ecu: Ecuador; MV Col: Valle del Magdalena, Colombia; RR Br: Región de Roraima de Brasil; RO Br: Región de Rondonia de Brasil; Amazonia Br: región amazónica de Brasil; Amazonia Col: región amazónica de Colombia; LlanOrient Col: región de la Orinoquia de Colombia. Nombres de familias de proteínas: SVMP: metaloproteínasa; PLA2: fosfolipasa A2; SVSP: serina proteínasa; LAAO: L-aminoácido oxidasa; CTL: lectina de tipo C/similar a lectina; BPP: péptido potenciador de bradiquinina; CRISP: proteína secretora rica en cisteína; Dis: Desintegrinas; VEGF: factor de crecimiento vascular del endotelio; Unk: nucleotidasa; factor de crecimiento nervioso, péptidos/o compuestos no peptídicos.



De todos los diversos linajes de *B. atrox* descritos previamente en análisis filogenéticos, solo dos cuentan con proteomas de al menos una de las poblaciones que lo conforman (Piedemonte llanero, departamento del Meta; y región norte de Brasil, estado de Amazonas). En consecuencia, se hacen evidentes los significativos vacíos de conocimiento en torno a la composición de los venenos del complejo *B. atrox*, indicando que se requiere invertir grandes esfuerzos por caracterizar sus poblaciones distribuidas a lo largo de la vertiente oriental de la Cordillera Oriental (departamento de Boyacá), piedemonte amazónico colombiano (departamentos de Caquetá, Putumayo), así como las tierras bajas amazónicas (departamentos de Guainía, Guaviare, Vaupés y Amazonas). Asimismo, a la fecha, no existe información sobre la composición de los venenos de las poblaciones de tierras altas de la vertiente oriental de la Cordillera Oriental identificadas como el linaje *B. isabelae*, las cuales representan un desafío para la comprensión de víboras de montaña del género *Bothrops*. Es posible suponer que la composición de los venenos de estas poblaciones varíe significativamente a la observada al interior de las poblaciones *B. atrox* de tierras bajas, como respuesta funcional y adaptativa a los gradientes ecológicos relacionados con la altitud; empleando dinámicas evolutivas específicas, como, por ejemplo, la duplicación de genes. No obstante, esta y otras posibles hipótesis, deben ser contrastadas en futuros estudios.

La potencia en la actividad hemorrágica de los diferentes tipos de metaloproteinasas presentes en el veneno de vipéridos (SVMP), es uno de los factores importantes en las actividades biológicas de los envenenamientos causados por las especies del género *Bothrops*. En general, su abundancia relativa está relacionada con síntomas como la hemorragia local y sistémica [43]. Nuestro análisis mostró que las especies/linajes con el mayor contenido de SVMP, se distribuyen tanto en regiones tropicales secas como húmedas. Además, la composición del veneno mostró una alta variabilidad dentro de linajes estrechamente relacionados, indicando una posible respuesta ecológica. Probablemente, la distribución y dispersión heterogénea de especies/linajes sea una posible causa de los efectos

sinérgicos entre diferentes tipos de SVMP. De hecho, la hemorragia, que también contribuye a la mionecrosis [108], es uno de los síntomas más documentados en los accidentes ofídicos de todos los miembros del grupo de especies *B. asper-atrox*.

Las PLA₂, la segunda toxina más abundante en el veneno del complejo de especies *B. asper-atrox*, es responsable de la mionecrosis y está estrechamente relacionada con las funciones digestivas del veneno [109-110] (ver Capítulo 5). Esta toxina suele representar alrededor del 20-40% de la composición total del proteoma en las especies del complejo *B. asper-atrox*, pero muestra una variabilidad moderada. De hecho, la variabilidad en el porcentaje de PLA₂ no parece estar relacionada con un clado, región o clima específico. Sin embargo, debido a los grandes vacíos de información, en futuros estudios este patrón podría cambiar o estar asociado a variables ecológicas como la disponibilidad de presas, pérdida de hábitat, o la presión antropogénica.

Las enzimas que imitan de manera incompleta la acción de la trombina, las serino proteasas (SVSP), constituyen el tercer grupo de toxinas más importante en los venenos de las especies del género *Bothrops* y ejercen múltiples acciones sobre la hemostasia y los sistemas cinina y cinina-callicreína en las presas de estas serpientes [111,112]. Este grupo de toxinas muestran poca variación dentro de las especies/linajes del complejo de especies *B. asper-atrox*, y aparentemente, no hay una relación clara con la topología recuperada de la filogenia molecular obtenida. De hecho, los reportes de accidentes ofídicos causados por vipéridos no informan sobre la variabilidad en síntomas como coagulopatías o inflamación debido a que estos son signos típicos del envenenamiento botrópico (ver Capítulo 9). Al parecer, evolutivamente esta es una característica intrínsecamente ligada a la acción sinérgica con otros componentes del veneno (ver Capítulo 5 y 9).

Patocos y Patoquillas : complejo de especies del género *Porthidium*

Las víboras conocidas en Colombia como, patocos o patoquillas, habitan en Centro y Suramérica en una amplia gama de hábitats tropicales. Se hipotetiza que su origen es Centroamericano, con una dispersión a lo largo de la costa del Pacífico durante la fase final del surgimiento del istmo de Panamá (hace 3,5 millones de años), e incluso después de su formación [63]. Esta dispersión podría relacionarse de manera positiva o negativa a la competencia interespecífica con otras especies de víboras como *B. asper*, la cual colonizó Suramérica antes del cierre del istmo de Panamá [2,53,63]. Las especies de *Porthidium* son serpientes terrestres de cuerpo corto que no superan los 100 cm de longitud [2,3,13,14,113].

Las especies de este género comparten patrones de coloración críptica y un *canthus rostralis* claramente pronunciado con una escama rostral proyectada hacia arriba (Figura 3). Estas adaptaciones en la forma de la cabeza y coloración son típicas de los depredadores de emboscada [2]. Desde la década de 1990, se han realizado revisiones de las relaciones

filogenéticas entre las diferentes especies del género empleando caracteres morfológicos y algunos datos moleculares [6,50,104].

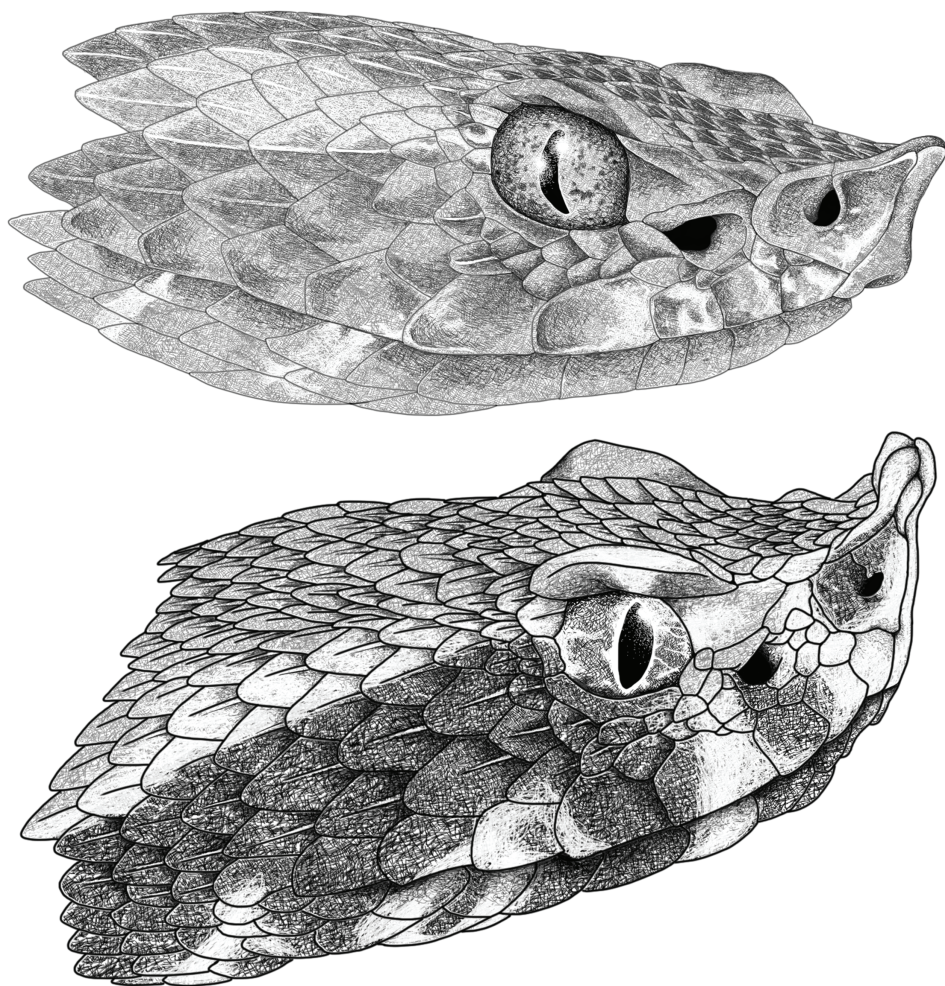


Figura 3. Ilustraciones de la cabeza del complejo de especies *Porthidium lansbergii* -*nasutum*. (Superior): Cabeza en vista lateral de *Porthidium lansbergii* (INSV-SR-89) de Yondó, Antioquia, Colombia. (Inferior): Cabeza en vista lateral de *Porthidium nasutum* (QCAZR 15395) de Tundaloma Lodge, Durango, Ecuador. Ilustraciones por Oscar A. Ramírez Ruiz.

Actualmente, diversos estudios taxonómicos han revelado las relaciones evolutivas y sistemáticas entre las diferentes especies del género *Porthidium*, sustentando la validez taxonómica de nueve especies: *P. dunni*, *P. hespere*, *P. ophryomegas*, *P. volnicacum* y *P. yucatanicum* especies con una fuerte afinidad hacia las zonas áridas; y las especies *P. nasutum*, *P. porrasi*, *P. lansbergii*, y *P. arcossae* asociadas a bosques tropicales de tierras bajas [95]. La descripción de la especie Centroamérica *P. porrasi* [114], a partir de un análisis de las poblaciones adyacentes de *P. nasutum* de Costa Rica, dio inicio a la discusión sobre la diversidad filogenética dentro del género y la necesidad de analizar poblaciones distribuidas al norte de Suramérica [95].

En Colombia, *P. nasutum* [115] y *P. lansbergii* [116] son especies estrechamente relacionadas. *Porthidium nasutum* se distribuye desde México a través de los bosques húmedos centroamericanos, pasando por la ecorregión Chocó-Darién, la ecorregión biogeográfica chocoana, incluido el

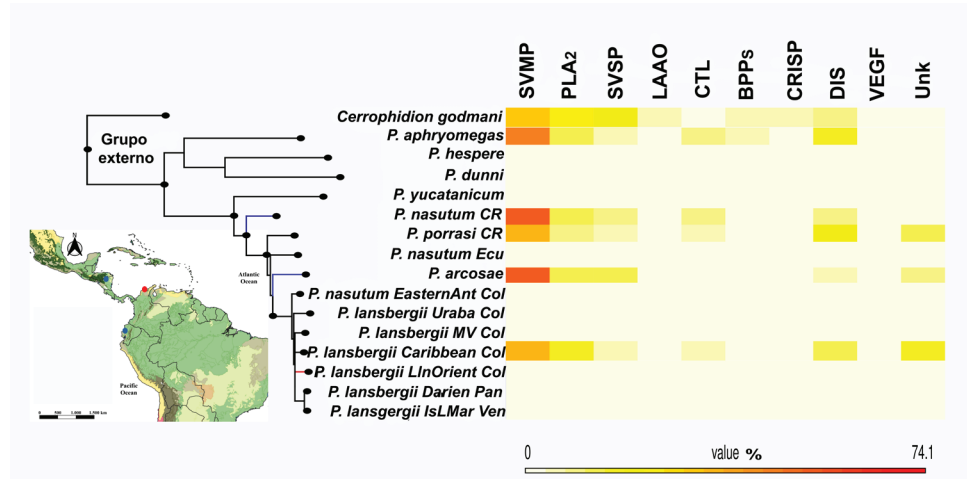
Ecuador [2]. Por otro lado, *P. lansbergii*, se distribuye en los bosques secos del Istmo-Pacífico de Panamá, alcanzando la región del Chocó-Darién y extendiéndose sobre los bosques húmedos de Urabá, así como en los bosques secos tropicales del Caribe colombiano y el norte de Venezuela. Su distribución también abarca los bosques secos, premontanos y montanos de la cuenca del río Magdalena [2,117].

La mayoría de los estudios filogenéticos previos de *P. nasutum* y *P. lansbergii* se realizaron con base en muestras moleculares pequeñas, o de un único individuo proveniente de poblaciones geográficamente aisladas [117,118]. La complejidad taxonómica observada en Panamá y en las diversas poblaciones colombianas sugiere una investigación a gran escala. Por ejemplo, Castoe et al. [95] muestran que *P. nasutum* es un clado parafilético conformado por dos linajes bien diferenciados genéticamente en Costa Rica y Ecuador.

De forma similar, nuestra filogenia muestra que *P. nasutum* presenta una diferenciación clara entre las poblaciones evaluadas recuperando tres linajes principales (Figura 4), de los cuales, el Clado 1 (Costa Rica) y el Clado 2 (Ecuador) coinciden con los resultados previos reportados por Castoe et al. [95], mientras que el Clado 3 agrupa poblaciones distribuidas al noreste de los Andes colombianos. Sin embargo, en nuestro análisis filogenético el linaje representado por las poblaciones del centro-oriental de Antioquia se anidó dentro del clado que agrupa todos los linajes *P. lansbergii*. Curiosamente, dos décadas atrás, Cisneros-Heredia y Yáñez-Muñoz [119] sugirieron que la población ecuatoriana (Clado 2) debería considerarse como una especie nueva, distinta de *P. nasutum* de Centroamérica. No obstante, nuestra filogenia no incluyó muestras de poblaciones chocoanas de *P. nasutum* (Región Pacífico en Colombia) y de *Porthidium lansbergii* de la cuenca alta del río Magdalena (departamento de Huila).

Por otro lado, nuestra filogenia molecular (Figura 4) muestra que *Porthidium lansbergii* exhibe una amplia diversificación a través de diversas ecorregiones que abarcan rangos de elevación desde el nivel del mar hasta los 1.200 msnm. Los linajes colombianos conforman un grupo parafilético: se distinguen las poblaciones del Darién-Panamá de aquellas ubicadas en la ecorregión del Caribe colombiano, la cuenca del río Magdalena, y las poblaciones al oriente de Venezuela. Además, algunas secuencias genéticas asociadas con las dos subespecies de *P. lansbergii* (*P. l. hutmanni* y *P. l. rozei*), se agruparon en un clado politómico, indicando que, a partir de los marcadores moleculares disponibles, no es posible comprender las relaciones evolutivas entre las poblaciones de la costa Caribe, el valle del río Magdalena y las poblaciones del norte de Venezuela. Este resultado es similar a lo reportado por De Arco-Rodríguez et al. [118] para las poblaciones del Caribe colombiano. Todo lo anterior sugiere, que es necesario invertir más esfuerzos para dilucidar las relaciones evolutivas entre el complejo de especies *Porthidium nasutum-lansbergii*, siendo necesario incluir a futuro muestras genéticas de las poblaciones del Pacífico colombiano y cuenca alta del río Magdalena.

Figura 4. Mapa de calor usando datos de proteomas para algunas víboras colombianas relacionadas al complejo *Porthidium nasutum-lansbergii*. Los datos proteómicos están graficados sobre una Filogenia molecular que usa una matriz de genes concatenados, construida a partir del método de Máxima Verosimilitud (ML) (secuencias parciales de MT-ND4 y MT-CYB, producidas por [95,114] y Cubides-Cubillos y colaboradores). La topología filogenética recupera las especies y sus linajes más importantes, y aquellos para los cuales hay información genética y proteómica disponible (ver información bibliográfica en la Sección 3). Adicionalmente se muestran los nodos con soporte $bs > 90\%$. Informaciones abreviadas: linajes/poblaciones (CR: Costa Rica; Ecu: Ecuador; EasternAnt-Col: Este del departamento de Antioquia, Colombia; Col Urabá: región de Urabá de Colombia; MV Col: Valle del río Magdalena, Colombia; Col Caribe: región caribeña de Colombia; Col LlanOrient: Región de la Orinoquia de Colombia; Darién Pan: Región del Darién de Panamá; IslMarg Ven: Isla Margarita de Venezuela). Nombres de familias de proteínas: SVMP: metaloproteínasa; PLA₂: fosfolipasa A₂; SVSP: serina proteínasa; LAAO: L-aminoácido oxidasa; CTL: lectina de tipo C/similar a lectina; BPP: péptido potenciador de bradiquinina; CRISP: proteína secretora rica en cisteína; Dis: Desintegrinas; VEGF: factor de crecimiento vascular del endotelio; Unk: nucleotidasa; factor de crecimiento nervioso, péptidos/o compuestos no peptídicos. Nombres de familias de proteínas: SVMP: metaloproteínasa; PLA₂: fosfolipasa A₂; SVSP: serina proteínasa; LAAO: L-aminoácido oxidasa; CTL: lectina de tipo C/similar a lectina; BPP: péptido potenciador de bradiquinina; CRISP: proteína secretora rica en cisteína; Dis: Desintegrinas; VEGF: factor de crecimiento vascular del endotelio; Unk: nucleotidasa; factor de crecimiento nervioso, péptidos/o compuestos no peptídicos.



La composición del proteoma, o composición proteica del veneno, solo es conocida para unas pocas especies de del género *Porthidium*, a pesar de que todas son de importancia médica, y algunas como las especies presentes en Colombia, representan un porcentaje importante de la incidencia anual de los accidentes ofídicos reportados (ver Capítulo 9). Actualmente, solo una población de la especie *P. lansbergii* cuenta con una descripción proteómica de su veneno (Figura 3).

No obstante, el análisis de la relación de la filogenia molecular y los datos proteómicos para las especies de *Porthidium*, muestra que existen diferencias importantes entre los proteomas de estas dos especies hermanas. Sin embargo, debido al fragmentado conocimiento sobre la composición de sus venenos, no es posible proponer una explicación para la aparente variabilidad observada entre los linajes, ni sobre la concordancia entre linajes filogeográficos y ecorregiones. La variación en sus venenos se observa en las principales toxinas que lo componen: SVMP, PLA₂ y SVSP. Estas toxinas varían entre los clados y regiones geográficas divergentes. No obstante, hace falta un muestreo mucho más robusto y completo, que incluya la mayoría de las poblaciones/linajes de las especies distribuidas en Colombia, para poder comprender con claridad la variación en sus venenos. De hecho, es posible considerar que en las poblaciones de *P. nasutum* y *P. lansbergii* puedan existir diferentes procesos adaptativos que promueven aleatoriamente la explosión de diversos fenotipos en sus venenos, y que estos a su vez, se relacionen con la formación de linajes [188]. Estas hipótesis y especulaciones requieren estudios futuros que reduzcan significativamente la incertidumbre en torno a la evolución de los linajes de las especies del género *Porthidium* y su relación con la respuesta funcional de sus venenos.

Víboras gigantes colombianas: La serpiente cascabel suramericana y el verrugoso

La serpiente cascabel sudamericana *Crotalus durissus* (*sensu lato*) es una especie que se destaca entre sus congéneres del género *Crotalus* por su amplia distribución geográfica, un número significativo de accidentes ofídicos reportados anualmente, y por los síntomas de sus envenenamientos, como la parálisis neuromuscular, rabdomiólisis, lesión renal aguda

y coagulopatía [120] (ver Capítulo 5 y 9). Investigaciones taxonómicas y sistemática, documentan la amplia diversidad de linajes/subespecies de la especie *C. durissus* [121]: *C. d. durissus* [11]; *C. d. cascavella* [9]; *C. d. collilineatus* [52]; *C. d. cumanensis* [122]; *C. d. marajoensis* [123]; *C. d. maricelae* [124]; *C. d. ruruima* [123]; *C. d. terrificus* [37]; and *C. d. trigonicus* [125]. Estos autores incluyen dos especies adicionales del norte de Suramérica, *Crotalus unicolor* [126] con una distribución geográfica restringida a Aruba, y *Crotalus vegrandis* [127] restringida a Venezuela, la cual previamente fue considerada como una subespecie de *C. durissus* (ver Figura 5 Superior).

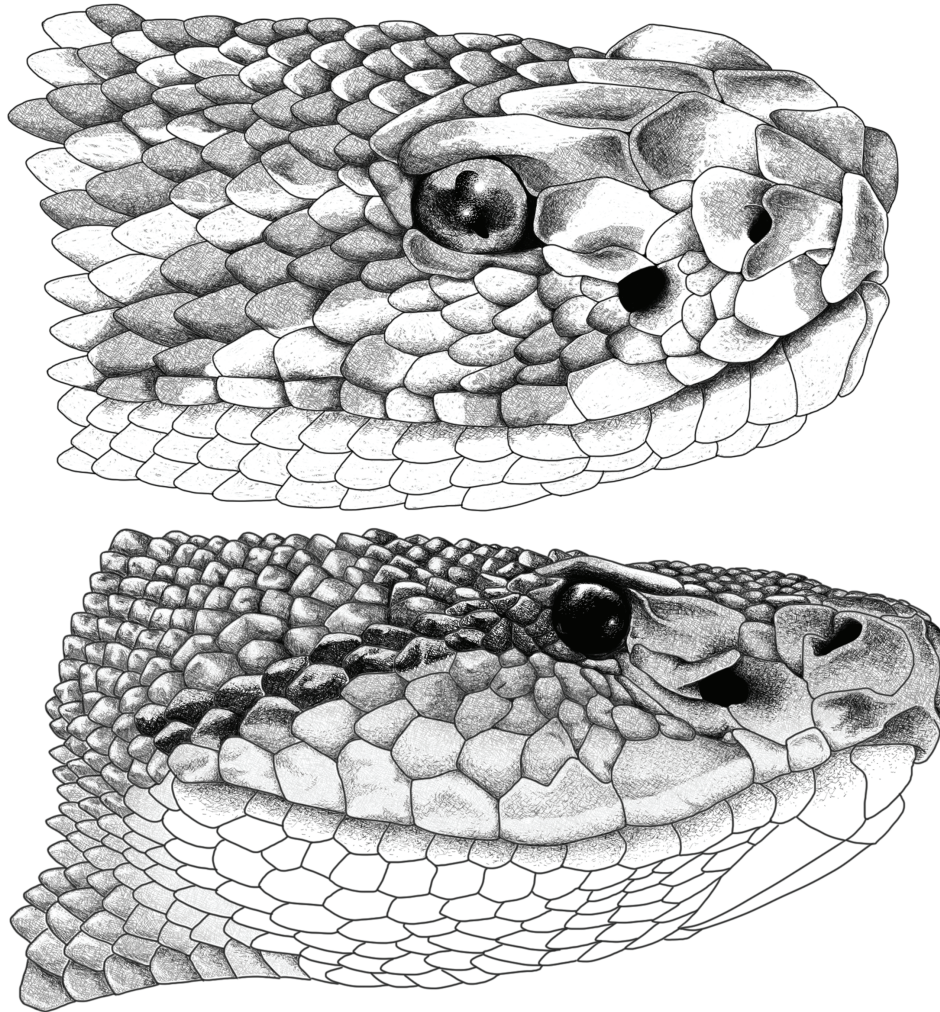


Figura 5. Ilustraciones de cabezas de las víboras gigantes colombianas. (Superior) Cabeza en vista lateral de *Crotalus durissus* del municipio de El Paso, Cesar Colombia (INSZ 115). (Inferior) Cabeza en vista lateral de *Lachesis muta* de Mirití-Paraná, municipio de La Pedrera, Amazonas, Colombia (IAvH-R-8721). Ilustraciones por Óscar Ramírez.

En las últimas décadas se han comenzado a reconocer algunas subespecies como unidades taxonómicas operacionales o taxa a nivel de especies [128,129]. Recientemente, el linaje de *C. durissus* (incluido *C. vegrandis*) fue recuperado filogenéticamente como el grupo hermano de *C. simus* (Cascabel centroamericana) [121]. Esto sugiere que la diversidad críptica en este grupo parece estar dirigida por procesos de aislamiento geográfico. Sin embargo, la filogenia molecular publicada para el grupo *C. durissus* no contó con muestras de individuos de las regiones trasandina y cisandina de Colombia.

En Colombia, *Crotalus durissus* se distribuye en la región transandina del país sobre las tierras bajas de la región Caribe, extendiéndose hasta el valle del Magdalena. Asimismo, se distribuye en la región cisandina habitando en las altillanuras bien drenadas de la Orinoquía [2]. Se considera una especie de hábitos terrestres y habita predominantemente en zonas abiertas relativamente secas [130]. Esta serpiente de cascabel exhibe una notable flexibilidad ecológica permitiéndole estar activa, tanto dentro de los bosques como sobre sus bordes, siendo comúnmente encontrada en zonas abiertas y fuertemente antropizadas [130,131]. Aunque es una de las especies más venenosas de Colombia, a su vez, una de las más traficada ilegalmente [89], esta especie presenta profundos vacíos de conocimiento en torno a su historia natural, registros de ocurrencia y evaluación de su estado de conservación [64] (ver Capítulo 1). El patrón de distribución disyunto de sus poblaciones dentro de la región transandina, así como entre las poblaciones cis y transandinas, sugiere que es muy probable que *Crotalus durissus* esté compuesta por más de un linaje evolutivo que han divergido por aislamiento geográfico y ecológico. Recientemente, se encontró que existen diferencias intraespecíficas significativas en la composición y actividades biológicas del veneno de *Crotalus durissus* entre las poblaciones distribuidas en la cuenca media del río Magdalena, el piedemonte llanero y la costa caribe colombiana (ver Capítulo 5). Estos resultados sugieren que es plausible hipotetizar que *Crotalus durissus* es un complejo de especies con múltiples linajes evolutivos que han divergido por aislamiento geográfico y ecológico. No obstante, se espera que futuros estudios filogenéticos ayuden a resolver estas incógnitas al incluir muestras representativas de todas las poblaciones colombianas, así como poblaciones distribuidas en ecosistemas del Brasil.

Dentro de la familia Viperidae, las serpientes del género *Lachesis* [12], comúnmente en Colombia conocidas como «verrugosos», son las víboras más grandes conocidas a la fecha, llegando a medir más de 3,5 metros [2]. Las serpientes de este género son las únicas especies ovíparas entre todas las víboras de América [132]. El género *Lachesis* se divide entre linajes centroamericanos y suramericanos, con una divergencia estimada entre 6 y 18 millones de años. La divergencia dentro de las especies centroamericanas parece haber ocurrido entre 4 y 11 millones de años, probablemente debido al levantamiento de la Cordillera de Talamanca; sin embargo, la diferenciación entre linajes suramericanos se produjo sólo hace unos 800.000 a 300.000 años [48,133]. Particularmente, el surgimiento y estructuración de las tres cordilleras andinas en Colombia se ha propuesto como el mecanismo de aislamiento entre *L. muta* (restringida al Amazonas) y las especies de verrugosos centroamericanos (*L. melanocephala* y *L. stenophrys*), y *L. acrochorda*, la única especie de *Lachesis* que habita en la región transandina, distribuyéndose en los bosques húmedos del Pacífico suramericano, región del Darién en Panamá, y cuenca media del río Magdalena.

Publicaciones recientes que sintetizan el conocimiento disponible sobre las especies del género *Lachesis*, resaltan la rareza de los verrugosos co-

lombianos, indicando que sus registros conocidos son escasos, así como el número accidentes ofídicos registrados oficialmente [134] (ver Capítulo 1 y 9). De hecho, es sorprendente que anualmente se presente un bajo número de mordeduras ocasionados por estas especies, teniendo en cuenta su gran tamaño (> 3,5 metros [89]), así como su amplia distribución en el país, abarcando cuatro de las cinco ecorregiones colombianas.

Los aspectos mejor estudiados del género *Lachesis* son su sistemática y taxonomía. Estos estudios han incluido múltiples líneas de evidencia (ADN, morfología hemipenial, el patrón de color y el conteo de escamas) para establecer los parentescos evolutivos y la delimitación de especies dentro del género. A pesar de esto, las poblaciones colombianas de las dos especies distribuidas en el país están pobremente representadas en estos estudios, o no han sido incluidas [134].

Es importante resaltar que en Colombia las especies de verrugosos *L. acrochorda* (Figura 5 Inferior) y *L. muta*, tienen distribuciones alopátricas. *Lachesis acrochorda* se distribuye en el Pacífico colombiano, región del Urabá-Darién, y cuenca media del río Magdalena; mientras que las poblaciones de *L. muta* se distribuyen en las laderas orientales de la Cordillera Oriental y en la ecorregión amazónica [135].

El conocimiento sobre la composición y actividad biológica de los venenos de los verrugosos colombianos es muy limitado. La composición proteica del veneno de *L. acrochorda* se conoce en poblaciones de la costa del Pacífico y la cuenca media del río Magdalena en Colombia, lo que permite apreciar que la conformación del veneno de *Lachesis* es aparentemente muy conservadora en todas las especies del género [136,137]. Sin embargo, en el futuro se publicarán algunos estudios de sistemática molecular y nuevos análisis venómicos entre poblaciones de *L. acrochorda* del suroeste, noreste y costa pacífica de Colombia, que muestran una baja variabilidad entre linajes (A.M. Franco-Vásquez comunicación personal 2024). Actualmente, no se cuenta con caracterizaciones proteómicas de los venenos de *L. muta* de poblaciones colombianas. En general, los registros de distribución e información general de la biología de *L. muta* de las poblaciones colombianas es muy escasa o inexistente [138]. Por lo tanto, es prioritario caracterizar los venenos de los verrugosos de la Amazonía colombiana dada su importancia médica, así como evaluar la posible variabilidad en la composición y actividades biológicas de los venenos entre las poblaciones colombianas y brasileras.

Perspectivas sobre las víboras poco estudiadas en Colombia

Los últimos 20 años de investigaciones herpetológicas nos han permitido esclarecer varios de los procesos biológicos importantes en las principales especies de víboras colombianas. Los vipéridos de los géneros *Bothrocophias* y *Bothriechis* representan uno de los grandes retos a ser abordados por los investigadores que emplean marcadores moleculares como herramientas para indagar las trayectorias evolutivas de estos grupos, y así ayudar a comprender sus morfologías crípticas y distribuciones

enigmáticas. La reciente descripción de dos nuevas especies de *Bothrocophias* para Colombia [75], señala la importancia de evaluar las poblaciones crípticas de algunas especies que históricamente presentan una amplia distribución geográfica en Suramérica (p. ej., *B. microphthalmus*).

De manera similar, la propuesta de nuevas especies de *Bothriechis* para Colombia abre un espacio para investigaciones más profundas sobre los venenos del grupo de víboras arborícolas más conspicuo en Colombia [139]. Sin embargo, estos esfuerzos se vieron obstaculizados debido a las significativas inconsistencias en la delimitación de especies dentro de las poblaciones colombianas, así como por la evidencia débil y los linajes no respaldados propuestos por Arteaga et al. [139] (ver Capítulo 1). Recientemente, Reyes-Velasco [222] revaluó la propuesta taxonómica de Arteaga et al. [139], demostrando que estos autores interpretaron incorrectamente sus resultados. Las diferencias genéticas que ellos interpretaron como límites entre especies, reflejan en su lugar variación clinal, no linajes independientes. Además, Reyes-Velasco concluye que dentro del complejo *B. schlegelii*, solo tres especies (*B. nigroadspersus*, *B. schlegelii* y *B. supraciliaris*) deben considerarse como válidas. El resto de los taxones propuestos Arteaga et al. [139], incluidos *B. khwargi*, *B. klebbai*, *B. rahimi*, *B. rasikusumorum* y *B. torvus*, no se sostienen bajo el análisis más riguroso presentado por Reyes-Velasco [222], y, por lo tanto, deben ser sinonimizadas con *B. schlegelii*. En consecuencia, coincidimos con las conclusiones de Reyes-Velasco [222] y recomendamos que las futuras publicaciones que traten con poblaciones colombianas de *Bothriechis schlegelii* se refieran a este como el complejo de especies *B. schlegelii* (ver Capítulo 1).

La Tabla 1 resume los marcadores moleculares disponibles para las diferentes especies de víboras que habitan en Colombia, con los cuales se han construido las principales filogenias publicadas actualmente, y constituyen nuestra comprensión actual de los caminos evolutivos de las víboras colombianas. No obstante, varios taxones y poblaciones de víboras en Colombia están pobremente representadas o no han sido incluidas en estos análisis [63, 92, 93, 101, 55]. Por tanto, el conocimiento y las relaciones evolutivas de las víboras colombianas es muy limitado.

Bothrops asper ha sido la única especie colombiana que cuenta con amplio análisis genético [53, 60], empleando genes como el citocromo b y NDH4. Esperamos que en los próximos años surjan los resultados de algunos proyectos en curso, que investigan las trayectorias evolutivas que explican la compleja historia filogenética de víboras colombianas como *B. atrox*, *P. nasutum*, *P. lansbergii* y *Crotalus durissus* (Cubides-Cubillos et al; Arias-Sosa et al. *en prensa*).

Tabla 1. Datos de marcadores moleculares publicados para víboras de Colombia y otros países de la región neotropical.

Especies	Citocromo b	NDH4	Genes nucleares	Microsatélites
<i>Bothriechis schlegelii</i>	+	*	-	-
<i>Bothrocophias hyoprora</i>	+	+	-	-
<i>Bothrocophias tulitoi</i>	+	+	-	-
<i>Bothrocophias myrringae</i>	+	+	-	-
<i>Bothrocophias myersi</i>	-	-	-	-
<i>Bothrocophias colombianus</i>	-	-	-	-
<i>Bothrops asper</i>	+	+	*	-
Linaje <i>B. rhombeatus</i>	-	-	-	-
Linaje <i>B. ayerbei</i>	-	-	-	-
<i>Bothrops atrox</i>	+	+	+	*
<i>Bothrops bilineatus</i>	+	+	*	-
<i>Bothrops punctatus</i>	-	-	-	-
<i>Bothrops pulcher</i>	-	-	-	-
<i>Crotalus durissus</i>	+	+	+	-
<i>Lachesis acrochorda</i>	+	+	-	-
<i>Lachesis muta</i>	+	+	-	-
<i>Porthidium lansbergii</i>	+	+	*	-
<i>Porthidium nasutum</i>	+	+	*	-

(+) Datos para especies colombianas. (*) Datos de especies de otros países. (-) datos no publicados. Para la especie *P. lansbergii* y *P. nasutum*, los datos moleculares corresponden a investigaciones en curso desarrolladas por Cubides-Cubillos et al. en prensa. Los datos de *C. durissus* correspondiente a una revisión desarrollada por Mario Vargas y colaboradores; las otras secuencias fueron recuperadas en el portal del NCBI [3,50,53,63,75,95,96,104,114].

3. Actividades biológicas y proteómica de los venenos de víboras colombianas

Desde una perspectiva evolutiva, la selección de toxinas específicas en los venenos de las serpientes parece haber sido un proceso limitado, que conllevó fijar un número reducido de familias de proteínas en el tiempo [140]. De hecho, la restringida variedad de familias proteicas aparentemente promovió una rápida evolución de numerosas funciones biológicas para hacer frente a los requerimientos dietarios y estrategias de caza de estas serpientes [141]. Es por ello, que los venenos son considerados como

adaptaciones tróficas que facilitaron a las serpientes el poder capturar, someter y digerir a sus presas, respondiendo de forma específica al tipo de presa y su disponibilidad en el hábitat. Esto explica porque los venenos de las serpientes exhiben una variación significativa en su composición [142].

Es bien conocido que la composición del veneno de las serpientes presenta variaciones en todos los niveles taxonómicos (entre familias, géneros y especies), pero la comprensión de cómo son los mecanismos de acción aun es tema de investigación [143,144]. Para poder comprender los determinantes de esta variación se requiere realizar estudios enfocados en los procesos evolutivos de adaptación, coevolución, teniendo como marco de referencia hipótesis filogenéticas y ecológicas que expliquen su relacionamiento evolutivo [110,145,146,144]. El poder comprender como varía la composición en los venenos tiene un impacto transcendental en las ciencias aplicadas y biomédicas, ya que ayudará significativamente al desarrollo de nuevos medicamentos, así como al mejoramiento y eficacia de lo antiofídicos desarrollados para atender el envenenamiento [111,147] (ver Capítulo 6 y 10).

Varios países de Suramérica presentan una alta prevalencia de accidente ofídicos del género *Bothrops*, los cuales se asocian con envenenamientos graves y potencialmente mortales (ver Capítulo 9). Esto ha llevado a la estigmatización de las restantes especies de víboras, así como de serpientes no venenosas con apariencia similar. Esta estigmatización ha resultado en la matanza deliberada por parte de diversas comunidades humanas a múltiples especies de serpientes en todo el continente. Particularmente, existe un rechazo generalizado hacia las especies del género *Bothrops*. No obstante, este rechazo no es infundado, debido a su amplia distribución en diversas zonas ecológicas que confluyen con las principales áreas agrícolas, así como su alta capacidad para provocar envenenamientos, estas víboras se encuentran entre las serpientes venenosas más peligrosas de las regiones tropicales de Centro y Suramérica. Particularmente en Colombia, el envenenamiento botrópico representa el 62% del total de los casos anuales [111,148] (ver Capítulo 9).

Actualmente, el estudio de los venenos emplea un enfoque multidisciplinario, que utiliza tecnologías “ómicas” como la genómica, transcriptómica, proteómica y, más recientemente, la metabolómica, logrando una mejor comprensión de los componentes de los venenos, particularmente, aquellos con bajo peso molecular [149]. Estos campos de investigación han tenido un impacto significativo en la ciencia biomédica actual [150], al incorporar técnicas avanzadas en espectrometría de masas (MS) de alta resolución [151] y métodos de anotación de novo que emplean bases de datos que requieren cantidades mínimas de veneno [152]. Esto ha permitido la identificación de nuevas familias de toxinas, toxinas individuales, isoformas únicas y variantes de empalme, así como aminos, aminoácidos y alcaloides presentes en los venenos.

Más de cien especies de víboras neotropicales son reconocidas a nivel mundial [4]; y dada su amplia distribución, los envenenamientos causados

por estas especies constituyen un evento de importancia médica con un impacto significativo en la salud pública, al causar más de 2,7 millones de accidentes ofídicos al año [108]. No obstante, los venenos de las serpientes, al mismo tiempo, son una fuente de materia prima para la adquisición de nuevos compuestos moleculares [153], que facilitan los diversos avances biotecnológicos en biología molecular y biomedicina (ver Capítulo 10).

Chippaux et al. [154] allanó el camino para el estudio de los venenos de serpientes, demostrando que estas intrincadas secreciones varían en múltiples dimensiones y están afectadas por diversos factores intrínsecos y extrínsecos [144]. Actualmente, la venómica provee múltiples modelos útiles para la comprensión de la evolución de los genes [155,156]. En las siguientes secciones, presentamos una breve reseña sobre los estudios en venómica de las víboras colombianas. También discutimos los vacíos de conocimiento y perspectivas de investigación que consideramos deben abordarse en el futuro cercano.

3.1 La complejidad del veneno: más que un arma de caza

El veneno de víbora contiene una mezcla compleja de proteínas y enzimas con diferentes actividades biológicas [157]. Su función principal es someter, predigerir y matar a la presa (ver Capítulo 5). El veneno como arma de cacería, permitió a las serpientes transitar del sometimiento mecánico de la presa (inmovilización y constricción del cuerpo) a un sometimiento químico (inoculación de veneno) [158]. Así, el sistema de inoculación de veneno se convirtió en una característica principal de las serpientes avanzadas [159], así como un rasgo muy distintivo para comprender la evolución y ecología de varias especies de serpientes [141].

Esta mezcla compleja de proteínas es producida por glándulas bucales especializadas que son homólogas a las glándulas salivales y de Duvernoy presentes en las serpientes de la superfamilia Colubroidea [157,160]. Estas toxinas se originaron a partir de eventos de duplicación de genes que codifican proteínas con funciones fisiológicas no tóxicas (cuyas proteínas resultantes son reclutadas por la glándula venenosa) pero que muestran una expresión selectiva en una estructura en particular [141,161].

Con el tiempo, las proteínas codificadas por las glándulas venenosas fueron sometidas a presiones selectivas que dieron como resultado su modificación estructural y funcional, e incluso, la supresión de su expresión en la glándula [161]. Sin embargo, aún no se comprende muy bien cuales fueron los mecanismos que conllevaron a los cambios en los componentes estructurales y de expresión proteica de los genes. Actualmente, conocemos parcialmente cómo se dio la duplicación de genes relacionados con el origen de las funciones originales de las diversas proteínas y toxinas. Por lo tanto, comprender el orden de estos eventos que explican el origen de cualquier proteína es un desafío aún por resolver [162].

Los venenos de serpientes presentan una gran variabilidad intraespecífica e interespecífica, en gran medida porque se trata de rasgos fun-

cionales ecológicos que evolucionan dinámicamente. Se han propuesto varios factores que influyen en su síntesis, como la estacionalidad, la distribución geográfica, variación ecológica entre poblaciones, así como la variabilidad en la dieta entre los sexos y durante el desarrollo ontogenético de los individuos [154,163,164]. Recientemente se ha sugerido que las actividades biológicas de algunos venenos son útiles a la hora de defenderse de los depredadores, entre los cuales el ser humano hace parte de esta interacción [165].

Por ejemplo, los venenos de tres linajes de cobras escupidoras tienen la capacidad de activar neuronas sensoriales en mamíferos, induciendo dolor [165]. De hecho, la divergencia de los clados de cobras escupidoras en África (6,7 millones de años) podría estar asociada con la evolución del bipedalismo y el desarrollo de cerebros más grandes en los homínidos [165], lo que sugiere que «escupir veneno» podría ser un mecanismo defensivo que evolucionó como respuesta a las interacciones negativas con homínidos antiguos (nuestros antepasados). En este sentido, las serpientes necesitaron producir grandes cantidades de veneno, lo que implícitamente haría difícil inferir si el veneno tiene un alto costo energético (en comparación con otros rasgos ecológicos). No obstante, esta premisa no se ha logrado poner a prueba, debido a la dificultad de establecer experimentalmente un diseño en el que se pueda controlar de forma adecuada el tamaño y tipo de presas, la modulación autónoma por parte de la serpiente en la producción, y propulsión de veneno, así como cuál es la toxicidad óptima de cada taxón para la generación de dolor o envenenamiento [166].

El accidente ofídico, es un evento circunstancial o provocado en el que una serpiente muerde a un humano [167]. Como resultado de este incidente, se genera una intoxicación debido a la inoculación de veneno dando lugar a un caso clínico considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las enfermedades tropicales desatendidas más importantes (ver Capítulo 9). Desafortunadamente, los accidentes ofídicos ocurren con mayor frecuencia en los países en vía de desarrollo, representando casi el 95% del total de casos de accidentes ofídicos reportados en todo el mundo [168]. Además, dado que estos accidentes son frecuentes en las comunidades rurales de bajos ingresos y con escaso acceso a los servicios de salud, hacer frente a estos envenenamientos es desafiante, debido al bajo acceso a los antiofídicos y los altos costos en la movilidad de los accidentados [168,169] (ver Capítulo 6).

En perspectiva, los venenos son un rasgo que evoluciona rápidamente; se ha inferido que los factores ambientales pueden generar presiones adaptativas que modulan su variación funcional entre las especies. Al ser una característica adaptativa empleada tanto para alimentarse como para disuadir o defenderse de los posibles depredadores. Actualmente, el desarrollo de antiofídicos efectivos que neutralicen sus envenenamientos es un gran desafío, ya que estas terapias deben considerar la amplia variabilidad intraespecífica en la composición de los venenos. De hecho, investigaciones recientes que indagaron sobre la divergencia del contenido de crotamina en poblaciones *Crotalus durissus*, advierten sobre la

necesidad de desarrollar antiofídicos que logren neutralizar la amplia variabilidad de sus toxinas [170,171].

Uno de los principales sistemas diana de los venenos de algunas serpientes es el sistema nervioso de su presa o posible depredador [172]. La presencia de neurotoxinas en estos venenos se atribuye a su capacidad de alterar el funcionamiento normal en la transmisión de señales eléctricas del sistema nervioso central y/o periférico [173,174]. La alta especificidad y selectividad de las neurotoxinas de los venenos de las serpientes de cascabel se han utilizado ampliamente para estudiar la estructura y función de las neuronas del sistema nervioso central y elementos de su membrana celular implicados en la transmisión eléctrica de las señales [175]. Particularmente, estas toxinas se han empleado en estudios de patologías neurológicas que provocan enfermedades como el Parkinson y Alzheimer (ver Capítulo 10). Sin embargo, actualmente el efecto de estas toxinas en el sistema nervioso periférico y algunos órganos específicos ha sido pobremente explorado [172]. Se espera que, en el corto plazo, los investigadores sigan adquiriendo conocimientos sobre la administración dirigida de fármacos derivados de toxinas de serpientes empleadas para el tratamiento de diversas afecciones nerviosas, tumores y enfermedades neurodegenerativas. Mientras tanto, numerosas investigaciones persisten en la búsqueda e identificación nuevos péptidos derivados de los venenos de serpientes que ayuden a comprender la correlación entre la estructura y función, permitiendo el desarrollo de nuevas terapias biomédicas (ver Capítulo 10).

En Colombia, la colonización histórica de los vipéridos de nuevos nichos ecológicos en diferentes ecosistemas montañosos, de tierras bajas secas o tropicales húmedos, contribuyó de forma significativa a la diversificación fenotípica de sus venenos. Este proceso se ejemplifica en las poblaciones colombianas de *Crotalus durissus* en las que se observa una contrastante variación intraespecífica en la composición de sus venenos [171]. No obstante, aún se requiere mayores esfuerzos de investigación para comprender las relaciones entre la composición de los venenos, su contexto ecológico y su vínculo con las transformaciones del hábitat por actividades humanas. Para ello, se requiere el desarrollar un marco conceptual más robusto, que permita proponer hipótesis que expliquen la diferenciación o especificidad de los venenos en un contexto ecológico y evolutivo.

Comprender cómo han evolucionado estos venenos en relación con las interacciones interespecíficas con los humanos ayudaría a investigar el efecto antropogénico sobre las poblaciones naturales de víboras, así como a resolver algunas cuestiones relacionadas con la eficacia de los antivenenos. Nuestro propósito en este apartado fue explicar que los venenos de serpientes, antes de ser un componente biológico que desencadena un cuadro clínico complejo (ver Capítulo 9), son un arma letal de caza, modificada y seleccionada, a través del curso de la evolución de forma independiente en múltiples especies de serpientes. Este rasgo evolutivo les otorgó a las víboras uno de los más sofisticados medios para alimentarse y defenderse.

3.2. Estudios en proteómica en Colombia

A pesar de la gran diversidad de vipéridos en Colombia, sólo nueve especies (40%) han sido objeto de estudios proteómicos, contando con al menos una población caracterizada en todo su rango de distribución dentro del país (Tabla 2). Las proteínas presentes en estos venenos se clasifican entre siete a doce familias de proteínas. Generalmente, las toxinas de la familia PLA₂ son los componentes más abundantes identificados, seguidas por SVMP, SVSP y LAAO. Sin embargo, existen algunas excepciones. Por ejemplo, el veneno de *C. durissus* exhibe una concentración significativa de crotoxina (64,71%), siendo una toxina característica de las serpientes de cascabel suramericanas [170,176], pero con variación intraespecíficas entre las poblaciones colombianas. Por ejemplo, la crotamina es una toxina que solo se presenta en las poblaciones del Caribe colombiano [171].

Hasta ahora, los venenos de las especies del género *Bothrops* presentan las mayores proporciones de SVMP que PLA₂. Este mismo patrón se observó en los venenos de *P. lansbergii* y *L. acrochorda*. Por el contrario, el veneno de *Bothrocophias myersi* tiene un mayor porcentaje de PLA₂, y sus toxinas se agrupan en 12 familias proteicas, convirtiéndolo en el veneno más complejo entre todos los vipéridos colombianos con proteomas conocidos. De forma similar, el veneno de *L. acrochorda* exhibe un perfil proteómico único al presentar elevadas proporciones de SVSP y BBP (35,1% y 25,5%), y un bajo porcentaje de PLA₂. En contraste, el veneno de su especie hermana *L. muta* (verrugoso amazónico) tiene la mayor cantidad de LAAO (9,6%) entre todos los proteomas de los vipéridos Colombianos.

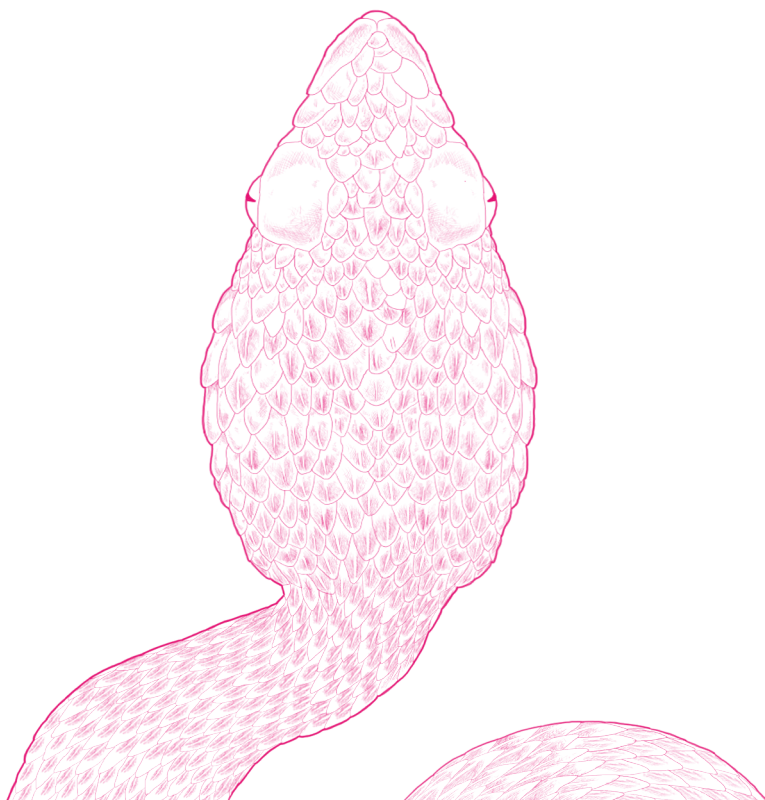


Tabla 2 . Proteomas conocidos de las especies de víperidos distribuidas en Colombia. Cada toxina se expresa en su proporción relativa (%).

Toxinas	<i>Bothrops atrox</i>	<i>Bothrops asper</i>	<i>Bothrops ayerbei</i> **	<i>Bothrops rhombeatus</i> **	<i>Bothrops punctatus</i>	<i>Porthidium lansbergii</i>	<i>Bothrocophias myersi</i>	<i>Lachesis acrochorda</i>	<i>Crotalus durissus</i>
SVMP	48,5	33,2	53,7	39,7	41,4	35,5	21,5	23,2	3,3
PLA ₂	24,1	31,3	0,7	23	9,3	16,2	54,1	2,3	0,58
SVSP	10,9	3,89	9,3	4,9	5,4	4,5	3,4	35,1	6,33
LAOO	4,7	3	3,3	2,1	3,1	3,6	1,10	9,6	3,16
Hya	*	*	*	*	*	*	0,01	*	*
crotoquina	*	*	*	*	*	*	*	*	64,71
CRISP	2,6	1,45	1,1	0,7	1,2	1,4	*	0,9	1,27
Dis	1,7	3,27	2,3	4	3,8	12,9	0,62	*	13,7
PLB	*	*	*	*	*	0,7	0,37	*	*
PDE	*	*	0,7	0,2	*	0,3	0,08	*	*
CTL	7,1	8,54	10,1	3,1	16,7	6,7	0,56	6,9	1,18
VEGF	*	*	*	*	1,7	2,2	*	0,6	*
NGF	*	*	0,1	*	*	*	0,07	*	*
PNP	*	*	*	*	*	*	*	*	*
BPP	0,3	*	8,3	7	*	*	*	21,5	*
PEP	*	*	8,7	*	10,7	*	9,1	*	*
Nuc	*	*	*	*	*	0,4	0,02	*	*
SVMPI	*	*	*	10	*	*	*	*	*
Crotamina	*	*	*	*	*	*	*	*	5,77

Abreviaturas: PLA₂s : Fosfolipasa A₂ ; SVMP : metaloproteínasa; SVMPI : Inhibidoras de metaloproteínasa ;LAOO : L-aminoácido oxidasa; CTL: Lectina de tipo C/ similar a lectina; CRISP: Proteína secretora rica en cisteína; SVSP: Serina proteínasa; Nuc: nucleotidasa; PDE : fosfolipasa; Hya: Hialuronidasa; NGF: factor de crecimiento nervioso; PLB: Fosfolipasa B; PNP: péptidos y/o compuestos no proteicos; BPP: Péptido potenciador de bradicinina. * Ausente en el proteoma. ** Especies dudosas del complejo de especies *Bothrops asper* (ver Capítulo 1) [118, 136,171,181,184,187,192,195].

Curiosamente, a pesar de que las de lectinas de tipo C han sido identificadas en todos los venenos de serpientes colombianas evaluadas, con porcentajes que oscilan entre 0,56% y 10,1%, en el veneno de *B. punctatus* esta toxina presenta un alto porcentaje en relación con sus congéneres (16,7%). De forma similar, el veneno de *P. lansbergii* exhibe las mayores concentraciones de desintegrinas, mientras que estas toxinas no fueron detectadas en el veneno de *L. acrochorda*. La ausencia o presencia de toxinas en los proteomas puede deberse a múltiples factores, no obstante, un factor común es las limitaciones inherentes a las técnicas empleadas para detectar compuestos con bajas concentraciones. No obstante, estudios rigurosos han logrado detectar toxinas a muy bajas concentraciones. Por ejemplo, en el veneno de *B. myersi*, se logró detectar una cantidad mínima (0,01%) la presencia de hialuronidasas las cuales funcionan como un factor de propagación de los venenos (ver Capítulo 5). En promedio, en la mayoría de las investigaciones se describieron ocho grupos de toxinas o familias proteicas, de las cuales las SVMP, PLA₂s, SVSP, LAAO, CRISP, Dis, CTL y BPP están presentes en todos los proteomas, siendo la crotoxina y crotamina componentes exclusivos del género *Crotalus*.

El veneno de *Crotalus durissus* requiere especial atención por ser el único con actividad neurotóxica y miotoxinas a partir de toxinas de bajo peso molecular. El veneno de las cascabeles colombianas está compuesto por una proporción considerable de crotoxina (64,71%), responsable de inducir la parálisis flácida del diafragma. Sin embargo, otra toxina única de este veneno es la crotamina, un pequeño polipéptido básico con actividades miotóxicas y de penetración celular [177,178], el cual como ya lo indicamos anteriormente, varía geográficamente entre las poblaciones de esta especie [171,179].

3.3 Las actividades biológicas de las víboras colombianas

En general, todas las actividades del veneno analizadas para las víboras colombianas se correlacionan con los signos y síntomas observados en los accidentes ofídicos reportados (ver Capítulo 9). No obstante, al revisar los valores reportados previamente sobre su actividad letal (LD₅₀ µg/ratón) se observa una notable variabilidad en las especies del género *Bothrops* (*B. atrox*, *B. asper*, Linaje *B. ayerbeii*, Linaje *B. rhombeatus* y *B. punctatus*; Figura 6) que varía según en cada estudio: 81,4 (80,2–83,6) [42], 63 (rango 50–81 para varias ecorregiones de Colombia) [180], 50,1 (37,5–58,3) [181], 54,9 (36,0–83,8) [181] y 47 (36–61) [180]. Esto evidencia que existe una significativa variabilidad geográfica que no ha sido explicada o explorada previamente. Los venenos más letales entre las especies de *Bothrops* caracterizadas hasta ahora son los de *B. asper* y *B. punctatus*. No obstante, esto podría cambiar en la medida que aumente el muestreo y caracterización de los venenos de las poblaciones colombianas de las especies del género *Bothrops*. Entre todas las víboras del país, el veneno de *C. durissus* es el más letal con un promedio de 1 µg/ratón (0,02–2,5) [171,180]. La alta letalidad de esta especie se atribuye a la neurotoxicidad del veneno que rápidamente paraliza y causa asfixia a sus presas [182,183].

Saldarriaga et al. [42] llevaron a cabo uno de los estudios pioneros sobre la variabilidad ontogénica de los venenos de *B. asper* en Colombia. Este estudio permitió comprender cómo *B. asper* durante sus primeras etapas de vida, desarrollan venenos con fracciones dotadas de alta actividad hemorrágica, mientras que en la etapa adulta se producen mayoritariamente fracciones con actividad hemolítica. Además, en este estudio mostró que cuando se comparan los venenos de poblaciones de *B. asper* de Colombia y Costa Rica, existen divergencias específicas asociadas con variaciones en las actividades letales, hemorrágicas, edematogénicas, miotóxicas y hemolíticas.

De forma similar, en este estudio comparamos las actividades biológicas de las principales especies de víboras de importancia biológica de Colombia. Encontramos que dentro de los linajes de *B. asper* (*B. asper*, *B. ayerbei* y *B. rhombeatus* [184]) el veneno del linaje principal de *B. asper* (distribuido en toda la región del Caribe y el valle medio del río Magdalena) es significativamente más letal que los linajes de *B. ayerbei* y *B. rhombeatus* (Figura 6). El veneno de *Bothrops asper* resultó ser más hemorrágico que el veneno del linaje de *B. rhombeatus*, pero la dosis mínima hemorrágica del linaje *B. ayerbei* fue significativamente menor, mostrando su mayor capacidad para causar hemorragia.

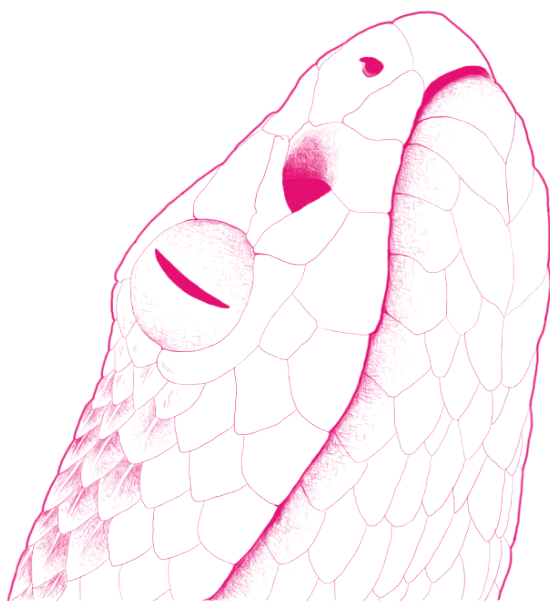
Por otro lado, el veneno del linaje *B. rhombeatus* mostró una mayor capacidad coagulante mientras que el veneno del linaje *B. ayerbei* exhibió la capacidad coagulante más baja. Además, a pesar del aislamiento geográfico entre las poblaciones de *B. asper* de la Isla de Gorgona (Océano Pacífico) y las poblaciones continentales del Valle del Cauca, las actividades biológicas de sus venenos mostraron actividades muy similares, con excepción de la actividad coagulante, la cual es mucho más baja en las poblaciones de la Isla Gorgona. Sin embargo, las actividades biológicas del veneno de estas dos poblaciones son significativamente diferentes en comparación con los venenos de las poblaciones distribuidas en la costa Caribe y en la cuenca del río Magdalena [185]. Se ha inferido que la divergencia de poblaciones dentro de algunos linajes de *B. asper* está fuertemente influenciada por la orografía de la cordillera de los Andes, así como por el cambio dinámico de sus ecosistemas que impulsa la especificidad de los diferentes nichos ecológicos [184]. De hecho, al comparar los proteomas y la diversidad genética de los linajes de *Bothrops asper*, se observa variación intraespecífica en cuatro de los componentes principales del veneno [53,60]: SVMP, SVSP, PLA₂ y CTL [184] (Figura 2).

Existe controversia en torno a las actividades biológicas del veneno de varias poblaciones del complejo de especies *Bothriechis schlegelii*. Como los explicamos anteriormente, esta especie presenta una variación clinal entre sus poblaciones que posiblemente se relaciona con la variabilidad en las actividades biológicas de sus venenos (Figura 6A, C-E). Por ejemplo, las poblaciones colombianas del noroeste del Cordillera Central (departamento de Antioquia) [180,186] y las de la región suroeste Cordillera Occidental (departamento del Valle del Cauca) [187] no presentan actividad hemorrágica. Sin embargo, el veneno de estas poblaciones

muestra actividad coagulante y una alta capacidad de formación de edema similar a lo observado en las poblaciones de Costa Rica (*Bothriechis nigroadspersus*) [188]. Dada la importancia médica de esta especie y su amplia distribución sobre las franjas de producción agrícola de los andes colombianos, es prioritario realizar estudios que exploren de forma rigurosa los determinantes en la variabilidad de las actividades biológicas del complejo de especies *Bothriechis schlegelii*. Esto permitirá a los médicos tratantes de los envenenamientos generar diagnósticos más acertados, establecer de forma oportuna y adecuada la terapia, y anticipar las posibles complicaciones clínicas.

La actividad hemorrágica de los venenos de serpientes se atribuye a la actividad de los SVMP [189]. La mayoría de los venenos de víboras colombianas caracterizados hasta ahora tienen actividad hemorrágica. Sin embargo, su potencia es variable. Generalmente, las especies de *Bothrops* spp., *Porthidium* spp., *L. acrochorda* y *Bothrocophias* spp., son más hemorrágicas que el complejo de especies de *B. schlegelii*, mientras que *C. durissus* rara vez induce hemorragia local [190-193]; y el veneno de *Bothrocophias campbelli* induce hemorragias leves y trastornos de la coagulación [194].

Porthidium lansbergii y *P. nasutum* muestran una actividad citotóxica moderada y una letalidad baja cuando se prueban en ratones, pero ambas especies muestran una alta actividad hemorrágica [195]. Además, los venenos del complejo *Porthidium nasutum-lansbergii* en Colombia inducen trastornos hemostáticos que se relacionan con su actividad procoagulante demostrada *in vitro*, su actividad fibrinogenolítica demostrada *in vivo*, y la alteración de los tiempos de coagulación. Estos venenos se caracterizan por un consumo masivo de fibrinógeno que sólo puede recuperarse mediante la aplicación de antiofídicos [90,193,196].



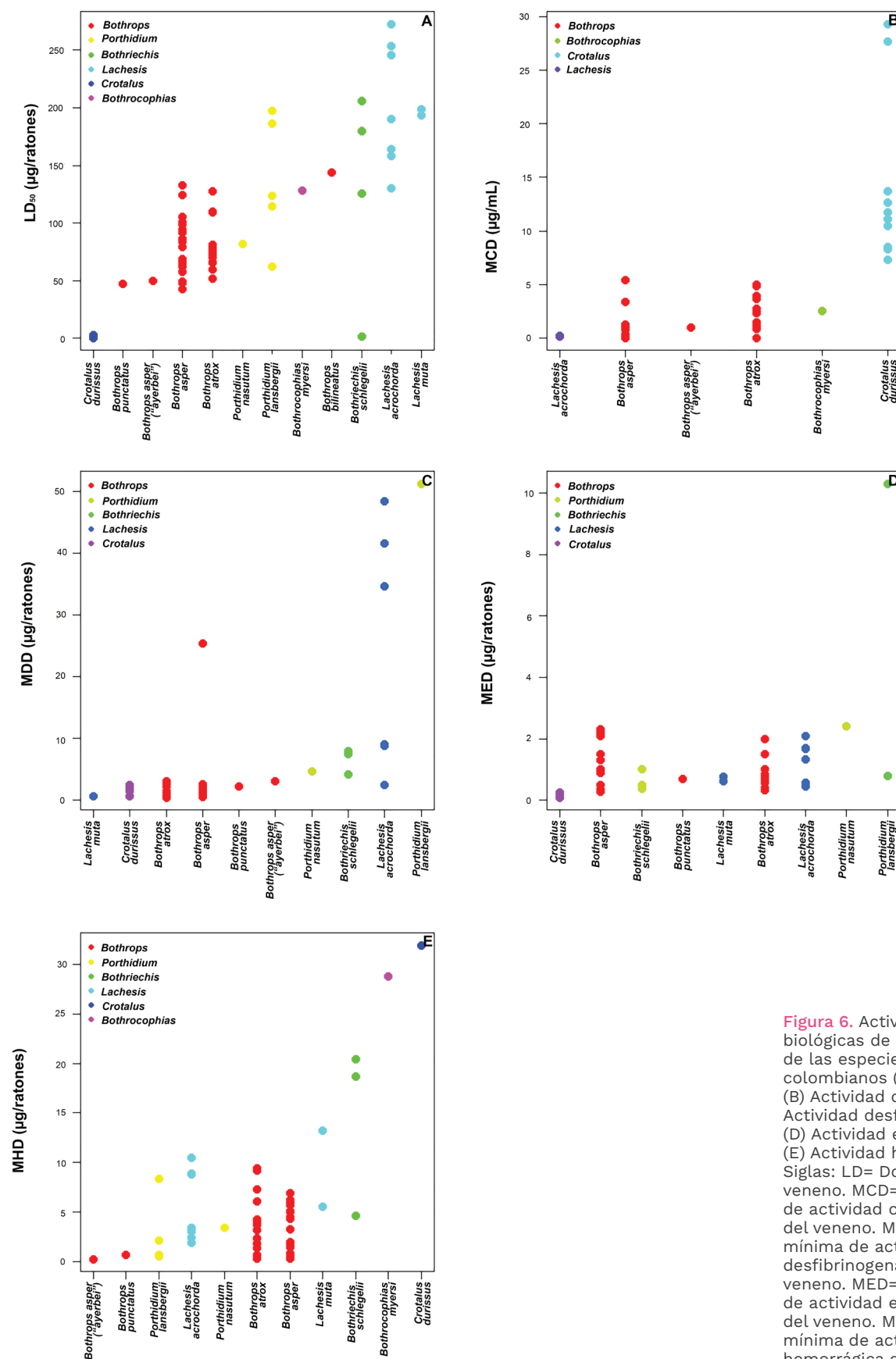


Figura 6. Actividades biológicas de los venenos de las especies de víperidos colombianos (A) Dosis letal. (B) Actividad coagulante. (C) Actividad desfibrinogenante. (D) Actividad edematizante. (E) Actividad hemorrágica. Siglas: LD= Dosis letal del veneno. MCD= Dosis mínima de actividad coagulante del veneno. MDD= Dosis mínima de actividad desfibrinogenante del veneno. MED= Dosis mínima de actividad edematizante del veneno. MHD= Dosis mínima de actividad hemorrágica del veneno.

Tabla 3. Actividades biológicas evaluadas las víboras colombianas

Especies	Letalidad	Hemorragico	Mitotoxicidad	Edemático	Coagulante	Hemolítico (actividad PLA ₂)	Desfibrinogénante	Neurotóxico
<i>Bothriechis schlegelii</i>	Evaluable	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente
<i>Bothrocophias myersi</i>	Evaluable	Presente	Presente	Presente	Presente	no evaluado	no evaluado	Ausente
<i>Bothrops asper</i>	Evaluable	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente
Linaje <i>B. ayerbei</i> *	Evaluable	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente
Linaje <i>B. rhombatus</i> *	Evaluable	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente
<i>Bothrops atrox</i>	Evaluable	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente
<i>Bothrops punctatus</i>	Evaluable	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente
<i>Crotalus durissus</i>	Evaluable	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
<i>Lachesis acrochorda</i>	Evaluable	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente
<i>Lachesis muta</i>	Evaluable	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente
<i>Porthidium lansbergii</i>	Evaluable	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente
<i>Porthidium nasutum</i>	Evaluable	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Ausente
<i>Bothrocophias campbelli</i>								
<i>Bothrocophias colombianus</i>								
<i>Bothrocophias hyoprora</i>								
<i>Bothrocophias myringae</i>								
<i>Bothrocophias tulitoi</i>								
<i>Bothrops bilineatus</i>								
<i>Bothrops oligobalius</i>								
<i>Bothrops pulcher</i>								
<i>Bothrops taeniatus</i>								
<i>Bothrops venezuelensis</i>								

* Especies dudosas en el complejo de especies *Bothrops asper* (ver Capítulo 1) [42,118,136,171,180-190,194].

3.4 Perspectivas de la investigación sobre antiofídicos

Los antiofídicos como terapia para la neutralización del envenenamiento causado por las mordeduras de serpientes se desarrollaron en el siglo XIX (ver Capítulo 6 y 7). A través del tiempo, esta terapia ha tenido grandes mejoras en la purificación y selección de inmunoglobulinas con alta capacidad neutralizante, estableciéndose como la terapia estándar y primordial para atender los accidentes botrópicos, así como los accidentes ofídicos en general alrededor del mundo [108,197]. Los antiofídicos se elaboran a partir de anticuerpos (inmunoglobulinas) o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a las toxinas del veneno, neutralizándolas y permitiendo su eliminación del organismo.

La administración de los antiofídicos es vía intravenosa. Al entrar al torrente sanguíneo los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se unen a las toxinas del veneno impidiendo que continúen dañando los tejidos o interfiriendo con funciones fisiológicas vitales. Estas inmunoglobulinas son obtenidas y purificadas del plasma de grandes mamíferos (generalmente caballos), que han sido previamente inmunizados con dosis subletales de veneno de serpiente [198,199] (ver Capítulo 6). Los antiofídicos pueden ser monovalentes o polivalentes, dependiendo de si la inmunización de los caballos se realiza con veneno de una única especie, o con la mezcla de venenos de múltiples especies, respectivamente [200].

En algunos casos, esta terapia puede provocar reacciones adversas (p. ej., anafilaxia) [111], sin embargo, la incidencia y gravedad de estas reacciones asociadas con la administración de antiofídico se han reducido significativamente mediante la mejora técnica y tecnológica en la purificación de las inmunoglobulinas [201], lo que a su vez, ha aumentado la eficacia terapéutica de los antiofídicos para detener las manifestaciones sistémicas de la ofidiotoxicosis [202]. Sin embargo, la heterogeneidad del veneno entre especies podría explicar las diferencias en los síntomas clínicos de los accidentes ofídicos registrados en diferentes regiones geográficas del país [154]. No obstante, no se cuenta con estudios que asocien de forma robusta la variabilidad de los síntomas clínicos observados en los accidentes ofídicos con la variabilidad geográfica de las actividades biológicas de los venenos y proteomas de las especies causantes del accidente. Actualmente, el desarrollo de nuevos enfoques de inmunoterapia para hacer frente al envenenamiento por serpientes en todas las regiones tropicales del mundo representa un enorme desafío [111].

Por ejemplo, las pruebas preclínicas de neutralización del veneno de *C. durissus* utilizando el antiveneno del Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS), empleadas para calcular la dosis efectiva media (DE_{50}), muestran que se requiere más antiofídico para neutralizar el veneno de las poblaciones del Caribe (2,3 mg veneno/mL) que las de la cuenca media del Magdalena (1,4 mg veneno/mL), o la ecorregión de la Orinoquia (0,6 mg veneno/mL) [171]. Por lo tanto, existe la necesidad de utilizar la combinación de venenos de diferentes orígenes geográficos (=poblaciones/linajes) en la producción de antiofídicos. Asimismo, es importante priorizar la investigación del veneno de serpiente utilizando una combinación de

herramientas proteómicas, toxicológicas y bioquímicas funcionales [199]. De hecho, Calvete et al. [111] presentan un protocolo útil para investigar la inmunorreactividad antígeno-anticuerpo, abriendo una nueva puerta para el desarrollo de inmunoterapias que hacen frente a envenenamientos por venenos homólogos y heterólogos en diferentes especies de víboras.

Con base en la inmunorreactividad de las diversas toxinas frente a los antiofídicos, estos componentes tóxicos podrían agruparse en tres tipos de toxinas: completamente inmunodegradadas, parcialmente inmunodegradadas y no inmunodegradadas. Por tanto, los protocolos de inmunización deben mejorarse mediante el uso de mezclas de inmunógenos [111]. Este enfoque novedoso con un fundamento inmunológicamente sólido proporciona las bases para el desarrollo de antiofídicos mediante el uso de análisis inmunoquímicos y proteómicos para la neutralización de los venenos de las serpientes de importancia médica en una región en específico [111].

Un primer ejemplo de este tipo de nuevas terapias es el desarrollo de un antiofídico para el tratamiento de las mordeduras causadas por *Bothrops lanceolatus* (víbora endémica de la isla de Martinica en las Antillas Menores de Martinica). Este producto, Sanofi-Pasteur Bothrofav®, ha demostrado buena eficacia preclínica en la neutralización, previniendo oportunamente el desarrollo de los eventos sistémicos más graves [203,204].

La limitada disponibilidad de antivenenos en varios países de Centro y Suramérica como resultado de diferentes procesos sociales (sociales y ambientales; ver Capítulos 6) ha creado la necesidad y el desafío de mejorar la capacidad neutralizante de los antiofídicos disponibles. Para ello, se ha propuesto como alternativa el uso de inhibidores de pequeño tamaño molecular que contrarresten el efecto de las principales proteínas del veneno de serpiente que causan los síntomas clínicos. La investigación en este campo ha cobrado fuerza recientemente [144]. El efecto de estos inhibidores ha sido estudiado tanto *in vitro* como *in vivo*, obteniendo resultados prometedores para la inhibición de PLA₂, SVMP y SVSP [205,206].

Investigadores del Instituto Clodomiro Picado dirigidos por el Dr. José María Gutiérrez realizaron estudios detallados a nivel proteómico de venenos de *Bothrops caribbaeus* y *B. lanceolatus* (especies incluidas dentro del complejo *B. atrox*), encontrando inmunorreactividad ante el antiofídico polivalente producido en Costa Rica para neutralizar el veneno de las serpientes de cascabel centroamericanas. Este antiofídico logró inmunodegradar el 80% de las proteínas y neutralizar las actividades letales de los venenos en estas dos especies [205]. Otras investigaciones reportan la importancia de comparar los proteomas entre especies con una historia natural similar, pero con incertidumbres taxonómicas o linajes no definidos dentro del complejo *Bothrops asper-atrox* [111,207,208]. Los hallazgos de los investigadores costarricenses aportan un importante avance en la comprensión de la actividad cruzada en los antiofídicos que contrarrestan los síntomas de envenenamiento causados por los vipéridos americanos.

En Colombia, se han realizado experimentos buscando opciones complementarias al tratamiento con antiofídicos. Recientemente, se han producido proteínas recombinantes para mejorar la inmunogenicidad de proteínas como el PLA₂ y las toxinas de tres dedos (3FTx), lo cual representa un avance novedoso para el futuro en el desarrollo los antiofídicos que neutraliza las toxinas de las serpientes del género *Micrurus* [209]. Asimismo, se han realizado experimentos utilizando moléculas purificadas de extractos de plantas para inhibir ciertas actividades biológicas de los venenos de serpientes [192,210,211], así como inhibidores sintéticos que han mostrado actividad inhibidora contra PLA₂ y SVMP [212], todos estos en pruebas preclínicas.

La incorporación gradual de técnicas cromatográficas y de espectrometría de masas para complementar las plataformas actuales recomendadas por la OMS en la evaluación de antivenenos, son ideales para establecer su validez clínica en un rango geográfico definido [213]. Además, cuando se combinan con ensayos de neutralización *in vivo*, los antiofídicos representan un buen complemento para evaluar la eficacia terapéutica de los antiofídico contra los mismos venenos utilizados en su producción [214].

Los antiofídicos polivalentes como el ICP (Costa Rica), INS (Colombia), PROBIOL (Colombia), UCV (Venezuela), BIOL (Argentina) y INS-PERÚ (Perú) pueden reconocer las principales familias de toxinas presentes en los venenos de *Bothrops asper* (SVMP, PLA₂s, CRISP, SVSP, CTL); de estos el antiofídico del INS es la terapia más eficaz y segura [181]. Al realizar estudios comparativos entre los antiofídicos disponibles en Colombia, el antiofídico del INS muestra la capacidad de inmunoreconocimiento más efectiva, así como la mejor capacidad neutralizante de las actividades biológicas de los venenos de *Bothrops* spp., *Bothrocophias* spp., *Bothriechis* spp., *Crotalus durissus*, *Lachesis* spp., y *Porthidium* spp., seguido por el antiofídico de Silanes (Bioclon) México [190]. En un estudio más reciente [185], se evaluaron venenos de *B. asper* de la Isla Gorgona y de las ecorregiones del Pacífico y occidente de Colombia, a partir de ensayos de inmunorreactividad utilizando antivenenos INS y Probiol. Los resultados obtenidos indican nuevamente que el antiveneno INS tuvo mayores títulos de anticuerpos y neutralización en comparación con el antiveneno Probiol, mostrando su mayor capacidad neutralizante para los venenos de *B. asper* de la población de la isla Gorgona.

Finalmente, es importante estudiar la variabilidad en la composición proteica de diferentes venenos de los vipéridos y desarrollar estudios que describan las correlaciones estructura-función de toxinas individuales que ayudarán a mejorar la comprensión de los venenos como adaptaciones tróficas y defensivas en diferentes especies [213]. Asimismo, es importante continuar buscando alternativas para el posible uso de las toxinas del veneno como compuestos activos para el desarrollo de nuevos medicamentos, no sin antes, profundizar en el estudio de la historia natural de los géneros vipéridos presente en Colombia (p. ej., distribución), que permita comprender cómo la destrucción de sus hábitats naturales y el cambio climático afecta la variabilidad de sus venenos y supervivencia en los ambientes naturales y alterados.

Apéndice: Material y métodos

Análisis filogenéticos

Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando la estimación de máxima verosimilitud en el software IQ tree. [215]. Los modelos evolutivos se realizaron utilizando el buscador de modelos. [216]: TN+F+I: CYTB1_ND41, TIM+F+R2: CYTB2, GTR+F+I+G4: CYTB3_ND43, TN+F+R2: ND42. Los análisis se realizaron utilizando una matriz de 102 secuencias concatenadas para 51 terminales para el grupo *Bothrops atrox* y el género *Porthidium* distribuidos en Colombia, Brasil, Ecuador, Venezuela y Costa Rica. Se utilizaron 20 especies como grupo externo: *Gloydus halys*, *Sistrurus miliaris* y *S. catenatus*; *Crotalus horridus*, *C. ruber*, *C. atrox* y *C. durissus*; *Agkistrodon piscivorus* y *A. contortrix*; *Mixcoatlus melanurus*; *Ophryacus ondulatus*; *Cerrophidion godmani*; *Metlapilcoatlus (Atropoides) nummifer* y *M. mexicanus*; *Atropoides picadoi*, *Bothrocophias hyoprora*, *B. tulitoi*, *B. myrringae*; *Bothriechis nigroadspersus*; y *Bothrops jararaca*. Además, se utilizó el software phytools para realizar un análisis de relaciones a nivel filogenético [217], utilizando dos proteomas publicados para especies de víboras colombianas y algunos linajes/clados relacionados.

Prueba de biológicas

Las pruebas biológicas de letalidad, coagulante, desfibrinogenante, hemorrágica y edemática fueron realizadas por el INS en cumplimiento de sus actividades de producción de sueros antiofídicos y alineados a la caracterización de venenos que indica la OMS en «Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins; 2017». Todas las pruebas fueron realizadas en ratones de la cepa CD1 de 18-22 g acorde con los protocolos establecidos por el INS para el uso de animales de laboratorio.

Dosis letal 50 (DL_{50}).— Evaluamos la letalidad del veneno siguiendo los procedimientos y protocolos descritos por [200,218], así como el protocolo de producción MEN-R04.6022-011 del INS. La dosis letal media de un veneno se define como la cantidad de veneno que causa la muerte en el 50% de los ratones inoculados. Para determinar DL_{50} se prepararon diferentes dosis de veneno en solución salina las cuales se les inyectó por vía intraperitoneal en grupos de cinco ratones. Después de 48 horas se registraron el número de muertes. Se empleó como grupo control cinco ratones a los que se les inyectó solución salina. Finalmente, la DL_{50} se estimó usando métodos estadísticos, como Spearman-Kärber, función Probit u otros métodos no paramétricos [219].

Dosis mínima coagulante (DMC).— Realizamos pruebas de coagulación in vitro siguiendo los procedimientos y protocolos descritos por [200,220], así como el protocolo de producción MEN-R04.6031-001 del INS. Definimos como actividad coagulante positiva la dosis mínima de veneno que indujo la coagulación en plasma humano citratado.

Dosis mínima desfibrinogenante (DMD).— Realizamos pruebas de desfibrinogénación in vivo siguiendo el protocolo de producción MEN-R04.6022-046

del INS, así como los procedimientos y protocolos descritos por [200,220]. La dosis DMD corresponde a la dosis de veneno, que, administrada vía intravenosa en cinco ratones inyectados con una dilución de veneno, induce incoagulabilidad luego de 2 horas de tomada la muestra.

Dosis mínima edemática (DME).—Realizamos pruebas de edema in vivo siguiendo el protocolo de producción MEN-R04.6022-043 del INS, así como los procedimientos y protocolos descritos por [200]. La DEM corresponde a la dosis de veneno que induce un edema del 30% en patas de ratón, posterior a la inyección y se cuantifica mediante pesaje de las patas y establecimiento de la diferencia en el aumento del edema. Para ello, se prepararon soluciones en diferentes concentraciones de veneno. Cada dilución es inyectada a cinco ratones en almohadilla plantar de la pata derecha, mientras que la pata izquierda se inocula solución salina estéril (0,85%). Una hora después de las inoculaciones, se realiza la eutanasia de los animales de manera ética [221]. Se cortan ambas patas (a nivel articulación tibiotarsiana) y se pesan.

Dosis mínima hemorrágica (DMH).— Realizamos pruebas hemorrágicas in vivo siguiendo el protocolo de producción MEN-R04.6022-049 del INS, así como los procedimientos y protocolos descritos por [200,220]. La dosis mínima hemorrágica se define como la cantidad de veneno capaz de inducir una lesión hemorrágica con un diámetro de 10 mm. Para determinar esto, se prepararon diferentes diluciones de veneno en solución salina con un volumen final de inyección de 50 μ L. Luego, cada dilución es inyectada a cinco ratones intradérmicamente en la piel ventral (rasurada) de los ratones. Finalmente, después de 2-3 horas, se realiza la eutanasia de los animales de manera ética [221]; se disecciona la piel y se mide el diámetro de la lesión hemorrágica resultante.

Referencias

1. Cubides-Cubillos, S.D. Actitudes, Creencias y Prácticas Desarrolladas En Comunidades Rurales Del Urabá Antioqueño Con Relación a Las Serpientes y Su Mordedura. Trabajo presentado para optar al título de Magister en Educación – Línea de formación: pedagogía y diversidad cultural, Universidad de Antioquia: Medellín, Colombia, **2016**.
2. Campbell, J.A.; Lamar, W. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*; Cornell University Press, Ed; Comstock Publishing: Ithaca, New York, **2004**.
3. Alencar, L.R.V.; Quental, T.B.; Grazziotin, F.G.; Alfaro, M.L.; Martins, M.; Venzon, M.; Zaher, H. Diversification in Vipers: Phylogenetic Relationships, Time of Divergence and Shifts in Speciation Rates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2016**, *105*, 50–62, doi:10.1016/j.ympev.2016.07.029.
4. Uetz, P.; Freed, P.; Aguilar, R.; Hošek, J. The Reptile Database. **2023**.
5. Palisot de Beauvois Memoir on Amphibia. Serpents. *Transactions of the American Philosophical Society* **1799**, *4*, 362–381.
6. Werman, S.D. Phylogenetic Relationships of Central and South American Pitvipers of the Genus *Bothrops* (Sensu Lato): Cladistic Analyses of Biochemical and Anatomical Characters. In *Biology of the Pitvipers*; J.A. Campbell, E.D. Brodie, Eds.; Selva: Texas, **1992**; pp. 21–40.
7. Peters, W. Über Die von Hrn. Dr. Hoffmann in Costa Rica Gesammelten Und an Das Königl. Zoologische Museum gesandten Schlangen **1859**, pp. 275–278.
8. Gutberlet, R.L.; Campbell, J.A. Generic Recognition for a Neglected Lineage of South American Pitvipers (Squamata: Viperidae: Crotalinae), with the Description of a New Species from the Colombian Chocó. *American Museum Novitates* **2001**, 1–15.
9. Wagler, J. Serpentina Brasiliensium Species Novae, Ou Histoire Naturelle Des Espèces Nouvelles de Serpens. *Jean de Spix, Animalia nova sive species novae* **1824**, *VII*, 1–75.
10. Campbell, J.A.; Lamar, W.W. Taxonomic Status of Miscellaneous Neotropical Viperids, with the Description of a New Genus. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University*. **1992**, *153*, 1–31.
11. Linnaeus, C. *Systema Naturæ per Regna Tria Naturæ, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species. Cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis*; 10th ed.; **1758**; Vol. 1.
12. Daudin, F.M. Histoire Naturelle, Générale et Particulière, *Des Reptiles*; F. Dufart.; Paris, **1802**; Vol. 4.
13. Campbell, J.D.; Frost, R.; and Castoe, T.A. A new generic name for jumping pitvipers (Serpentes: Viperidae). *Revista Latinoamericana de Herpetología* **2019**, *2*, 52–53.
14. Jadin, R.C.; Gutberlet Jr, R.L.; Smith, E.N. Phylogeny, Evolutionary Morphology, and Hemipenis Descriptions of the Middle American Jumping Pitvipers (Serpentes: Crotalinae: *Atropoides*). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **2010**, *48*, 360–365, doi:10.1111/j.1439-0469.2009.00559.x.
15. Cope, E.D. Catalogue of Batrachians and Reptiles [Batrachia and Reptilia] of Central America and Mexico. **1887**, *32*, 1–98.

16. Cope, E.D. "Ninth Contribution to the Herpetology of Tropical America." *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* **1871**, 23, 200–224.
17. Garman, S. The Reptiles and Batrachians of North America. *Memoirs of the Museum of Comparative Zoölogy*, Cambridge (Massachusetts) **1884**, 8, 34–185.
18. Cope, E.D. «Notes upon Some REPTILES of the Old World». *Proceedings of the Academy of Natural Science of Philadelphia*. **1862**, 14, 337–344.
19. Boulenger, G.A. "An Account of the Reptilia Obtained in Burma, North of Tenasserim, by Monsieur. L. Fea, of the Genoa Civic Museum." *Annali del Museo Civico di Storia Naturale di Genova* **1888**, 6, 593–604.
20. Gray, J.E. Monographic Synopsis of the Vipers, or the Family Viperidæ. *Zoological Miscellany*, London **1842**, 2, 68–71.
21. Cope, E.D. Catalogue of the Venomous Serpents in the Museum of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, with Notes on the Families, Genera and Species. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* **1860**, 11, 332–347.
22. Wagler, J.G. Natürliches System Der Amphibien, Mit Vorangehender Classification Der Säugetiere Und Vögel. *Ein Beitrag zur vergleichenden Zoologie* **1830**, 1–352.
23. Kuhl, K.; Van Hasselt, J.C. Uittreksel Uit de Brieven van Heeren Kuhl En van Hasselt, Aan de Heeren C.J. Temminck, Th. van Swinderen En W. de Haan. *Algemeene Konst. Letterbode* **1822**, 7, 99–104.
24. Gloyd, H.K. "A New Generic Name for the Hundred-Pace Viper." *Proceedings of the Biological Society of Washington* **1979**, 91, 963–964.
25. Merrem, B. Versuch Eines Systems Der Amphibien. *Tentamen Systematis Amphibiorum*. Marburg: J.C. Krieger **1820**, 191.
26. Alcock, A., F.F. "An Account of the Reptilia Collected by Dr. F. P. Maynard, Captain A. H. McMahon, C.I.E., and the Members of the Afghan-Baluch Boundary Commission of 1896." *Journal of the Asiatic Society of Bengal* **1897**, 65, 550–556.
27. Malhotra, A.; Thorpe, R.S. A Phylogeny of Four Mitochondrial Gene Regions Suggests a Revised Taxonomy for Asian Pitvipers (*Trimeresurus* and *Ovophis*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2004**, 32, 83–100, doi:10.1016/j.ympev.2004.02.008.
28. Hoge, A.R.; Romano-Hoge, S.A.R. Poisonous Snakes of the World. Part 1: Check List of the Pitvipers, Viperioidea, Viperidae, Crotalinae. *Memorias do Instituto Butantan* **1981**, 42, 179–309.
29. Fitzinger, L. Systema Reptilium. Fasciculus Primus: Amblyglossae. *Vindobonae: Braumüller und Seidel* **1843**, 1–106.
30. Reuss, A.F. Sechs Europäische Giftschlangengattungen. *Zoologischer Anzeiger* **1927**, 75, 124–129.
31. Broadley, D.G. A Review of the Tribe Atherini (Serpentes: Viperidae), with Descriptions of Two New Genera. *African Journal of Herpetology* **1996**, 45, 40–48.
32. Nilson, G., T.B., A.C., O.N., J.U. & H.H.W. Taxonomic Position of the *Vipera xanthina* Complex. *Kaupia* **1999**, 8, 99–102.
33. McDiarmid, R.W., C.J.A., T.T. Snake Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. *Herpetologists' League* **1999**, 1, 511.

34. Hoge A.R.; Romano-Hoge S.A.L. «Notes on Micro and Ultrastructure of 'Oberhäutschen' in Viperioidea. Viperioidea, Viperidae, Crotalinae». *Memorias do Instituto Butantan* **1983**, 44, 81–118.
35. Boulenger, G.A. Catalogue of the Snakes in the British Museum (Natural History. Volume III., Containing the . Viperidæ. *London: Trustees of the British Museum (Natural History). (Taylor and Francis, printers)* **1896**, 3, 772.
36. Lacepede, B.G.E.L. Memoire Sur Plusieurs Animaux de La Nouvelle Hollande Dont La Description n'a Pas Encore Ete Publiee. *Annales du Museum d'Histoire naturelle* **1804**, 4, 184–211.
37. Laurenti, J. Specimen Medicus Exhibens Synopsin Reptilium. *J. Thoma* (Vienna) **1768**, 1–2.
38. Wüster, W.; Peppin, L.; Pook, C.E.; Walker, D.E. A Nesting of Vipers: Phylogeny and Historical Biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2008**, 49, 445–459, doi:10.1016/j.ympev.2008.08.019.
39. Greene, H. The Ecological and Behavioral Context for Pitviper Evolution. In *Biology of the Pitvipers*; **1992**; pp. 107–117.
40. Mackessy, S. Venom Ontogeny in the Pacific Rattlesnakes *Crotalus viridis helleri* and *C. d. oreganus*. *Copeia* **1988**, 2, 92–101.
41. Guércio, R.A.P.; Shevchenko, A.; Shevchenko, A.; López-Lozano, J.L.; Paba, J.; Sousa, M. V.; Ricart, C.A.O. Ontogenetic Variations in the Venom Proteome of the Amazonian Snake *Bothrops atrox*. *Proteome Science* **2006**, 4, doi:10.1186/1477-5956-4-11.
42. Saldarriaga, M.M.; Otero, R.; Núñez, V.; Toro, M.F.; Díaz, A.; Gutiérrez, J.M. Ontogenetic Variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* Snake Venoms from Colombia. *Toxicon* **2003**, 42, 405–411, doi:10.1016/S0041-0101(03)00171-5.
43. Alape-Girón, A.; Sanz, L.; Escolano, J.; Flores-Díaz, M.; Madrigal, M.; Sasa, M.; Calvete, J.J. Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*. Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. *Journal of Proteome Research* **2008**, 7, 3556–3571, doi:10.1021/pr800332p.
44. Kardong, K.; Kiene, T.; Bels, V. Evolution of Trophic Systems in Squamates. *Neth Journal Zoology* **1997**, 47, 1–17.
45. Burger, W.L. Genera of Pitvipers (Serpentes: Crotalidae), University of Kansas: Lawrence, **1971**.
46. Avise, J.C. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*; Springer US, **1994**.
47. Avise, J.C. *Phylogeography*; Harvard University Press, **2000**; ISBN 9780674268708.
48. Zamudio, K.R.; Greene, H.W.; Zamudio, K.R.; Greene, H.W. Phylogeography of the Bushmaster (*Lachesis muta*: Viperidae): Implications for Neotropical Biogeography. *Systematics and Conservation*; **1997**; Vol. 62.
49. Thorpe, R.S.; Mcgregor, D.P.; Cumming, A.M.; Jordan, W.C. DNA Evolution and Colonization Sequence of Island Lizards in Relation to Geological History: MtDNA RFLP, Cytochrome b, Cytochrome Oxidase, 12s RRNA Sequence, and RAPD Nuclear Analysis. *Evolution* (NY) **1994**, 48, 230–240.

50. Parkinson, C.L. Molecular Systematics and Biogeographical History of Pitvipers as Determined by Mitochondrial Ribosomal DNA Sequences. *Copeia* **1999**, 576–586.
51. Gutberlet Jr, R.L.; Harvey, M.B. Phylogenetic Relationships of New World Pit Vipers as Inferred from Anatomical Evidence. In *Biology of the Vipers*; G.W. Schuett, M. Höggren, M.E. Douglas, H.W. Greene, Eds.; Eagle Mountain Publishing: Salta Lake City, **2002**; Vol. 1, pp. 51–68.
52. Amaral, A. Contribuicao ao conhecimento dos ofidios neotropicos XXXVI. Redescricao da espécie *Bothrops hyoprora* Amaral, **1935**. Mem. Inst. Butantan 26: 221–225.
53. Saldarriaga-Córdoba, M.; Parkinson, C.L.; Daza, J.M.; Wüster, W.; Sasa, M. Phylogeography of the Central American Lancehead *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae). *PLoS One* **2017**, 12, e0187969, doi:10.1371/journal.pone.0187969.
54. Gregory-Wodzicki, K.M. Uplift History of the Central and Northern Andes: A Review. *Bulletin of the Geological Society of America* **2000**, 112, 1091–1105, doi:10.1130/0016-7606(2000)112<1091:UHOTCA>2.3.CO;2.
55. Carrasco, P.A.; Mattoni, C.I.; Leynaud, G.C.; Scrocchi, G.J. Morphology, Phylogeny and Taxonomy of South American Bothropoid Pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zoologica Scripta* **2012**, 41, 109–124, doi:10.1111/j.1463-6409.2011.00511.x.
56. Bagley, J.C.; Johnson, J.B. Phylogeography and Biogeography of the Lower Central American Neotropics: Diversification between Two Continents and between Two Seas. *Biological Reviews* **2014**, 89, 767–790, doi:10.1111/brv.12076.
57. Carrasco, P.A.; Koch, C.; Graziotin, F.G.; Venegas, P.J.; Chaparro, J.C.; Scrocchi, G.J.; Salazar-Valenzuela, D.; Leynaud, G.C.; Mattoni, C.I. Total evidence Phylogeny and Evolutionary Morphology of New World Pitvipers (Serpentes: Viperidae: Crotalinae). *Cladistics* **2023**, 39, 71–100, doi:10.1111/cla.12522.
58. Antonelli, A.; Quijada, A.; Crawford, A.J.; Bates, J.M. Molecular Studies and Phylogeography of Amazonian Tetrapods and Their Relation to Geological and Climatic Models Origin, Evolution, Genetics and Selective Drivers of Snake Venom Evolution. *View Project Population Genetics and Molecular Ecology of Ectothermic Vertebrates* **2010**.
59. Lagomarsino, L.P.; Condamine, F.L.; Antonelli, A.; Mulch, A.; Davis, C.C. The Abiotic and Biotic Drivers of Rapid Diversification in Andean Bellflowers (Campanulaceae). *New Phytologist* **2016**, 210, 1430–1442, doi:10.1111/nph.13920.
60. Salazar-Valenzuela, D.; Kuch, U.; Torres-Carvajal, O.; Valencia, J.H.; Gibbs, H.L. Divergence of Tropical Pitvipers Promoted by Independent Colonization Events of Dry Montane Andean Habitats. *Journal of Biogeography* **2019**, 46, 1826–1840, doi:10.1111/jbi.13661.
61. Solís-Lemus, C.; Ané, C. Inferring Phylogenetic Networks with Maximum Pseudolikelihood under Incomplete Lineage Sorting. *PLoS Genetics* **2016**, 12, doi:10.1371/journal.pgen.1005896.
62. Sousa, V.; Hey, J. Understanding the Origin of Species with Genome-Scale Data: Modelling Gene Flow. *Nature Reviews Genetics* **2013**, 14, 404–414, doi:10.1038/nrg3446.

63. Wüster, W.; Salomão, M.; Quijada-Mascareñas, J.A.; Thorpe, R.; BBBSP Origins and Evolution of the South American Pitviper Fauna: Evidence from Mitochondrial DNA Sequence Analysis. In *Proceedings of the Biology of the Vipers*; Campbell, J.A., Brodie, E.D., Schuett, G.W., Hoggren, M., Douglas, M.E., Greene, H.W., Eds.; Eagle Mountain Publishing: UT, USA, **2002**; pp. 111–128.
64. Díaz-Ricaurte, J.; Cubides-Cubillos, S.D.; Ferreto Fiorillo, B. *Bothrops asper* (Garman, 1884). *Catálogo de Anfibios y Reptiles de Colombia* **2018**, 4, 4–22.
65. Cubides-Cubillos, S.D.; Loaiza-López, F.; Molina-Betancourt, J. *Porthidium nasutum* (Bocourt, 1868). *Catálogo de Anfibios y Reptiles de Colombia* **2021**, 7, 64–73.
66. Molina-Betancourth, J.; Loaiza-López, F.; Cubides-Cubillos, S.D. *Porthidium lansbergii* (Schlegel, 1841). *Catálogo de Anfibios y Reptiles de Colombia* **2021**, 7, 51–63.
67. Gutenkunst, R.N.; Hernandez, R.D.; Williamson, S.H.; Bustamante, C.D. Inferring the Joint Demographic History of Multiple Populations from Multidimensional SNP Frequency Data. *PLoS Genetics* **2009**, 5, doi:10.1371/journal.pgen.1000695.
68. Pickrell, J.K.; Pritchard, J.K. Inference of Population Splits and Mixtures from Genome-Wide Allele Frequency Data. *PLoS Genetics* **2012**, 8, doi:10.1371/journal.pgen.1002967.
69. Rittmeyer, E.N.; Austin, C.C. Combined Next-Generation Sequencing and Morphology Reveal Fine-Scale Speciation in Crocodile Skinks (Squamata: Scincidae: Tribolonotus). *Molecular Ecology* **2015**, 24, 466–483, doi:10.1111/mec.13030.
70. Leaché, A.D.; Banbury, B.L.; Felsenstein, J.; De Oca, A.N.M.; Stamatakis, A. Short Tree, Long Tree, Right Tree, Wrong Tree: New Acquisition Bias Corrections for Inferring SNP Phylogenies. *Systematic Biology* **2015**, 64, 1032–1047, doi:10.1093/sysbio/syv053.
71. McCormack, B.; Rycroft-Malone, J.; DeCorby, K.; Hutchinson, A.M.; Bucknall, T.; Kent, B.; Schultz, A.; Snelgrove-Clarke, E.; Stetler, C.; Titler, M.; et al. A Realist Review of Interventions and Strategies to Promote Evidence-Informed Healthcare: A Focus on Change Agency. *Implementation Science* **2013**, 8, doi:10.1186/1748-5908-8-107.
72. Pyron, R.A.; Costa, G.C.; Patten, M.A.; Burbrink, F.T. Phylogenetic Niche Conservatism and the Evolutionary Basis of Ecological Speciation. *Biological Reviews* **2015**, 90, 1248–1262, doi:10.1111/brv.12154.
73. Shanker, K.; Vijayakumar, S.P.; Ganeshaiah, K.N. Unpacking the Species Conundrum: Philosophy, Practice and a Way Forward. *Journal of Genetics* **2017**, 96, 413–430, doi:10.1007/s12041-017-0800-0.
74. Mallik, A.K.; Srikanthan, A.N.; Ganesh, S.R.; Vijayakumar, S.P.; Campbell, P.D.; Malhotra, A.; Shanker, K. Resolving Pitfalls in Pit Viper Systematics – A Multi-Criteria Approach to Species Delimitation in Pitvipers (Reptilia, Viperidae, *Craspedocephalus*) of Peninsular India Reveals Cryptic Diversity. *Vertebrate Zoology* **2021**, 71, 577–619, doi:10.3897/vz.71.e66239.
75. Angarita-Sierra, T.; Cubides-Cubillos, S.D.; Hurtado-Gómez, J.P. Hidden in the Highs: Two New Species of the Enigmatic Toadheaded Pitvipers of the Genus *Bothrocophias*. *Vertebrate Zoology* **2022**, 72, 971–996, doi:10.3897/vz.72.e87313.

76. Haffer, J. Speciation in Amazonian Forest Birds. *Science* **1969**, 165, 131–137.
77. Fjelds, J. Geographical Patterns for Relict and Young Species of Birds in Africa and South America and Implications for Conservation Priorities; **1994**; Vol. 3.
78. Duellman, W.E. Global Distribution of Amphibians: Patterns, Conservation and Future Challenges. In *Patterns of distribution of amphibians: A global perspective*; Duellman, W.E., Ed.; John Hopkins University Press, **1999**; pp. 1–30.
79. Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Da Fonseca, G.A.B.; Kent, J. *Biodiversity Hotspots for Conservation Priorities*; **2000**; Vol. 403.
80. Brumfield, R.T.; Edwards, S. V. Evolution into and out of the Andes: a bayesian analysis of historical diversification in *Thamnophilus antshrikes*. *Evolution* (NY) **2007**, 61, 346–367, doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00039.x.
81. Coates, A.; Obando, J. “The Geologic Evolution of the Central American Isthmus.” In *Evolution and Environment in Tropical America*; Jackson, J., Budd, A., Coates, A., Eds.; The University of Chicago Press: Chicago, **1996**; pp. 21–56.
82. Harvey, M.G.; Brumfield, R.T. Genomic Variation in a Widespread Neotropical Bird (*Xenops minutus*) Reveals Divergence, Population Expansion, and Gene Flow. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2015**, 83, 305–316.
83. Burbrink, F.T.; Castoe, T. Molecular Phylogeography of Snakes Rattlesnake Phylogeonomics and Morphology in MX: *Crotalus atrox* and *Crotalus scutulatus*. *View Project*; **2009**.
84. Mason-Gamer, R.J.; Kellogg, E.A. Testing for phylogenetic conflict among molecular data sets in the tribe Triticeae (Gramineae); **1996**; Vol. 45.
85. van Veller, M.G.P.; Zandee, M.; Kornet, D.J. Two Requirements for Obtaining Valid Common Patterns under Assumptions Zero, 1 and 2 in Vicariance Biogeography. *Cladistics* **1999**, 15, 393–406.
86. Crisci, J. V.; Katinas, L.; Posadas, P. Historical Bioeogeography: An Introduction; Harvard University Press: Cambridge, **2003**.
87. Guarnizo, C.E.; Amézquita, A.; Bermingham, E. The Relative Roles of Vicariance versus Elevational Gradients in the Genetic Differentiation of the High Andean Tree Frog, *Dendropsophus labialis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2009**, 50, 84–92, doi:10.1016/j.ympev.2008.10.005.
88. Martins, M.; Marques, O.; Sazima, I. Ecological and Phylogenetic Correlates of Feeding Habits in Neotropical Pitvipers of the Genus *Bothrops*. In *Biology of the Vipers*; G.W. Schuett, M. Hoggren, M.E. Douglas, H.W. Greene, Eds.; Eagle Mountain Publishing, **2002**; pp. 307–328.
89. Lynch, J.D. El Contexto de Las Serpientes de Colombia Con Un Análisis de Las Amenazas En Contra de Su Conservación. *Revista de la academia colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* **2012**, 36, 435–449.
90. Cañas-Dávila, C.A.; Castro-Herrera, F.; Castaño-Valencia, R.S. Serpientes Venenosas: Lecciones Aprendidas Desde Colombia; Tobón

- García, G.J., Osorno Reyes, J., Cañas Dávila, C.A., Castro Herrera, F., Castaño Valencia, R.S., Eugenia Rebolled, V., Eds.; Fundación Valle del Lili: Cali, Colombia., **2016**; Vol. 1.
91. Quiñones-Betancourt, E.; Díaz-Ricaurte, Juan.; Angarita-Sierra, T.; Guevara- Molina, C.; Díaz-Morales, R. *Bothrops asper* (Linnaeus, 1758). *Catálogo de Anfibios y Reptiles de Colombia* **2018**, 4, 7–23.
 92. Salomão, M.G.; Wüster, W.; Thorpe, R.S. MtDNA Phylogeny of Neotropical Pitvipers of the Genus *Bothrops* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Kaupia (Darmstadt)* **1999**, 8, 127–134.
 93. Wuster, W.; Salomao, M.G.; Duckett, D.; Thorpe, R.S. Systematics of the *Bothrops atrox* Complex: New Insights from Multivariate Analysis and Mitochondrial DNA Sequence Information. *Symposia of the Zoological Society of London* **1997**, 70, 99–113.
 94. Castoe, T.A.; Parkinson, C.L. Bayesian Mixed Models and the Phylogeny of Pitvipers (Viperidae: Serpentes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2006**, 39, 91–110, doi:10.1016/j.ympev.2005.12.014.
 95. Castoe, T.A.; Sasa, M.M.; Parkinson, C.L. Modeling Nucleotide Evolution at the Mesoscale: The Phylogeny of the Neotropical Pitvipers of the Porthidium Group (Viperidae: Crotalinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2005**, 37, 881–898, doi:10.1016/j.ympev.2005.05.013.
 96. Parkinson, C.L.; Zamudio, K.R.; Greene, H.W. Phylogeography of the Pitviper Clade *Agkistrodon*: Historical Ecology, Species Status, and Conservation of Cantils. *Molecular Ecology* **2000**, 9, 411–420.
 97. Gibbs, H.L.; Sovic, M.; Amazonas, D.; Chalkidis, H.; Salazar-Valenzuela, D.; Moura-Da-Silva, A.M. Recent Lineage Diversification in a Venomous Snake through Dispersal across the Amazon River. *Biological Journal of the Linnean Society* **2018**, 123, 651–665, doi:10.1093/biolinnean/blx158.
 98. Sandner-Montilla, F. Una Nueva Especie de Genero *Bothrops* (Serpentes, Crotalidae, Bothropinae) de La Región de Guanare, Estado Portuguesa, Venezuela. *Memorias científica de ofidiologia* **1979**, 4, 1–19.
 99. Hallowell, E. Descriptions of Reptiles from South America, Supposed to Be New. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* **1845**, 2, 241–247.
 100. Markezich, A.L.; Taphorn, D.C. A Variational Analysis of Populations of *Bothrops* (Serpentes: Viperidae) from Western Venezuela. *Journal of Herpetology* **1993**, 27, 248–254.
 101. Fenwick, A.M.; Gutberlet Jr, R.L.; Evans, J.A.; Parkinson, C.L. 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* **2009**; 156(3):617 – 640. DOI:10.1111/j.1096-3642.2008.00495.x
 102. de Queiroz, K. “The General Lineage Concept of Species, Species Criteria, and the Process of Speciation.” In book: *Endless Forms: Species and Speciation* **1998**, 57–75.
 103. Nascimento, D. dos S. Filogenia Molecular de Serpentes Neotropicais Do Grupo *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758) (Viperidae: Crotalinae). Tese de doutorado; **2014**.
 104. Parkinson, C.L.; Campbell, J.A.; Chippindale, P. Multigene Phylogenetic Analyses of Pitviper Relationships, with Comments on Their Bio-

- geography. In *Biology of the Vipers*; G.W. Schuett, M. Höggren, H.W. Greene, Eds.; *Biological Sciences Press*, Traverse City, **2002**; pp. 3–110.
105. Folleco-Fernández, A.J. Taxonomía del complejo *Bothrops asper* (serpentes: viperidæ) en el sudoeste de Colombia. Revalidación de la especie *Bothrops rhombeatus* (García 1896) y descripción de una nueva especie. *Revista Novedades Colombianas* **2010**, *10*, 33–70.
106. Ramírez-Chaves, H.E.; Solari, S. *Bothrops ayerbei* Folleco-Fernández, 2010 y *Bothrops rhomboatus* García, 1896 (Serpentes: Viperidae) Son Un Nombre No Disponible y Un Nomen Dubium, Respectivamente. *Boletín Científico Centro de Museos Museo de Historia Natural, Universidad del Caldas* **2014**, *18*, 138–141.
107. Garcia, E. Los Ofidios Venenosos Del Cauca. Métodos Empíricos y Racionales Empleados Contra Los Accidentes Producidos Por La Mordedura de Esos Reptiles. *Cali: Librería Colombiana* **1896**, 102.
108. Gutiérrez, J.M.; Calvete, J.J.; Habib, A.G.; Harrison, R.A.; Williams, D.J.; Warrell, D.A. Snakebite Envenoming. *Nature Reviews Disease Primers* **2017**, *3*, doi:10.1038/NRDP.2017.63.
109. Gutiérrez, J.M. Comprendiendo Los Venenos de Serpientes: 50 Años de Investigaciones En América Latina; *Revista de Biología Tropical* **2002**; Vol. 50.
110. Daltry, J.C.; Wüster, W.; Thorpe, R.S. Diet and Snake Venom Evolution. *Nature* **1996**, 379, doi:10.1038/379537a0.
111. Calvete, J.J.; Sanz, L.; Angulo, Y.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J.M. Venoms, Venomics, Antivenomics. *FEBS Letters* **2009**, *583*, 1736–1743, doi:10.1016/j.febslet.2009.03.029.
112. Gutiérrez, J.M.; Sanz, L.; Escolano, J.; Fernández, J.; Lomonte, B.; Angulo, Y.; Rucavado, A.; Warrell, D.A.; Calvete, J.J. Snake Venomics of the Lesser Antillean Pit Vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: Correlation with Toxicological Activities and Immunoreactivity of a Heterologous Antivenom. *Journal of Proteome Research* **2008**, *7*, 4396–4408, doi:10.1021/pr8003826.
113. Savage, J.M. *The Amphibians and Reptiles of Costa Rica. A Herpetofauna between Two Continents, between Two Seas*; The University of Chicago: Chicago and London, **2002**.
114. Lamar, W.; Sasa, Mahmood. A New Species of Hognose Pitviper, Genus *Porthidium*, from the Southwestern Pacific of Costa Rica (Serpentes: Viperidae). *Revista de Biología Tropical*. **2003**, *51*, 797–804.
115. Bocourt, M.F. Descriptions de Quelques Crotaliens Nouveaux Appartenant au Genre *Bothrops*, Recueillis Dans Le Guatemala. *Annales des sciences naturelles., Paris* **1868**, 201–202.
116. Schlegel, H. Description d'une Nouvelle Espèce Du Genre *Trigonocephale* (*Trigonocephalus lansbergii*). *Mag. Zool. Rept* **1841**, 1–3.
117. Monteza-Moreno, C.M.; Ramos, C.; Martínez, V.; Sasa, M. On the identity of hog-nosed pit-vipers from western panama: a review of specimens of *Porthidium lansbergii* (Schlegel, 1841) in lower Central America. *Tecnociencia (Panama)* **2020**, *22*, 27–44, doi:10.48204/j.tecno.v22n2a2.
118. De arco-Rodríguez, B.; Montealegre-Sánchez, L.; Solano-Redondo, L.; Castro-Herrera, F.; Ortega, J.G.; Castillo, A.; Vargas-Zapata, C.; Jiménez-Charris, E. Phylogeny and Toxicological Assessments of Two *Porthidium lansbergii lansbergii* Morphotypes from the Caribbean

- Region of Colombia. *Toxicon* **2019**, 166, 56–65, doi:10.1016/j.toxicon.2019.05.010.
119. Cisneros-Heredia, D.F.; Yáñez-Muñoz, M. Reptilia, Viperidae, Crotalinae, Porthidium Nasutum: Distribution Extension and Remarks on Its Range and Records. *Check List* **2005**, 1, 16–17, doi:10.15560/1.1.16.
 120. Warrell, D.A. Snakebites in Central and South America: Epidemiology, Clinical Features, and Clinical Management. In *Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*; Campbell, J.A., Lamar, W.W., Comstock, Eds.; Cornell University: Ithaca, NY, 2004; Vol. 2, pp. 709–761.
 121. Reyes-Velasco, J.; Cox, C.L.; Jones, J.M.; Borja, M.; Campbell, J.A. how many species of rattlesnakes are there in the *Crotalus durissus* species group (Serpentes: Crotalidae); *Revista Latinoamericana de Herpetologia* **2022**, 5, 43–55, doi:10.22201/fc.25942158e.2022.1.330.
 122. Humboldt, A. Sur Deux Nouvelles Espèces de Crotles. In: Humboldt and Bonpland, 1813. *Recueil d'observations de zoologie*. **1811**, 2, 1–8.
 123. Hoge, A.R. Preliminary Account on Neotropical Crotalinae (Serpentes Viperidae). *Mem Inst Butantan* **1966**, 32, 137–184.
 124. García-Perez, J. Una Nueva Especie de Cascabel (Serpentes: Crotalidae) Para El Bolsón Árido de Lagunillas, Cordillera de Mérida, Venezuela. *Latin American scientific contribution to ecology* **1995**, 3, 7–12.
 125. Harris, H.S.JR.; Simmons, R.S. A New Subspecies of *Crotalus durissus* (Serpentes: Crotalidae) from the Rupununi Savanna of Southwestern Guyana. *Instituto Butantan* **1978**, 305–311.
 126. van Lidth de Jeude, T.W. On a Collection of Reptiles and Fishes from the West-Indies. *Notes from the Leyden Museum* **1887**, 9, 129–139.
 127. Klauber, Laurence. A New Species of Rattlesnake from Venezuela. *Transactions of the San Diego Society of Natural History* **1941**, 9, 333–336.
 128. Wallach, Van.; Williams, K.; Boundy, J. Snakes of the World: A Catalogue of Living and Extinct Species. *Taylor and Francis, CRC Press* **2014**, 1–1237.
 129. Zaher, H.; Murphy, R.W.; Arredondo, J.C.; Graboski, R.; Machado-Filho, P.R.; Mahlow, K.; Montingelli, G.G.; Quadros, A.B.; Orlov, N.L.; Wilkinson, M.; et al. Large-Scale Molecular Phylogeny, Morphology, Divergence-Time Estimation, and the Fossil Record of Advanced Caenophidian Snakes (Squamata: Serpentes). *PLoS One* **2019**, 14, e0216148, doi:10.1371/journal.pone.0216148.
 130. Sawaya, R.J.; M.O.A.V. & M.M. Composition and Natural History of a Cerrado Snake Assemblage at Itirapina, São Paulo State, Southeastern Brazil. *Biota Neotropica* **2008**, 8, 127–149.
 131. Hartmann, P.A. Ecology of a Snake Assemblage in the Atlantic Forest of Southeastern Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia* **2009**, 49, 343–360.
 132. McDiarmid, R.W.; Campbell, J.A.; Touré, T.A. *Snake Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*; 1st ed.; *Herpetologists' League*, **1999**; Vol. 1.
 133. Fernandes, D.S.; Franco, F.L.; Fernandes, R. Systematic revision of the genus *Lachesis* Daudin, 1803 (Serpentes, Viperidae). *Herpetologica* **2004**, 60, 245–260, doi:10.1655/02-85.
 134. Cubides-Cubillos, Sergio.; Loaiza-López, F.; Molina-Betancourth, J.; Agudelo-Sánchez, W. *Lachesis acrochorda* (García, 1896). *Catálogo de Anfibios y Reptiles de Colombia* **2021**, 7, 39–50.

135. Barrio-Amorós, C.L.; Corrales, G.; Rodríguez, S.; Culebras, J.; Dwyer, Q.; Flores, D.A. The Bushmasters (*Lachesis* Spp.): Queens of the Rainforest. *Reptiles & Amphibians* **2020**, *27*, 358–381, doi:10.17161/randa.v27i3.14978.
136. Madrigal, M.; Sanz, L.; Flores-Díaz, M.; Sasa, M.; Núñez, V.; Alape-Girón, A.; Calvete, J.J. Snake Venomics across Genus *Lachesis*. Ontogenetic Changes in the Venom Composition of *Lachesis stenophrys* and Comparative Proteomics of the Venoms of Adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis acrochorda*. *Journal in Proteomics* **2012**, *77*, 280–297, doi:10.1016/j.jprot.2012.09.003.
137. Diniz-Sousa, R.; Moraes, J. do N.; Rodrigues-da-Silva, T.M.; Oliveira, C.S.; Caldeira, C.A. A Brief Review on the Natural History, Venomics and the Medical Importance of Bushmaster (*Lachesis*) Pit Viper Snakes. *Toxicon X* **2020**, *7*, 100053, doi:10.1016/j.toxcx.2020.100053.
138. Díaz-Ricaurte, Juan.; Guevara-Molina, C.; Cubides-Cubillos, Sergio. *Lachesis Muta* (Linnaeus 1766). *Catálogo de Anfibios y Reptiles de Colombia* **2017**, *3*, 20–24.
139. Arteaga, A.; Pyron, R.A.; Batista, A.; Vieira, J.; Meneses Pelayo, E.; Smith, E.N.; Barrio Amorós, C.L.; Koch, C.; Agne, S.; Valencia, J.H.; et al. Systematic Revision of the Eyelash Palm-Pitviper *Bothriechis schlegelii* (Serpentes, Viperidae), with the Description of Five New Species and Revalidation of Three. *Journal of Systematics and Evolution* **2024**, *8*, 15–64, doi:10.3897/evolsyst.8.114527.
140. Calvete, J.J.; Escolano, J.; Sanz, L. Snake Venomics of *Bitis* Species Reveals Large Intragenus Venom Toxin Composition Variation: Application to Taxonomy of Congeneric Taxa. *Journal of Proteome Research* **2007**, *6*, 2732–2745, doi:10.1021/pr0701714.
141. Fry, B.G. From Genome to “Venome”: Molecular Origin and Evolution of the Snake Venom Proteome Inferred from Phylogenetic Analysis of Toxin Sequences and Related Body Proteins. *Genome Research* **2005**, *15*, 403–420, doi:10.1101/gr.3228405.
142. Earl, S.T.H.; Birrell, G.W.; Wallis, T.P.; St Pierre, L.D.; Masci, P.P.; de Jersey, J.; Gorman, J.J.; Lavin, M.F. Post-Translational Modification Accounts for the Presence of Varied Forms of Nerve Growth Factor in Australian Elapid Snake Venoms. *Proteomics* **2006**, *6*, 6554–6565, doi:10.1002/pmic.200600263.
143. Chippaux, J. P.; Williams, V.; White, J.; Chippaux, J. P.; Williabis, V. State Toxinology Service, Adelaide Children’s Hospital; **1991**; Vol. 29.
144. Casewell, N.R.; Jackson, T.N.W.; Laustsen, A.H.; Sunagar, K. Causes and Consequences of Snake Venom Variation. *Trends in Pharmacological Sciences* **2020**, *41*, doi:10.1016/j.tips.2020.05.006.
145. Fry, B.G.; Wüster, W. Assembling an Arsenal: Origin and Evolution of the Snake Venom Proteome Inferred from Phylogenetic Analysis of Toxin Sequences. *Molecular Biology and Evolution* **2004**, *21*, 870–883, doi:10.1093/molbev/msh091.
146. Wüster, W.; Peppin, L.; Pook, C.E.; Walker, D.E. A Nesting of Vipers: Phylogeny and Historical Biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2008**, *49*, doi:10.1016/j.ympev.2008.08.019.
147. Fry, B.G.; Winkel, K.D.; Wickramaratna, J.C.; Hodgson, W.C.; Wüster, W. Effectiveness of Snake Antivenom: Species and Regional Venom

- Variation and Its Clinical Impact. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* **2003**, 22, 23–34, doi:10.1081/TXR-120019018.
148. Calvete, J.J.; Borges, A.; Segura, Á.; Flores-Díaz, M.; Alape-Girón, A.; Gutiérrez, J.M.; Diez, N.; De Sousa, L.; Kiriakos, D.; Sánchez, E.; et al. Snake Venomics and Antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a Medically Important Pitviper of the *Bothrops atrox-asper* Complex Endemic to Venezuela: Contributing to Its Taxonomy and Snakebite Management. *Journal in Proteomics* **2009**, 72, 227–240, doi:10.1016/j.jprot.2009.01.005.
 149. Klupczynska, A.; Pawlak, M.; Kokot, Z.J.; Matysiak, J. Application of Metabolomic Tools for Studying Low Molecular-Weight Fraction of Animal Venoms and Poisons. *Toxins (Basel)* **2018**, 10, 306, <https://doi.org/10.3390/toxins10080306>
 150. Modahl, C.M.; Brahma, R.K.; Koh, C.Y.; Shioi, N.; Kini, R.M. Omics Technologies for Profiling Toxin Diversity and Evolution in Snake Venom: Impacts on the Discovery of Therapeutic and Diagnostic Agents. *Annual Review of Animal Bioscience* **2020**, 8, 91–116.
 151. Abd El-Aziz, T.M.; Soares, A.G.; Stockand, J.D. Advances in Venomics: Modern Separation Techniques and Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2020**, 1160.
 152. Walker, A.A.; Robinson, S.D.; Hamilton, B.F.; Undheim, E.A.B.; King, G.F. Deadly Proteomes: A Practical Guide to Proteotranscriptomics of Animal Venoms. *Proteomics* **2020**, 20, doi:10.1002/pmic.201900324.
 153. Damm, M.; Hempel, B.F.; Süssmuth, R.D. Old World Vipers—a Review about Snake Venom Proteomics of Viperinae and Their Variations. *Toxins* **2021**, 13.
 154. Chippaux, J.-P.; Williams, V.; White, J. Snake Venom Variability: Methods of Study, Results and Interpretation. *Toxicon* **1991**, 29, doi:10.1016/0041-0101(91)90116-9.
 155. Arbuckle, K. From Molecules to Macroevolution: Venom as a Model System for Evolutionary Biology across Levels of Life. *Toxicon X* **2020**, 6, doi:10.1016/j.toxcx.2020.100034.
 156. Zancolli, G.; Casewell, N.R. Venom Systems as Models for Studying the Origin and Regulation of Evolutionary Novelties. *Molecular Biology and Evolution* **2020**, 37, doi:10.1093/molbev/msaa133.
 157. Fry, B.G. *Venomous Reptiles and Their Toxins. Evolution, Pathophysiology, and Biodiscovery*; Oxford University Press, USA., Ed.; Oxford University Press: New York, NY, **2015**; Vol. 1.
 158. Mackessy, S.P.; Saviola, A.J. Understanding Biological Roles of Venoms Among the Caenophidia: The Importance of Rear-Fanged Snakes. *Integrative and Comparative Biology* **2016**, 56, 1004–1021, doi:10.1093/icb/icw110.
 159. Fry, B.G.; Scheib, H.; van der Weerd, L.; Young, B.; McNaughtan, J.; Ryan Ramjan, S.F.; Vidal, N.; Poelmann, R.E.; Norman, J.A. Evolution of an Arsenal: Structural and Functional Diversification of the Venom System in the Advanced Snakes (Caenophidia). *Molecular and Cellular Proteomics* **2008**, 7, 215–246, doi:10.1074/mcp.M700094-MCP200.
 160. Jackson, T.; Koludarov, I.; Ali, S.; Dobson, J.; Zdenek, C.; Dashevsky, D.; op den Brouw, B.; Masci, P.; Nouwens, A.; Josh, P.; et al. Rapid Radiations and the Race to Redundancy: An Investigation of the Evolution

- of Australian Elapid Snake Venoms. *Toxins* **2016**, 8, 309, doi:10.3390/toxins8110309.
161. Casewell, N.R.; Wüster, W.; Vonk, F.J.; Harrison, R.A.; Fry, B.G. Complex Cocktails: The Evolutionary Novelty of Venoms. *Trends in Ecology & Evolution* **2013**, 28, 219–229, doi:10.1016/j.tree.2012.10.020.
162. Giorgianni, M.W.; Dowell, N.L.; Griffin, S.; Kassner, V.A.; Selegue, J.E.; Carroll, S.B. The Origin and Diversification of a Novel Protein Family in Venomous Snakes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2020**, 117, 10911–10920, doi:10.1073/pnas.1920011117.
163. Amorim, F.; Costa, T.; Baiwir, D.; De Pauw, E.; Quinton, L.; Sampaio, S. Proteopeptidomic, Functional and Immunoreactivity Characterization of *Bothrops moojeni* Snake Venom: Influence of Snake Gender on Venom Composition. *Toxins* **2018**, 10, 177, doi:10.3390/toxins10050177.
164. Queiroz, G.P.; Pessoa, L.A.; Portaro, F.C.V.; Furtado, M. de F.D.; Tambourgi, D. V. Interspecific Variation in Venom Composition and Toxicity of Brazilian Snakes from *Bothrops* Genus. *Toxicon* **2008**, 52, 842–851, doi:10.1016/j.toxicon.2008.10.002.
165. Kazandjian, T.D.; Petras, D.; Robinson, S.D.; van Thiel, J.; Greene, H.W.; Arbuckle, K.; Barlow, A.; Carter, D.A.; Wouters, R.M.; Whiteley, G.; et al. Convergent Evolution of Pain-Inducing Defensive Venom Components in Spitting Cobras. *Science* **2021**, 371, 386–390, doi:10.1126/science.abb9303.
166. Barua, A.; Mikheyev, A.S. Toxin Expression in Snake Venom Evolves Rapidly with Constant Shifts in Evolutionary Rates. *Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences* **2020**, 287, 20200613, doi:10.1098/rspb.2020.0613.
167. Cubides-Cubillos, S.D.; Alarcón-Pérez, J.C. Accidente Ofídico En Antioquia, Colombia: Análisis Etnobiológico de Las Construcciones Culturales. *Revista Etnobiología* **2018**, 16, 18–29.
168. Chippaux, J.-P. Snakebite Envenomation Turns Again into a Neglected Tropical Disease! *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* **2017**, 23, 38, doi:10.1186/s40409-017-0127-6.
169. Chippaux, J.-P. Epidemiology of Envenomations by Terrestrial Venomous Animals in Brazil Based on Case Reporting: From Obvious Facts to Contingencies. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* **2015**, 21, 13, doi:10.1186/s40409-015-0011-1.
170. Boldrini-França, J.; Corrêa-Netto, C.; Silva, M.M.S.; Rodrigues, R.S.; De La Torre, P.; Pérez, A.; Soares, A.M.; Zingali, R.B.; Nogueira, R.A.; Rodrigues, V.M.; et al. Snake Venomics and Antivenomics of *Crotalus durissus* Subspecies from Brazil: Assessment of Geographic Variation and Its Implication on Snakebite Management. *Journal in Proteomics* **2010**, 73, 1758–1776, doi:10.1016/j.jprot.2010.06.001.
171. Rodríguez-Vargas, A.; Vega, N.; Reyes-Montaña, E.; Corzo, G.; Neri-Castro, E.; Clement, H.; Ruiz-Gómez, F. Intraspecific Differences in the Venom of *Crotalus durissus cumanensis* from Colombia. *Toxins* **2022**, 14, doi:10.3390/toxins14080532.
172. Talukdar, A.; Maddhesiya, P.; Namsa, N.D.; Doley, R. Snake Venom Toxins Targeting the Central Nervous System. *Toxin Reviews* **2023**, 42, 382–406, doi:10.1080/15569543.2022.2084418.

173. Lewis, R.; Gutmann, L. Snake Venoms and the Neuromuscular Junction. *Semin Neurol* **2004**, *24*, 175–179, doi:10.1055/s-2004-830904.
174. Rossetto, O.; Morbiato, L.; Caccin, P.; Rigoni, M.; Montecucco, C. Presynaptic Enzymatic Neurotoxins. *Journal Neurochem* **2006**, *97*, 1534–1545, doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03965.x.
175. Gawade, S.P. Snake Venom Neurotoxins: Pharmacological Classification. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* **2004**, *23*, 37–96, doi:10.1081/TOX-120030647.
176. Calvete, J.J.; Sanz, L.; Cid, P.; De La Torre, P.; Flores-Díaz, M.; Dos Santos, M.C.; Borges, A.; Bremono, A.; Angulo, Y.; Lomonte, B.; et al. Snake Venomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* Complex Points to Neurotoxicity as an Adaptive Paedomorphic Trend along *Crotalus* Dispersal in South America. *Journal of Proteome Research* **2010**, *9*, 528–544, doi:10.1021/pr9008749.
177. Batista da Cunha, D.; Pupo Silvestrini, A.V.; Gomes da Silva, A.C.; Maria de Paula Estevam, D.; Pollettini, F.L.; de Oliveira Navarro, J.; Alves, A.A.; Remédio Zeni Beretta, A.L.; Annichino Bizzacchi, J.M.; Pereira, L.C.; et al. Mechanistic Insights into Functional Characteristics of Native Crotoamine. *Toxicon* **2018**, *146*, 1–12, doi:10.1016/j.toxicon.2018.03.007.
178. Rádis-Baptista, G.; Kerkis, I. Crotoamine, a Small Basic Polypeptide Myo-toxin from Rattlesnake Venom with Cell-Penetrating Properties. *Curr Pharm Des* **2011**, *17*(38), 4351–4361, doi:10.2174/138161211798999429.
179. Schenberg, S. Geographical Pattern of Crotoamine Distribution in the Same Rattlesnake Subspecies. *Science* (1979) **1959**, *129*, 1361–1363.
180. Otero, R.; Osorio, R.G.; Valderrama, R.; Giraldo, C.A. Efectos farmacológicos y enzimáticos de los venenos de serpientes de Antioquia y Chocó (Colombia); *Toxicon* **1992**, *30* (5-6): 611–620, doi: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90855-Y](https://doi.org/10.1016/0041-0101(92)90855-Y)
181. Mora-Obando, D.; Plaid, D.; Lomonte, B.; Guerrero-Vargas, J.A.; Ayerbe, S.; Calvete, J.J. Antivenomics and in Vivo Preclinical Efficacy of Six Latin American Antivenoms towards Southwestern Colombian *Bothrops asper* Lineage Venoms. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **2021**, *15*, 1–36, doi:10.1371/journal.pntd.0009073.
182. Arévalo-Páez, M.; Rada-Vargas, E.; Betancur-Hurtado, C.; Renjifo, J.M.; Renjifo-Ibáñez, C. Neuromuscular Effect of Venoms from Adults and Juveniles of *Crotalus durissus cumanensis* (Humboldt, 1811) from Guajira, Colombia. *Toxicon* **2017**, *139*, 41–44, doi:10.1016/j.toxicon.2017.09.016.
183. Pereañez, J.A.; Núñez, V.; Huancahuire-Vega, S.; Marangoni, S.; Ponce-Soto, L.A. Biochemical and Biological Characterization of a PLA2 from Crotoxin Complex of *Crotalus durissus cumanensis*. *Toxicon* **2009**, *53*, 534–542, doi:10.1016/j.toxicon.2009.01.021.
184. Mora-Obando, D.; Salazar-Valenzuela, D.; Pla, D.; Lomonte, B.; Guerrero-Vargas, J.A.; Ayerbe, S.; Gibbs, H.L.; Calvete, J.J. Venom Variation in *Bothrops asper* Lineages from North-Western South America. *Journal in Proteomics* **2020**, *229*, 103945, doi:10.1016/j.jprot.2020.103945.
185. Jiménez-Charris, E.; Montoya-Gómez, A.; Torres, J.K.; Gómez-Díaz, M.; Bolívar-García, W. First Functional and Proteomic Analysis of *Bothrops asper* Snake Venom from Gorgona Island - Colombia, and Its Comparative Characterization with Two Colombian Southwest Ecoregions. *Biochimie* **2022**, *194*, 19–27, doi:10.1016/j.biochi.2021.12.005.

186. Quintana, J.; Otero, R.; Nuñez, V.; Toro, F. Estudio de La Variabilidad En El Veneno de 2 Poblaciones de *Bothriechis schlegelii* Del Suroeste y Norte de Antioquia y Correlación Morfométrica. *Iatreia* **2000**, 1–107.
187. Montealegre-Sánchez, L.; Montoya-Gómez, A.; Jiménez-Charris, E. Individual Variations in the Protein Profiles and Functional Activities of the Eyelash Palm Pit-Viper (*Bothriechis schlegelii*) Venom from the Colombian Southwest Region. *Acta Tropica* **2021**, 223, 106113, doi:10.1016/j.actatropica.2021.106113.
188. Lomonte, B.; Escolano, J.; Fernández, J.; Sanz, L.; Angulo, Y.; Gutiérrez, J.M.; Calvete, J.J. Snake Venomics and Antivenomics of the Arbo-real Neotropical Pitvipers *Bothriechis lateralis* and *Bothriechis schlegelii*. *Journal of Proteome Research* **2008**, 7, 2445–2457, doi:10.1021/pr8000139.
189. Gutiérrez, J.; Escalante, T.; Rucavado, A.; Herrera, C. Hemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteinases: A Journey of Discovery and Understanding. *Toxins* **2016**, 8, 93, doi:10.3390/toxins8040093.
190. Otero, R.; Gutiérrez, J.; Beatriz Mesa, M.; Duque, E.; Rodríguez, O.; Luis Arango, J.; Gómez, F.; Toro, A.; Cano, F.; María Rodríguez, L.; et al. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* Snakebites in Colombia. A Clinical and Epidemiological Study of 39 Cases Attended in a University Hospital. *Toxicon* **2002**, 40, 1107–1114, doi:10.1016/S0041-0101(02)00104-6.
191. Otero-Patiño, R. Snake Bites in Colombia. In: Vogel, C.W., Seifert, S., Tambourgi, D. (eds) *Clinical Toxinology in Australia, Europe, and Americas*. *Toxinology*. Springer, Dordrecht; **2018**; pp. 3–50. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7438-3_41
192. Preciado, L.M.; Pereañez, J.A.; Comer, J. Potential of Matrix Metalloproteinase Inhibitors for the Treatment of Local Tissue Damage Induced by a Type P-I Snake Venom Metalloproteinase. *Toxins (Basel)* **2019**, 12, 8, doi:10.3390/toxins12010008.
193. Pereañez, J.A.; Preciado, L.M.; Fernández, J.; Camacho, E.; Lomonte, B.; Castro, F.; Cañas, C.A.; Galvis, C.; Castaño, S. Snake Venomics, Experimental Toxic Activities and Clinical Characteristics of Human Envenomation by *Bothrocophias myersi* (Serpentes: Viperidae) from Colombia. *Journal in Proteomics* **2020**, 220, doi:10.1016/j.jprot.2020.103758.
194. Sevilla-Sánchez, M.-J.; Guerrero-Vargas, J.A.; Ayerbe-González, S.; Calderón-Leytón, J.J.; Lomonte, B.; Mora-Obando, D. Toxinological Profile and Histopathological Alterations Induced by *Bothrocophias campbelli* Venom from Colombia. *Acta Tropica* **2024**, 250, 107094, doi:10.1016/j.actatropica.2023.107094.
195. Jiménez-Charris, E.; Montealegre-Sanchez, L.; Solano-Redondo, L.; Mora-Obando, D.; Camacho, E.; Castro-Herrera, F.; Fierro-Pérez, L.; Lomonte, B. Proteomic and Functional Analyses of the Venom of *Porthidium lansbergii lansbergii* (Lansberg's Hognose Viper) from the Atlantic Department of Colombia. *J Proteomics* **2015**, 114, 287–299, doi:10.1016/j.jprot.2014.11.016.
196. Otero-Patiño, R.; Segura, Á.; Herrera, M.; Angulo, Y.; León, G.; Gutiérrez, J.M.; Barona, J.; Estrada, S.; Pereañez, A.; Quintana, J.C.; et al. Comparative Study of the Efficacy and Safety of Two Polyvalent, Ca-

- pyrylic Acid Fractionated [IgG and F(Ab')₂] Antivenoms, in *Bothrops asper* Bites in Colombia. *Toxicon* **2012**, 59, 344–355, doi:10.1016/j.toxicon.2011.11.017.
197. Kalil, J.; Fan, H.W. Production and Utilization of Snake Antivenoms in South America. In; **2017**; pp. 81–101.
 198. Bermúdez-Méndez, E.; Fuglsang-Madsen, A.; Føns, S.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J.; Laustsen, A. Innovative Immunization Strategies for Antivenom Development. *Toxins* **2018**, 10, 452, doi:10.3390/toxins10110452.
 199. Gutiérrez, J.M.; León, G.; Burnouf, T. Antivenoms for the Treatment of Snakebite Envenomings: The Road Ahead. *Biologicals* **2011**, 39, 129–142.
 200. Theakston, R.D.G.; Reid, H.A. Development of Simple Standard Assay Procedures for the Characterization of Snake Venoms. *Bulletin of the World Health Organization* **1983**, 61, 949–956.
 201. Rojas, G.; Jiménez, J.M.; Gutiérrez, J.M. Caprylic Acid Fractionation of Hyperimmune Horse Plasma: Description of a Simple Procedure for Antivenom Production; *Toxicon* **1994**, 32, 351–363, [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90087-6).
 202. Laloo, D.G.; Theakston, R.D.G. Snake Antivenoms. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* **2003**, 41, 277–290, doi:10.1081/CLT-120021113.
 203. Bogarín, G.; Romero, M.; Rojas, G.; Lutsch, C.; Casadamont, M.; Lang, J.; Otero, R.; Gutiérrez, J.M. Neutralization, by a Monospecific *Bothrops lanceolatus* Antivenom, of Toxic Activities Induced by Homologous and Heterologous *Bothrops* Snake Venoms. *Toxicon* **1999**, 37, 551–557, doi:10.1016/S0041-0101(98)00193-7.
 204. Bucher, B.; Canongel, D.; Thomas, L.; Tyburn, B. Clinical Indicators of Envenoming and Serum Levels of Venom Antigens Bitten by *Bothrops lanceolatus* in Martinique. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine*. **1997** (2):186–90. doi: 10.1016/s0035-9203(97)90219-4..
 205. Gutiérrez, J.M.; Theakston, R.D.G.; Warrell, D.A. Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership. *PLoS Medicine* **2006**, 3, 0727–0731.
 206. Layfield, H.J.; Williams, H.F.; Ravishankar, D.; Mehmi, A.; Sonavane, M.; Salim, A.; Vaiyapuri, R.; Lakshminarayanan, K.; Vallance, T.M.; Bicknell, A.B.; et al. Repurposing Cancer Drugs Batimastat and Marimastat to Inhibit the Activity of a Group I Metalloprotease from the Venom of the Western Diamondback Rattlesnake, *Crotalus Atrox*. *Toxins (Basel)* **2020**, 12, 309, doi:10.3390/toxins12050309.
 207. Calvete, J.J.; Pérez, A.; Lomonte, B.; Sánchez, E.E.; Sanz, L. Snake Venomics of *Crotalus tigris*: The Minimalist Toxin Arsenal of the Deadliest Neartic Rattlesnake Venom. Evolutionary Clues for Generating a Pan-Specific Antivenom against Crotalid Type II Venoms. *Journal of Proteome Research* **2012**, 11, 1382–1390, doi:10.1021/pr201021d.
 208. Calvete, J.J.; Fasoli, E.; Sanz, L.; Boschetti, E.; Righetti, P.G. Exploring the Venom Proteome of the Western Diamondback Rattlesnake, *Crotalus atrox*, via Snake Venomics and Combinatorial Peptide Ligand Library Approaches. *Journal of Proteome Research* **2009**, 8, 3055–3067, doi:10.1021/pr900249q.
 209. Romero-Giraldo, L.E.; Pulido, S.; Berrío, M.A.; Flórez, M.F.; Rey-Suárez, P.; Nuñez, V.; Pereañez, J.A. Heterologous Expression and Immuno-

- genic Potential of the Most Abundant Phospholipase A2 from Coral Snake *Micrurus dumerilii* to Develop Antivenoms. *Toxins* **2022**, *14*, 825, doi:10.3390/toxins14120825.
210. Carvalho, B.M.A.; Santos, J.D.L.; Xavier, B.M.; Almeida, J.R.; Resende, L.M.; Martins, W.; Marcussi, S.; Marangoni, S.; Stábili, R.G.; Calderon, L.A.; et al. Snake Venom PLA₂s Inhibitors Isolated from Brazilian Plants: Synthetic and Natural Molecules. *BioMed Research International* **2013**, *2013*, 1–8, doi:10.1155/2013/153045.
211. Gómez-Betancur, I.; Gogineni, V.; Salazar-Ospina, A.; León, F. Perspective on the Therapeutics of Anti-Snake Venom. *Molecules* **2019**, *24*, 3276, doi:10.3390/molecules24183276.
212. Quiroz, S.; Henao Castañeda, I.C.; Granados, J.; Patiño, A.C.; Preciado, L.M.; Pereañez, J.A. Inhibitory Effects of Varespladib, CP471474, and Their Potential Synergistic Activity on *Bothrops asper* and *Crotalus durissus cumanensis* Venoms. *Molecules* **2022**, *27*, 8588, doi:10.3390/molecules27238588.
213. Mora-Obando, D.; Lomonte, B.; Pla, D.; Guerrero-Vargas, J.A.; Ayerbe-González, S.; Gutiérrez, J.M.; Sasa, M.; Calvete, J.J. Half a Century of Research on *Bothrops asper* Venom Variation: Biological and Biomedical Implications. *Toxicon* **2023**, *221*, 106983, doi:10.1016/j.toxicon.2022.106983.
214. Calvete, J.J.; Rodríguez, Y.; Quesada-Bernat, S.; Pla, D. Toxin-Resolved Antivenomics-Guided Assessment of the Immunorecognition Landscape of Antivenoms. *Toxicon* **2018**, *148*, 107–122, doi:10.1016/j.toxicon.2018.04.015.
215. Nguyen, L.-T.; Schmidt, H.A.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **2015**, *32*, 268–274, doi:10.1093/molbev/msu300.
216. Kalyaanamoorthy, S.; Minh, B.Q.; Wong, T.K.F.; von Haeseler, A.; Jermini, L.S. ModelFinder: Fast Model Selection for Accurate Phylogenetic Estimates. *Nature Methods* **2017**, *14*, 587–589, doi:10.1038/nmeth.4285.
217. Revell, L.J. Phytools: An R Package for Phylogenetic Comparative Biology (and Other Things). *Methods in Ecology and Evolution* **2012**, *3*, 217–223, doi:10.1111/j.2041-210X.2011.00169.x.
218. Warrell, D.A. Snake Bite. *The Lancet* **2010**, *375*, 77–88.
219. Ramakrishnan, M.A. Determination of 50% Endpoint Titer Using a Simple Formula. *World Journal of Virology* **2016**, *5*, 85, doi:10.5501/wjv.v5.i2.85.
220. Sells, P.G. Animal Experimentation in Snake Venom Research and in Vitro Alternatives. *Toxicon* **2003**, *42*, 115–133.
221. Boivin, G.P.; Hickman, D.L.; Creamer-Hente, M.A.; Pritchett-Corning, K.R.; Bratcher, N.A. Review of CO₂ as a Euthanasia Agent for Laboratory Rats and Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* **2017**, *56*, 491–499.
222. Reyes-Velasco, J. A revision of recent taxonomic changes to the eyelash palm pitviper (Serpentes, Viperidae, *Bothriechis schlegelii*). *Herpetozoa* **2024**, *37*, 1–14, doi:10.3897/herpetozoa.

