

**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**  
Facultad de Ciencias y Humanidades



Contribución a la ecotoxinología de la serpiente gushnayera  
*Bothriechis aurifer* (Viperidae)

Trabajo de graduación presentado por Melissa Villatoro Castañeda  
para optar al grado académico de Licenciada en Biología.

Guatemala  
2017



Contribución a la ecotoxinología de la serpiente gushnayera  
*Bothriechis aurifer* (Viperidae)



**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA**  
Facultad de Ciencias y Humanidades  
Departamento de Biología



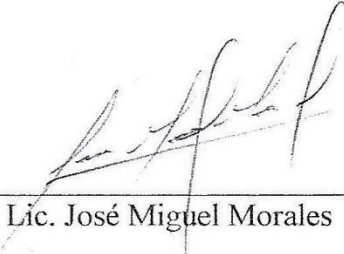
Contribución a la ecotoxinología de la serpiente gushnayera  
*Bothriechis aurifer* (Viperidae)

Trabajo de graduación presentado por Melissa Villatoro Castañeda  
para optar al grado académico de Licenciatura en Biología

Guatemala  
2017


Vo. Bo. :

(f)


  
Lic. José Miguel Morales

Tribunal Examinador:


(f)

  
Lic. José Miguel Morales

(f)

  
M. Sc. Daniel Ariano

(f)

  
M. Sc. Gabriela Alfaro

Fecha de aprobación del examen de graduación: Guatemala, 24 de noviembre de 2017

## AGRADECIMIENTOS

La realización del presente estudio no hubiese sido posible sin las siguientes personas:

A mis papás, Guisela Castañeda y Daniel Villatoro, les agradezco su apoyo y esfuerzo durante todo el proceso, ustedes me han enseñado a trabajar duro y a dar todo de mí, les agradezco su paciencia y amor. A Rigoberto Castañeda por inspirarme, darme fuerza y motivarme. A mi guía desde pequeña, Rigoberto Castañeda hijo por siempre explicarme y ayudarme. A Estuardo Villatoro, por encontrar a una *Bothriechis* y ayudarme a seguir adelante con el estudio, con todo y regaños. A Mercedes Asturias de Castañeda por cuidarme y protegerme. A Norma Escalante por motivarme y alentarme desde lejos.

A mis asistentes de campo, sin ustedes no lo hubiera logrado, les agradezco su tiempo, esfuerzo, entusiasmo y trabajo duro: María Renée Braeuner en especial por llevarnos a todos a los muestreos, Andrés Muñoz, Cristina Arrivillaga en especial por ayudarme con los modelos de plasticina y tus fotografías, a Jennifer Hernández, Rodrigo Morales, André Sempé, Kennedy Ruiz, Luis González, Rafael Grajeda e Israel Pimentel.

Un especial agradecimiento a quienes estuvieron ahí siempre, sin dudarlo y me inspiraron a seguir adelante: Andrés Novales en especial por tu tiempo, gran trabajo en campo y excelentes fotografías; Sergio González, Alejandro Vásquez, Antonio McSweeney y Sergio Sánchez. Les agradezco a Alex Ruiz, Rodrigo Ardón, Roberto Chiroy, Esteban Wyss, Juan Carlos Ramírez, Milvia Paz, Pablo Tijerino, Michael Heffner y Anette Pérez por siempre estar pendientes, alentarme y celebrar cada logro todos juntos.

Les agradezco de todo corazón las atenciones, apoyo, entusiasmo, cariño y trabajo inspirador a Edna Álvarez, Juan Pablo Pinto y todo el equipo de Ranchitos del Quetzal. Sus esfuerzos de conservación me inspiran a seguir trabajando duro como bióloga.

A todas las personas que de una u otra manera me ayudaron en el laboratorio, resolvieron dudas y acompañaron durante el proceso: Edwin Castañón, Diane Ávalos, Santiago

Sánchez, Kervin Cardona, Sergio Sánchez; a Erick Andrade por tu apoyo incondicional y todo lo demás, Daniel Juárez, Alejandra López y Ninoshka López gracias además por todas tus palabras alentadoras. Le agradezco mucho a Priscilla Juárez, Don Freddy, Don Mynor y Ericka Santos por su apoyo con el material de giras y de laboratorio.

A las personas que me ayudaron durante el ensayo con los ratones, les agradezco su tiempo y apoyo: Fernando Castañeda a quien también agradezco por sus palabras alentadoras, Andrés Duarte, Nora Guzmán, Vanessa Granados, Don Rigoberto, Don Marcelino, Andrea Nájera, y mis asistentes Cecilia Pira, Isabela Rossito, Kennedy Ruiz y María Andrea Bolaños. Y a Ericka Villatoro por su apoyo.

Un especial agradecimiento a Gabriela Palomo por todo su apoyo y guía durante la realización del estudio y a Daniel Ariano por todas sus enseñanzas y permitirme realizar el estudio con Zootropic. Le agradezco a Danny Mazariegos por enseñarme nuevas técnicas y por permitirme realizar el estudio con Antigua Exotic. Le agradezco a Rowland Griffin por su apoyo y orientación con los datos aquí presentados.

Agradezco también a María Renée Álvarez por guiarme, revisar el trabajo y apoyarme desde el inicio. Así mismo, agradezco la revisión y guía de Maricruz Álvarez y David Morán. Y por todo el apoyo a Gabriela Alfaro.

Agradezco a CONAP, CEUCA, Zootropic, Antigua Exotic, Global Quality, a Mayra Oliva y los guardarrrecursos del Biotopo del Quetzal, al Bioterio USAC, al laboratorio de histología, al Departamento de Biología y Colecciones Biológicas UVG.

A las siguientes personas por estar desde el principio, ayudarme cuando lo necesitaba sin importar las madrugadas, cansancio y sus propias actividades; sin ustedes no hubiera podido completar el estudio y si pudiera expresarles lo agradecida que estoy con ustedes lo haría: Alejandro Mármol, Cecilia Pira, Isabela Rossito y Marcelo Serrano. Se aprecia mucho su ayuda durante todo este proceso.

Agradezco a mi asesor, amigo y apoyo incondicional Miguel Morales, todas las horas de desvelo, esfuerzo y confusión mental valieron la pena.

Espero que este trabajo sirva para proteger a tan interesante especie, la serpiente gushnayera *Bothriechis aurifer* y contribuya con los esfuerzos de conservación en el bosque nuboso de Guatemala; que inspire a biólogos y biólogas a luchar por realizar investigaciones que ayuden a la flora y fauna guatemalteca y que los datos aquí presentes se puedan utilizar en futuras investigaciones.



# ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xviii
SINOPSIS.....	xxi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MÉTODOS.....	17
III. RESULTADOS .....	40
IV. DISCUSIÓN.....	57
V. CONCLUSIONES.....	71
VI. RECOMENDACIONES.....	73
VII. LITERATURA CONSULTADA.....	75
VIII. ANEXOS.....	89



## LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro	
1. Dosis necesarias para determinación de DL <sub>50</sub> en ratones según OECD (2001)...	32
2. Tratamientos observados durante ensayo hemolítico.....	36
3. Información de individuos muestreados en campo y en cautiverio.....	40
4. Peso molecular de proteínas encontradas en el veneno de <i>B. aurifer</i> según Pla <i>et al</i> (2017).....	42
5. Posible identidad proteica de las bandas encontradas por SDS-PAGE del veneno de <i>B. aurifer</i> .....	43
6. Áreas corporales atacadas según el tratamiento evaluado.....	55



## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Distribución de la serpiente gushnayera, <i>Bothriechis aurifer</i> .....	1
2. Serpiente gushnayera, <i>Bothriechis aurifer</i> (Villatoro-Castañeda 2014).....	2
3. Vista dorsal (A) y lateral (B) de la cabeza de <i>Bothriechis aurifer</i> .....	3
4. Sistema inoculador del veneno de Viperidae.....	5
5. Ubicación de sitios de muestreo Parque Ecológico Gucumatz - Ranchitos del Quetzal y Biotopo del Quetzal Mario Dary Rivera, en Baja Verapaz .....	18
6. <i>Bothriechis aurifer</i> en gancho herpetológico.....	20
7. Salón de trabajo en Parque Ecológico Gucumatz - Ranchitos del Quetzal. ....	22
8. <i>Bothriechis aurifer</i> en caja de transporte. ....	22
9. <i>Bothriechis aurifer</i> sujeta para extracción de veneno por investigadora .....	24
10. Extracción de veneno de <i>Bothriechis aurifer</i> por investigadora y asistentes de campo: Cristina Arrivillaga y Alejandro Mármol .....	24
11. Liberación de <i>Bothriechis aurifer</i> tras extracción de veneno .....	25
12. Mapa de carga de muestras para gel SDS-PAGE. ....	28
13. Diagrama de posición de discos para prueba antibacteriana en un Agar Müller-Hinton. ....	29
14. Jaula de aclimatación para ratones de laboratorio a utilizarse en ensayo de dosis letal media.....	30
15. Jaulas individuales para ensayo de dosis letal media.....	31
16. Determinación de categoría de toxicidad y dosis letal media de acuerdo a OECD (2001). ....	33
17. Estaciones de trabajo para ensayo hemolítico en donde A- estación de descarte y vórtex, B- estación de toma de muestra, C - estación de	

inoculación de sustancias, D - estación de observación.....	35
18. Modelos de plasticina con patrón inspirado en <i>Bothriechis aurifer</i> .....	37
19. Mapa de distribución de modelos de plasticina dentro de Parque Ecológico Gucumatz - Ranchitos del Quetzal .....	38
20. Efecto antibacteriano del veneno y gentamicina por cepa bacteriana .....	45
21. Efecto antibacteriano entre gentamicina y veneno .....	46
22. Efecto antibacteriano entre cepas gram negativo y gram positivo. ....	46
23. Hematoma observado con la dosis 50ug/g en ratones blancos de laboratorio.....	48
24. Hematoma observado en ratones blancos con dosis de 300 ug/g .....	48
25. Cambios en el corazón observados con la dosis de 50 ug/g y 300 ug/g en ratones blancos de laboratorio .....	49
26. Efectos del veneno en hígado de ratones bajo la dosis de 5 y 50 ug/g .....	50
27. Efectos del veneno en corazón de ratón bajo las dosis de 5 y 50 ug/g .....	51
28. Trombosis en corazón de ratón bajo la dosis de 5 ug/g .....	52
29. Efectos del veneno en riñones de ratón bajo las dosis de 5 y 50 ug/g .....	53
30. Efecto hemolítico del veneno en sangre CP.....	54
31. Efecto hemolítico del veneno en sangre MS.....	54
32. Ataques de roedores en modelos de plasticina. ....	56
33. Cantidad de picotazos totales presentados en los modelos de plasticina.....	56
34. Cantidad de picotazos totales por segmento corporal en modelos de plasticina. ..	57
35. Ba7HR encontrada debajo de hoja de guarumo.....	100
36. Ba7HR previo a ser liberada .....	101
37. Ba6 y Ba8 en vista lateral. ....	101
38. Patrón de manchas negras en la cabeza de Ba6 y Ba8.....	102
39. Control utilizado para identificación de individuos en FotoSpottr .....	102
40. Cópula de Ba8 y Ba9. ....	103
41. Colas de juveniles encontrados. ....	104
42. Colas de hembras encontradas. ....	104

43. Cola de macho en cópula. ....	104
44. <i>Bothriechis aurifer</i> juvenil encontrada en Biotopo del Quetzal.. ....	105



## SINOPSIS

En el presente trabajo de graduación se encuentra la contribución a la caracterización de las proteínas encontradas en el veneno de la serpiente gushnayera *Bothriechis aurifer*, datos ecológicos y comportamiento antidepredatorio. El muestreo tuvo una duración de un año, ubicado principalmente en el Parque Ecológico Gucumatz – Ranchitos del Quetzal. Dentro del estudio se pueden encontrar observaciones únicas de la especie y casos interesantes tales como un individuo anémico y dos individuos encontrados en cópula. Se obtuvo un total de ocho muestras de veneno provenientes de siete individuos. Se obtuvo la concentración proteica promedio del veneno, siendo para esta especie de 153,065.63  $\mu\text{g/mL}$ . Se realizó un SDS-PAGE para obtener la identidad proteica del veneno, analizándolo en el software Gel Analyzer, encontrando proteínas con actividad hemotóxica. Se realizaron antibiogramas con diferentes cepas bacterianas, siendo el efecto inhibitorio del veneno menor pero casi similar al efecto inhibitorio de la gentamicina ( $\chi^2=2$ ,  $p=0.572$ ,  $\alpha=0.05$ ) y siendo el efecto del veneno mayor sobre las cepas gram positivo que las gram negativo ( $\chi^2=9.756$ ,  $p=1.00$ ,  $\alpha=0.05$ ). Se realizó un ensayo hemolítico en donde se observó el efecto inmediato del veneno sobre la sangre humana. A pesar de no encontrar la dosis letal media en ratones, se realizaron placas histológicas para evaluar el efecto del veneno en los órganos de ratones blancos del laboratorio, evidenciando un alto efecto sobre el corazón presentando trombosis. Los demás órganos presentaron efectos hemotóxicos. Además, se evaluó el rol del patrón de rombos negros en el dorso de la serpiente gushnayera como mecanismo antidepredatorio, en donde se encontró evidencia para poder determinar su función antidepredatoria contra aves ( $\chi^2=3.7247$ ,  $p=0.0536$ ,  $\alpha=0.0500$ ).

**Palabras clave:** *Bothriechis aurifer*, veneno, proteínas, antibacteriano, concentración, hemotóxico.



# I. INTRODUCCIÓN

## A. Marco teórico

### 1. Aspectos básicos de la biología de *Bothriechis aurifer* (Viperidae)

a. **Distribución.** *Bothriechis aurifer* conocida como serpiente gushnayera, víbora de árbol, cantil verde, ic'bolay, raxcaj o yaaxcan, habita bosques nubosos en altitudes de 1200 a 2300 metros sobre el nivel del mar (msnm). También es frecuentemente encontrada en cultivos de café, maíz y cardamomo de altura (Vásquez y Avendaño 2009). Es endémica de Guatemala y Chiapas. En Guatemala, se puede encontrar en Quiché, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Huehuetenango, El Progreso, Zacapa e Izabal (Campbell y Lamar 2004). Su distribución se puede observar en la Figura 1.

**FIGURA 1.** Distribución de la serpiente gushnayera, *Bothriechis aurifer*



(Campbell y Muñoz-Alonso 2014).

b. **Hábito.** Es una especie arborícola (Vásquez y Avendaño 2009). Durante el día, todo el género *Bothriechis*, descansa sobre ramas o troncos de los árboles (Köhler 2003). A pesar de tener una cola prensil, también pueden ser encontradas en el sotobosque.

Los juveniles cuentan con una coloración amarilla al final de la cola, con la cual generan un movimiento para atraer a presas potenciales. El cambio de coloración en la cola se relaciona con el cambio de la dieta entre juveniles y adultos de esta especie. Los adultos se alimentan de mamíferos y aves, mientras que los juveniles de lagartijas, anfibios y artrópodos grandes (Crother 2009, Lomonte *et al.* 2012).

**2. Aspectos diagnósticos de *Bothriechis aurifer*** Llega a medir un metro de longitud (Köhler 2003). Los adultos no suelen sobrepasar los 70 cm (Campbell y Lamar 2004). Su coloración es verde (Guerra *et al.* 2012). Los juveniles tienen una coloración verde pálido. Se distingue por tener un patrón de manchas amarillas con borde negro en el dorso. También, por lo general, presentan una línea negra dorsal entre estos parches (Campbell y Lamar 2004). Sus ojos son pequeños con pupila vertical (Guerra *et al.* 2012). El iris de esta especie es desde amarillo a bronce con puntos negros (Campbell y Lamar 2004). El epíteto específico *aurifer* significa “que porta oro”, esto hace referencia a los parches amarillos en el dorso (Campbell y Lamar 2004, Crother 2009). Una característica de esta especie es que presenta bandas negras desde la parte posterior de los ojos hacia el borde posterior de la cabeza (Guerra *et al.* 2012). Los detalles de su coloración se pueden apreciar en la Figura 2.

**FIGURA 2.** Serpiente gushnayera, *Bothriechis aurifer*

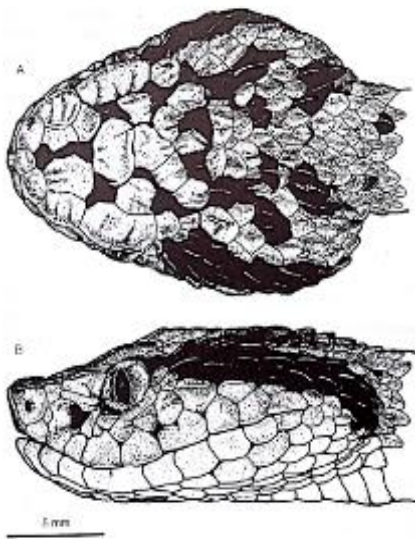


(Villatoro-Castañeda 2014)

*Bothriechis aurifer* presenta termofosetas en ambos lados de la cabeza. Estas se localizan entre el nostrilo y el ojo (Crother 2009). Estas termofosetas permiten percibir temperaturas externas, es por ello que tienen un papel importante en la defensa y en la precisión del ataque hacia las presas (López 2014). Además, sirven para la termorregulación (Krochmal *et al.* 2004).

La serpiente gushnayera tiene una cabeza en forma de triángulo, característica también de las especies encontradas en la familia Viperidae. Sus escamas corporales son aquilladas, brindándole una apariencia áspera (López 2014). Una característica de esta especie es que posee escamas grandes e irregularmente dispuestas en su cabeza (Campbell y Lamar 2004), tal como se puede observar en la Figura 3.

**FIGURA 3.** Vista dorsal (A) y lateral (B) de la cabeza de *Bothriechis aurifer*



(Campbell y Lamar 2004).

### 3. Sistema inoculador y toxinología del veneno del género *Bothriechis*

Al igual que las demás especies dentro de la familia Viperidae, a la cual esta serpiente pertenece, posee un aparato inoculador del veneno compuesto de un par de glándulas productoras del veneno, ubicadas cerca de los ojos y conectadas a través de unos canales a los colmillos (López 2014). El veneno de *Bothriechis aurifer* se inocula a partir de una pareja de colmillos huecos ubicados en el área frontal de la mandíbula (Crother 2009).

Estos colmillos actúan como agujas de inyección, presentan un movimiento retráctil y movilidad independiente uno de otro. A esta dentadura se le conoce como dentadura solenoglifa (López 2014). El veneno se inocula por medio de presión por el músculo compresor glandular. Luego, fluye dentro del colmillo y entra en la epidermis de la presa (Mackessy 2010). Este sistema de inyección, además presenta una estructura defensiva al causar daño a través de los colmillos e inocular el veneno contra sus atacantes (Savage 2002).

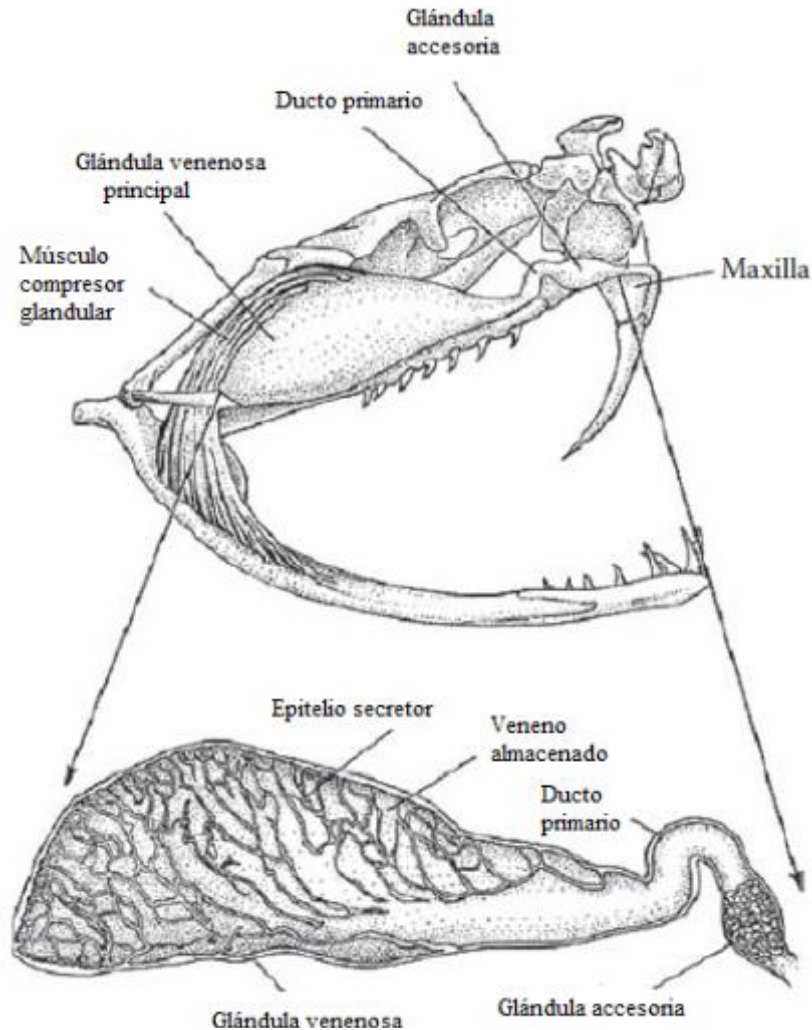
El veneno de los vipéridos se produce en la mandíbula superior. Aquí se encuentran las glándulas venenosas, músculos, dientes y el veneno (Figura 4). La glándula venenosa cuenta de una glándula principal y una glándula accesoria. El veneno producido en la glándula principal, se vacía por medio de un ducto hacia la glándula accesoria, desde ahí se libera a través del colmillo. Las serpientes venenosas pueden almacenar veneno durante largos períodos, pero se encuentra listo cuando las temporadas de hibernación terminan, se van a alimentar o necesitan defenderse (Mackessy 2010).

El veneno de la serpiente gushnayera aún no ha sido caracterizado por completo. Se realizó el análisis proteico del veneno de esta especie para evaluar las diferencias con la composición del veneno de las serpientes de este género (Pla *et al.* 2016). Sin embargo, a partir de reportes por mordedura, se conoce que el veneno es hemotóxico. Los efectos reportados son: hemorragia, edema, dolor e hinchazón (Vásquez y Avendaño 2009). Accidentes de mordedura por el género *Bothriechis* en humanos son escasos. Sin embargo, debido a su hábito arbóreo, las mordeduras son por lo general en la región de la cabeza, cuello y hombros; provocando así, efectos adversos (Calvete 2011). También se han reportado mordeduras en manos, sin embargo, resultan de severidad moderada debido a que no inoculan altas cantidades de veneno. No se han reportado manifestaciones sistemáticas a partir de mordeduras por este género (Camacho *et al.* 2014).

El veneno en las serpientes es una transición entre el mecanismo alimenticio de constricción a un medio de facilitación de digestión y descomposición de la presa (Calvete 2011). Se cree que esta adaptación es una ventaja selectiva para las serpientes ya que evita

que, al tener una digestión lenta en climas fríos, el alimento se descomponga y provoque muerte por intoxicación hacia estos organismos, ya que los Vipéridos evolucionaron en climas fríos en el Oligoceno (Mackessy 2010).

**FIGURA 4.** Sistema inoculador del veneno de Viperidae



(Mackessy 2010).

A partir de estudios filogenéticos se ha determinado el clado toxicófera el cual consta de los grupos: Serpentes, Helodermatidae, Anguidae, Varanidae e Iguania. Esto demuestra un mismo origen para los aparatos venenosos de dichos reptiles. La diferencia entre ambos aparatos venenosos es la ubicación de las glándulas venenosas, en Serpentes son glándulas maxilares y en Helodermatidae, Anguidae, Varanidae e Iguania son glándulas mandibulares. Con base en esto, se conoce que las Serpentes secuencian las toxinas

plesiomórficas; es decir, toxinas ancestrales del clado toxicófera; AVIT (alanine, valine, isoleucine y threonine), BNP (B-type natriuretic peptide), CRISP (cysteine-rich secretory protein), CVF (cobra venom factor), Crotamina, Calicreína y NGF (nerve growth factor). Además de ello secuencian toxinas propias al grupo, o autopomórficas, de: ADAM (a disintegrin and metalloproteinase domain like protein decysin), 3FTx, acetilcolinesterasa, CNP-BPP (C-type natriuretic peptide-bradykinin-potentiating peptides), Citoquina, Factor V, Factor X, Kunitz, L-amino oxidasa, lectina, PLA<sub>2</sub> (tipo IB y IIA), sarafotoxina, VEGF (vascular endotelial growth factor), Waglireina y Waprina (Fry *et al.* 2006).

#### 4. Hábitat

**a. Silvestre.** *Bothriechis aurifer* habita en bosques nubosos con una elevación de 1,200 a 2,300 msnm (Crother 2009). Estos bosques se caracterizan por la presencia de niebla en movimiento. Esta brinda humedad constante y aumenta el volumen de agua que precipita en la vegetación y en el suelo (Jiménez 2009). En Guatemala, los bosques nubosos se encuentran en un rango de 1,200 a 2,600 msnm (Jiménez 2009), lo cual es ideal para la serpiente gushnayera. Su rango de temperatura es de 12 a 23°C, exceptuando el Volcán de Acatenango con un rango de 12.5 a 18.5°C. Tiene un promedio anual de precipitación pluival de 2,000 – 5,000 mm (Gil 2014).

La presencia persistente de la nubosidad, reduce la cantidad de luz solar que llega al suelo y el déficit de vapor, lo cual suprime los procesos de evapotranspiración. Este tipo de bosque presenta una alta biodiversidad vegetal y altos niveles de endemismo. Este tipo de bosques se encuentran en los departamentos de Guatemala en: Huehuetenango, San Marcos, Quetzaltenango, Quiché, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Zacapa e Izabal; principalmente en las cadenas volcánicas o sierras. Cuenta con una extensión 50,000 ha en todo el país, de estas, 20,000 se encuentran protegidas (Gil 2014).

**b. En cautiverio** A pesar de que una de las amenazas hacia esta especie es el comercio internacional como mascota (Crother 2009), existen recomendaciones para mantener a esta especie en cautiverio. Los elementos comunes para tener dentro del terrario

o hábitat son: plantas, ramas, ventilación y una fuente constante de humedad. La pecera en donde se construye el terrario tiene, por lo general, un tamaño de 40 x 60 x 40 cm. Este tamaño se recomienda para que las serpientes tengan suficiente espacio para estirarse y movilizarse. Como sustrato, se recomienda utilizar ciprés ya que es resistente a los altos niveles de humedad necesarios y evita el crecimiento de hongos (Hollister 2004). Además de estas recomendaciones, los herpetarios que tienen a esta especie también deberían de cumplir con las regulaciones básicas de bienestar animal en cautiverio y normativas de bioética.

Se debe colocar una lámpara o fuente de calor para proveer luz a las plantas del terrario y un fotoperiodo para las serpientes. Los contenedores de agua deben estar elevados. Tanto el sustrato como las plantas deben ser regados semanalmente con abundante agua. Se recomienda tener un termostato para mantener la temperatura en un rango de 25 a 27°C (Hollister 2004).

**5. Caracterización proteica del veneno** La caracterización del veneno es el estudio de los compuestos proteicos, concentración, determinación de la dosis letal media, análisis del perfil proteico y fragmentación de los componentes encontrados (Culma *et al.* 2014). En el presente estudio se busca realizar la caracterización del veneno de *Bothriechis aurifer*. El género *Bothriechis* cuenta con once especies: *Bothriechis aurifer*, *B. bicolor*, *B. guifarroi*, *B. lateralis*, *B. marchi*, *B. nigroviridis*, *B. nubestris*, *B. rowleyi*, *B. schlegelii*, *B. supraciliaris* y *B. thalassinus* (Calvate 2011, Doan *et al.* 2016, Townsend *et al.* 2013). Cuatro de estas especies se encuentran en Guatemala: *B. bicolor*, *B. aurifer*, *B. thalassinus* y *B. schlegelii* (Köhler 2003).

Actualmente, se ha realizado un estudio sobre la composición proteica de las especies de *Bothriechis* encontradas en el país (Pla *et al.* 2016). A pesar de que se cuenta con cierta información, aún se desconoce la dosis letal media, efectos histopatológicos, antibacterianos y hemolíticos del veneno de *B. aurifer*. El país en donde más investigaciones se han realizado con el género *Bothriechis* y la composición de su veneno

es en Costa Rica. Ahí, el veneno de *B. schlegelii*, *B. lateralis*, *B. supraciliaris* y *B. nigroviridis* ha sido caracterizado (Lomonte *et al.* 2012).

El veneno de varias especies de *Bothriechis* presenta miotoxinas de fosfolipasa A<sub>2</sub>. Se han realizado varias investigaciones con el veneno de *Bothriechis schlegelii* en Costa Rica (Angulo *et al.* 1997). A pesar de la similitud de algunos compuestos entre las especies de este género, se ha encontrado que, entre el veneno de *B. lateralis*, *B. schlegelii* y *B. nigroviridis*, existe una diferencia en la composición del mismo a pesar de que estas especies poseen adaptaciones arbóreas y un tipo de dieta similar. Las familias de toxinas principales en *B. lateralis* y *B. schlegelii* son: SVMP y PLA<sub>2</sub> (Calvete 2011). En el veneno de *B. aurifer* se han encontrado las proteínas: SVMP, BPP, DISI, DC, 5'NT, PDE, CRISP, SVSP, LAO, PIII-SVMP, PI-SVMP, AP, PLB, CTL y PII-SVMP. Siendo PIII-SVMP el compuesto mayoritario con 20.5% del total de proteínas (Pla *et al.* 2016).

En estudios recientes de análisis de la composición de veneno de serpientes, en general se ha encontrado que las metaloproteinasas representan el mayor porcentaje de componentes en venenos de Vipéridos y Crotálidos. SVMP es una metaloproteinasas que actúa como hemorrágico y presenta actividad del fibrinógeno, activa la protrombina, activa la coagulación sanguínea con el factor X, entre otros (Serrano 2013). La PLA<sub>2</sub> o fosfolipasa A<sub>2</sub> forma parte de las proteínas secuenciadas de las glándulas maxilares de serpientes. Esta permite la descomposición de los fosfolípidos de la membrana plasmática (Fry *et al.* 2006).

**7. Análisis de proteínas SDS-PAGE** La base del método SDS-PAGE es la separación de las proteínas encontradas en un extracto o solución. Estas se separan por en un gel de poliacrilamida (PAGE). Se utiliza el detergente dodecilsulfato sódico (SDS) para revestir a las proteínas con una carga negativa. De esta manera, las proteínas se van separando en el gel de acuerdo a su peso molecular. Además, una fuente de poder brinda una carga para la migración de las proteínas. Se utiliza un buffer que contiene Tris, el cual mantiene el pH estable, glicina como conductor de la electricidad y el SDS que mantiene las proteínas cargadas negativamente. En esta técnica se utilizan dos tipos de geles, el de apilamiento o

concentración y el de resolución, los cuales varían en su pH para permitir el flujo de iones (Advansta 2011).

Conocer qué proteínas componen los venenos permite relacionar los efectos de los mismos con sus diferentes compuestos. Por medio de la técnica de SDS-PAGE se pueden conocer dichas proteínas. A partir de ello, se puede proceder con el aislamiento de las toxinas para algún uso farmacológico o también para analizar la procedencia de las proteínas a un nivel filogenético. La metodología de SDS-PAGE ha resultado útil para determinar las proteínas de diferentes venenos, tales como la medusa cubo (Chung *et al.* 2001), arañas (Fitches *et al.* 2004) avispas (Parkinson *et al.* 2002) y varias especies de serpientes (Wagstaff *et al.* 2009, Salazar *et al.* 2007, Menezes *et al.* 2006 y Serrano *et al.* 1999).

Utilizar esta metodología es clave para conocer la identidad única de las toxinas, un ejemplo claro de su utilidad se dio en el estudio de *Atropoides mexicanus* y *A. picadoi*. A pesar de su similar apariencia física y constante identificación errada, la composición proteica del veneno varía altamente así como sus rasgos bioquímicos (Gutiérrez *et al.* 2009).

**8. Efecto antibacteriano** La actividad antibacteriana se mide a través de la elaboración de antibiogramas. Esta técnica consiste en la inoculación de la sustancia a estudiar, en este caso veneno, en discos de papel esterilizados que luego se colocan sobre un agar Müller-Hinton con la cepa bacteriana de interés. Transcurrido un periodo establecido de observación, se miden los halos de inhibición ocasionados por la sustancia sobre el medio de cultivo (Moon *et al.* 2007, Kuti *et al.* 2004).

Uno de las posibles aplicaciones de las proteínas de los venenos es la evaluación de las mismas contra cepas bacterianas dañinas a la salud tales como: *Serratia* sp. que puede causar infección nosocomial y urinaria (Ausina y Moreno 2006), *Escherichia coli* que puede causar infecciones intestinales y del sistema excretor (Sussman 1997) o bacterias

causantes de infecciones cutáneas como *Staphylococcus aureus* (Vyas 2014). El potencial uso de venenos como antibacteriano se ha demostrado en varios organismos. Entre ellos se encuentra el veneno de la abeja, estudiada en una cepa de *S. aureus* resistente a la penicilina y demostrado ser efectiva contra bacterias gram-positivas (Fennell *et al.* 1968). Asimismo, se han encontrado péptidos que han demostrado ser efectivos contra bacterias en el veneno del escorpión sur-africano *Opisththalmus carinatus*. En este estudio se demostró que el veneno actúa de manera más efectiva en bacterias gram-positivas que en bacterias gram-negativas (Moerman *et al.* 2002).

Los estudios de actividad antibacteriana también han sido realizados con venenos de serpientes. Según Stiles *et al.* (1991), en un estudio utilizando el veneno de 30 especies de serpientes, varios de ellos demostraron ser efectivos contra bacterias gram-positiva y gram-negativas; incluyendo la especie *Aeromonas hydrophila*, que es un patógeno en reptiles y anfibios. La actividad antibacteriana de los venenos de serpientes es atribuida a la L-amino oxidasa (LAAOs). Muchos estudios recientes se basan en el análisis de LAAOs para desarrollo de fármacos (Stábeli *et al.* 2004).

**9. Dosis letal media** La dosis letal media se define como la dosis de una sustancia de concentración conocida, en este caso de veneno, en donde se produce la muerte del 50% de la población muestreada (de Roodt *et al.* 2006). Es importante determinar la dosis letal media o DL<sub>50</sub> para conocer el peligro relativo del veneno. Esta técnica permite complementar a las demás pruebas de toxicidad y cuantificar la potencia del veneno (Sanjuán-Galindez *et al.* 2012).

Para realizar esta técnica se utilizan ratones blancos. Se busca que sean de la misma cepa y con un rango de peso similar. La DL<sub>50</sub> se puede determinar al transcurrir un período de 24 o 48 horas después de la inoculación del veneno. Se utilizan diluciones dependiendo de la concentración del veneno. Por lo general se utiliza una regresión no lineal del porcentaje de mortalidad (de Roodt *et al.* 2006, Sanjuán-Galindez *et al.* 2012). Según las

recomendaciones de bioética, se ha logrado reducir el número de ratones utilizados en esta técnica. Se recomienda utilizar cinco ratones por dosis evaluada y cumplir con todos los requisitos de manejo, traslado y reducción de dolor para evitar un mayor estrés o maltrato animal (OECD 2001).

Comprender la composición de los venenos junto a la evolución de los mismos, es importante para explorar fuentes potenciales de fármacos y químicos novedosos y combatir los efectos adversos de los envenenamientos (Goncalves-Machado *et al.* 2016).

**10. Mecanismo antidepredatorio contra ataques de aves** En sistemas de depredador-presa, las presas han desarrollado mecanismos complejos para evitar ser atacadas e ingeridas y a su vez, los depredadores han desarrollado mecanismos de contradefensa (Desfilis y Font 2002). Organismos que no son comestibles por los depredadores pueden ser identificados a través exhibición fenotípica de colores conspicuos o reconocibles. Estos colores han evolucionado como señal de advertencia para depredadores potenciales y se le conoce aposematismo (Jorón 2009). El éxito del mecanismo aposemático depende de la evasión de presa por la asociación de la coloración con el peligro o mal sabor del animal, a través de aprendizaje o respuesta innata (Saporito *et al.* 2007).

El aposematismo en las serpientes se ha estudiado principalmente con la familia de las corales (Elapidae) debido a la coloración brillante y llamativa de bandas que presentan a lo largo del cuerpo. Se conoce que especies de la familia Viperidae también presentan patrones de alerta, que si bien no son tan llamativos como en las corales, han demostrado tener una función aposemática. En esta familia se pueden identificar dichos caracteres como: patrones dorsales en zigzag con triángulos o rombos y una cabeza triangular (Rodríguez *et al.* 2016). *Bothriechis aurifer* presenta también, bandas negras desde la parte posterior del ojos hasta el borde posterior de la cabeza (Guerra *et al.* 2012). Teniendo en cuenta la toxicidad del veneno (Shupe 2013) y la presencia de patrón en *B. aurifer*, se podrían relacionar ambas características como señalización de su toxicidad a los depredadores, como en el caso de otros animales (Campbell y Reece 2007).

**11. Estudios realizados en Guatemala con venenos de reptiles** A pesar de que se han realizado estudios sobre reptiles en Guatemala, pocos se han enfocado en el veneno de estos. Se ha hecho la caracterización farmacopatológica del veneno de la serpiente mano de piedra *Atropoides nummifer* (Chávez 2001). El enfoque de este proyecto estaba dirigido hacia los efectos del veneno. Se centraron en la actividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y en actividades hemotóxicas. También se ha caracterizado toxicológicamente el veneno de la serpiente de cascabel *Crotalus simus* (Guevara 2000). Al igual que el veneno de *Heloderma horridum charlesbogerti* (Ariano-Sánchez, 2003), en este estudio también se determinó la dosis letal media por medio de ratones blancos de laboratorio. Con *Bothriechis aurifer* se ha realizado el análisis proteico para comparar entre las demás especies del género encontradas en Mesoamérica (Pla *et al.* 2016).

## B. Justificación

Una amplia variedad de compuestos proteicos se puede encontrar en los venenos de reptiles. Los venenos de serpientes son principalmente estudiados por los efectos de intoxicación y lesión en los casos de mordedura hacia los humanos. La caracterización, el estudio del mecanismo de acción y aislamiento de las toxinas que pueden causar un accidente ofídico, se realizan con el objetivo de comprender de una mejor manera los venenos de las serpientes y sus acciones patológicas en el organismo intoxicado (Lomonte 2015). En Guatemala, se han realizado pocos estudios en donde se haya hecho una caracterización del veneno de serpientes.

En años recientes, la toxínología ha empezado a incrementar su valor al encontrar compuestos en venenos animales que pueden contribuir a la mejora de la salud humana. Por ejemplo, la batroxobina es un tratamiento para la trombosis vascular que inhibe la conversión de fibrinógeno a fibrina. Este medicamento se fabricó a partir de una proteasa sérica del veneno de *Bothrops atrox moojeni*, también conocida como Cabeza de lanza brasileña (Vu *et al.* 2013). Otro medicamento basado en un componente aislado del veneno de una serpiente es Captopril®, el cual es usado para tratar la hipertensión arterial. Este medicamento se extrajo a partir del veneno de *Bothrops jararaca* (Zicha *et al.* 2014).

*Bothriechis aurifer* es una serpiente que se encuentra clasificada en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) como una especie vulnerable (Campbell y Muñoz-Alonso 2014). Entre sus principales amenazas se encuentra la pérdida de su hábitat. No se ha reportado un porcentaje de accidentes causados por esta especie sin embargo, se puede clasificar bajo el 22.1% de accidentes causados por especies reportadas como desconocidas (Vásquez y Avendaño 2009), por lo que conocer los efectos del veneno podría servir para futuros estudios sobre el tratamiento de la intoxicación.

Poco se conoce sobre el veneno de esta serpiente, sin embargo sí se han reportado muertes por mordedura y se conoce que su veneno es hemotóxico, produciendo sangrado, edema, dolor e hinchazón (Vásquez y Avendaño 2009). Realizar la caracterización del

veneno de *Bothriechis aurifer* es una oportunidad para establecer nuevas líneas de investigación. Además, que permitirá conocer la dosis letal media y los verdaderos efectos de este.

A partir de caracterizaciones de venenos como el de esta serpiente, es posible elaborar un estudio filogenético en las especies de la familia Viperidae encontradas en Guatemala. También, se pueden encontrar compuestos nuevos para el uso farmacológico en el veneno estudiado. Además, se contribuirá con la determinación de la dosis letal media, la cual permitirá conocer la potencia del veneno.

La caracterización propuesta permitirá generar una investigación conjunta de diferentes herpetarios del país. Se trabajará con *Bothriechis aurifer* en cautiverio encontradas en el herpetario de Zootropic y el herpetario de Antigua Exotics. Las serpientes silvestres serán muestreadas en campo en Parque Ecológico Gucumatz, Ranchitos del Quetzal en Baja Verapaz y en el Biotopo Universitario para la Conservación del Quetzal “Mario Dary Rivera” en Baja Verapaz. Esto brinda una oportunidad para formar nuevo grupos de investigación y asociaciones con la Universidad para futuras investigaciones.

## C. Objetivos

### 1. General

a. Evaluar los aspectos ecotoxinológicos de la serpiente gushnayera, *Bothriechis aurifer* silvestre y en cautiverio, mediante observaciones de campo, evaluación de aposematismo y bioensayos en laboratorio para complementar el conocimiento de esta especie.

### 2. Específicos

a. Determinar la dosis letal media del veneno de *Bothriechis aurifer*, al igual que efectos *in vivo* e histopatológicos en ratones de laboratorio.

b. Determinar si existe actividad antibacteriana ocasionada por el veneno de *Bothriechis aurifer* en seis cepas bacterianas.

c. Determinar la concentración protéica promedio del veneno de *Bothriechis aurifer*.

d. Determinar si el patrón dorsal negro de *B. aurifer* cumple un rol antidepredatorio contra el ataque de aves.



## II. MÉTODOS

### A. Área de estudio

1. **Ranchitos del Quetzal – Reserva Natural Gucumatz, Purulhá, Baja Verapaz** Es una Reserva fundada en 1986 por Julio Álvarez Ponce y Julio Álvarez Arrué. Surge de la idea de convertir a la antes antigua finca en reforestación, en un oasis para Quetzales, fauna y flora propia del Bosque Nuboso de Baja Verapaz. Gucumatz quiere decir quetzal, como le conocían los mayas. La reserva busca ser auto sostenible y brindar servicios turísticos para tener recursos e invertirlos en el cuidado y preservación del bosque. Cuenta con senderos dentro del bosque, que llegan a fuentes de agua dentro de la montaña. Además es un sitio ideal para el avistamiento de aves e insectos (Álvarez 2016).

2. **Biotopo Universitario para la Conservación del Quetzal “Mario Dary Rivera”** Nombrada área protegida con la declaratoria de la Ley de Áreas Protegidas en 1976 y administrado por el centro de Estudios Conservacionistas (CECON), el Biotopo cumple con el objetivo de proteger y conservar el Quetzal y el Bosque Nuboso. Dentro del biotopo se encuentra la zona de vida de bosque pluvial montano bajo subtropical y bosque muy húmedo subtropical, frío. En el área se encuentran cuatro ríos y un aproximado de 20 quebradas. Es un sitio ideal para el avistamiento de varias especies vegetales pertenecientes a esta zona de vida, al igual que el Quetzal y diversas aves (Gil 2014).

**FIGURA 5.** Ubicación de sitios de muestreo Parque Ecológico Gucumatz - Ranchitos del Quetzal y Biotopo del Quetzal Mario Dary Rivera, en Baja Verapaz.



(Imagen satelital obtenida de Google Earth [27/09/2017]).

3. **Herpetario Zootropic** Zootropic fue fundado en 2000, busca preservar bosques, ecosistemas y organismos que habitan el país. Se enfoca principalmente en conservar a las especies endémicas y en el desarrollo comunitario. Cuenta con dos programas principales: la investigación científica aplicada a conservación, con un enfoque en la región Semiárida del Valle del Motagua; y educar acerca de la importancia de especies amenazadas (Zootropic 2015).

4. **Herpetario Antigua Exotic** Se encuentra a cuatro kilómetros del centro de La Antigua, en San Felipe de Jesús. Su dueño, el Dr. Roger R. Mazariegos Pinzón, inició el sitio con una pequeña colección personal de anfibios y reptiles. En el 2006, se inauguró el centro de rescate de reptiles y anfibios de Guatemala. Aquí se rescatan animales que son de decomisos por tráfico ilegal y animales de origen silvestre que necesitan asistencia o

reubicación. Además, se realizan talleres de capacitación sobre el manejo de reptiles (Chowhan, 2012).

## **B. Hipótesis**

1. El órgano que se ve más afectado con el veneno de *Bothriechis aurifer* es el corazón debido a sus propiedades hemotóxicas.
2. Existe una diferencia significativa entre el número de ataques por aves registrado en los modelos de plasticina con patrón dorsal negro inspirado en *Bothriechis aurifer* y los modelos de plasticina verde.
3. Existe un efecto antibacteriano del veneno de *Bothriechis aurifer*

## **C. Procedimiento**

### **1. Proceso**

a. **Obtención de muestras del veneno de serpientes silvestres.** Las serpientes silvestres se muestrearon Reserva Gucumatz, Purulhá, Baja Verapaz y en el Biotopo del Quetzal. El muestreo tomó lugar en el período de un año, iniciando en junio 2016 y finalizando en julio 2017, utilizando fines de semana para las salidas de campo y una semana completa durante junio 2016. En cada muestreo se contó con al menos dos asistentes de campo. El veneno se extrajo en el sitio. Al finalizar, se trasladaron las muestras al laboratorio de Biología de la Universidad del Valle de Guatemala en donde se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En cada salida se contaba con suero antiofídico y se llevó impreso el protocolo a seguir en caso de accidente por mordedura (Anexo 1).

La extracción del veneno se realizó *in situ*, al encontrar un individuo se colocaba en un saco de tela o costal. Al ser encontradas, se tomó el punto GPS y se trasladan desde el punto donde fueron encontradas (por ejemplo en las ramas) con ayuda del gancho y se colocan en el suelo. Luego estas son cargadas nuevamente con el gancho, sujetándolo desde el

mango con la mano dominante, se realiza un movimiento rápido en curva para sujetar a la serpiente desde la parte media del cuerpo. Por el hábito arborícola de esta especie, se facilita la sujeción por gancho ya que ella misma se enrolla en la curvatura del gancho (Figura 6). Dicha curvatura se encuentra alejada del mango a una distancia de 1 metro, que es suficiente para evitar mordeduras al sujetar con el gancho (Savage 2002). El saco de tela o costal se abrió con ayuda de otro gancho herpetológico manipulado por uno de los asistentes de campo. Se anudó el costal colocándolo en el suelo y por medio del gancho, cerrando la apertura y amarrando con rafia la misma. Se utilizan costales o sacos de tela para impedir que la mordedura de la serpiente atraviese. Además, se transportan amarrando el saco al gancho y agarrándolos del extremo más lejano a donde se encuentre el saco para dejar suficiente espacio entre el investigador y el saco.

**FIGURA 6.** *Bothriechis aurifer* en gancho herpetológico.



(Fotografía por: Isabella Rosito.)

Se realizó inspección por encuentro visual (IEV) por su gran utilidad en la medición de composición de especies (Gil 2014). Este consiste en realizar caminatas en áreas delimitadas revisando el sendero, en la vegetación, por debajo de troncos caídos y rocas en el suelo, además dentro de bromelias en búsqueda de anfibios y reptiles (Bongers 2011). Para motivos de esta investigación y basado en los hábitos de esta especie, se buscó en ramas de árboles, arbustos y en el nivel del suelo.

Las caminatas se realizaron en los senderos de Ranchitos del Quetzal en diferentes horarios, por la mañana: de 10 a 12 horas, por la tarde: de 16 a 18 horas y por la noche: de 20 a 24 horas. Debido a que, en la mayoría de visitas se contaba con al menos tres asistentes de campo, se realizaron muestreos simultáneos en la parte alta y baja del parque. En las visitas al Biotopo del Quetzal, se realizaron las caminatas dirigidas a la zona núcleo iniciando el ascenso a las 14 horas y regresando a las 2 am, utilizando solamente los senderos permitidos y acompañados de un guardarecursos.

Cada pareja llevó un GPS para registrar las coordenadas geográficas (latitud/longitud) en Datum WGS84 y un radio para mantener la comunicación. Al encontrar una serpiente, dos personas contaban con ganchos herpetológicos para colocarla en sacos de tela de un tamaño apropiado para colocar al individuo. Se marcó el punto en donde fue encontrado el individuo para liberarlo en ese mismo sitio posterior a la extracción. Se siguieron las normas éticas y de bioseguridad aprendidos en cursos de Herpetología de la Universidad del Valle de Guatemala y de una capacitación realizada en Antigua Exotic.

Se contó con un cuarto apartado exclusivamente para mantener a las serpientes y realizar la extracción. El cuarto contaba con iluminación natural (Figura 7). Al llegar al cuarto de trabajo, se sacaron las serpientes de los costales por medio del gancho herpetológico y se colocaron rápidamente dentro de sus cajas respectivas. Un asistente de campo sostuvo la tapadera de la caja, que cuenta con un agarrador superior, y se colocó rápidamente cuando la serpiente se encontraba por completo dentro de la caja. Las tapaderas cuentan con cierres fuertes para evitar que la serpiente salga de la caja. Dichas cajas cuentan con una dimensión de 28 x 45 x 20 cm, una tapadera con sujetadores para asegurarla y agujeros en las paredes y tapadera para ventilación. Los agujeros fueron colocados para permitir que fluya aire y que las cajas se mantengan siempre frescas.

**FIGURA 7.** Salón de trabajo en Parque Ecológico Gucumatz - Ranchitos del Quetzal.



Se colocó tierra y hojarasca recogida *in situ* y un plato para agua en cada caja. Además de una rama para permitir que las serpientes descansen sobre ella debido a su hábito arbóreo (Figura 8). Esta se colocó de manera que no superara los 12 centímetros de elevación para que el individuo pudiese colocarse sobre ella sin estar muy alto para atacar al abrir la caja (Hosking 2013). Se les dio agua limpia cada día según las recomendaciones de cautiverio a corto plazo de Bennett (1999). Las serpientes pasaron un máximo de dos noches en cautiverio, realizando la extracción temprano en la mañana para llevar la muestra fresca a la ciudad. Se observaban por la mañana y por la tarde mientras estaban en cautiverio para verificar que se encontraban en buen estado.

**FIGURA 8.** *Bothriechis aurifer* en caja de transporte.



El día de la extracción se registró las medidas de las serpientes. Se registró la longitud hocico-cloaca (LHC) y la longitud de la cola (LC) y longitud total (LT) por medio de una cinta métrica. Se determinó el sexo por medio de observación del ancho de la cola, corroborando la observación con asistentes de campo con conocimiento del tema. Se reportó cualquier anomalía presentada en el animal, al igual que la intensidad de la coloración y se reportó si el individuo presentaba más de un colmillo en algún lado de la mandíbula. Esto se escribió en hojas de toma de datos (Anexo 2). El registro de estos aspectos principales permite tener una idea de la estructura general de las características de la población de estudio. Debido al nivel de estrés generado en los organismos por su manipulación, se realizan estos registros básicos de manera rápida y efectiva (Bennett 1999). Se utilizó la codificación descrita en el anexo 3 para identificar a cada individuo.

Los organismos encontrados fueron marcados con pinta uñas negro en las escamas ventrales. Además, se tomaron fotografías de la parte superior de la cabeza para la identificación de patrones característicos del individuo. Este método ha resultado éxitos en otras especies de víboras arborícolas (Yang *et al.* 2013). Se utilizó el software FotoSpottr para la identificación de individuos (Schoen *et al.* 2015). Las serpientes también fueron fotografiadas de cuerpo completo, cola y en las áreas específicas donde se encontraron lesiones.

El veneno se extrajo manualmente al masajear las glándulas venenosas. Las serpientes se manipularon con un gancho herpetológico, sosteniéndolas firmemente con una mano y con la otra, se masajearon las glándulas venenosas. Las serpientes se colocaron sobre una superficie plana, utilizando el gancho herpetológico. Con el mango del mismo, se aseguró la cabeza de la serpiente y luego, se sujetó con una mano hasta tener seguridad la mandíbula de la misma con el dedo pulgar y medio, con el dedo índice se sujetó la parte superior de la cabeza (Figura 9).

**FIGURA 9.** *Bothriechis aurifer* sujeta para extracción de veneno por investigadora.



(Fotografía por: Israel Pimentel)

La boca del reptil se acercaba al borde de un Beaker esterilizado, el cual se sostuvo firmemente sobre la mesa por un ayudante de campo (Figura 10). Se utilizó una membrana de dos capas de Parafilm para que la serpiente mordiera e inoculara el veneno directamente dentro del Beaker. Se masajeó una glándula primero y luego la otra para mantener un mayor control (Chippaux *et al.* 1991). En todo momento, se mantuvo el silencio y se evitaron movimientos bruscos o muy fuertes para evitar dañar al organismo. Además, se trabajó con la puerta cerrada y dentro, solamente los asistentes de campo necesarios para el procedimiento.

**FIGURA 10.** Extracción de veneno de *Bothriechis aurifer* por investigadora y asistentes de campo: Cristina Arrivillaga y Alejandro Mármol.



(Fotografía por: Isabella Rosito)

Las fotografías y liberación se realizaron una hora después de la extracción para permitir al individuo un período de descanso después de la manipulación. Las fotografías se tomaron en áreas abiertas, con suficiente iluminación y en silencio para evitar un mayor estrés al animal. La manipulación durante las mismas fue mínima, sólo para colocarlas sobre una rama o en una superficie donde permanecieran quietas durante la toma de fotografía. Para la liberación, las serpientes fueron transportadas dentro de sus cajas respectivas para disminuir el estrés de trasladarlas a un saco después de la extracción, ya que es más fácil colocarlas dentro de la caja por que cuentan con más espacio para moverse (Figura 11).

**FIGURA 11.** Liberación de *Bothriechis aurifer* tras extracción de veneno.



(Fotografía por: María Renée Bräuner)

El veneno se recolectó por medio de una micropipeta e inmediatamente se colocó en tubos eppendorf de 1.5 mL etiquetados previamente con etiquetas adhesivas y marcador indeleble. Para realizar dicho traspaso, se utilizaron guantes de látex y por una persona que no estuviera manipulando a la serpiente. Todas las superficies se limpiaron con cloro, etanol y Lysol previo y después de la extracción. Se lavaron las manos con suficiente agua y jabón al finalizar la manipulación con cada serpiente. Cada muestra se guardó en una hielera y el mismo día de colecta se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  al regresar a la Universidad del Valle de Guatemala. Se utilizaron puntas nuevas y un Beaker limpio por cada muestra de veneno.

Cada muestra se identificó según el código generado a partir de su localidad, número de individuo y sexo (Anexo 3). Dentro del congelador de la universidad, se contó con una caja con seguro para evitar cualquier accidente con las muestras y se colocaron en una gradilla en frío dentro de la caja para asegurar que se mantuvieran congeladas todo el tiempo.

La extracción de veneno en el Biotopo del Quetzal se realizó de inmediato al encontrar a los individuos en los senderos permitidos. Se colocó un tubo eppendorf de 1.5 mL directamente bajo la mordida de la serpiente y se masajó de igual manera que el procedimiento anterior.

**b. Obtención de muestras del veneno de serpientes en cautiverio.**

Las serpientes en cautiverio se muestrearon en los herpetarios de: Zootropic y Antigua Exotic. Se contaba con los contactos y aprobación de los encargados de los herpetarios bajo estudio. Se llamó previamente para establecer una cita para la extracción, además de ello, se solicitó que no le dieran alimento a las serpientes tres días antes de la extracción. Posterior a la extracción, se continuó su alimentación habitual según cada herpetario. Se colectó el veneno dependiendo de la disponibilidad de cada herpetario. Al finalizar cada extracción, se llevaron las muestras a la Universidad del Valle de Guatemala en donde se congelaron. Se extrajo el veneno de la misma manera que con las serpientes silvestres, siguiendo las mismas medidas de seguridad y limpieza de las muestras. La única diferencia es que, en este caso, el veneno se extrajo el mismo día de la visita a los herpetarios.

**c. Diluciones de trabajo del veneno de *Bothriechis aurifer*.**

Para realizar los bioensayos y cuantificación proteica se prepararon diluciones 1/50 de las muestras obtenidas. Se utilizaron tubos eppendorf esterilizados de 1.5 mL. Se agregó 1  $\mu$ L de veneno y 49  $\mu$ L de agua ultrapura. Además, se prepararon diluciones 1/100 para el análisis SDS-PAGE, añadiendo 1  $\mu$ L de cada muestra en 99  $\mu$ L de agua ultrapura. Se utilizó esta dilución debido a que esta demostró ser la más óptima según lo observado con los venenos control de *Crotalus simus* y *Atropoides mexicanus* obtenidos en extracciones realizadas en el curso de Herpetología 2016. Todos los procedimientos involucrando el uso

del veneno se realizaron bajo condiciones estériles, limpiando el área de trabajo con cloro y etanol, utilizando guantes cuando fuese necesario, puntas nuevas para micropipeta esterilizada y material esterilizado en autoclave, asimismo, todo el material fue lavado previo a su uso y desinfectado con cloro posterior al experimento.

d. **Concentración proteica de los venenos.** Para determinar la concentración proteica de las muestras de veneno, se utilizó el ensayo de Bradford. Este método consiste en determinar la concentración de proteínas dentro de una solución, utilizando azul de Coomassie para teñir a las proteínas, que se detecta a una longitud de onda de 595 nm utilizando un espectrofotómetro BioRad 2007. Se preparó el reactivo Bradford (Anexo 4) en una botella de 1 L cubierta con papel aluminio. Se etiquetó con la fecha de elaboración, nombre e iniciales de investigadora. Se prepararon los estándares para la curva de calibración para poder determinar la concentración proteica, utilizando BSA (Anexo 5). Para el ensayo, se utilizaron 10  $\mu$ L del estándar y 500  $\mu$ L del reactivo de Bradford. Se mezcló durante 30 segundos agitando los tubos eppendorf donde se preparó la solución y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se midió la absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro 2800 UV/VIS marca UNICO. Con estos datos, se generó la curva de calibración utilizando el software Microsoft Excel.

Al haber obtenido una curva con un R aceptable, mayor a 0.8, se utilizaron los venenos control para probar medir la concentración proteica de estas muestras. Para ello se utilizaron diluciones 1/25 y 1/50, siguiendo el mismo procedimiento de preparación de dilución explicado anteriormente. Cada dilución contaba con tres réplicas para la medida de concentración, de las cuales se obtuvo un promedio final. Las muestras se prepararon de la misma manera, sustituyendo los 10 $\mu$ L del estándar con el mismo volumen de la dilución a estudiar. Como blanco se utilizó agua ultra pura y este se medía previo a cada muestra, así mismo, se repitió la lectura de cada muestra para obtener tres réplicas y asegurarse que el valor no variase mucho. Este procedimiento se realizó con las muestras del veneno de

*Bothriechis aurifer* utilizando únicamente la dilución 1/50 y cada muestra contaba con un duplicado.

e. **Determinación de proteínas por ensayo SDS-PAGE.** Para determinar el peso molecular de las proteínas encontradas en las muestras de veneno de *Bothriechis aurifer*, se realizó un ensayo SDS-PAGE. Para ello se preparó el buffer Laemli y buffer de corrida (Anexo 6). En un tubo eppendorf de 0.5 mL se agregaron 10 µL del pool de veneno con dilución 1/100 y 10 µL del buffer de muestra Laemmli. Se agitó bien y se dejó incubar a 95°C durante 5 minutos en un termociclador. Los geles se prepararon siguiendo la receta encontrada en el Anexo 7. Se cargaron 8 µL de la muestra preparada y 8 µL de escalera de proteínas BioRad. Las muestras fueron cargadas siguiendo el siguiente mapa:

**FIGURA 12.** Mapa de carga de muestras para gel SDS-PAGE.

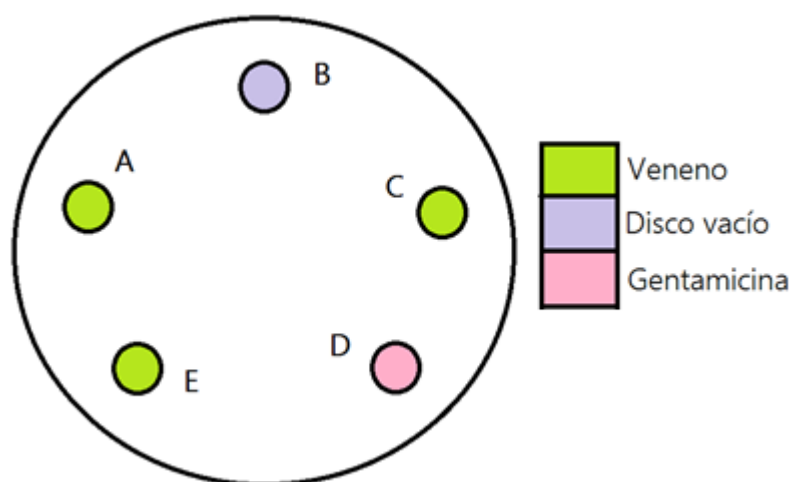
Gel	Pozos del gel													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A	Vacío	0	0*	1	1*	3	3*	4	4*	6	6*	8	8*	Escalera
B										9	9*	10	10*	Escalera

El gel se corrió a 100 V durante 3 horas. Luego se colocaron en una bandeja de tinción, utilizando una solución de tinción de azul de Coomassie durante 25 minutos. Se retiró de la solución y se agregó una solución decolorante hasta cubrir los geles. Los geles fueron fotografiados y escaneados, se guardaron dentro de dos hojas de papel acetato. Para el análisis de los mismos, se utilizó el programa GelAnalyzer.

f. **Actividad antibacteriana del veneno de la serpiente gushnayera.** Para determinar si el veneno de *Bothriechis aurifer* presenta propiedades antibacterianas o no, se realizó un antibiograma utilizando las cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus*. Estas bacterias fueron compradas en la empresa Global Quality, para su

preparación se siguió el protocolo encontrado en el Anexo 8. Para este bioensayo, se preparó un pool del veneno de las muestras obtenidas. Para ello, se agregaron 80  $\mu\text{L}$  de cada dilución (1/50) en un tubo eppendorf estéril, obteniendo un volumen total de 600  $\mu\text{L}$ . Por cada cepa bacteriana, se prepararon tres réplicas del medio de cultivo Müller-Hinton (MH) con cinco discos: A- pool veneno 1/50, B – control negativo: disco esterilizado, C – pool veneno 1/50, D – control positivo: antibiótico Gentamicina, y E – pool veneno 1/50, como se puede observar en la Figura 13. La concentración del caldo bacteriano a inocular fue de  $10^8$  UFC/mL.

**FIGURA 13.** Diagrama de posición de discos para prueba antibacteriana en un Agar Müller-Hinton.



Para preparar el medio de cultivo MH se pesaron 9.8 g y se diluyeron en 250 mL de agua destilada esterilizada, calentándolo hasta que se disolviera y tornara un color transparente. Se esterilizó en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Se utilizaron cajas Petri nuevas estériles. Estas se rotularon con: fecha, iniciales del cultivo, nombre y cepa bacteriana. Se trabajó bajo campana de extracción. Se vació aproximadamente 20 mL del medio por caja Petri, evitando la formación de burbujas. Se dejó solidificar durante 15 minutos. Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de la cepa bacteriana en el caso de *E. coli* y *S. aureus*, y 50  $\mu\text{L}$  para el resto de las cepas, esparciéndolo con hisopos estériles individuales. Se dejó secar durante 15 minutos. Por cada disco, se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de su muestra respectiva y se colocó con pinzas estériles sobre el medio de cultivo. Se dejó en incubación durante 19 horas en el caso de *E. coli* y *S. aureus*, 39 horas para *Bacillus subtilis* y 15 horas para el resto.

Para la medición de halos de inhibición ocasionados por el veneno y el antibiótico, se utilizó un vernier digital. Se registró el diámetro del halo en milímetros, con una incertidumbre de  $\pm 0.05$  mm. Los discos contaban con un diámetro de 5.5 mm. Luego se obtuvo el promedio por cepa bacteriana y se comparó con el promedio obtenido en cada cepa por el antibiótico.

**g. Determinación en ratones de  $DL_{50}$  del veneno por vía subcutánea.** Se utilizaron 16 ratones blancos Webster hembras con un peso promedio de 27.5 g. Se seleccionaron hembras ya que no hay sensibilidad en el sexo para la determinación de la dosis letal media (OECD 2001). Los ratones se compraron del bioterio de la Universidad San Carlos de Guatemala (USAC). Se trasladaron en carro desde el bioterio de la USAC hacia un salón reservado para este estudio en Colecciones Biológicas de la Universidad del Valle de Guatemala. Dentro del carro se mantuvo una temperatura de 25°C y se mantuvo el silencio para reducir el estrés de los ratones. Los ratones iban en cajas de transporte con ventilación, agua y viruta. La ruta no sobrepasa una hora de transporte, por lo que no se les colocó alimento. Al llegar a la Universidad, los ratones fueron colocados en dos jaulas grandes con suficiente espacio para ocho individuos cada una. Dichas jaulas contaban con un bebedero grande, un plato de alimento, juguetes y una cama de viruta (Figura 14).

**FIGURA 14.** Jaula de aclimatación para ratones de laboratorio a utilizarse en ensayo de dosis letal media.



En cuanto al uso de los ratones, es necesario utilizarlos para la determinación de la dosis letal media y los efectos histopatológicos del veneno de *Bothriechis aurifer* ya que permiten un análisis confiable de los resultados. Las alternativas para realizar la dosis letal media incluyen: predicción de dosis letal media a partir de datos obtenidos *in vitro* utilizando cultivos celulares y tres nuevas alternativas planteadas por la OCDE: 420, 423 y 425 (Repetto *et al.* 2005). En la presente investigación se trabajó con la alternativa 420 ya que se reduce significativamente el número de animales empleados, al igual que el estrés y el dolor asociado. No se utilizó la alternativa de cultivos celulares ya que no se cuenta con el equipo y la capacidad de realizarlo en la Universidad del Valle de Guatemala.

Los ratones se dejaron durante cinco días en el salón apartado para que se aclimataran. Tenían doce horas de luz y doce horas de oscuridad, al igual que agua ilimitada y sustrato limpio. Se revisaron una vez por día para cambiarles el agua, limpiarles la jaula y darles alimento (Fuentes *et al.* 2008). El alimento se discontinuó cuatro horas previo al estudio y dos horas después de inyectarles el veneno (OECD 2001).

Para realizar el ensayo, se trabajó una dosis por día. Se separaron cuatro ratones en jaulas individuales. Estas jaulas permiten que se puedan ver unos con otros para reducir el estrés (Figura 15). Los ratones tenían un número asignado en su jaula respectiva (1,2,3 y C para el control) y un código de color (morado, amarillo, verde y azul). Se pintó una sección del pelo con marcadores permanentes de colores según la dosis inoculada (Anexo 9).

**FIGURA 15.** Jaulas individuales para ensayo de dosis letal media.



Se realizó un pool de las muestras de veneno de *Bothriechis aurifer*, agregando 25  $\mu\text{L}$  de cada muestra para un volumen total de 200  $\mu\text{L}$ . Se trabajó con una dilución 1/50 en PBS para poder realizar las dosis a inocularse en los ratones. Con base en el promedio de concentración obtenida por medio del ensayo de Bradford, se calcularon las siguientes dosis:

**CUADRO 1.** Dosis necesarias para la determinación de  $DL_{50}$  en ratones, según OECD (2001).

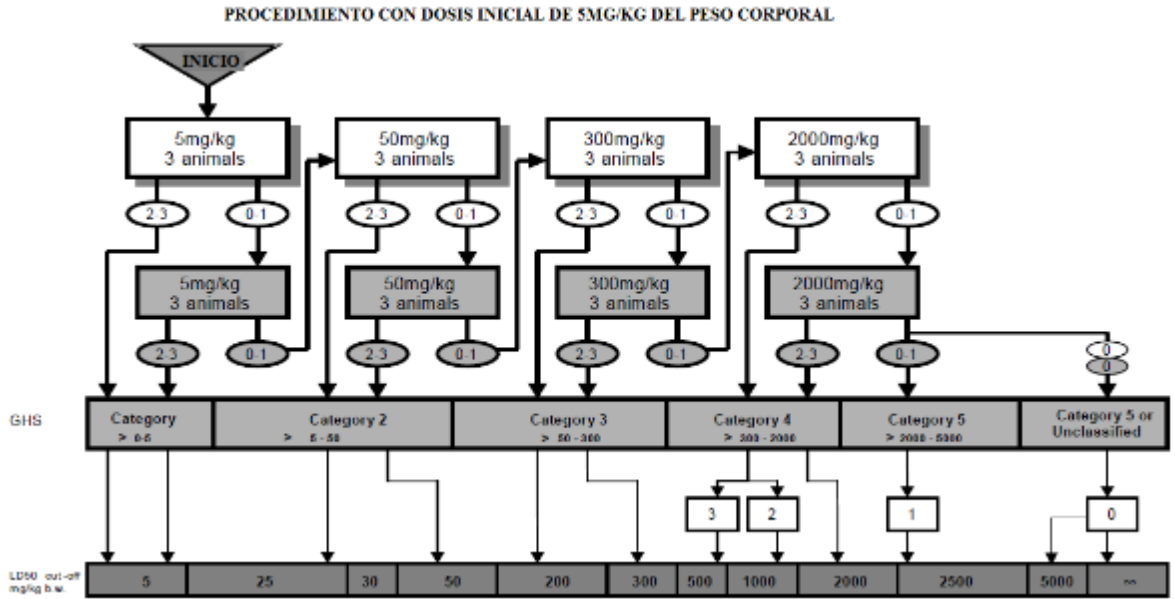
Toxina ( $\mu\text{g/g}$ )	Muestra de veneno ( $\mu\text{L}$ )	PBS (mL)
3.75	1	3
5	4.5	10
50	44.9	10
300	269.0	10
2,000	1,796.0	10

Previo a iniciar el ensayo, se pesaron los ratones y se registró el dato en hojas de toma de datos (Anexo 10). Se inoculó 0.1 mL de dosis por ratón. Al ratón control se le inoculó el mismo volumen de PBS. La inoculación se realizó con jeringas de insulina 100 UL/ 1 mL con aguja 30 G x 1/2'' de manera subcutánea. Se utilizaron guantes y se mantuvo el silencio y la calma para evitar un mayor estrés a los animales (OECD 2001, Pirela *et al.* 2006). Solamente se utilizaron cuatro ratones por dosis siguiendo las recomendaciones de bioética y la metodología utilizada por Pirela *et al.* (2006). Tras inocular el veneno, se regresaron a sus jaulas respectivas y se inició la observación. Los síntomas se reportaron en hojas de toma de datos (Anexo 11). Se observaron a intervalos de 5 minutos durante la primera media hora, reportando el comportamiento de los ratones. Se tomó especial

atención en los comportamientos de: nivel reducido de acicalamiento, poca actividad espontánea, posición encorvada, ojos entrecerrados y aislamiento ante otros individuos ya que estos comportamientos se reconocen como respuesta de dolor en estos organismos (Kohn *et al.* 2006). Además se reportó cualquier cambio en la piel, pelaje, ojos mucosas y ritmo respiratorio; ocurrencia de temblores, convulsiones, salivación, letargo, diarrea o coma (OECD 2001). Luego de este período de observación, se revisaron una vez cada hora durante 5 horas. Asimismo, se utilizó una cámara para grabar toda la actividad durante la primera media hora.

Transcurridas 24 horas, y si los ratones no murieron con la dosis evaluada, se anestesiaron y se les realizó eutanasia con la ayuda de la veterinaria Vanessa Granados. Se realizó con pentobarbital de sodio por inyección intramuscular, siguiendo el protocolo de AVMA (2013). Todos los ratones fueron disectados, preservando 1 cm<sup>2</sup> de la piel alrededor del sitio de inyección, el corazón, hígado y los riñones. Estos órganos se utilizaron para realizar el análisis histológico. Se tomaron fotografías al realizar la disección para observar los cambios entre las dosis. Tras preservar los órganos de interés en FAA, se dispuso del cadáver en bolsas de ECOTERMO para su posterior eliminación según los protocolos de esta empresa, dichas bolsas se proporcionaron por la Universidad del Valle de Guatemala. Los datos fueron evaluados según la categoría de toxicidad y determinación de DL<sub>50</sub> de la OECD (2001), siguiendo el presente mapa de decisión:

**FIGURA 16.** Determinación de categoría de toxicidad y dosis letal media de acuerdo a OECD (2001).



h. **Análisis histológico del veneno de *B. aurifer* en ratones.** Los órganos preservados de ratones en FAA se utilizaron para analizar cuál de estos se encuentra más afectado por el veneno de la serpiente gushnayera. Los cortes histológicos fueron realizados en el Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala. Se usó una tinción de hematoxilina eosina. Las placas histológicas se analizaron bajo el microscopio electrónico con cámara para tener un registro fotográfico de las placas.

i. **Ensayo hemolítico con veneno de *B. aurifer*.** Se utilizó la sangre de dos sujetos de estudio, una mujer (CP) con sangre A+ y un hombre (MS), ambos de 22 años de edad y con perfectas condiciones de salud. Se preparó un pool de las muestras de veneno puro, añadiendo 4  $\mu$ L de veneno por muestra en un tubo eppendorf limpio. Se lavaron placas de vidrio con agua, jabón y etanol para llevar a cabo la prueba. Se trabajó en un área desinfectada con cloro y etanol, marcando cada estación de trabajo por separado para evitar accidentes y contaminación (Figura 17).

**FIGURA 17.** Estaciones de trabajo para ensayo hemolítico en donde A- estación de descarte y vórtex, B- estación de toma de muestra, C - estación de inoculación de sustancias, D - estación de observación.



Se trabajó en todo momento con guantes, utilizando un nuevo par por estación y descartándolos en bolsas de ECOTERMO. Para extraer la sangre de los sujetos de estudio se utilizaron lancetas nuevas y se descartaron en el descarte para objetos cortopunzantes de ECOTERMO. Para la toma de muestra, los sujetos de estudio se lavaron las manos con agua y jabón y luego se desinfectó el área de pinchazo con un algodón y alcohol. Después de colocar una gota de sangre en el porta objetos de vidrio, se colocó una curita en la zona de herida. Luego, con otro porta objetos de vidrio limpio, se corrió la sangre dejando una capa fina y uniforme en toda la placa. Esta se observó inmediatamente utilizando el microscopio marca SWIFT con cámara incluida utilizando el aumento 40x. Transcurridos 5 minutos, se volvió a observar y documentar fotográficamente así como a los 10 minutos. Esto se realizó con cada uno de los tratamientos mostrados a continuación:

**CUADRO 2.** Tratamientos observados durante ensayo hemolítico.

No.	Individuo	Solución
1		Sangre
2	CP	Sangre + PBS
3		Sangre + veneno
4		Sangre
5	MS	Sangre + PBS
6		Sangre + veneno
7	-	PBS

Para preparar la solución, se inocularon 4  $\mu$ L de veneno o de PBS utilizando una micropipeta p10, mezclándolo rápidamente y luego realizando el corrido de muestra sobre la placa. Las fotografías y videos fueron registradas según el cuadro anterior.

j. **Evaluación del mecanismo antidepredatorio de la serpiente gushnayera contra aves.** Para evaluar el mecanismo de antidepredación por aves, tomando en cuenta la hipótesis de que la coloración y patrones de *B. aurifer* funcionan como mecanismos aposemáticos, se utilizaron modelos de plasticina que se asemejan al organismo en el Parque Ecológico Gucumatz – Ranchitos del Quetzal. El uso de modelos de plasticina de lagartijas, serpientes, salamandras y ranas, se ha realizado con éxito para la evaluación de mecanismos de aposematismo y mimetismo (Saporito *et al.* 2007, Bateman *et al.* 2016, Rodriguez *et al.* 2016). Se utilizó plasticina de la marca Vinci no tóxica, se realizaron 90 modelos de serpientes bajo tres tratamientos: 30 serpientes verdes, 30 serpientes café y 30 serpientes verde con patrón dorsal inspirado en la especie *Bothriechis aurifer*. Cada modelo llevaba de base un alambre de cobre de 35 cm de largo. Los modelos medían 27 cm. Se realizó un único patrón negro dorsal, con un marcador

permanente no tóxico de la marca Corona, el cual se repitió en los demás modelos bajo este tratamiento (Figura 18). Se utilizó un total de 36 gramos (g) de plasticina por modelo, sumando un total de 1,080 g de plasticina por tratamiento. Para el transporte, los modelos fueron empacados cuidadosamente con plástico de cocina y colocados en cajas de transporte con suficiente ventilación para evitar que los modelos se dañaran. Para la colocación en campo, se utilizaron las mismas cajas para transportar los modelos dentro del parque y así evitar daño previo a la experimentación.

**FIGURA 18.** Modelos de plasticina con patrón inspirado en *Bothriechis aurifer*



Debido al hábito arborícola de la serpiente gushnayera, los modelos fueron colocados en ramas de árboles y arbustos a una altura de 1.65 metros (m). El alambre de cobre sirvió para asegurar al modelo en su respectivo sitio. Los modelos fueron distribuidos aleatoriamente a lo largo del Parque Ecológico Gucumatz – Ranchitos del Quetzal, obteniendo una distribución mostrada en la Figura 19, en donde el círculo azul representa el área clasificada como “Alto” y el círculo amarillo representa el área clasificada como

“Bajo”. Se tomó el punto GPS del modelo colocado en los extremos de ambos sitios (el más alto y el más bajo).

**FIGURA 19.** Mapa de distribución de modelos de plasticina dentro de Parque-Ecológico Gucumatz - Ranchitos del Quetzal



Los modelos se colocaron dentro de la vegetación, marcando en el sendero con cinta y escribiendo el código de cada modelo para saber dónde específicamente se encontraba cada uno. Los modelos fueron colocados el día viernes 31 de marzo y se recogieron ocho días después (8 de abril). Al recoger los modelos, se tomó una fotografía y se registró el número y ubicación del ataque previo a bajar el modelo de su sitio. Se amarró la cinta con el código a su respectivo modelo para su registro posterior.

Los datos fueron registrados en hojas de datos (Anexo 12) previamente establecidas. Los modelos fueron empacados de la misma manera como cuando fueron transportados al sitio de estudio. Con base en las hojas de datos, se midió el largo del ataque (milímetros) por medio de un vernier digital y la ubicación en el cuerpo (cm) utilizando una cinta métrica. Además, se tomaron fotografías individuales de cada una de las heridas para generar el registro de las mismas. Para el registro del área corporal afectada, se dividió el cuerpo del modelo en cabeza y cola, siendo de 0 a 5 cm la cabeza y el resto la cola.

Los datos se tabularon en el software Microsoft Excel. Se calcularon las medias de los ataques por tratamiento y el promedio del tamaño de los ataques. Asimismo se realizó un gráfico de barras comparando el número de picotazos por tratamiento y número de picotazos en cabeza y cola en sus respectivos tratamientos.

#### **D. Análisis estadístico**

La dosis letal media se obtiene a partir de una fórmula estadística ya establecida. Debido a que se siguió la metodología de la OECD (2001), se usó el mapa de decisión para determinar la dosis letal media del veneno evaluado.

Se utilizó el software SPSS para realizar una prueba de chi cuadrado para determinar si existe o no diferencia entre los halos de inhibición generados por el veneno de *B. aurifer* y el antibiótico Gentamicina. Se obtuvo el promedio de halos de veneno por caja para comparar con las tres medidas de halos de inhibición por Gentamicina. Se realizó un boxplot por cepa bacteriana para evaluar la diferencia entre el efecto del veneno y del antibiótico. Se realizó también un boxplot para evaluar la diferencia entre el efecto del veneno en bacterias gram positivas y gram negativas.

Se utilizó el software JMP para realizar una prueba de Wilcoxon/Kruskal Wallis y una prueba de chi cuadrado para determinar si existe o no diferencia significativa en los resultados obtenidos de los ataques de aves a los modelos de plasticina.

#### **E. Ética**

Para la manipulación y manejo de las serpientes colectadas en cautiverio, se siguieron las recomendaciones por Bennett (1999). Se siguieron las recomendaciones generadas por el Comité de Ética para el Uso y Cuidado Animal de la Universidad del Valle de Guatemala (CEUCA UVG), y se tramitaron los permisos respectivos bajo este comité para el manejo de las serpientes y el de los ratones para la dosis letal media (Anexo 13). Se tramitó también la licencia de colecta para esta investigación por parte de CONAP (Anexo 14).

## J. Resultados

1. **Extracción del veneno y medidas de *Bothriechis aurifer* encontradas en campo.** Se encontraron 10 individuos en campo, de los cuales se obtuvo 9 muestras de veneno. En cautiverio, 2 individuos fueron evaluados y el veneno extraído. A continuación se presentan los datos de los individuos muestreados.

**CUADRO 3.** Información de individuos muestreados en campo y en cautiverio.

<b>Código</b>	<b>Sexo</b>	<b>SVL (cm)</b>	<b>tL (cm)</b>	<b>TL (cm)</b>	<b>Loc .</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Hum (%)</b>	<b>Hora</b>	<b>Luna</b>
<b>BA0ZH</b>	H	60.20	9.10	69.30	Z	-	-	-	-
<b>BA1MR</b>	M	58.20	10.30	68.50	RQ	-	-	5:15 p. m.	Cuarto menguante
<b>BA2HB</b>	H	51.20	4.10	55.30	BQ	-	-	3:05 p. m.	Cuarto creciente
<b>BA3MB</b>	M	54.00	10.50	64.50	BQ	-	-	3:35 p. m.	Cuarto creciente
<b>BA4MA</b>	M	68.00	14.00	82.00	AE	-	-	-	-
<b>BA5HR</b>	H	39.00	8.00	47.00	RQ	15.78	90	11:32 a. m.	Cuarto creciente
<b>BA6HR</b>	H	68.00	12.00	80.00	RQ	12.72	98	4:30 p. m.	Luna llena
<b>BA7HR</b>	H	54.00	11.00	65.00	RQ	16.88	94	10:09 p. m.	Cuarto menguante
<b>BA8HR</b>	H	68.00	13.00	79.00	RQ	16.38	97	7:30 p. m.	Cuarto creciente
<b>BA9MR</b>	M	58.50	6.50	65.00	RQ	16.38	97	7:30 p. m.	Cuarto creciente
<b>BA10H R</b>	H	54.70	10.00	64.70	RQ	17.00	96	10:30 p. m.	Cuarto creciente

Para mayor detalle de las observaciones realizadas ir a Anexo 15. Las muestras BA2 y BA5 se perdieron. La serpiente BA7 se encontraba enferma Anexo 16. La muestra BA6 y BA8 pertenecen a una serpiente recapturada, identificada por sus rasgos característicos (Anexo 17). Las serpientes BA8 Y BA9 se encontraron en cópula (Anexo 18). Además de estas observaciones se encontraron dos individuos más que no fueron examinados (Anexo 19). Los datos de temperatura se obtuvieron a partir de la estación meteorológica encontrada en Ranchitos del Quetzal, se carece del dato de las primeras muestras debido a que aún no contaban con la estación cuando se realizó el muestreo. Las siglas RQ pertenecen a Ranchitos del Quetzal, BQ al Biotopo del Quetzal, AE a Antigua Exotic y Z a Zootropic. Solamente un individuo se encontró en los muestreos matutinos (Ba5).

2. **Concentración proteica del veneno.** A partir de la curva de calibración (anexo 20) y las absorbancias obtenidas (anexo 21), se calculó la concentración proteica de los venenos control y de *Bothriechis*. Se obtuvo una concentración de 153,065.63 µg/mL para el veneno de *B. aurifer* promedio de 8 muestras con una réplica cada una. Esta concentración resultó ser mayor que la encontrada para *Crotalus simus* con 131,618.06 µg/mL y de *Atropoides mexicanus* con 126,118.06 µg/mL. De estas últimas muestras, solamente se contaba con un individuo y tres réplicas por veneno.

3. **Proteínas encontradas en el veneno por SDS-PAGE.** Por medio del software GelAnalyzer, se observaron los geles obtenidos por medio del SDS-PAGE (Anexo 22). A partir de la escalera, se obtuvo la curva de calibración para calcular el peso molecular de las bandas obtenidas en cada gel (Anexo 23 y 24). Para ello, se contaba con un  $R^2$  de 0.864 para el primer gel y de 0.994 para el segundo gel. Luego se obtuvo el promedio del peso molecular (kDa) de su muestra y réplica. Se buscó en el banco de datos de NCBI la secuencia FASTA de las proteínas reportadas en el veneno de *Bothriechis aurifer* por Pla *et al.* (2017). Luego se obtuvo el peso molecular de las mismas por medio de la página bioinformatics.org, presentadas a continuación. Debido a que no se encuentra específicamente registrado el peso de las proteínas del veneno, se buscaron aquellas

pertenecientes a las especies del mismo género o más cercanas al mismo. No se encontró el peso de 5'NT, DC y DISI en la base de datos.

**CUADRO 4.** Peso molecular de proteínas encontradas en el veneno de *B. aurifer* según Pla *et al.* (2017).

	<b>%</b>	<b>PM (kDa)</b>	<b>Especie</b>
<b>PLB</b>	0.7	64.19	<i>Crotalus horridus</i>
<b>CTL</b>	16.4	17.44	<i>Crotalus horridus</i>
<b>AP</b>	0.8	49.4	<i>Crotalus horridus</i>
<b>PI-SVMP</b>	12.5	51.26	<i>Echis ocellatus</i>
<b>PII-SVMP</b>	2.1	54.31	<i>Bothriechis lateralis</i>
<b>PIII-SVMP</b>	20.5	19.58	<i>Crotalus viridis</i>
<b>LAO</b>	9.5	56.38	<i>Bothriechis schlegelii</i>
<b>SVSP</b>	7.3	27.84	<i>Crotalus horridus</i>
<b>CRISP</b>	10.7	26.95	<i>Bothriechis schlegelii</i>
<b>PDE</b>	1.2	96.4	<i>Crotalus horridus</i>
<b>5'NT</b>	0.4	-	-
<b>DC</b>	0.2	-	-
<b>DISI</b>	1.2	-	-
<b>BPP</b>	13.4	20.17	<i>Crotalus horridus</i>
<b>SVMP</b>	3.2	19.58	<i>Crotalus horridus</i>

Con base en estos pesos moleculares, se estimó la posible identidad proteica de las bandas encontradas con las muestras de veneno aquí presentes.

**CUADRO 5.** Posible identidad proteica de las bandas encontradas por SDS-PAGE del veneno de *B. aurifer*.

<b>Muestra</b>	<b>Banda</b>	<b>PM promedio</b>	<b>Posible ID</b>
<b>0</b>	1	55.5	PII-SVMP - LAO
	2	30.5	SVSP
	3	12.5	-
<b>1</b>	1	59.5	LAO - PLB
	2	32	SVSP
	3	13	-
<b>3</b>	1	75	PLB
	2	59.5	LAO
	3	30.5	SVSP
	4	13.5	-
<b>4</b>	1	80	PDE
	2	63.5	PLB
	3	36	SVSP
	4	14	-
<b>6</b>	1	75.5	?
	2	61	LAO - PLB
	3	31	SVSP
	4	12	-
<b>8</b>	1	58	LAO
	2	32.5	SVSP
	3	11.5	-
<b>9</b>	1	67	PLB
	2	39.5	AP*
	3	28.5	SVSP
	4	23.5	-

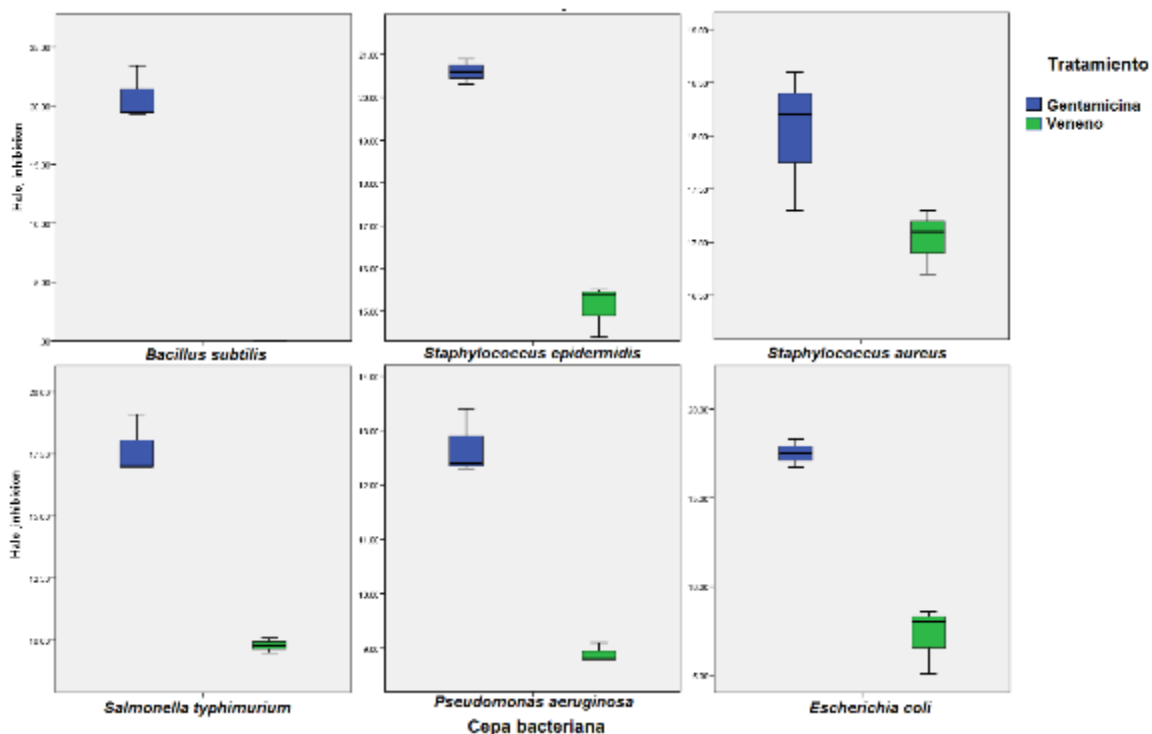
Continuación Cuadro 5

Muestra	Banda	PM promedio	Posible ID
<b>10</b>	1	68.5	PLB
	2	41.5	AP
	3	28.5	SVSP
	4	24	-

Se obtuvo un promedio de los pesos entre las réplicas corridas en el gel SDS-PAGE. Todas las muestras, excepto la muestra Ba0 y Ba1 presentaron cuatro bandas de proteínas. Debido a que no se obtuvo un dato exacto que represente la identidad de la proteína, se reportó la posible identidad de acuerdo al dato que más se acercara. Se presentan dos posibles identidades en algunas bandas debido a que el dato se encuentra entre ambos valores. Se presenta con un signo de interrogación aquellas bandas que no se acercaron a ningún peso molecular de las proteínas reportadas para este veneno. Se presenta con un guion la última banda detectada por el software pues la escalera no resuelve bajo a 20 kDa. La banda con mayor intensidad de color en todas las muestras pertenece a SVSP.

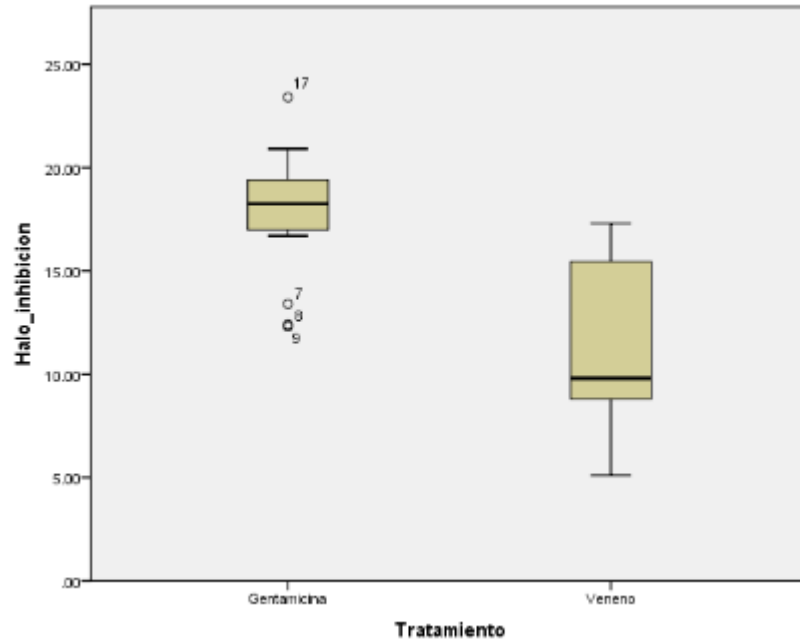
4. **Actividad antibacteriana del veneno.** El veneno presentó halos de inhibición en todas las cepas bacterianas excepto *Bacillus subtilis*. Las medidas y fotografías se pueden encontrar en anexos (anexo 25, 26-31). Para el análisis, se obvió el dato del control negativo, el disco vacío, ya que en ningún caso presentó inhibición. Según el estándar de halos de inhibición por la CLSI (2015), las bacterias *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* y *B. subtilis* se encuentran bajo el rango de resistentes ante el veneno de *B. aurifer* en comparación a la gentamicina. Las demás cepas bacterianas: *S. aureus* y *S. epidermidis* se encuentran bajo el rango de sensibles. A continuación se presenta el boxplot de comparación de medias para evaluar el efecto inhibitorio entre el veneno y el antibiótico por cepa bacteriana.

**FIGURA 20.** Efecto antibacteriano del veneno y gentamicina por cepa bacteriana



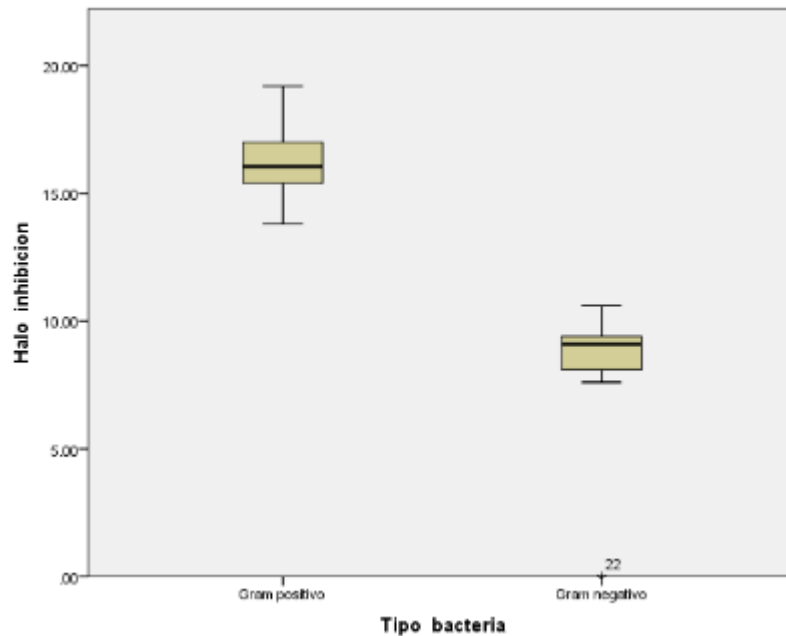
De acuerdo a lo observado, hay una marcada diferencia significativa entre el efecto antibacteriano del veneno y de la gentamicina, siendo el efecto más obvio en la cepa bacteriana *Bacillus subtilis* ( $x^2=2$ ,  $p=0.572$ ,  $\alpha=0.05$ ). El efecto del veneno se acerca mucho al efecto de la gentamicina en la cepa *Staphylococcus aureus* ( $x^2=0.667$ ,  $p=0.955$ ,  $\alpha=0.05$ ). El efecto antibacteriano del veneno en *Salmonella typhimurium* ( $x^2=0.667$ ,  $p=0.955$ ,  $\alpha=0.05$ ) y en *Pseudomonas aeruginosa* ( $x^2=0.667$ ,  $p=0.955$ ,  $\alpha=0.05$ ) es muy similar. Así como con *Escherichia coli* ( $x^2=0.00$ ,  $p=1.00$ ,  $\alpha=0.05$ ) y *Staphylococcus epidermidis* ( $x^2=0.00$ ,  $p=1.00$ ,  $\alpha=0.05$ )

**FIGURA 21.** Efecto antibacteriano entre gentamicina y veneno



Existe suficiente evidencia para concluir que hay diferencia significativa entre el efecto antibacteriano del veneno y del antibiótico en las cepas bacterianas ( $\chi^2=3.03$ ,  $p=1.00$ ,  $\alpha=0.05$ ). Existe un mayor efecto inhibitorio en las cepas bacterianas evaluadas con la gentamicina que con el veneno. Para esta prueba no se tomó en cuenta los valores nulos del efecto en *B. subtilis*.

**FIGURA 22.** Efecto antibacteriano entre cepas gram negativo y gram positivo.



Además, se evaluó el efecto del veneno sobre las bacterias gram positivo y gram negativo en total, obviando los datos nulos de *B. subtilis*. En base a este análisis existe suficiente evidencia para concluir que hay diferencia significativa entre ambos tipos de bacterias ( $\chi^2=9.756$ ,  $p=1.00$ ,  $\alpha=0.05$ ), siendo la mayor inhibición en las bacterias gram positivo.

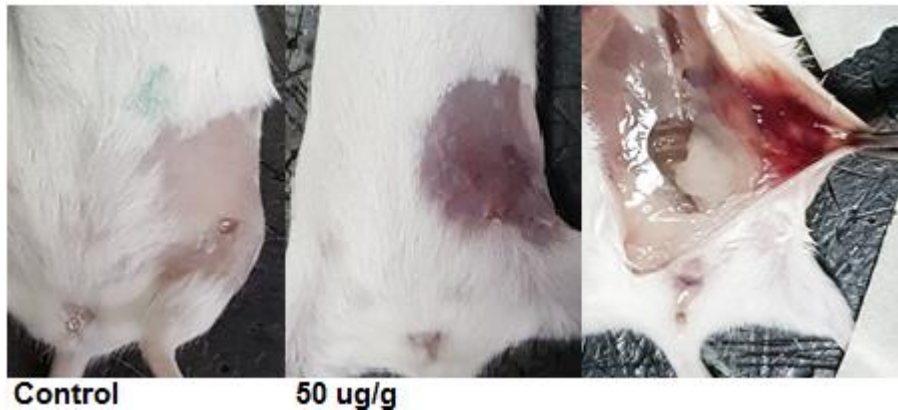
5. **Determinación de DL<sub>50</sub> por vía subcutánea en ratones blancos de laboratorio.** No se encontró la dosis letal media del veneno de *Bothriechis aurifer* en ratones blancos de laboratorio. Sin embargo, se cuenta con un registro detallado de los síntomas y de la apariencia de los órganos tras la inoculación de las dosis del veneno. Se trabajó con las dosis de 3.75, 5, 50 y 300  $\mu\text{g/g}$ . No se trabajó con la última dosis de 2,000  $\mu\text{g/g}$  debido a la falta de ratones. Al realizar la disección de los ratones inoculados con la primera y segunda dosis, no se observó ningún cambio físico al comparar con el ratón control. Durante la observación de media hora los ratones inoculados con la dosis de 3.75  $\mu\text{g/g}$  pasaron el 85.7% del tiempo bajo actividad normal, 7.1 % acicalándose y 7.1% acicalando la herida. Se le determinó como normal a: olfatear y observar activamente sus alrededores. El resto del tiempo pasaron la mayoría del tiempo dormidas (35%), inactivas (20%) o normales (20%). Sin embargo se reportó un individuo que presentó una respiración acelerada, uno que tomó agua y una acicalándose (Anexo 32).

Con la dosis de 5  $\mu\text{g/g}$ , durante el período de observación de media hora, los ratones pasaron un 42.8% del tiempo realizando actividad normal. El resto del tiempo se pasaron acicalando (32.1%), inactivas (14.3%) y acicalando el sitio de inoculación (10.7%) (Anexo 33). Durante las horas de observación, permanecieron dormidas. Se les realizó eutanasia a todos los ratones.

Los ratones inoculados con la dosis de 50  $\mu\text{g/g}$  pasaron el 75.0% de la media hora de observación realizando un comportamiento normal, 21.4% acicalando la herida y 3.6% acicalándose. El resto de las horas permanecieron dormidas (Anexo 34). Los ratones 1 y 3, realizaron una vocalización distinta a la vocalización normal del resto de los ratones, siendo

esta como gruñidos bajos y continuos. Se les realizó eutanasia a todos los ratones. Al realizar la disección, se observó un marcado hematoma en todos los ratones inoculados, se observaba desde la superficie de la piel y al abrir la misma (Figura 23). Así mismo, se observó un cambio en el aspecto del corazón, siendo este más agrandado y con una tonalidad más oscura que el del ratón control (Figura 25).

**FIGURA 23.** Hematoma observado con la dosis 50ug/g en ratones blancos de laboratorio.



(Fotografía por: María Andrea Bolaños)

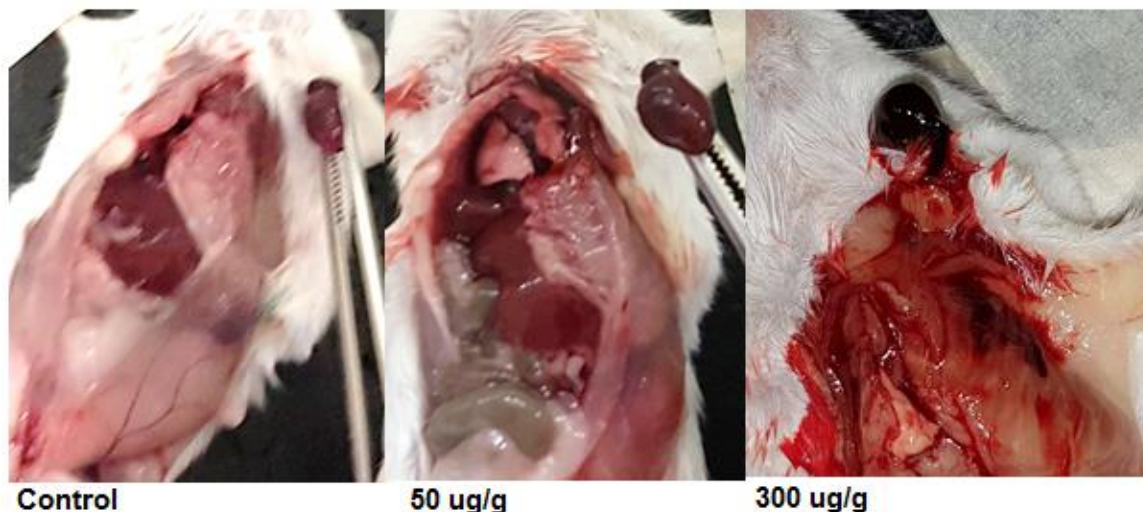
Los ratones inoculados con la dosis de 300  $\mu$ g/g realizaron una actividad normal durante el 75.0% del tiempo de observación de media hora, 10.7% inactivas, 7.1% acicalando el área de inoculación y 7.1% con los ojos entrecerrados. La primera hora de observación estuvieron realizando un comportamiento normal y el resto del tiempo permanecieron dormidas (Anexo 35). Al realizar la disección, se observó un hematoma en el área de inoculación, además de hemorragia en toda la cavidad corporal (Figura 24). Se observó una evidente deformación del musculo cardiaco (Figura 25).

**FIGURA 24.** Hematoma observado en ratones blancos con dosis de 300 ug/g.



(Fotografía por María Andrea Bolaños)

**FIGURA 25.** Cambios en el corazón observados con la dosis de 50 ug/g y 300 ug/g en ratones blancos de laboratorio.

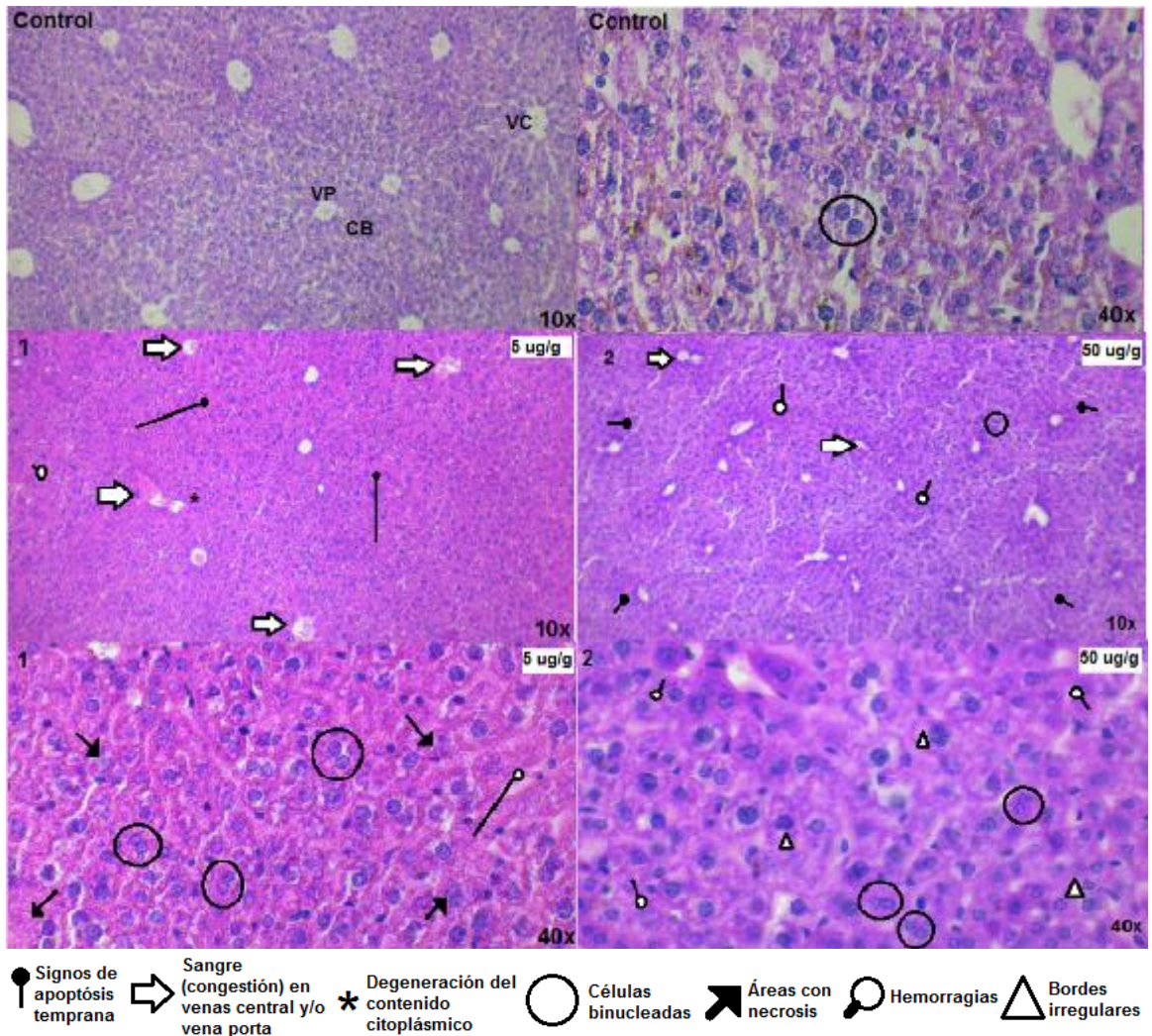


(Fotografía por: María Andrea Bolaños)

Debido a que el ratón control bajo la última dosis no contaba con un tamaño ideal, no se le inoculó PBS. Sin embargo, se utilizó para observar su comportamiento durante el período establecido. Además, como ya se contaba con los tejidos de los demás ratones control con PBS no se le realizó la disección transcurrido el período de observación.

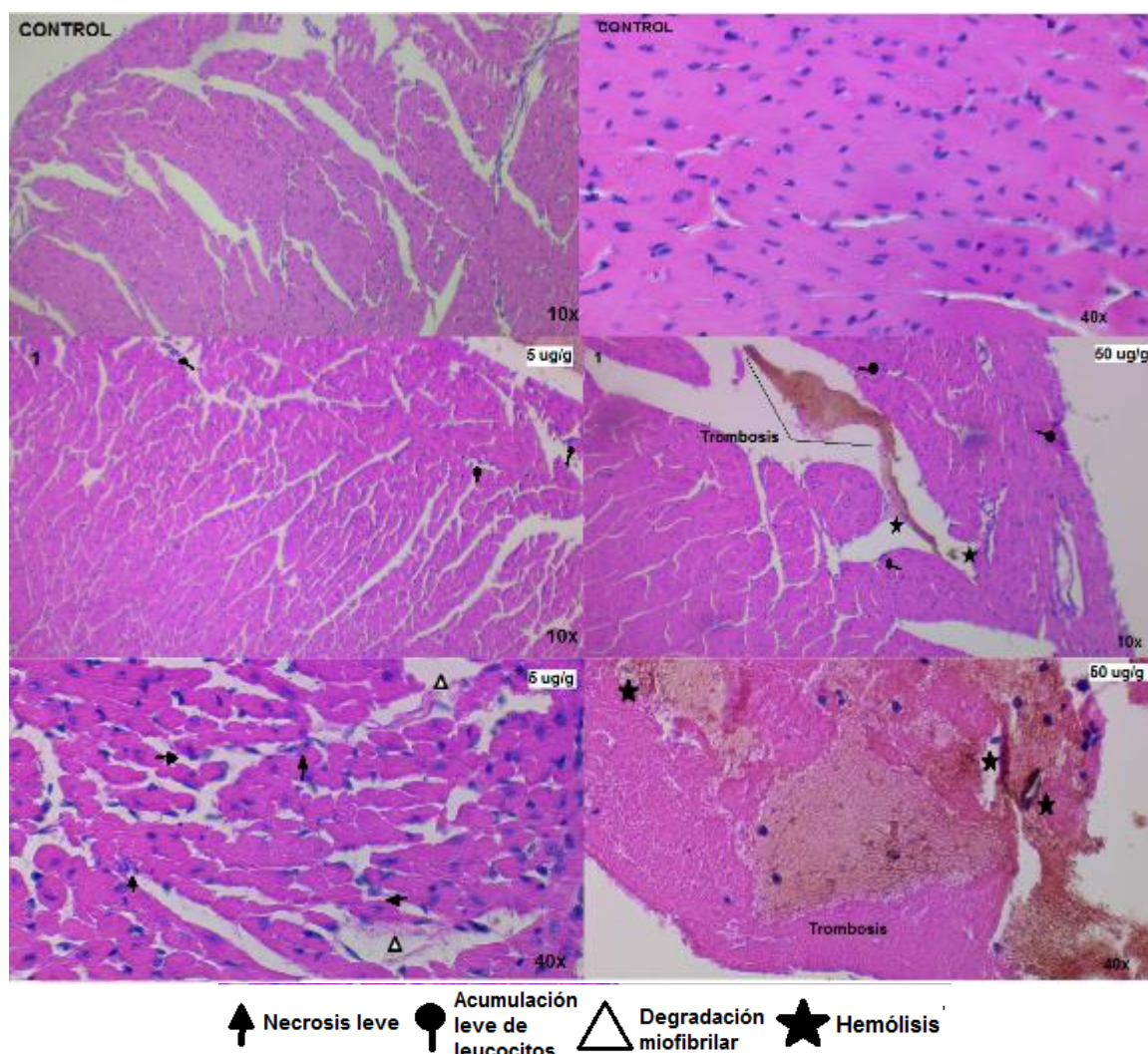
6. **Análisis histológico de órganos de ratones blancos inoculados con veneno de *B. aurifer*.** Se realizaron autopsias de todos los ratones eutanasiados bajo sus respectivas dosis de veneno. Se analizaron los cortes histológicos por órgano y dosis inoculada. No se cuentan con las placas de la última dosis (300  $\mu\text{g/g}$ ). La dosis de 3.75  $\mu\text{g/g}$  fue obviada para el análisis de resultados debido a que el PBS utilizado en esa dosis causó hemorragias y destrucción en las células (anexo 36 a 38). Esto se comprobó al inocular sangre únicamente con PBS. Debido a ello, se cambió de PBS para las siguientes dosis evaluadas (5, 50 y 300  $\mu\text{g/g}$ ). Los cortes histológicos de piel no pudieron ser analizados debido a la calidad de las placas. No se distinguía el tejido y los cortes no eran comparables con los controles. Se observó daño en los demás órganos evaluados: corazón, hígado y riñones presentados a continuación.

**FIGURA 26.** Efectos del veneno en hígado de ratones bajo la dosis de 5 y 50  $\mu\text{g/g}$



En la Figura 26 se pueden observar los efectos del veneno de la serpiente gushnayera en el hígado. Se encuentra en la primera columna, la dosis de 5  $\mu\text{g/g}$  y en la segunda columna la dosis de 50  $\mu\text{g/g}$ . La primera fila pertenece a los controles. En la hilera superior se encuentra un aumento de 10x y en la inferior un aumento de 40x. El detalle de los efectos en el hígado en todas las réplicas bajo la primera dosis se puede encontrar en el anexo 39 y en el anexo 42 las réplicas para la segunda dosis. En ambas dosis se encontró un deterioro hemolítico, siendo más evidente en la dosis de 50  $\mu\text{g/g}$ . Los cortes histológicos de hígado fueron analizados con ayuda de los datos reportados por: Al-seeni *et al.* 2011, Ross y Pawlina 2011, y Di Fiore 2000.

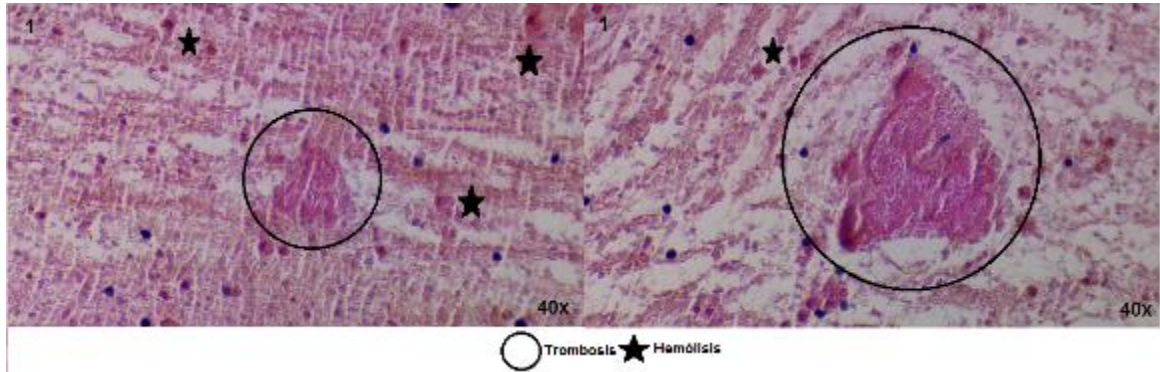
**FIGURA 27.** Efectos del veneno en corazón de ratones bajo la dosis de 5 y 50  $\mu\text{g/g}$



En la Figura 27 se pueden observar los efectos del veneno en el corazón. Se encuentra en la primera columna, la dosis de 5  $\mu\text{g/g}$  y en la segunda columna la dosis de 50  $\mu\text{g/g}$ . La primera fila pertenece a los controles. En la hilera superior se encuentra un aumento de 10x y en la inferior un aumento de 40x. El detalle de los efectos en el corazón en todas las réplicas bajo la primera dosis se puede encontrar en el anexo 40 y en el anexo 43 las réplicas para la segunda dosis. En la primera dosis se encuentran evidencias de daño hemotóxico, incluso un pequeño coágulo (Figura 28), sin embargo en la dosis de 50  $\mu\text{g/g}$  ya se evidencia un daño mucho mayor caracterizado por trombosis, hemólisis y áreas necrotizadas. Los cortes histológicos de corazón fueron analizados con ayuda de los datos reportados por:

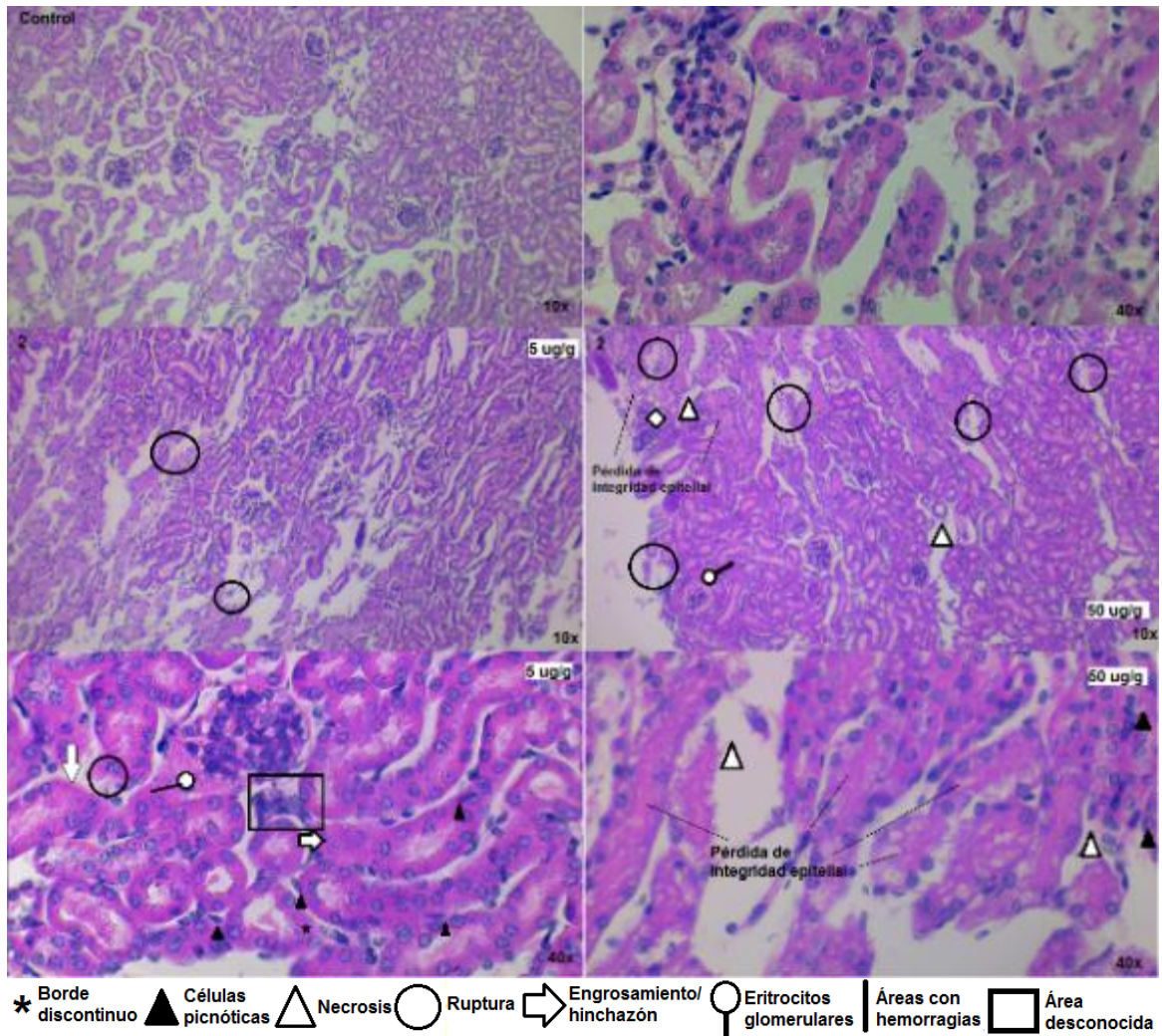
Anderson 2013, Kumar *et al.* 2013, Cambruzzi *et al.* 2012, Swamy *et al.* 2011, Ross y Pawlina 2011, Pat *et al.* 2010 y Di Fiore 2000.

**FIGURA 28.** Trombosis en corazón de ratón bajo la dosis de 5 ug/g

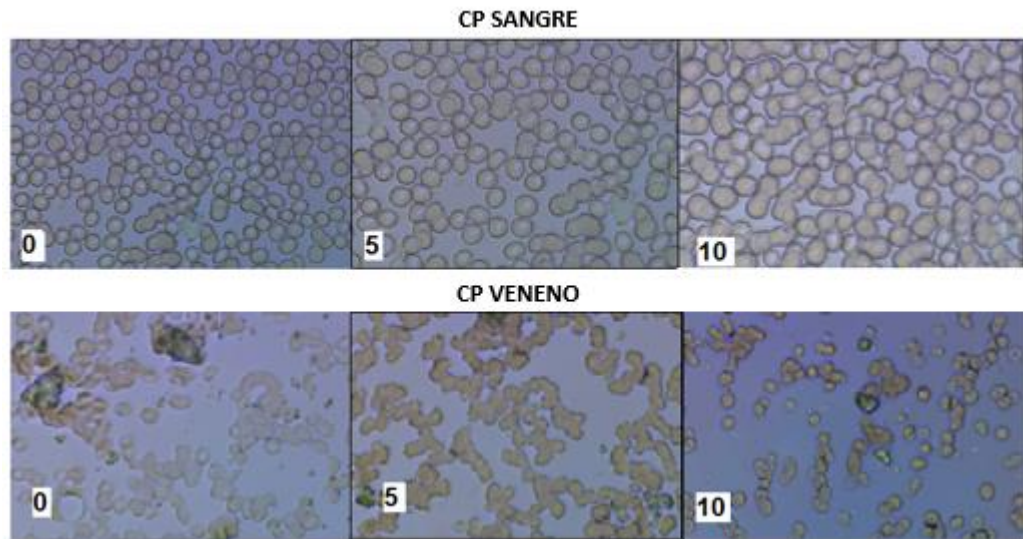


A continuación se pueden observar los efectos del veneno en los riñones de ratón. Se encuentra en la primera columna, la dosis de 5  $\mu\text{g/g}$  y en la segunda columna la dosis de 50  $\mu\text{g/g}$ . La primera fila pertenece a los controles. En la hilera superior se encuentra un aumento de 10x y en la inferior un aumento de 40x. El detalle de los efectos en los riñones en todas las réplicas bajo la primera dosis se puede encontrar en el anexo 41 y en el anexo 44 las réplicas para la segunda dosis. Los efectos del daño en el tejido son evidentes desde la primera dosis, sin embargo son más severos en la dosis de 50  $\mu\text{g/g}$ . La pérdida de integridad epitelial en los riñones se encontró principalmente bajo dicha dosis. Entre todos los órganos evaluados, los riñones son los que más evidencia presentaron de degradación hemotóxica. Los cortes histológicos del riñón fueron analizadas con ayuda de los datos reportados por: Al-Kahtani *et al.* 2014, Kumar *et al.* 2013, Ross y Pawlina 2011, Sangiorgio *et al.* 2008, Luciano *et al.* 2004 y Boer-Lima *et al.* 1999.

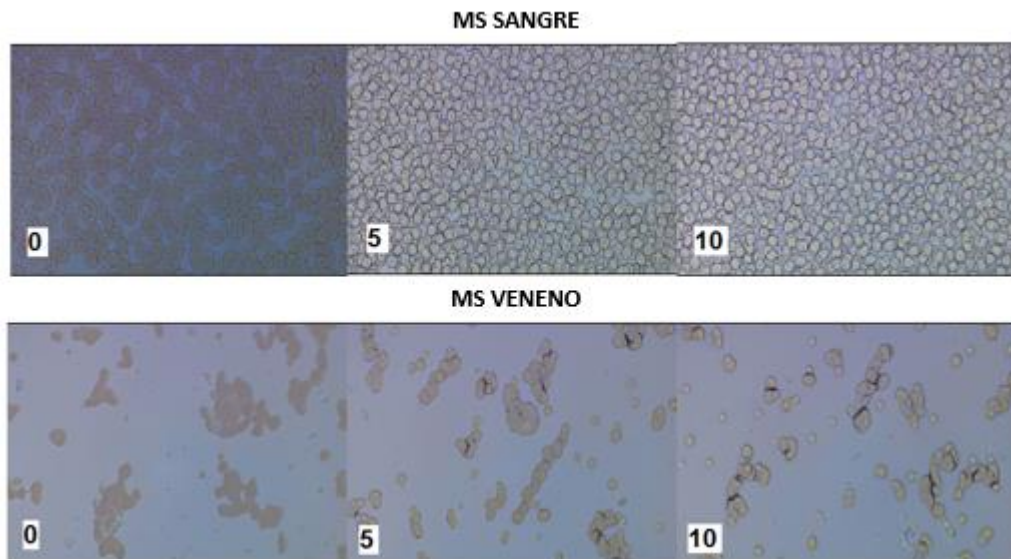
**FIGURA 29.** Efectos del veneno en riñones de ratones bajo la dosis de 5 y 50  $\mu\text{g/g}$



7. **Ensayo hemolítico.** Se observaron los efectos en la sangre de los dos sujetos de estudio. Además del registro fotográfico, se cuenta con un video del efecto del veneno inmediatamente después de inocularlo en la sangre del sujeto de estudio MS. A continuación se presenta el efecto del veneno de *Bothriechis aurifer* en sangre.

**FIGURA 30.** Efecto hemolítico del veneno en sangre CP.

Se muestra en la primera hilera, la sangre del primer sujeto de estudio transcurridos 0, 5 y 10 minutos a partir de la toma de muestra. Esto sirve como control para luego poder evaluar qué sucede cuando se inocula el veneno. En la hilera de abajo se puede apreciar que el efecto ocurre de inmediato (tiempo 0), evidenciándose aún más la formación de coágulos transcurridos los 5 minutos.

**FIGURA 31.** Efecto hemolítico del veneno en sangre MS

El individuo MS presentó una mayor cantidad de glóbulos rojos que CP. En la hilera de arriba se muestra como control, solamente la sangre transcurrido el tiempo establecido. En la hilera de abajo se evidencia la formación de coágulos. En este caso, sí se logró observar restos de células reventadas en el tiempo 10.

8. **Mecanismo antidepredatorio contra aves.** Se encontraron 88 modelos de plasticina, pues se perdió un modelo verde y un modelo café. Se cuantificó la cantidad de ataques en cada individuo y cada uno de los ataques fue medido en posición corporal y longitud de la herida. Se evaluó la cantidad de actividad por sitio de muestreo. Además, se cuantificó el área más afectada entre los tratamientos. Se realizó un registro fotográfico de las heridas presentado a continuación. En promedio, las heridas reportadas para *Bothriechis* midieron 3.84mm, 3.95 mm para café y 4.51 mm para verde. Se ubicaron 41 individuos en la parte alta del Parque Ecológico Gucumatz – Ranchitos del Quetzal y 47 en la parte baja del sitio. Para la parte alta, se encontraron 48 ataques mientras que en la parte baja se encontraron 74 ataques. A continuación se presenta la cuantificación de ataques por modelo. La documentación de todos los ataques se encuentra en el anexo 45.

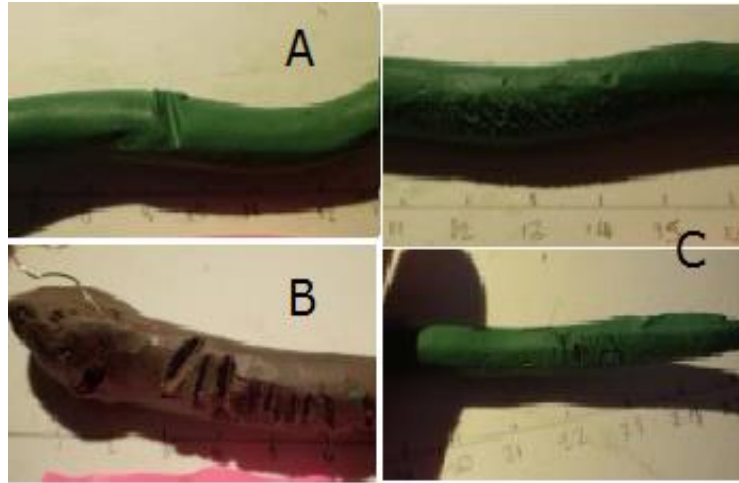
**CUADRO 6.** Áreas corporales atacadas según el tratamiento evaluado.

Tratamiento	Cabeza	Cola	Ambos	Solo Cabeza	Solo Cola	Individuos	Total ataque
B	15	13	2	7	6	15	28
C	17	27	4	5	8	18	44
V	35	19	8	8	4	21	54

El tratamiento que presentó un mayor número de ataques fue el color verde, seguido por el color café y por último el patrón *Bothriechis*. Se observa que en *Bothriechis* y en verde, el segmento más atacado fue la cabeza con 15 y 35 ataques respectivamente. En general,

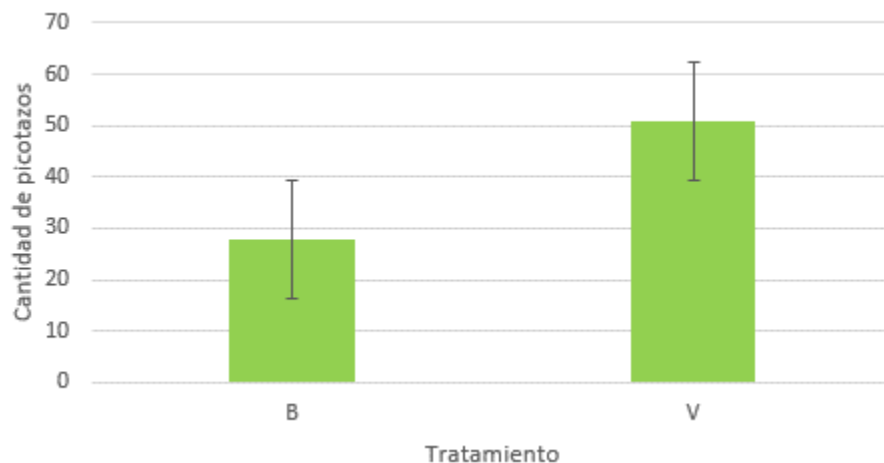
pocos individuos presentaron ataques en ambas partes corporales. Además de encontrar individuos atacados por aves, se encontraron modelos atacados por roedores presentados a continuación.

**FIGURA 32.** Ataques de roedores en modelos de plasticina.



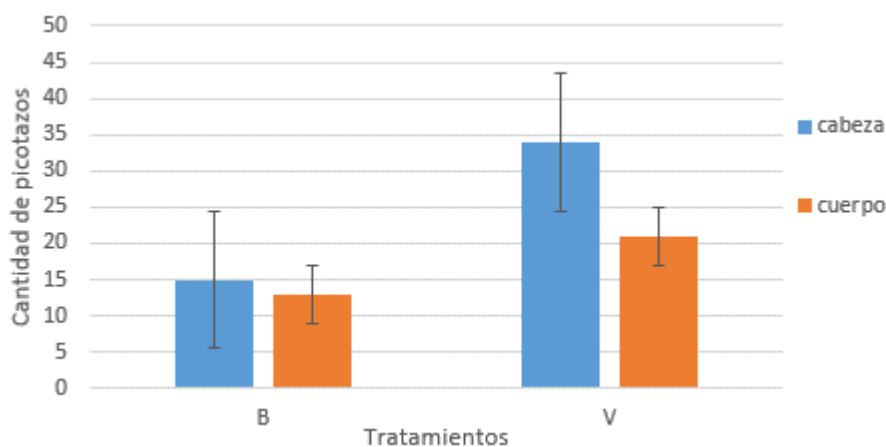
Se observan ataques de roedores en los diferentes tratamientos: A –verde, B – café y C – *Bothriechis aurifer*. Se sospecha que los ataques de A y B corresponden a un roedor por la marca de los incisivos, se desconoce qué mamífero pudo atacar a C, sin embargo se sabe que no fue un ave debido a la profundidad, tamaño y patrón de las heridas. La documentación fotográfica de las heridas registradas en los individuos de plasticina se presenta en anexos (anexo 45 - 47).

**FIGURA 33.** Cantidad de picotazos totales presentados en los modelos de plasticina



Existe evidencia estadística para concluir que hay poca diferencia significativa entre la cantidad de picotazos totales en el tratamiento con patrón *Bothriechis* y en el tratamiento de color verde ( $\chi^2=3.7247$ ,  $p=0.0536$ ,  $\alpha=0.0500$ ). Para analizar los datos, no se tomaron en cuenta los modelos cafés.

**FIGURA 34.** Cantidad de picotazos totales por segmento corporal en modelos de plasticina.



Existe evidencia estadística para concluir que hay diferencia significativa entre la cantidad de picotazos totales en la cabeza entre los tratamientos *Bothriechis* y verde ( $\chi^2=4.6401$ ,  $p=0.0312$ ,  $\alpha=0.05$ ). Según la evidencia estadística, no existe diferencia significativa entre la cantidad de picotazos totales en el cuerpo entre ambos tratamientos ( $\chi^2=1.5378$ ,  $p=0.2150$ ,  $\alpha=0.05$ ).

## K. Discusión

### 1. Extracción del veneno y observaciones en campo de *Bothriechis aurifer*.

No se midió la cantidad de veneno que se extrajo de cada individuo, pero en base al tamaño del tubo eppendorf, se calcula que se extrajo un promedio entre 200 – 400  $\mu\text{L}$ . La coloración del veneno varió también entre individuos (Anexo 48). El caso más interesante se obtuvo de la hembra Ba6, que fue recapturada bajo el código Ba8. En la primera extracción, el veneno obtenido tenía una coloración muy clara. En la segunda extracción, el veneno era de un color amarillo fuerte y, al utilizar la muestra para los ensayos, se notó que este tenía

un particular olor fuerte. El color amarillo en el veneno se relaciona con la riboflavina, un pigmento de la enzima L-amino oxidasa. La variación en el contenido de esta enzima brinda una amplia gama de variación en el color del veneno (Izidoro *et al.* 2014). Por lo que resulta interesante encontrarse con esta variación intraespecífica.

Durante las extracciones, solamente un individuo macho Ba9, lanzó mordidas y presentó un comportamiento de defensa y agresividad. Los demás individuos, a pesar de presentar las pautas de comportamiento de incomodidad al ser sujetadas por querer escapar, permanecieron tranquilos durante el procedimiento. El macho Ba9, fue encontrado en cópula dos noches previas a la extracción (Anexo 18), por lo que probablemente su comportamiento agresivo se debe al mismo período reproductivo.

El volumen obtenido de veneno parece correlacionarse con el tamaño del individuo, sin embargo no se realizó un análisis cuantitativo de esta relación para poder concluir respecto a ello. La relación entre el volumen de veneno producido por las serpientes y la edad y el tamaño ha sido demostrada en estudios previos (Mackessy 2010). Los datos de las medidas de los individuos encontrados pueden servir como línea base para estudios poblacionales de esta especie dentro del sitio de estudio. Con los datos de la longitud-narina-cloaca (SVL por sus siglas en inglés), es posible realizar estudios ecológicos tales como: correlación del tamaño del individuo con el uso del hábitat (Bellini *et al.* 2015), diferencia morfométrica entre machos y hembras de una misma especie (Elizondo *et al.* 2015), y un registro del crecimiento de serpientes que se puede relacionar con la dieta de la especie (Brown *et al.* 2017).

La fase lunar mayoritaria en donde se encontraron los individuos fue cuarto creciente (cuadro 2). No se realizó un análisis estadístico de la ocurrencia de serpientes según la fase lunar ya que solamente se encontraron ocho individuos en campo y esto no es estadísticamente robusto. No existe un consenso con respecto al efecto de la fase lunar y la ocurrencia de reptiles en los muestreos. Autores como Lillywhite y Brischoux (2011) y Rich y Longcore (2013) reportan que sí hay un marcado efecto en la fase lunar con la actividad de las serpientes muestreadas, teniendo estas preferencias para cazar en una fase

específica. Sin embargo, otros autores reportan que el efecto lunar en la abundancia encontrada en los muestreos, junto a otras condiciones climáticas, varían entre especies y no se puede generalizar (Bailey *et al.* 2009, Brown y Shine 2002). Probablemente, los individuos encontrados en este estudio fueron encontrados en su mayoría en cuarto creciente debido a que con poca iluminación de la luna, las presas cuentan con una mayor probabilidad de escapar al depredador (Lillywhite y Brischoux 2011); a pesar de que los vipéridos utilizan termofosetas para detectar a su presa (López 2014) y no dependen de la iluminación para una caza efectiva, pueden presentarse más activas con poca luz lunar ya que las presas forrajean mayores áreas a comparación de cuando hay luna llena.

De igual manera, se desconoce la temperatura (°C) preferida por estos individuos ya que se cuentan con muy pocos datos para establecer un parámetro estadísticamente confiable. Los individuos se encontraron en un rango de 12 – 17°C. Dentro de este rango se encontró el único individuo diurno en Ranchitos del Quetzal, Ba5. Sin embargo este individuo era un juvenil que parecía estar lesionado pues se iba de lado al moverse, además que fue encontrado sobre una hoja de guarumo seca por lo que posiblemente se pudo haber caído desde muy alto. Según Campbell y Lamar (2004) esta especie esta activa solamente de día, sin embargo se encontraron varios individuos activos en altas horas de la noche.

Dentro de las observaciones en campo, se encontró una pareja de *Bothriechis* en cópula (Anexo 18). El comportamiento reproductivo de *B. aurifer* concuerda con lo reportado para la mayoría de los miembros de la subfamilia Crotalinae (Carpenter y Ferguson 1977), en donde el macho inicia la cópula al enrollarse en la hembra. Una observación interesante es que este fue que el macho fue el único individuo que presentó la cola amarilla. La diferencia de color en la cola entre adultos y juveniles está reportado por Greene y Campbell (1972) y se relaciona con los cambios en la dieta entre adultos y juveniles de la familia Viperidae. Según Campbell y Lamar (2004) los juveniles de esta especie presentan colas con punta amarilla. Los juveniles de otras especies como *Bothrops moojeni* utilizan la punta de la cola para atraer a las presas (Greene y Campbell 1972). Sin embargo los juveniles encontrados presentaron colas negras (Anexo 18, Figura 37). Se presume que la cola amarilla podría ser un tipo de dimorfismo sexual en época reproductiva.

La altura en donde fueron encontrados los individuos de este estudio también representa un dato interesante. Por lo general estos individuos se encuentran a una altura promedio de 1.30 metros del nivel del suelo, sobre la vegetación principalmente en palmeras (Griffin com. pers. 2017, Mazariegos com. pers. 2017) o a una vegetación de hasta 1.5 metros según Campbell y Lamar (2004). Sin embargo, durante este estudio se encontraron principalmente a nivel del suelo y en el caso de los organismos en cópula, se encontraron a 5 metros sobre el nivel del suelo. Este dato puede ser útil para futuros estudios ya que indica una zona de búsqueda mayor a la esperada.

Se encontró también un individuo que presentaba posiblemente anemia (Anexo 16). Esta se puede definir como una reducción en el número de células rojas o eritrocitos por el volumen de sangre, lo cual provoca una reducción en el transporte de oxígeno. Rara vez se utiliza la anemia como diagnóstico final, pero es un indicio de otras condiciones patológicas o enfermedades. Reptiles con un alto número de ectoparásitos, tales como garrapatas, tienden a presentar anemia (Saggese, 2009). Se ha reportado que las infecciones virales y exposición a toxinas pueden causar anemia moderada o severa. Además, se conoce que a raíz de falta de alimento o durante periodos de hibernación y épocas de sequía las serpientes pueden presentar anemia (Jacobson, 2007). El diagnóstico de la condición de esta serpiente solamente podría ser certero si se hubiese realizado una evaluación sanguínea, sin embargo no se contaba con el equipo, preparación o permisos para realizarla. Según las condiciones del individuo es posible que este presentara síntomas tempranos de estomatitis. Debido a este caso, se sospecha que esta especie posiblemente permanece en periodos de baja actividad metabólica en los meses más fríos del año (diciembre – febrero) ya que durante el año de muestreo, se empezaron a encontrar a partir de abril.

A pesar de que no se aplicó un mayor tratamiento a la serpiente anémica, más que darle alimento y agua, es importante reportar lo realizado para saber los pasos a seguir en caso se encontrara alguna en el mismo estado. Además, es un dato de gran relevancia ya que, no solo la población en un año de muestreo fue muy escasa, sino que también se encontró un individuo enfermo lo cual puede representar que la población está más en peligro de lo que

se ha reportado previamente (Se encuentra clasificada en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) como una especie vulnerable (Campbell y Muñoz-Alonso 2014)). Este tipo de observaciones pueden utilizarse en futuros estudios de vigilancia de patógenos y enfermedades en poblaciones herpetológicas (Gray *et al.* 2017). El registro de lesiones en la mayoría de los individuos encontrados puede deberse a su hábitat arbóreo. No se encontraron heridas que pudieran complicarse o fueran de gravedad.

Entre las amenazas de la población encontrada, se ha reportado que el género *Bothriechis* junto a los géneros *Heloderma* y *Abronia* son los más traficados ilegalmente en el país (Monterroso 2012), por lo que existen muchas presiones que pueden reflejar un declive en esta población. Incluso uno de los individuos muestreados, Ba4, fue rescatado de un traficante al haberla encontrado dentro de un calcetín en el aeropuerto nacional (Mazariegos 2017 com. pers.).

La poza donde fueron encontradas la mayoría de las serpientes se caracteriza por tener un área de conexión entre las ramas de ambos lados del río, un tronco que conecta la parte de la catarata con el sendero y muchos árboles circundantes a la orilla de la poza (Anexo 49). En esta poza se han encontrado varias especies de reptiles y anfibios entre ellos: *Plectrohyla hartwegi* tanto adulta como metamorfo, *Ptychohyla hypomykter*, *Criptotriton veraepacis*, *Norops cobanensis*, *Bolitoglossa helmrichi*, *Leptophis ahaetulla* y *Cerrophidion godmani*. El agua encontrada ahí es la más limpia del río dentro de Ranchitos del Quetzal (Anexo 51, referencia al documento completo encontrada en Ranchitos del Quetzal). Además se han observado una gran cantidad de colibríes cerca de los árboles.

Se utilizó el software FotoSpottr para la identificación de patrones negros en la superficie de la cabeza de *Bothriechis aurifer*. Se tomó la fotografía de todos los individuos encontrados para el procesamiento de las fotos. Además, se utilizó como control el individuo Ba7, tomando la fotografía desde el terrario para tener esa confirmación visual. Con el software, se obtuvo un 57% de alineamiento entre los patrones de las fotografías control (Anexo 17, Figura 35). Las fotografías de los individuos marcados como Ba6 y Ba9

presentaron un 46% de alineamiento entre sus patrones. Sin embargo, debido a sus lesiones, tamaño y aspecto general se conocía que esta serpiente fue recaptura. Según Schoen *et al.* (2015), este software facilita la confirmación visual de los patrones. Al realizar dicho análisis, se encontró que los patrones de la cabeza son fácilmente reconocibles. Esto concuerda con lo observado con otras especies de víboras arborícolas (Yang *et al.* 2013). Se recomienda realizar este tipo de identificación para estudios de captura y recaptura con esta especie, sin embargo se carecen de datos estadísticamente robustos para poder concluirlo.

**2. Concentración proteica del veneno.** Conocer la concentración proteica total del veneno permite establecer, en base a la identidad proteica, en qué concentración individual se encuentra cada proteína. Además, sirve para calcular la dosis necesaria para ensayos tales como DL<sub>50</sub>, ELISA, entre otros (OECD 2001, Sousa *et al.* 2013). Al tener este dato, al igual que el de *C. simus* y *A. mexicanus* se podría hacer una comparación de la concentración proteica entre las especies de vipéridos encontrados en el país. No se encontró diferencia al medir la concentración proteica de muestras que ya llevaban tiempo en refrigeración y al medir la concentración de una muestra fresca, sin embargo no se realizó un análisis estadístico para comprobar esto directamente.

**3. Actividad del veneno de *Bothriechis aurifer*.** Se encontraron seis de las quince proteínas reportadas en el veneno de *Bothriechis aurifer* por Pla *et al.* (2017), por medio del método SDS-PAGE. Debido a que no se obtuvo un dato exacto que representara la identidad de la proteína, se reportó la posible identidad de acuerdo al dato que más se acercara. Para obtener un dato más certero de la identidad de las proteínas encontradas en el veneno, se recomienda realizar una separación cromatográfica por metodología HPLC, en comparación de estándares proteicos para determinar la composición completa del veneno. Esta técnica es la más utilizada para caracterizaciones de los venenos (Goncalves-Machado *et al.* 2016, Bregge-Silva *et al.* 2012, Gutiérrez *et al.* 2009). Otras modificaciones que se recomiendan realizar para obtener identidades con mayor certeza son: un gel con mayor concentración en el resolving gel,

liofilización del veneno y/o purificación con kit y realizar un análisis con un kit que permita la resolución de proteínas de menor peso molecular.

A las metaloproteinasas en el veneno conocidas como SVMPs (snake venom metalloproteinases en inglés (Oyama y Takahashi, 2017)) se les atribuye la actividad hemorrágica (Markland y Swenson, 2013; Arce-Estrada, *et al.* 2009), sin embargo algunas presentan dicha actividad y otras no (Oyama y Takahashi, 2017). Estas toxinas ocasionan la activación de la protrombina, coagulación de la sangre, activación del factor X, destrucción celular y formación de coágulos (Markland y Swenson, 2013). A las metaloproteinasas hemorrágicas en los venenos se les atribuye la letalidad del veneno hemotóxico (Oyama y Takahashi, 2017). La metaloproteinasas encontrada en el veneno de *B. aurifer* es PII-SVMP. Estas metaloproteinasas se clasifican como PI, PII y PIII dependiendo de su tamaño y estructura (Oyama y Takahashi, 2017). En las muestras analizadas, solamente en el individuo Ba0 se identificó aproximadamente la PII-SVMP (Cuadro 5).

Todas las muestras presentaron una banda con identidad proteica aproximada a SVSP (Cuadro 5), conocidas como snake venom serine proteinases en inglés (Oyama y Takahashi, 2017). Estas actúan directamente en la cascada de coagulación, específicamente en el sistema fibrinolítico, formando coágulos, y en el sistema caliceína-cinina, impidiendo la activación del factor XII en la vía intrínseca de la cascada de coagulación y además, en la formación de plaquetas (Serrano 2013, Terra *et al.* 2009), por lo que es un factor clave en el efecto hemorrágico del veneno.

En el caso de LAO y/o PLB encontradas en el veneno de *B. aurifer*, se reportó la posible identidad como ambos debido a que el peso molecular obtenido en el SDS-PAGE se acerca a cualquiera de las dos proteínas. La L-amino oxidasa (LAO) ha demostrado inducir edemas y hemorragias en estudios de efectos *in vivo* (Bregge-Silva *et al.* 2012). La fosfolipasa B (PLB) causa hemólisis (Chatrah *et al.* 2010, Bernheimer *et al.* 1986). Una proteína encontrada solamente en la muestra Ba4 fue PDE. Esta fosforodiesterasa es

conocida por atacar ácidos nucleicos como parte de la acción de los venenos (Mamillapallia *et al.* 1998).

Se logró identificar la toxina AP en dos muestras. La amino peptidasa A (AP) elimina selectivamente amino ácidos terminales (Glu y Asp) de los péptidos. Esta toxina es común en venenos de las especies: *Bothrops jararaca*, *Crotalus atrox* y *Trimeresurus flavoviridis* (Ogowa *et al.* 2007). Según Pla *et al.* (2017) esta toxina solamente se encuentra en *B. aurifer* y *B. thalassinus* entre las especies del género *Bothriechis*.

Existe cierta variedad entre la posible identidad proteica de las bandas del veneno entre las diferentes muestras (cuadro 5). Las muestras de cautiverio, Ba0 y Ba4, son diferentes entre sí. En la muestra Ba0 se detectó la banda de la proteína PII-SVMP y en la muestra Ba4 se detectó la banda PDE. Como se mencionó anteriormente, la técnica del SDS-PAGE no resultó ser efectiva para conocer todas las proteínas presentes en el veneno de *Bothriechis aurifer*, sin embargo se pueden analizar las diferencias en la presencia de bandas de acuerdo a las características de los individuos. En estudios con otras especies de serpientes se ha encontrado variación en la composición del veneno a nivel geográfico, individual y ontogénico (Gibbs *et al.* 2009, Alape-Girón *et al.* 2008). Esta variación es una evidencia de que la composición del veneno se determina a un nivel genético (Alape-Girón *et al.* 2008). Físicamente, el individuo en cautiverio Ba4 presentaba rasgos diferentes que los individuos encontrados en campo. Este individuo cuenta con una dieta regulada y evaluaciones médicas continuas, por lo que se sabe que se encuentra con un buen estado de salud y nutrición. Sin embargo, su coloración y estructura craneal parecen demostrar alguna clase de deficiencia (anexo 50). Se sospecha que esto puede representar algún cambio en la composición del veneno, pero se recomiendan otros análisis para conocer la identidad proteica de las muestras.

Otro factor que pudo influir en el análisis de la identidad proteica es la antigüedad de las muestras. Las muestras Ba 0 y Ba 1 pertenecen al año 2016, mientras que el resto es del 2017. Existe la posibilidad que las toxinas se hayan degradado, incluso se incrementa dicha posibilidad debido a un fallo en el congelador donde se guardaron las muestras, en donde

se perdió la muestra Ba2, ya que se descongelaron las muestras por lo menos durante 24 horas sin haberlo notado.

Un caso interesante ocurrió entre las muestras del veneno de Ba6 y Ba8, que como se describió con anterioridad, pertenecen a un mismo individuo capturado en dos fechas diferentes. Como se puede observar en el Cuadro 5, la muestra 6 presentó una banda, de identidad desconocida, más que la muestra 8. Estas muestras fueron tomadas con menos de un mes de diferencia, así que probablemente la dieta no tenga efecto en la diferencia entre la composición del veneno de este individuo. Sin embargo, este individuo hembra fue encontrado en cópula el fin de semana cuando se realizó la extracción del veneno. Debido a ello, posiblemente exista algún tipo de efecto en el veneno.

A pesar de no haber determinado la DL<sub>50</sub>, se encontraron efectos del veneno en los ratones inoculados. Se observó un efecto inmediato en la sangre al inocular el pool del veneno de *B. aurifer* (Figuras 26 y 27). Se evidencia claramente la formación de coágulos desde el tiempo 0. Al realizar la disección de los ratones bajo la dosis de 50 µg/g y 300 µg/g (Figuras 23 y 24) también se evidencian edemas y hemorragias. El corazón de los ratones inoculados bajo esta dosis también presentó efectos evidentes en el daño del tejido cardíaco (Figura 25). La apariencia general, coloración y fragilidad del tejido indican la formación de coágulos y necrosis en el tejido.

El hecho que los ratones no hayan fallecido con ninguna de las dosis estudiadas se puede atribuir a la posible degradación de compuestos proteicos en el veneno. Como se mencionó anteriormente, algunas muestras fueron extraídas hace un año y pasaron por un incidente de descongelación. Además, las muestras fueron congeladas y descongeladas en las ocasiones necesarias para realizar las diluciones y los ensayos por lo que estos cambios de temperatura también pudieron afectar. Según Munekiyo y Mackessy (1998), las muestras de veneno son estables a ciclos de congelación y descongelación, sin embargo la proteína que más variación presenta durante estos ciclos es la LAO. Las demás proteínas parecen permanecer estables al variar la temperatura. En base a este estudio se hace la recomendación de mantener las muestras congeladas para futuros estudios. En un estudio

realizado con conejos inoculados con el veneno de *Vipera raddei* demostró que a pesar de inocular el veneno en el hígado, riñones, corazón, bazo y pulmones por vía intramuscular, los animales no presentaron cambios significativos en su comportamiento más allá de movilidad reducida y ningún individuo falleció (Aznaurian y Amiryan 2006). Esto puede indicar otra razón por la cual la  $DL_{50}$  no fue encontrada. Existen diferencias taxo-específicas en la susceptibilidad a venenos y toxinas. Se han estudiado los venenos de especies con sus presas principales demostrando así una alta variación en la  $DL_{50}$  (Mackessy 2010).

Al analizar los cortes histológicos de los ratones inoculados se observó daño en los riñones, hígado y en el corazón. Entre estos, los daños más severos y notorios se dieron en el corazón. La degradación del tejido cardiaco se empieza a evidenciar bajo la dosis de 5  $\mu\text{g/g}$  con la acumulación de leucocitos, pues esta se desencadena por, entre otras causas, inflamación y hemorragias (Browder 2012) las cuales se observaron desde el sitio de inoculación del veneno. La formación de coágulos en el corazón, denominada trombosis (Rutherford 2006), fue evidente bajo la dosis de 50  $\mu\text{g/g}$  (Figura 28). Debido a la apariencia y estado frágil del corazón inoculado con la dosis de 300  $\mu\text{g/g}$  (Figura 25), se puede decir que el daño a este órgano es mayor entre más se aumenta la dosis.

El fallo renal ha sido citado por varios autores como la mayor complicación y causa de muerte en pacientes con accidente ofídico (Sangiorgio *et al.* 2008). Los efectos del veneno en los riñones fueron notorios desde la dosis de 5  $\mu\text{g/g}$  (Figura 29). Los eritrocitos glomerulares encontrados en esta dosis, demuestran hemorragias severas en el organismo. El engrosamiento e hinchazón señalados en el tejido pueden ser antecedentes de rupturas y/o necrosis en el órgano. Las células picnóticas también son un precedente a la necrosis (Bergillos 2013). La pérdida de integridad epitelial encontrada bajo la dosis de 50  $\mu\text{g/g}$  demuestra una tendencia a fallo renal, posible en dosis más elevadas.

En el hígado se encontraron hemorragias y necrosis (Figura 26). La elevada cantidad de células binucleadas encontradas en el tejido se pueden deber a interferencias en la división celular (Torres-Bugarín y Ramos-Ibarra 2013) o una reacción celular al daño hepático (Al-

Seeni *et al.* 2011). La apoptosis temprana, la congestión en las venas centrales o porta y la degeneración del contenido citoplásmico encontradas en la dosis de 5  $\mu\text{g/g}$  son síntomas previos a condiciones más severas observadas en la siguiente dosis: áreas necrotizadas y hemorragias. Al igual que con los demás órganos, existe un patrón de aumento de la intensidad de síntomas y áreas afectadas que parecen ser proporcionales a la dosis aplicada.

Según lo observado, la inducción de apoptosis y daño celular se atribuye a las l-amino oxidasas, las metaloproteinasas encontradas en el veneno causan las hemorragias y mionecrosis (Mackessy 2010) evidenciadas en los tejidos. La banda con mayor intensidad encontrada por SDS-PAGE pertenece a SVSP, esta enzima proteolítica interactúa con componentes del sistema hemostático y catalizan una amplia variedad de reacciones involucradas en la cascada de coagulación, además de daño en células endoteliales y plaquetas sanguíneas (Mackessy 2010). La evidencia aquí presentada junto a la identificación de las proteínas, indica que el veneno de la serpiente gushnayera es hemotóxico.

**4. Actividad antibacteriana del veneno.** A pesar de que la gentamicina presentó un mayor efecto inhibitorio que el veneno de *Bothriechis aurifer* sobre las cepas bacterianas, se puede observar que el efecto de ambos tratamientos es muy similar en las especies *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus* (Figura 20), y en general, se acerca mucho al efecto inhibitorio de la gentamicina (Figura 21). Los efectos antibacterianos han sido estudiados en venenos de viperidos anteriormente. En un estudio, se observó que el veneno de dos especies de cascabel tenía efecto sobre bacterias gram-positivas pero poco o efecto nulo en *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *S. aureus* (Stiles *et al.* 1991). Esto resulta interesante pues con el veneno de la serpiente gushnayera, se nota una marcada diferencia entre el efecto inhibitorio ante bacterias gram positivas y gram negativas (Figura 22), siendo este mayor en las bacterias gram positivas. *Bacillus subtilis* es una especie de bacteria gram positiva esporo-formadora (Stein 2005), a diferencia de *S. epidermidis* y *S. aureus* que no lo son (Gill *et al.* 2005, Chambers 2001). El efecto nulo del veneno sobre *B. subtilis* se puede deber a que la composición de la formación de las esporas impide la acción de las toxinas sobre la bacteria. La diferencia entre la acción en bacterias gram positivas y

gram negativas se puede deber a la conformación de la pared celular de estas bacterias. Las bacterias gram positivas carecen de una membrana externa y debido a ello, un bajo contenido de lípidos y lipidoproteínas que protegen el interior de las bacterias (Bagnoli y Rappuoli 2017). Por lo que es posible que el veneno pueda actuar con mayor facilidad.

Los compuestos antibacterianos presentes en el veneno de las serpientes pueden cumplir con el rol de protección contra presas contaminadas con patógenos dañinos (Stiles 1991). Una de los géneros bacterianos que más afectan a las serpientes es *Aeromonas* (Jorge *et al.* 1997), sin embargo esta es una especie gram-negativa al igual que otras bacterias asociadas con neumonía la cual es una enfermedad muy comúnmente encontrada en serpientes (Schmidt *et al.* 2013). A pesar de que el efecto fue leve (Figura 1), si se nota un efecto antibacteriano en cepas gram negativas con el veneno de *B. aurifer*. Sin embargo, se recomienda realizar antibiogramas con cepas bacterianas patógenas de vipéridos neotropicales para evaluar el rol del efecto antibacteriano del veneno de la serpiente gushnayera.

En un estudio se demostró que entre más intensa la coloración amarilla del veneno, mayor era el efecto antibacteriano en las cepas estudiadas. Esto se debe a que el color amarillo del veneno se asocia con la L-amino oxidasa a la cual se le atribuye la mayoría de la actividad antibacteriana (Blaylock 2000). Esta proteína fue encontrada en el veneno de *Bothriechis aurifer* (Cuadro 5).

**5. Mecanismo antidepredatorio contra aves.** Se buscaba evaluar si el patrón de rombos negros en la serpiente gushnayera *Bothriechis aurifer* cumplen como un mecanismo aposemático contra la depredación de aves. Según el Cuadro 6, el tratamiento verde fue en donde se reportaron más individuos atacados y a su vez, donde se encontró una mayor cantidad de ataques totales. El tratamiento café fue obviado para los análisis estadísticos debido a que este se utilizó para comprobar que las aves atacaban a los modelos ya que existía la posibilidad de que el color verde de los otros tratamientos comprometería la visibilidad de los mismos, y por ende, no serían atacados. Sin embargo, cabe mencionar

que se reportó un mayor número de individuos y de ataques totales en café que en el tratamiento con el patrón *Bothriechis*.

Entre los modelos encontrados, se reportaron tres modelos con ataques de mamíferos (Figura 32). Se distinguen de los ataques de aves debido al tamaño, patrón repetitivo y profundidad de la herida. Se sospecha que las marcas pudieron haber sido causados por un roedor debido a que la forma de la herida parece coincidir con la de los incisivos de estos organismos. Los incisivos de roedor son agudos y biselados, la mayoría carece de caninos (Curtis y Schnek 2006). Debido a la posición de los incisivos y a que no se encontró otro tipo de marca de dentadura cercano a los patrones, se presume la identificación del mamífero. Una de las razones por las cuales pudieron ocurrir los ataques es debido al olor de la plasticina utilizada que entre sus ingredientes presenta trigo y otros productos naturales.

No se encontró una diferencia en el nivel de actividad con respecto al número de individuos o ataques en los modelos basados en la ubicación alto o bajo (Figura 19). Estos sitios difieren en que “bajo” se encuentra cercano a un río. En “alto” los modelos se ubicaron en áreas menos visitadas por el público por lo que existía la posibilidad de que hubiesen menos ataques, sin embargo no se encontró ningún efecto debido a la ubicación. La diferencia significativa entre el número de ataques totales entre patrón *Bothriechis* y verde es mínima (Figura 33), sin embargo se sospecha que al aumentar el número de individuos la diferencia sí sea significativa, siendo los ataques menores en *Bothriechis* que en verde.

Se encontró diferencia significativa entre la cantidad de ataques en la cabeza entre los tratamientos (Figura 34). A pesar de ello, se encontró que tanto en el patrón *Bothriechis* como en el verde, la cabeza fue más atacada que la cola. Los vipéridos se caracterizan por poseer una cabeza ancha de forma triangular (Berger 2007). Los modelos de plasticina no poseían una forma triangular tan marcada como lo es en las cabezas de *Bothriechis*. Sin embargo, las especies verdes encontradas en el sitio, *Leptophis ahaetulla* (Colubridae) y *Drymobius chloroticus* (Colubridae) poseen cabezas alargadas sin la forma triangular de

las víboras (Köhler 2003). Según un estudio similar realizado por Rodrigues *et al.* (2016), no se encontró preferencia en ataques de la cabeza a pesar de que sí se tenía la diferenciación triangular. Esto implica que más que evitar la forma triangular de la cabeza de *Bothriechis*, las aves evitan el patrón negro, el cual es incluso más marcado en la cabeza que en el resto del cuerpo.

### III. CONCLUSIONES

1. La concentración proteica promedio del veneno de *Bothriechis aurifer* es de 153,065.63  $\mu\text{g/mL}$ .
2. La dosis letal media no fue determinada. Sin embargo, según los efectos inmediatos observados en la sangre durante el ensayo hemolítico, la apariencia del corazón tras la dosis de veneno evaluadas, la ocurrencia de trombosis y la presencia de hemotoxinas determinadas por el método SDS-PAGE; se sugiere que el órgano que se ve más afectado con el veneno de *Bothriechis aurifer* es el corazón.
3. Existe una diferencia significativa ( $\chi^2=3.7247$ ,  $p=0.0536$ ,  $\alpha=0.0500$ ) entre el número de ataques por aves registrado en los modelos de plasticina con patrón dorsal negro inspirado en *Bothriechis aurifer* y los modelos de plasticina verde.
4. Existe un efecto antibacteriano del veneno de *Bothriechis aurifer*, con una diferencia significativa entre las bacterias gram positivas y gram negativas ( $\chi^2=9.756$ ,  $p=1.00$ ,  $\alpha=0.05$ ), siendo el efecto inhibitorio mayor en las bacterias gram positivas.



#### **IV. RECOMENDACIONES**

Se recomienda liofilizar el veneno para preservar la integridad de la muestra y evitar sesgos de contaminación por otros fluidos como sangre o saliva de la especie. Se recomienda realizar un análisis HPLC para determinar la identidad proteica del veneno de *Bothriechis aurifer* ya que el método de SDS-PAGE aquí presentado no resultó de gran utilidad para definir la identidad de las proteínas correcta. Se recomienda realizar una comparación del efecto inhibitorio del veneno con los antibióticos a las cuales las cepas estudiadas son susceptibles. Se recomienda ampliar el número de modelos de plasticina para determinar la diferencia entre los picotazos encontrados bajo el patrón *Bothriechis* y verde, ya que la tendencia sugiere que la significancia incrementará.



## V. LITERATURA CITADA

- Advansta. 2011. *Análisis de Proteínas. Electroforesis, transferencia e inmunodetección*. Advansta, Estados Unidos. 24 pp.
- Al-Kahtani, M., Abdel-Moneim, A., Elmenshawy, O. y M. El-Kersh. 2014. *Hemin attenuates cisplatin-induced acute renal injury in male rats*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. ID 476430.
- Al-Seeni, M., El-Sawi, N., Shaker, S., y A. Al-Amoudi. 2011. *Investigation of the biochemical and histological changes induced by Zearalenone mycotoxin on liver in male mice and the protective role of crude venom extracted from jellyfish Cassiopea andromeda*. *Food and nutrition sciences*. 2: 314 – 322.
- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M. y J. Calvete. 2008. *Snake Venomics of the lancehead pitviper Bothrops asper: geographic, individual, and ontogenetic variations*. *Journal of proteome research*. 7: 3556 – 3571.
- Álvarez, E. 2016. *Reserva Natural Gucumatz, Eco-hospedaje Ranchitos del Quetzal*. Ranchitos del Quetzal. En: <http://www.ranchitosdelquetzal.com/how-it-all-started> [con acceso el 04-4-2016]
- American Veterinary Medical Association (AVMA). 2013. *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition*. Meacham Prints, Estados Unidos. 102 Pp.
- Anderson, P. 2013. *Histology cardiovascular heart: myocardial infarction, necrosis, haemorrhage and dissection*. *Pathology education informational resource (PEIR)*. 12: 167.
- Angulo, Y., Chaves, E., Alape, A., Rucavado, A., Gutiérrez, J. y B. Lomonte. 1997. *Isolation and Characterization of Myotoxic Phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the arboreal snake Bothriechis (Bothrops) schlegelii from Costa Rica*. *Archives of biochemistry and biophysics*. 339: 260-266.
- Arce-Estrada, V., Azofeifa-Cordero, G., Estrada, R., Alape-Girón, A. y M. Flores-Díaz. 2009. *Neutralization of venom-induced hemorrhage by equine antibodies*

*raised by immunization with a plasmid encoding a novel P-II metalloproteinase from the lancehead pitviper Bothrops asper.* Vaccine. 27: 460 – 466.

- Ariano-Sánchez, D. 2003. *Distribución e historia natural del Escorpión, Heloderma horridum charlesbogerti Campbell y Vannini, (Sauria: Helodermatidae) en Zacapa, Guatemala y caracterización de su veneno.* (Tesis de licenciatura no publicada) Universidad del Valle de Guatemala, Ciudad de Guatemala, Guatemala.
- Ausina, V. y S. Moreno. 2005. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica.* Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. 1602 pp.
- Aznurian, A., y S. Amiryan. 2006. *Histopathological changes induced by the venom of the snake Vipera raddei (Armenian adder).* Toxicon 47: 141 – 143.
- Bateman, P., Fleming, P. y A. Wolfe. 2016. *A different kind of ecological modelling: the use of clay model organisms to explore predator-prey interactions in vertebrate.* Journal of Zoology. 1-12.
- Bailey, L., Nimmo, D., Kelly, L., Bennett, A., y M. Clarke. 2009. *Maximising trapping efficiency in reptile surveys: the role of seasonality, weather conditions and moon phase on capture success.* Wildlife Research. 37: 104 – 115.
- Bagnoli, F. y R. Rappuoli. 2017. *Protein and sugar export and assembly in gram-positive bacteria.* Springer, Londres. 347 Pp.
- Bellini, G., Giraudo, A., Arzamendia, V. y E. Etchepare. 2015. *Temperate snake community in South America: is diet determined by phylogeny or ecology?* PLOS One. 10: e0123237.
- Bennett, D. 1999. *Expedition field techniques. Reptiles and amphibians.* 1ª edición. Geography Outdoors, Londres. Pp. 98
- Berger, C. 2007. *Venomous snakes.* Primera edición. Estados Unidos: Stackpole books. 50 Pp.
- Bergillos, F. 2013. *Toxinología clínica. Lesiones por picaduras y mordeduras de animales.* Barcelona, España: Bubok. 600 Pp.
- Bernheimer, A. W., Weinstein, S. A., y R. Linder. 1986. *Isoelectric analysis of some Australian elapid snake venoms with special reference to phospholipase B and hemolysis.* Toxicon. 24: 841 – 849.

- BioRad Laboratories, Inc. 2007. *Quick Start Bradford Protein Assay Instruction Manual*. Bio-Rad California, Estados Unidos de América. Pp. 36.
- Blaylock, R. S. 2000. *Antibacterial properties of KwaZulu Natal snake venoms*. Elsevier. 38: 1529 – 1534.
- Boer-Lima, P., Roncha, J. A., y M. Cruz-Höfling. 1999. *Histologic and functional renal alterations caused by Bothrops moojeni snake venom in rats*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 61: 698 – 706.
- Boldrini-Franca, J., Cologna, C., Pucca, M., *et al.* 2017. *Minor snake venom proteins: structure, function, and potential applications*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – general subjects. 1861: 824 – 838.
- Bongers, F. 2011. *Dynamics and Plant-Animal Interactions in a Neotropical Rainforest*. Kluwer Academic Publishers, Alemania. Pp. 421.
- Bregge-Silva, C., Nonato, M., de Albuquerque, S., Lee, P., Junqueira, I., Vasconcelos, M., Lomonte, B., Rucavado, A., Díaz, C., Gutiérrez, J. y E. Candiani. 2012. *Isolation and biochemical, functional and structural characterization of a novel L-amino acid oxidase from Lachesis muta snake venom*. Toxicon. 60: 1263 – 1276.
- Brown, G., Madsen, T., y R. Shine. 2017. *Resource availability and sexual size dimorphism: differential effects of prey abundance on the growth rates of tropical snakes*. The functional ecology journal. 31: 1592 – 1599.
- Browder, R. 2012. *Fisiopatología*. 4ta edición. Ciudad de México, México: Editorial El Manual Moderno. 897 Pp.
- Brown, G. y R. Shine. 2002. *Influence of weather conditions on activity of tropical snakes*. Austral Ecology. 27: 596 – 605.
- Calvete, J. 2011. *Proteomics in Venom Research: a focus on PLA<sub>2</sub> Molecules*. Acta Chimica Slovenica. 58: 629 – 637.
- Camacho, E., Villalobos, E., Sanz, L., Pérez, A., Escalante, T., Lomonte, B., Calvete, J., Gutiérrez, J. y A. Rucavado. 2014. *Understanding structural and functional aspects of PII snake venom metalloproteinases: Characterization of BlatH1, a hemorrhagic dimeric enzyme from the venom of Bothriechis lateralis*. Biochimie. 101: 145 - 155.

- Cambruzzi, E., Canedo, J., Budzyn, R., Ilha, E., de Melo, G., Ioppi, J., Pegas, K., Petry, I., Mascia, C. y A. Schaan. 2012. *Histopathological evaluation of coronary thrombi in patients with ST-segment elevation myocardial infarction*. Revista Brasileira do Cardiologia Invasiva. 20: 267 – 273.
- Campbell, J. y A. Muñoz-Alonso. 2014. *Bothriechis aurifer*. The IUCN Red List of Threatened Species. En: <http://www.iucnredlist.org/details/64302/0> [con acceso el 03-2-2016]
- Campbell, J.A. y W. Lamar. 2004. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Comstock Ithaca, New York and London, UK.
- Campbell, N. y J. Reece. 2007. *Biología*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. 1532 Pp.
- Carpenter, C. y G. Ferguson. 1977. *Variation and evolution of stereotyped behavior in reptiles*. Biology of Reptilia. Academic, Londres. 508 pp.
- Chávez, J. 2001. *Caracterización farmacopatológica del veneno de “mano de piedra” Atropoides nummifer (Rüppell, 1845, Squamata, Viperidae) y evaluación de la capacidad neutralizante de dos sueros antiofídicos polivalentes distribuidos en Guatemala*. (Tesis de licenciatura publicada en línea) Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Chambers, H. 2001. *The changing epidemiology of Staphylococcus aureus?* Emerging Infectious Diseases Journal. 7: 178 – 182.
- Chippaux, J., Williams, V. y J. White. 1991. *Snake venom variability: methods of study, results and interpretation*. Toxicon. 29: 1279-1303.
- Chowhan, A. 2012. ¡Ssssss! *El Serpentario en Antigua Exotic*. Qué Pasa, La Revista, qué hacer en La Antigua Guatemala. Flora & Fauna de Galería y Museos. En: <http://www.quepasa.gt/es/ir-de-paseo-sssssssssss/> [con acceso el 09/02/2017]
- Chung, J., Ratnapala, L., Cooke, I., y A. Yanagihara. 2001. *Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) from Hawaiian box jellyfish (Carybdea alata) venom*. Toxicon. 39: 981-990.
- CLSI. 2015. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 25 informational supplement*. CLSI document M100-S25. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute. 240 Pp.

- Crother, B. 2009. *Yellow-blotched palm-pitviper* *Bothriechis aurifer*. Biological Sciences. Southeastern Louisiana University.
- Culma, M., Pereañez, J., Núñez, V. y Lomonte, B. 2014. *Snake venomics of Bothrops punctatus, a semi-arboreal pitviper species from Antioquia, Colombia*. Peer Journal. 2: 246-262.
- Curtis, H. y A. Schnek. 2006. *Invitación a la biología*. Editorial Médica Panamericana, Ciudad de México. 768 Pp.
- De Roodt, A., Estévez-Ramírez, J., Paniagua-Solis, J., Litwin, S., Carvajal-Saucedo, A., Dolab, J., Robles-Ortiz, L. y A. Alagón. 2004. *Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México*. Gaceta Médica de México. 141: 13-21.
- Desfilis, E. y E. Font. 2002. *Efectos de la experiencia sobre el comportamiento depredador de los reptiles*. Revista Española de Herpetología. 79-94.
- Di Fiore, M. 2000. *Atlas de Histología Normal*. Madrid, España: Editorial El Ateneo. 115 Pp.
- Doan, T., Mason, A., Castoe, T., Sasa, M. y C. Parkinson. 2016. *A cryptic palm-pitviper species (Squamata: Viperidae: Bothriechis) from the Costa Rican highlands, with notes on the variation within B. nigroviridis*. Zootaxa. 4138: 271-290.
- Elizondo, L. Sosa-Bartuano, A., Ruback, P. y J. Ray. 2015. *Range extensión and natural history observations of a rare Panamian snake, Geophis bellus Myers, 2003 (Colubridae: Dipsadinae)*. Journal of biodiversity data. 11: 1675 pp.
- Fennell, J., Shipman, W. y L. Cole. 1968. *Antibacterial action of melittin, a polypeptide from bee venom*. Experimental Biology and Medicine. 127: 707 – 710.
- Fitches, E., Edwards, M., Mee, C., Grishin, E., Gatehouse, A., Edwards, J. y J. Gatehouse. 2004. *Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion*. Journal of Insect Physiology. 50: 61-71.
- Fuentes, F., Mendoza, R., Rosales, A. y R. Cisneros. 2008. *Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón*. Ministerio de salud, Instituto Nacional de Salud. Centro Nacional de Productos Biológicos, INS, Perú. Pp. 54.
- Fry, B., Vidal, N., Norman, J., Vonk, F., Scheib, H., Ramjan, S.F., Kuruppu, S., Fung, K., Hedges, S., Richardson, M., Hodgson, W., Ignjatovic, V., Summerhayes, R. y

- E. Kochva. 2006. *Early evolution of the venom system in lizards and snakes*. Nature. 439: 5.
- Gibbs, H., Sanz, L. y J. Calvete. 2009. *Snake population venomomics: proteomics-based analyses of individual variation reveals significant gene regulation effects on venom protein expression in *Sistrurus rattlesnakes**. Journal of Molecular Evolution. 68: 113-125.
- Gil, S., Fouts, D., Archer, G., et al.. 2005. *Insights on evolution of virulence and resistance form the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *S. epidermidis* strain*. Journal of Bacteriology. 199: 2426 – 2438.
- Gil, L. 2014. *Estado de conservación de las subcuencas de los Ríos Apaj, Cafetal y Colorado del Biotopo Universitario para la Conservación del Quetzal “Mario Dary Rivera”: análisis de parámetros fisicoquímicos y uso de los géneros de ranas *Plectrohyla* y *Ptychohyla* como bioindicadores*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Gray, M., Duffus, A., Haman, K., Harris, R., Allender, M., Thompson, T., Christman, M., Sacerdote-Velat, A., Sprague, L., Williams, J. y D. Miller. 2017. *Pathogen surveillance in herpetofunal populations: guidance on study design, sample collection, biosecurity, and intervention strategies*. Herpetological Review. 48. 334 – 351.
- Greene, H. y J. Campbell. 1972. *Notes on the use of caudal lures by arboreal Green pit viper*. Herpetologica, 28: 32 – 34.
- Goncalves-Machado, L., Pla, D., Sanz, L., Jorge, R., Leitao-de-Araujo, M., Alves, M., Janisch, A., De Miranda, J., Nowatzki, J., Morais-Zani, K., Fernandes, W., Tanaka-Azevedo, A., Fernández, J., Zingali, R., Gutiérrez, J. y C. Correa-Netto. 2016. *Combined venomomics, venom gland transcriptomics, ioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest*. Journal of Proteomics. 135: 73-89.
- Guerra, D., Fuentes, H. y V. Morán. 2012. *Serpientes de Guatemala: Guía para identificación de especies*. Unidad de Vida Silvestre, Facultad de Medicina

- Veterinaria y Zootecnia. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 186 p.
- Guevara, C. 2000. *Caracterización toxicológica del veneno de la serpiente de cascabel (Crotalus durissus durissus Linnaeus, 1758, Viperidae) y evaluación de la potencia neutralizante de los sueros antiofídicos disponibles en Guatemala.* (Tesis de licenciatura no publicada) Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., León, G., Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., Angulo, Y. y J. J. Calvete. 2009. *Snake venomomics and antivenomics: proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming.* Journal of Proteomics. 72: 165-182.
- Hollister, J. 2004. *Eyelash Viper.* Reptiles Magazine. 4: 255-265.
- Hosking, C. 2013. *Care of Reptiles.* Australian Museum. Web en línea. En: <https://australianmuseum.net.au/care-of-reptiles> [con acceso el 15 /03/2017]
- Humason, G. 1979. *Animal Tissue Techniques.* 4ª edición. W.H. Freeman, San Francisco. Pp. 661.
- Iziadoro, L., Sobrinho, J., Mendes, M., Costa, T., Grabner, A., Rodrigues, V., da Silva, S., Zanchi, F., Zuliani, J., Fernandes, C., Calderon, L., Stábeli, R. y A. Soares. 2017. *Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry.* BioMed Research Internationa. 2014: 19.
- Jacobson, E. 2007. *Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text.* CRC Press, Florida. 732 Pp.
- Jiménez, J. 2009. *Los helechos del corredor del Bosque Nuboso de Baja Verapaz, Guatemala.* Instituto Nacional de Biodiversidad, INBio, Costa Rica. 192 pg.
- Jorge, M. T., Nishioka, A., Oliveira, R. B., Ribeiro, L. A. y P. Silveira. 1998. *Aeromonas hydrophila soft-tissue infection as a complication of snake bite: report of three cases.* Annals of Tropical Medicine & Parasitology. 92: 213 – 217.
- Jorón, M. 2009. *Aposematic coloration.* En. Resh, V. y R. Cardé (Eds). Encyclopedia of Insects. 2a edición. California, Estados Unidos: Elsevier. 1168 Pp.
- Köhler, G. 2003. *Reptiles of Central América.* Herpeton, Alemania. 369 pg.

- Kohn, D., Martin, T., Foley, P., Morris, T., Swindle, M., Vogler, G. y S. Wixson. 2006. *Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits*. Journal of American Association for Laboratory Animal Science. 46(2): 97-108.
- Krochmal, A., Bakken, G. y T. LaDuc. 2004. *Heat in evolution's kitchen: evolutionary perspectives on the functions and origin of the facial pit of pitvipers (Viperidae: Crotalinae)*. The Journal of Experimental Biology. 207: 4231-4238.
- Kumar, P., Venkateshvaran, K., Rivastava, P., Nayak, S., Shivaprakash, S. y S. Chakraborty. 2013. *Toxicity and histopathological observations on albino mice on intra-peritoneal injection of three species of Conus*. International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical and Bio Sciences. 3: 1 – 11.
- Kuti, J., Nightingale, C., y D. Nicolau. 2004. *Optimizing pharmacodynamics target attainment using the MYSTIC antibiogram: data collected in North America in 2002*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48: 2464 – 2470.
- Lillywhite, H. y E. Brischoux. 2011. *Is it better in the moonlight? Nocturnal activity of insular cottonmouth snakes increases with lunar light levels*. Journal of Zoology. 286: 194 – 199.
- Lomonte, B. 2015. *Snake venoms: from research to treatment*. Acta médica costarricense. 54(2): 86-96
- Lomonte, B., Tsai, W.C., Bonilla, F., Solórzano, A., Solano, G., Angulo, Y., Gutiérrez, J. y J. Calvete. 2012. *Snake venomomics and toxicological profiling of the arboreal pitviper Bothriechis supraciliaris from Costa Rica*. Toxicon. 59: 592-299.
- López, S. 2014. *Las representaciones de la familia Viperidae en la arqueología de Guatemala: especies representadas y su significado*. (Tesis de licenciatura no publicada) Universidad de San Carlos de Guatemala, Ciudad de Guatemala, Guatemala.
- Luciano, M., da Silva, P., Chaim, O., dos Santos, V., Franco, C., Soares, M., Zanata, S., Mangili, O., Gremski, W. y S. Veiga. 2004. *Experimental evidence for a direct cytotoxicity of Loxosceles intermedia (Brown spider) venom in renal tissue*. Journal of histochemistry & cytochemistry. 52: 455 – 467.

- Mackessy, S. 2010. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press, Estados Unidos. Pp. 548.
- Mackessy, S., Sixberry, N., Heyborne, W., y Fritts, T. 2006. *Venom of the Brown Treesnake, Boiga irregularis: Ontogenetic shifts and taxa-specific toxicity*. *Toxicon*. 47: 537-548.
- Mamillapallia, R., Haimovitz, R., Ohadb, M. y M. Shinitzky. 1998. *Enhancement and inhibition of snake venom phosphodiesterase activity by lysophospholipid*. *FEBS Letters*. 436: 256 – 258.
- Markland, F. y S. Swenson. 2013. *Snake venom metalloproteinases*. *Toxicon*. 62: 3 – 18.
- Moerman, L., Bosteels, S., Noppe, W., Willems, J., Clynen, E., Schoofs, L., Thevissen, K., Tytgat, J., Eldere, J., Walt, J. y F. Verdonck. 2002. *Antibacterial and antifungal properties of  $\alpha$ -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa*. *The FEBS Journal*. 269: 4799-4810.
- Monterroso, Y. 2012. *Informe de docencia y servicio*. Consejo Nacional de Áreas Protegidas – CONAP – Departamento de vida silvestre. Enero-Julio 2007. Guatemala, 38 Pp.
- Moon, J., Lee, A., Knag, H, Lee, E., Kim, M., Paik, Y, Park, Y., Joo, Y., y H. Koo. 2007. *Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant Staphylococci isolated from Bovine mastitis in Korea*. *Journal of Dairy Sciences*. 90: 1176 – 1185.
- Munekiyo, S. y S. Mackessy. 1998. *Effects of temperature and storage conditions on the electrophoretic, toxic and enzymatic stability of venom components*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 199: 119 – 127.
- O'Farrell, P. 1975. *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. *Journal of Biological Chemistry*. 250: 4007-4021.
- Ogowa, Y., Murayama, N., Fujita, Y. y R. Yanoshita. 2007. *Characterization and cDNA cloning of aminopeptidase A from the venom of Gloydus blomhoffi brevicaudus*. *Toxicon*. 49: 1172 – 1181.
- Oyama, E. y H. Takahashi. 2017. *Structures and functions of snake venom metalloproteinases (SVMP) from Protobothrops venom Collected in Japan*. *Molecules*. 22: 1305 – 1316.

- Pat, B., Chen, Y., Killingsworth, C., Gladden, J., Shi, K., Zheng, J., Powell, P., Walcott, G., Ahmed, M., Gupta, H., Desai, R., Wei, C., Hase, N., Kobayashi, T., Sabri, A., Granzier, H., Denney, T., Tillson, M., Dillon, R., Husain, A., Dell'Italia, L. 2010. *Chymase inhibition prevents fibronectin and myofibrillar loss and improves cardiomyocyte function and LV torsion angle in dogs with isolated mitral regurgitation*. *Circulation*. 122: 1488 – 1495.
- Parkinson, N., Richards, E. H., Conyers, C., Smith, I., y J.P. Edwards. 2002. *Analysis of venom constituents from the parasitoid wasp Pimpla hypochondriaca and cloning of a cDNA encoding a venom protein*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32: 729-735.
- Pirela, R., López-Jonsthor, J. y J. Hernández. 2006. *Caracterización toxicológica del veneno total de la serpiente de cascabel Crotalus durissus cumananis (Viperidae), presente en la localidad de Porshoure, Guajira Venezolana*. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 16(2): 232-238.
- Pla, D., Sanz, L., Sasa, M., Acevedo, M., Dwyer, Q., Durban, J., Pérez, A., Rodríguez, Y., Lomonte, B. y J. Calvete. 2016. *Proteomic analysis of venom variability and ontogeny across the arboreal palm-pitvipers (genus Bothriechis)*. *Journal of Proteomics*. 152: 1-12
- Rich, C. y T. Longcore. 2013. *Ecological consequences of artificial night lighting*. Island Press, Estados Unidos. 479 pp.
- Rodrigues, F., da Silva, E., Cândido, R. e I. Monteiro. 2016. *Predation in different phenotypes of venomous snakes in the atlantic forest of paráiba, Northeast Brazil*. *Revista Nordestina de Biología*. 24(1): 19 – 28.
- Ross, M. H. y W. Pawlina. 2011. *Histology: a text and atlas with correlated cell and molecular biology*. 6ta edición. Nueva York, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins. 996 Pp.
- Rutherford, R. 2006. *Cirugía vascular*. 6ta edición. Madrid, España: Elsevier. 2612 Pp.
- Saggese, M. D. 2009. *Clinical approach to the anemic reptile*. *Journal of exotic pet medicine*. 18: 98 – 111.
- Salazar, A. M., Rodríguez-Acosta, A., Girón, M., Aguilar, I. y B. Guerrero. 2007. *A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the snake*

- venom (Bothrops atrox) from different geographical areas in Venezuela.* Thrombosis Research. 120: 95-104
- Sangiorgio, F., Sakate, M., Nogueira, R. y R. Tostes. 2008. *Histopathological evaluation in experimental envenomation of dogs with Crotalus durissus terrificus venom.* Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases. 14: 82 – 99.
- Sanjuán-Galindez, J., Vargas, A., Ortiz, I., Gonzalez-Herrera, L., Watanabe-Minto, B., Granja-Salcedo, Y. 2012. *Determinación de la DL50 del veneno de serpientes adultas de la especie Bothrops atrox en ratones albinos.* Momentos de Ciencia. 9: 147 - 152.
- Saporito, R., Zuercher, R., Roberts, M., Gerow, K. y M. Donnelly. 2007. *Experimental Evidence for Aposematism in the dendrobatid poison frog Oophaga pumilio.* Copeia. 4: 1006 – 1011.
- Savage, J. 2002. *The amphibians and reptiles of Costa Rica: a herpetofauna between two continents, between two seas.* The University of Chicago Press, Estados Unidos. 1054 pg.
- Schmidt, V., Marschan, R. E., Abbas, M. D., Ball, I., Szabo, I., Helmuth, R., Plenz, B., Spergser, J. y M. Pees. 2013. *Detection of pathogens in boidae and pythonidae with and without respiratory disease.* Veterinary record. 10.1136.
- Serrano, S. 2013. *The long road of research on snake venom serine proteinases.* Toxicon. 62: 19 – 26.
- Serrano, S., Reichl, A., Mentele, R., Auerswald, E., Santoro, M., Sampaio, C., Camargo, A. y M. Assakura. 1999. *A Novel Phospholipase A2, BJ-PLA2, from the venom of the snake Bothrops jararaca: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor.* Archives of Biochemistry and Biophysics. 367: 26-32.
- Schoen, A., Boenke, M. y D. Green. 2015. *Tracking toads using photo identification and image-recognition software.* Herpetological Review. 46. 188 – 191.
- Shupe, S. 2013. *Venomous snakes of the world: A manual for use by U.S. Amphibious Forces.* New York, Estados Unidos: Skyhorse Publishing. 325 Pp.
- Sousa, L., Nicolau, C., Peixoto, P., Bernardoni, J., Oliveira, S., Portes-Junior, J., Mourao, R., Lima-dos-santos, I., Sano-Martins, I., Chalkidis, H., Valente, R., y A.

- Moura-da-Silva. 2013. *Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex*. PLOS Neglected tropical diseases. 9: e3442 – e2458.
- Stábeli, R., Marcussi, S., Carlos, G., Pietro, R., Selistre-de-Araújo, H., Giglio, J., Oliveira, E. y A. Soares. 2004. *Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from Bothrops alternatus snake venom*. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 12: 2881-2886.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions*. Molecular Microbiology Journal. 56: 845 – 857.
- Stiles, B., Sexton, F., y S. Weinstein. 1991. *Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from Pseudechis australis (Australian king brown or mulga snake) venom*. Toxicon. 29: 1129 – 1141.
- Sussman, M. 1997. *Escherichia coli and human disease. Mechanisms of virulence*. Cambridge University Press, Cambridge. 3-48.
- Terra, R., Pinto, A., Guimaraes, J. y J. Fox. 2009. *Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): insights into venom induced pathology*. Toxicon. 54: 836 – 844.
- Torres-Bugarín, O. y M. Ramos-Ibarra. 2013. *Utilidad de la prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares en células exfoliadas de mucosa oral en la evaluación de daño genotóxico y citotóxico*. International Journal of Morphology. 31: 650 – 657.
- Townsend, J. H., Medina-Flores, M., Wilson, L. D., Jadin, R. C. y J. D. Austin. 2013. *A relict lineage and new species of Green palm-pitviper (Squamata, Viperidae, Bothriechis) from the Chortís Highlands of Mesoamerica*. Zookeys. 298: 77-105.
- Vásquez, C. y C. Avendaño. 2009. *Manual para la identificación, prevención y tratamiento de mordeduras de serpientes venenosas en Centroamérica, Volumen I: Guatemala*. Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Guatemala, Guatemala. 116 pp.

- Viswantha, A., Wangikar, U., Koti, B., Thippeswamy, A., Ronad, P. y D. Manjula. 2011. *Cardioprotective effect of ascorbic acid on doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats*. Indian Journal of Pharmacology. 43: 507 – 511.
- Voet, D., Voet, J., y C. Pratt. 2007. *Fundamentos de bioquímica*. Editorial Médica Panamericana, México. Pp. 1260.
- Vyas, K., Shadyab, A., Lin, C. y N. Crum-Cianflone. 2013. *Trends and factors associated with initial and recurrent methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Skin and soft-tissue infections among HIV-Infected Persons*. Journal of the International Association of Providers of AIDS Care (JIAPAC) 13: 206-213.
- Vu, T., Stafford, A., Leslie, B., Kim, P., Fredenburg, J. y J. Weitz. 2013. *Batroxobin binds fibrin with higher affinity and promotes clot expansion to a greater extent than thrombin*. 288(23): 16862-16871.
- Wagstaff, S., Sanz, L. Juárez, P., Harrison, R., y J. Calvete. 2009. *Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of the ocellated carpet viper, Echis ocellatus*. Journal of Proteomics. 71: 609-623.
- Yang, D., Chen, S., Chen, Y. y Y. Yan. 2013. *Using head patch pattern as a reliable biometric character for noninvasive individual recognition of an endangered pitviper Protobothrops mangshanensis*. Asian Herpetological Research. 4(2): 134 – 139.
- Zelanis, A., Tashima, A., Rocha, M., Furtado, M., Camargo, A., Ho, P., y S. Serrano. 2010. *Analysis of the Ontogenetic Variation in the Venom Proteome/Peptidome of Bothrops jararaca Reveals Different Strategies to Deal with Prey*. Journal of Proteome Research. 9: 2278- 2291.
- Zicha, J., Dobesová, Z., Zidek, V., Silhavý, J., Simáková, M., Mlejnek, P. Vanécková, I. Kunés, J. y M. Pravenec. 2014. *Pharmacogenetic analysis of captopril effects on blood pressure: posible role of the Ednrb (endothelin receptor type B) Candidate Gene*. Physiological Research. 63: 263-265.
- Zootropic. 2015. Zootropic. LinkedIn. En:  
<https://www.linkedin.com/company/zootropic> [con acceso el 04-4-2016]



## VI. ANEXOS

**Anexo 1.** Se presenta el protocolo a seguir en caso de accidente por mordedura de la serpiente gushnayera *Bothriechis aurifer*.

### Primeros auxilios

El primer paso a seguir al ocurrir un accidente ofídico es mantener la calma y no actuar apresuradamente. Se debe observar detalladamente la aparición de los síntomas ya que existe la posibilidad que en la mordedura, no se haya inoculado el veneno. Se debe evitar que el paciente pierda el control. Se debe colocar en posición de reposo. Cualquier instrumento que genere presión o que apriete al paciente (tales como cinchos, mochilas, zapatos) deberán ser removidos o aflojados. Mantener una temperatura corporal adecuada. No se debe aplicar torniquete, no se deben efectuar incisiones o cortaduras en el área afectada, no se debe succionar o chupar el área, no cauterizar, no ingerir bebidas alcohólicas, no aplicar compresas con hielo y no se deben suministrar sustancias químicas ni extractos de plantas o animales.

El segundo paso indispensable es el tratamiento hospitalario y la utilización del suero antiofídico para la neutralización del veneno, para el cual se utilizarán las recomendaciones encontradas en el “Manual para la identificación, prevención y tratamiento de mordeduras de serpientes venenosas en Centro América”, (páginas 95 a 114) el cual será llevado al viaje de campo y a las visitas a los diferentes herpetarios (Vásquez y Avendaño 2009).

Los contactos de emergencia en caso de accidente ofídico en Cobán son: Bomberos: 7952 1212 y el Hospital Nacional de Cobán 7931 6333, ubicado a una hora de Ranchitos del Quetzal. En la Ciudad de Guatemala se cuenta con Alerta Médica: 2493 1800/1711, y el Hospital Sanatorio Nuestra Señora del Pilar: 2420 0000.

**Anexo 2.** Se presenta la hoja de toma de datos para el registro visual de *Bothriechis aurifer* silvestre en Ranchitos del Quetzal.

CÓDIGO: _____		FECHA: _____				
LCH	COLORACIÓN	PRESENCIA PARÁSITOS (#)	LESIONES	Sexo	NO. COLMILLOS	OBSERVACIONES

**Anexo 3.** Se presenta el código a utilizar para la identificación de los individuos de *Bothriechis aurifer* muestreados.

**CÓDIGO EJEMPLO: CZ0H**  
**Origen:** Cautiverio – C  
 Silvestre – S  
**Localidad:** Ranchitos del Quetzal – R  
 Biotopo del Quetzal - B  
 Zootropic - Z  
 Antigua Exotic - A  
**Número de individuo**  
**Sexo:** Hembra – H  
 Macho – M

**Anexo 4.** Receta de preparación de reactivo de Bradford según Promega (2009).

Reactivo	Cantidad
Coomasie Blue	100 mg
Etanol 95%	50 mL
Ácido fosfórico 85%	100 mL
Agua destilada	1000 mL

**Anexo 5.** Estándar de Bradford según Promega (2009).

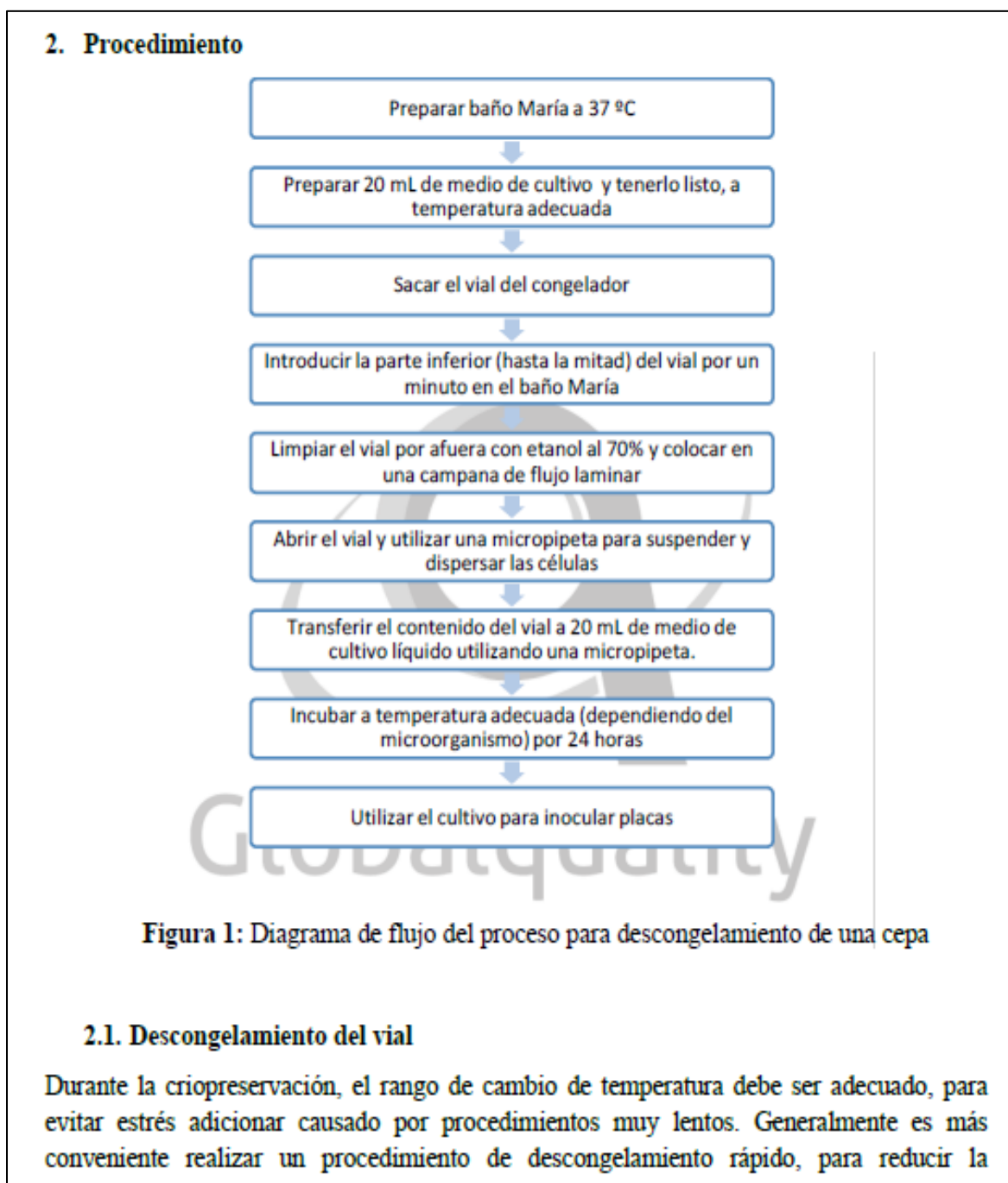
<b>Estándar</b>	<b>H<sub>2</sub>O (μL)</b>	<b>BSA (μL)</b>	<b>Fuente</b>	<b>Concentración final (μg/mL)</b>
A	0	300	Stock BSA	2000
B	125	375	Stock BSA	1500
C	325	325	Stock BSA	1000
D	175	175	B	750
E	325	325	C	500
F	325	325	E	250
G	325	325	F	125
H	400	100	G	25
I	400	0	-	0

**Anexo 6.** Receta de buffer de Laemli y buffer de corrida.

<b>Buffer de Laemli</b>		<b>Buffer de corrida</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
SDS 10% pH 7	3.2 mL	Tris-Base	3 g
Glicerol	1.88 mL	Glicina	14.4 g
2-mercaptoetanol	0.8 mL	SDS	1 g
Azul de bromofenol	3.2 μL	Agua destilada	1 L
Tris HCl	2 mL		

**Anexo 7.** Receta de preparación de geles SDS-PAGE.

<b>Resolving gel</b>		<b>Stacking gel</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Agua ultrapura	4.1 mL	Agua ultrapura	2.95 mL
Tris HCl 1 M pH 8.8	2.47 mL	Tris HCl 0.5 M pH 6.8	1.25 mL
Bis-acrilamida 30%	2.2 mL	Bis-acrilamida 30%	0.56 mL
APS 10%	90 $\mu$ L	APS 10%	45 $\mu$ L
TEMED	10 $\mu$ L	TEMED	5 $\mu$ L

**Anexo 8.** Preparación de cepas bacterianas según Global Quality (2017).

formación de cristales de hielo potencialmente dañinos cuando el vial está parcialmente descongelado.

Para obtener la mayor cantidad de células viables posibles, el descongelamiento de la cepa debe realizarse lo más rápido posible. Una vez el vial criogénico es sacado del congelador, éste debe ser sumergido inmediatamente en un baño María a 37 °C (hasta la mitad, sin introducir la tapa) y allí adentro, debe ser agitado manualmente hasta que pase a un estado líquido, en un tiempo no mayor a un minuto.

Siempre debe utilizarse bata, lentes, y guantes durante la manipulación del vial. Para evitar la transferencia de microorganismos y contaminación, el vial debe ser sumergido en etanol al 70% después de salir del baño María y antes de ser transferido a la campana de flujo laminar.

Las células recién descongeladas son particularmente vulnerables a dañarse y deben ser manejadas con cuidado. En este paso debe evitarse la centrifugación.

## 2.2. Inicio de cultivo y condiciones para su mantenimiento

Una vez el contenido del vial se ha descongelado, utilizar una micropipeta para resuspender el cultivo y dispersar las células. Transferir 1 mL que contiene el vial asépticamente a un tubo o frasco que contenga de 10 mL del medio líquido recomendado para cada cepa. El volumen del vial debe ser diluido por lo menos a 10x para minimizar la toxicidad que puede resultar del criopreservante. Después debe Incubar el cultivo a una temperatura y ambiente apropiados por 24 horas. El periodo de incubación variará según la cepa.

**Cuadro 1:** Requerimientos para el cultivo de cepas bacterianas

Cepa bacteriana	Medio de cultivo líquido	Temperatura de incubación
<i>Escherichia coli</i>	Caldo nutritivo o Caldo Tripticasa Soya	35 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Caldo Tripticasa Soya	35 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	Caldo Tripticasa Soya	35 °C
<i>Salmonella typhimurium</i>	Caldo nutritivo o Caldo Tripticasa Soya	35 °C
<i>Clostridium sporogenes</i>	Medio Reforzado para Clostridium	35 °C
<i>Bacillus subtilis</i>	Caldo Cerebro Corazón	30 °C
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Caldo nutritivo o Caldo Tripticasa Soya	35 °C
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Caldo nutritivo o Caldo Tripticasa Soya	35 °C

**Anexo 9.** Código de colores para determinación de dosis letal media en ratones.

Color	Dosis	No. ratón	Código
Azul	3.75 µg/g	1	1.1
		2	2.1
		3	3.1
		C	C.1
Morado	5 µg/g	1	1.2
		2	2.2
		3	3.2
		C	C.2
Amarillo	50 µg/g	1	1.3
		2	2.3
		3	3.3
		C	C.3
Verde	300 µg/g	1	1.4
		2	2.4
		3	3.4
		C	C.4

**Anexo 10.** Hoja de toma de datos para peso ratones.

DOSIS _____		COLOR _____		FECHA _____		HORA INCIO _____	
RATÓN	PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)	HORA DE MUERTE				
1							
2							
3							
C							

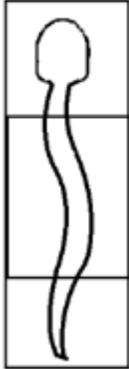
**Anexo 11.** Hoja de toma de datos para observación primaria de ratones.

DOSIS \_\_\_\_\_ COLOR \_\_\_\_\_ FECHA \_\_\_\_\_ HORA INICIO \_\_\_\_\_  
 CÓDIGO INDIVIDUO \_\_\_\_\_

MIN.	ACTIVIDAD	OBSERVACIONES
0		
5		
10		
15		
20		
25		
30		

**ACTIVIDADES:** Ac – acicalamiento, En – posición encorvada, Oe – ojos entrecerrados, Ai – aislamiento de otros individuos, Ra – respiración acelerada, RI – respiración lenta, Tm – temblores, Co – convulsiones, Sa – salivación, Le – letargo, Di – diarrea, Co – coma. |

**Anexo 12.** Hoja de toma de datos para ataques en modelos de plasticina.



Número: \_\_\_\_\_ Tratamiento: (B)(V)(C)

Ubicación: \_\_\_\_\_

Número de picotazos totales:  
 \_\_\_\_\_

Observaciones:  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**Anexo 13.** Carta de aprobación de protocolo según el Comité de Bioética de la Universidad del Valle de Guatemala – CEUCA.



**Comité de Ética, Uso y Cuidado animal de la  
Universidad del Valle de Guatemala**

**CEUCA - UVG**

Investigadora Principal: Miguel Morales Estudiante tesista: Melissa Villatoro

Edificio y oficina: Departamento de Biología

E-Mail: [jmmorales@uvg.edu.gt](mailto:jmmorales@uvg.edu.gt) , [melvcc@gmail.com](mailto:melvcc@gmail.com)

Teléfono: 5878 8534

Número de propuesta: I-2017(4)

Guatemala, 9 de junio de 2017

Estimados investigadores,

Por este medio se hace constar que la propuesta del proyecto de investigación titulado: *"Contribución a la caracterización de las proteínas del veneno de la serpiente gushnayera, Bothriechis aurifer (Viperidae)"* ha sido revisado por miembros del comité de Ética, para el Uso y Cuidado Animal de la Universidad Del Valle de Guatemala (CEUCA – UVG).

Los evaluadores han hecho revisión del protocolo con el fin de asegurar el trato ético y adecuado a los animales que serán utilizados para cumplir con los propósitos de la investigación. Se ha determinado que se cumple con los requisitos mínimos necesarios, así como también se ha cumplido con los procedimientos, recomendaciones y lineamientos dados por el comité.

Por este medio se le informa que la propuesta de investigación está autorizada para llevarse a la práctica con animales tal y como se describe en el protocolo mencionado, por un año a partir de la fecha de la presente carta. Se le solicita que si hubiese necesidad de hacer modificaciones se comuniquen de nuevo con el comité para que dichas enmiendas sean evaluadas de manera que se pueda garantizar que se cumple a cabalidad con los lineamientos del CEUCA-UVG.

Sin otro particular quedo a sus órdenes,



MV Vanessa Granados B

Médico Veterinario

Colegiado 997

CEUCA - UVG

Comité de Ética, Uso y Cuidado Animal

Universidad del Valle de Guatemala.

**Anexo 14.** Carta de aprobación de licencia de colecta por parte de CONAP.

Forma LI

  
**CONSEJO NACIONAL DE AREAS PROTEGIDAS**  
**CONAP**  
 PRESIDENCIA DE LA REPUBLICA  
 GUATEMALA, C. A.

Nº **00343** -**B**

**LICENCIA DE INVESTIGACION**

No. 027/2016

Nombre: Melisa Villaloro Castañeda No. Reg. I-DVS-RM-002-2016  
 Nacionalidad: Guatemalteco Identificación: DPI: 2679 80469 0101  
 Institución: Universidad del Valle de Guatemala  
 Si existe contrato administrativo que ampara esta Licencia, especificar referencia: \_\_\_\_\_  
 Título de la Investigación: \*Caracterización de las Proteínas del veneno de la serpiente gushnayera,  
Bothriechis aurifer (Viperidae)\*

**Anexo 15.** Observaciones de individuos muestreados en campo y en cautiverio.

Código	Fecha	No. colmillos	Coloración	Ubicación	Clima	Observaciones
BA0ZH	cautiverio	normal	normal	-	caluroso	-
BA1MR	26/06/2016	2 en derecha	normal	Palo cerca de lámina en cocina	soleado	-
BA2HB	10/09/2016	normal	clara	Sobre una planta de hoja ancha (como palmera/hay fotos para ID), a 100 cm del suelo	caluroso	sacó muy poco veneno
BA3MB	10/09/2016	normal	negro muy marcado	Nivel del suelo reposando en una rama	caluroso	Escamas muy separadas en barbillas (fotografía, según Ariano: no ha comido mucho)
BA4MA	cautiverio	normal	negro muy marcado	-	caluroso	Cabeza extraña

Código	Fecha	No. colmillos	Coloración	Ubicación	Clima	Observaciones
BA5HR	08/04/2017	normal	cola negra	Nivel del suelo sobre hoja de guarumo seca	caluroso	Muy poco veneno, lesión en costado derecho, se iba de lado al moverse
BA6HR	14/04/2017	normal	normal	Sobre roca en la poza de catarata	caluroso	Lesión en costado derecho, absceso del lado izquierdo del cuello
BA7HR	21/04/2017	normal	normal	Sobre tronco caído bajo hoja de guarumo en poza	caluroso	No extrajo veneno, Anémica
BA8HR	05/05/2017	normal	normal	A 5 metros en un árbol, en la poza de la catarata	neblina cerrada	Absceso del lado izquierdo del cuello a 7 cm de la cabeza, golpe lado derecho y golpe lado izquierdo
BA9MR	05/05/2017	normal	cola amarilla	A 5 metros en un árbol, en la poza de la catarata	neblina cerrada	-
BA10HR	28/07/2017	normal	normal	Encontrada en última poza, reposando en el piso	caluroso	cuatro lesiones en el cuerpo, como mascones (hay fotografías)

#### Anexo 16. Caso de serpiente anémica.

El 21 de abril del 2017, se encontró una hembra bajo una hoja de guarumo sobre un tronco caído en la poza del Parque Ecológico Gucumatz – Ranchitos del Quetzal (Figura 31). Fue encontrada a las 10:09 pm, minutos antes de liberar al individuo previo, Ba6HR. Estaba inactiva. Se capturó y prosiguió la metodología normal con los demás individuos.

**FIGURA 35.** Ba7HR encontrada debajo de hoja de guarumo.



Al medirla, se registró un LHC de 54.0 cm, LC de 11.0 y LT de 65.0 cm. Se encontraba muy delgada. La toma de muestra se realizó el 23 de abril del 2017. Al intentar extraer veneno, no se obtuvo muestra. Se esperaron unos minutos y se masajé de nuevo, sin obtener muestra. Debido a que se encontraba muy delgada, se contaba con el terrario y la disponibilidad de Juan Pablo Pinto para alimentarla, se tomó la decisión de dejarla durante 15 días en el terrario. Se le dio agua limpia diariamente y durante el transcurso de este tiempo, se alimentó de cuatro *Norops cobanensis*. Al regresar y realizar la extracción, no se obtuvo muestra nuevamente. Se llamó a Danny Mazariegos quien, según los síntomas observados: encillas blancuzcas, muy delgada, inactiva y sin veneno, determinó que era anémica. Estos síntomas concuerdan con los síntomas de anemia en reptiles reportados por Saggese (2009). Se dio la recomendación por dicho experto, de llevarla al centro de rescate y recuperación en Antigua Exotic, sin embargo, no se contaba con las licencias ni autorización por parte del parque para extraerla del sitio. Debido a ello, se decidió liberarla, momento en el cual ya se encontraba más activa que en la noche cuando fue encontrada.

**FIGURA 36.** Ba7HR previo a ser liberada.



(Fotografía por: Andrés Novales-Aguirrezabal)

**Anexo 17.** Recaptura de Ba6.

Las fotografías de los individuos marcados como Ba6 y Ba9 presentaron un 46% de alineamiento entre sus patrones, según el software FotoSpottr. Sin embargo, debido a sus lesiones, tamaño y aspecto general se conocía que esta serpiente fue recaptura. Se realizó una confirmación visual basado en el patrón negro de la cabeza presentado a continuación.

**FIGURA 37.** Ba6 y Ba8 en vista lateral.

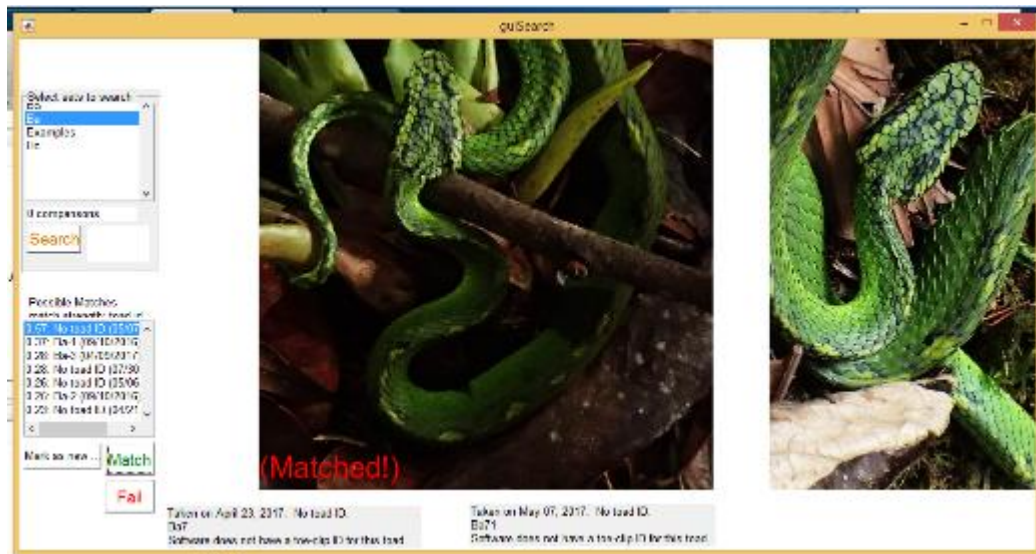


Las características distintivas, además del patrón negro de la cabeza son: lesión en costado derecho, similar a una cicatriz; absceso en lado izquierdo a 7 cm del cuello, golpe en lado izquierdo del cuerpo. LHC: 68 cm, LC: 15 cm, TL: 80 cm.

**FIGURA 38.** Patrón de manchas negras en la cabeza de Ba6 y Ba8.



**FIGURA 39.** Control utilizado para identificación de individuos en FotoSpott



**Anexo 18.** Cópula de Ba8 y Ba9.

En la noche del 5 de mayo de 2017, a las 7:30 p.m. encontramos una pareja de *B. aurifer* en cópula en lo alto de un árbol, de una altura aproximada de 5 metros. El árbol se localizaba en la poza previamente descrita en el Parque Ecológico Gucumatz – Ranchitos del Quetzal. El primer investigador en observarlas, Alejandro Mármol las encontró a las 7:30 p.m. Luego las observé a las 8:30 p.m. No habían cambiado de posición, por lo que se tomó la decisión de bajarlas, a las 9 p.m. Debido a la distancia, niebla intensa y poca iluminación no se pudo observar el comportamiento durante la cópula. Sin embargo, al liberar a los individuos a las 12:40 p.m a los dos días de encontrarlas, se observó nuevamente un intento de cópula. A las 12:42 p.m el macho se acercó a la hembra desde la cola y se posicionó sobre ella, enrollando su cuerpo sobre el de la hembra. Luego, empezaron a entrelazar la ambas colas. La hembra formó un arco entre la punta de la cola y la cloaca a la 1:00 p.m. Ambos permanecieron en esta posición durante 30 minutos. A la 1:35 p.m, la hembra empezó a inflar su cuerpo y garganta. El macho se movió a una rama más alta y la hembra se movió en otra dirección, lejos del macho. La secuencia de la actividad observada se encuentra en las fotografías presentadas a continuación.

**FIGURA 40.** Cópula de Ba8 y Ba9



(Fotografías por Cristina Arrivillaga y Melissa Villatoro-Castañeda)

**FIGURA 41.** Colas de juveniles encontrados.



**FIGURA 42.** Colas de hembras encontradas.



**FIGURA 43.** Cola de macho en cópula.



### Anexo 19. Información de individuos no examinados.

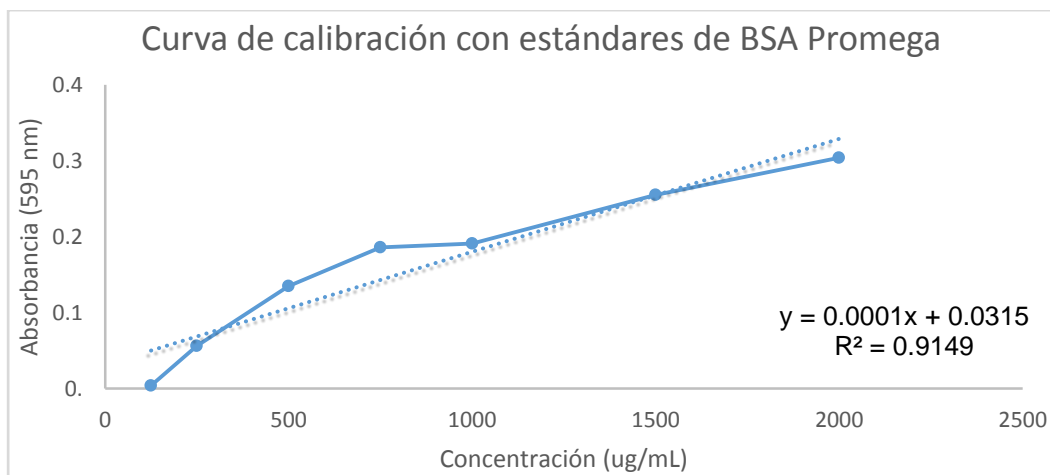
Debido a la dificultad de encontrar a estos individuos y a la disponibilidad de Edna Álvarez y Juan Pablo Pinto de ayudar con el presente estudio, se contaba con el personal del parque para avisar en caso avistaran una serpiente. El 08 de agosto del 2017, se encontró una *B. aurifer* adulta a las 5:00 pm. La temperatura era de 21.28°C, con un 86% de humedad y la luna estaba en fase llena. Aparte, se encontró un individuo de un tamaño muy pequeño de aproximadamente 20 cm de longitud el 12 de marzo de 2017 en el Biotopo del Quetzal. Esta no fue manipulada ni movida del sitio donde fue encontrada pues era demasiado pequeña para su manipulación. Se encontró a la 1:00 am en fase lunar llena. A continuación se presenta una imagen de la misma, haciendo énfasis en la cola negra.

**FIGURA 44.** *Bothriechis aurifer* juvenil encontrada en Biotopo del Quetzal.



(Fotografía por Andrés Novales-Aguirrezabal)

### Anexo 20. Curva de calibración para cuantificación proteica de los venenos.



**Anexo 21.** Absorbancias reportadas en muestras de cascabel, mano de piedra y gushnayera.

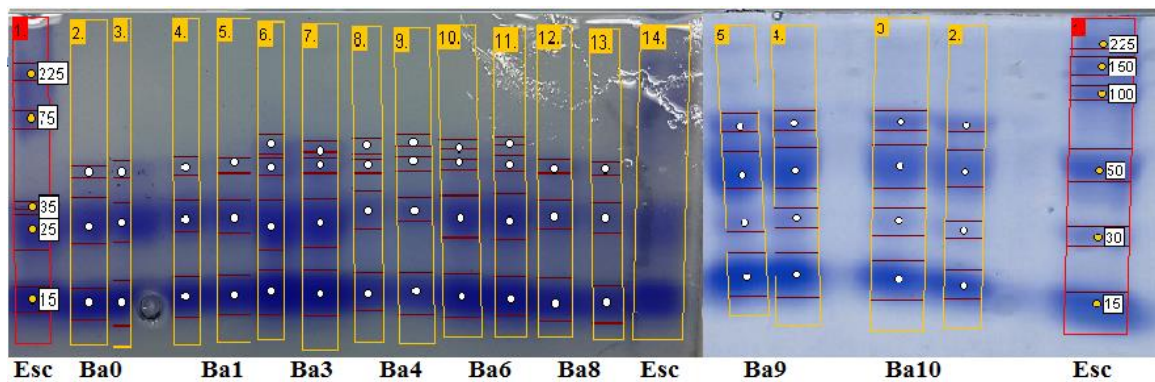
Especie	Muestra	Absorbancia (595 nm)				[] µg/mL dilución	[] µg/mL real x25 o x50
		1	2	3	Prom.		
<i>Crotalus simus</i>	<b>A</b>	0.381	0.381	0.381	0.381	3495.00	87375.00
	<b>B</b>	0.420	0.376	0.389	0.395	3635.00	90875.00
	<b>C</b>	0.404	0.397	0.402	0.401	3695.00	92375.00
	<b>G</b>	0.362	0.340	0.354	0.352	3861.67	96541.67
	<b>H</b>	0.361	0.371	0.367	0.366	4111.67	102791.67
	<b>I</b>	0.418	0.413	0.412	0.414	3591.67	89791.67
<i>Atropoides mexicanus</i>	<b>J</b>	0.344	0.349	0.362	0.352	3205.00	160250.00
	<b>K</b>	0.290	0.312	0.310	0.304	3348.33	167416.67
	<b>L</b>	0.361	0.377	0.384	0.374	3828.33	191416.67
	<b>D</b>	0.422	0.407	0.424	0.418	3201.67	160083.33
	<b>E</b>	0.458	0.430	0.440	0.443	2725.00	136250.00
	<b>F</b>	0.392	0.387	0.393	0.391	3425.00	171250.00
<i>Bothriechis aurifer</i>	<b>0</b>	0.384	0.369	0.417	0.390	3585.00	179250.00
	<b>0+</b>	0.400	0.370	0.361	0.377	3455.00	172750.00
	<b>1</b>	0.346	0.338	0.340	0.341	3098.33	154916.67
	<b>1+</b>	0.337	0.319	0.329	0.328	2968.33	148416.67
	<b>3</b>	0.373	0.357	0.370	0.367	3351.67	167583.33

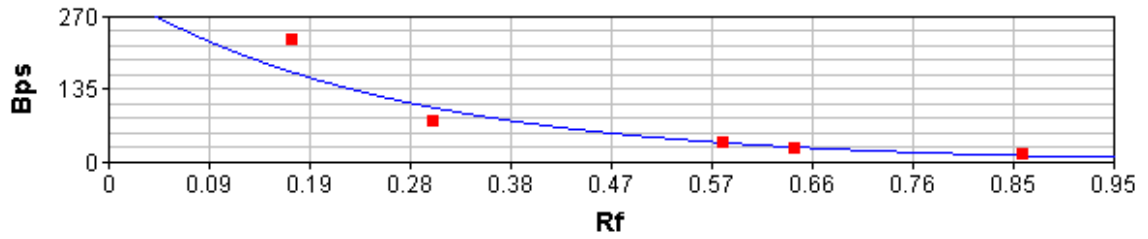
---

<b>3+</b>	0.290	0.309	0.305	0.301	2698.33	134916.67
<b>4</b>	0.372	0.372	0.376	0.373	3418.33	170916.67
<b>4+</b>	0.333	0.320	0.322	0.325	2935.00	146750.00
<b>6</b>	0.272	0.270	0.265	0.269	2375.00	118750.00
<b>6+</b>	0.363	0.355	0.339	0.352	3208.33	160416.67
<b>8</b>	0.403	0.402	0.415	0.407	3751.67	187583.33
<b>8+</b>	0.263	0.263	0.267	0.264	2328.33	116416.67
<b>9</b>	0.367	0.358	0.350	0.358	3268.33	163416.67
<b>9+</b>	0.333	0.308	0.314	0.318	2868.33	143416.67
<b>10</b>	0.387	0.381	0.379	0.382	3508.33	175416.67
<b>10+</b>	0.035	0.354	0.354	0.248	2162.67	108133.33

---

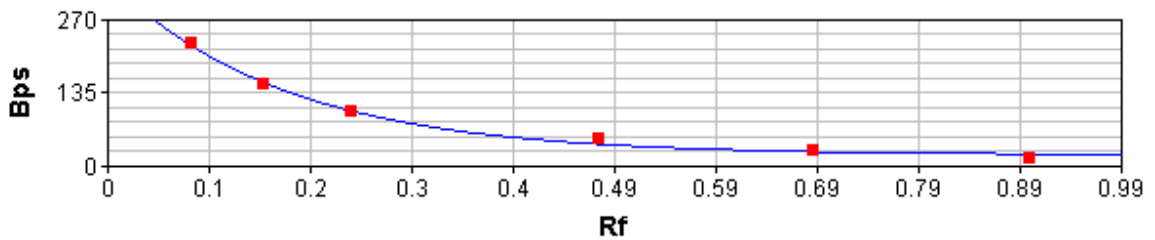
**Anexo 22.** Gel de proteínas SDS-PAGE de muestras de veneno de *B. aurifer*.



**Anexo 23.** Curva de calibración para peso molecular de gel 1.

$$\ln(y) = -3.7400131 * x + 5.767783$$

$$R^2 = 0.864$$

**Anexo 24.** Curva de calibración para peso molecular de gel 2.

$$y = 323.75995 * e^{(-5.821518 * x)} + 21.320307$$

$$R^2 = 0.994$$

**Anexo 25.** Halos de inhibición obtenidos por el veneno y gentamicida en seis cepas bacterianas.

Cepa bacteriana	Halos de inhibición (mm)				
	Réplica	A	C	D	E
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	16.1	16.2	18.6	17.4
	2	16.0	17.0	17.3	15.6
	3	19.2	18.8	18.2	17.2
<i>Escherichia coli</i>	1	8.9	0.0	17.5	8.0
	2	7.7	7.6	18.3	8.1
	3	9.3	7.6	16.7	8.0

Cepa bacteriana	Halos de inhibición (mm)				
	Réplica	A	C	D	E
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	9.1	9.2	13.4	9.1
	2	9.1	9.0	12.3	9.5
	3	8.1	8.1	12.4	8.7
<i>Salmonella typhimurium</i>	1	9.8	10.0	17.0	10.6
	2	9.2	9.2	17.0	9.3
	3	9.5	10.1	19.1	10.4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	14.5	14.0	20.6	15.5
	2	16.6	15.4	20.9	14.5
	3	15.4	13.8	20.3	16.2
<i>Bacillus subtilis</i>	1	0.0	0.0	19.3	0.0
	2	0.0	0.0	23.4	0.0
	3	0.0	0.0	19.4	0.0

**Anexo 26.** Halos de inhibición observados en *Staphylococcus aureus*.



**Anexo 27.** Halos de inhibición observados en *Escherichia coli*.



**Anexo 28.** Halos de inhibición observados en *Pseudomonas aeruginosa*.



**Anexo 29.** Halos de inhibición observados en *Salmonella typhimurium*.



**Anexo 30.** Halos de inhibición observados en *Staphylococcus epidermidis*.



**Anexo 31.** Halos de inhibición observados en *Bacillus subtilis*.**Anexo 32.** Registro de actividad de ratones inoculados con 3.75 µg/g.

<b>DOSIS</b>	5 ug/g			
<b>FECHA</b>	25 de septiembre 2017			
<b>HORA INICIO</b>	9:17 a. m.			
<b>CÓDIGO</b>	<b>Control 1</b>	<b>1.1</b>	<b>2.1</b>	<b>3.1</b>
<b>Hora inoculación</b>	9:17 a. m.	9:24 a. m.	9:32 a. m.	9:40
<b>Peso (g)</b>	26	28	27	23
<b>Min.</b>	<b>Actividad</b>			
0	normal	normal	normal	normal
5	normal	normal	normal	normal
10	normal	normal	normal	normal
15	normal	normal	normal	acicalando herida

20	normal	normal	normal	normal
25	acicalándose	normal	acicalando herida	normal
30	acicalándose	normal	normal	normal
<b>Hora</b>		<b>Actividad</b>		
11:00 a. m.	Dormida	normal	normal	normal
12:00 p. m.	Acicalándose	Inactiva, respiración acelerada	quieta, encorvada	quieta, encorvada
1:00 p. m.	Inactiva	normal	inactiva	inactiva
2:00 p. m.	Dormida	dormida	dormida	dormida
3:00 p. m.	Dormida	tomando agua	inactiva	dormida
<b>Observaciones generales</b> Se determinó como un comportamiento normal: olfateando y observando sus alrededores, activas.				

**Anexo 33.** Registro de actividad de ratones inoculados con 5 µg/g.

<b>DOSIS</b>	5 ug/g			
<b>FECHA</b>	03 de octubre 2017			
<b>HORA INICIO</b>	12:16 p. m.			
<b>CÓDIGO</b>	<b>Control 2</b>	<b>1.2</b>	<b>2.2</b>	<b>3.2</b>
<b>Hora inoculación</b>	12:31 p. m.	12:26 p. m.	12:29 p. m.	12:33
<b>Peso (g)</b>	27	27	24	27
<b>Min.</b>	<b>Actividad</b>			
<b>0</b>	inactiva	inactiva	inactiva	inactiva
<b>5</b>	Acicalamiento	normal	normal	normal

<b>10</b>	normal	normal	acicalamiento	acicalamiento
<b>15</b>	Acicalamiento	normal	normal	normal
<b>20</b>	Acicalamiento	acicalando herida	acicalando herida	acicalando herida
<b>25</b>	normal	normal	acicalamiento	acicalamiento
<b>30</b>	Acicalamiento	acicalamiento	normal	normal
<b>Hora</b>	<b>Actividad</b>			
<b>2:00 p. m.</b>	Dormida	Dormida	Dormida	Dormida
<b>3:00 p. m.</b>	Dormida	Dormida	Dormida	Inmóvil
<b>4:00 p. m.</b>	Dormida	Dormida	Dormida	Dormida
<b>5:00 p. m.</b>	Dormida	Dormida	Dormida	Dormida
<b>Observaciones generales</b> Se determinó como un comportamiento normal: olfateando y observando sus alrededores, activas.				

**Anexo 34.** Registro de actividad de ratones inoculados con 50 µg/g.

<b>DOSIS</b>	50 µg/g			
<b>FECHA</b>	10 de octubre 2017			
<b>HORA INICIO</b>	9:26 a. m.			
<b>CÓDIGO</b>	<b>Control 3</b>	<b>1.3</b>	<b>2.3</b>	<b>3.3</b>
<b>Hora inoculación</b>	9:28 a. m.	9:32 a. m.	9:38 a. m.	9:46
<b>Peso (g)</b>	27	28	27	26
<b>Min.</b>	<b>Actividad</b>			
<b>0</b>	normal	normal	normal	normal

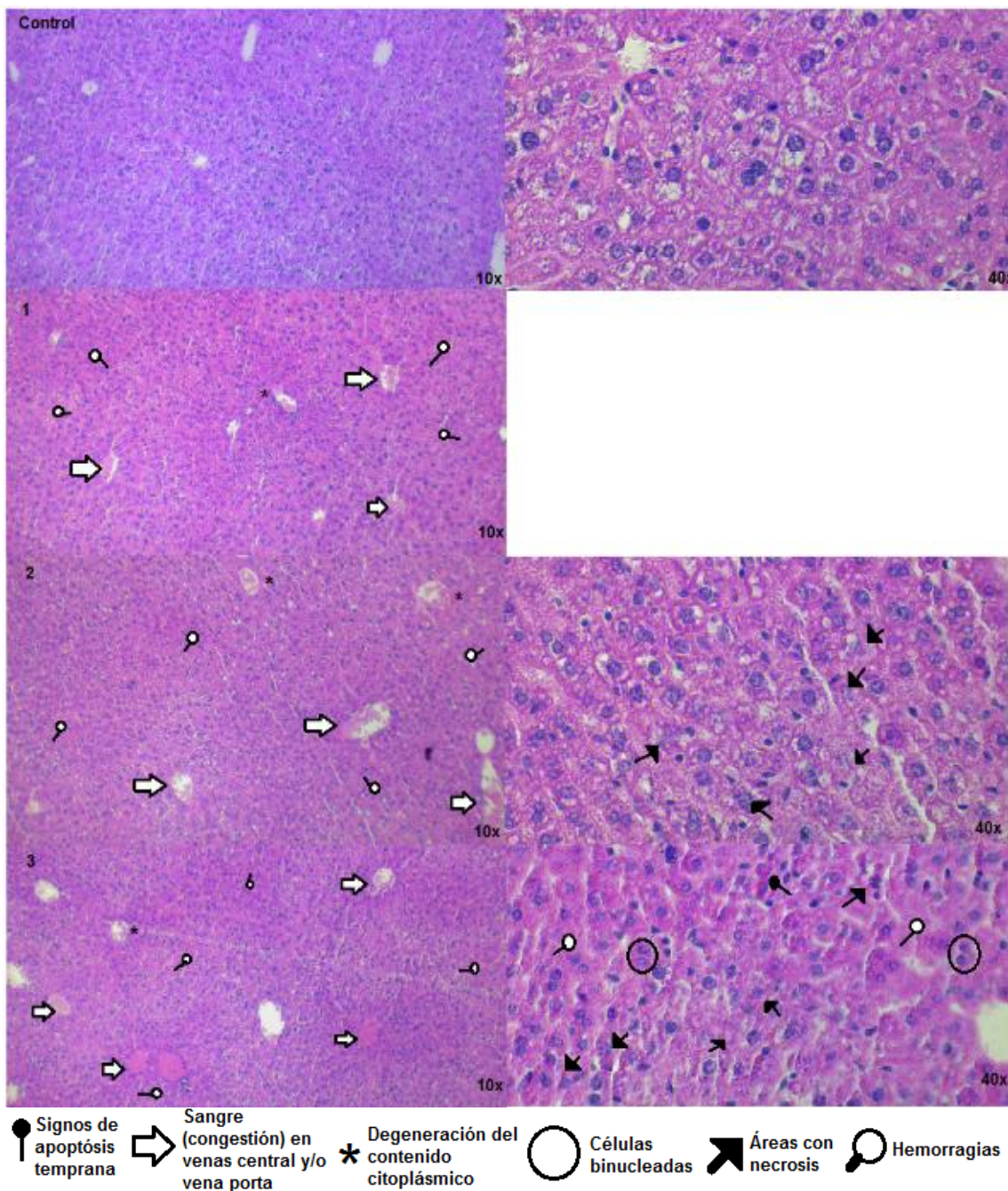
5	normal	acicalando herida	normal	normal
10	normal	acicalando herida	normal	acicalando herida
15	normal	acicalando herida	acicalando herida	normal voc. Ex.
20	normal	acicalando herida	normal	normal
25	normal	normal	normal	acicalamiento
30	normal	normal voc. Ex.	normal	normal
Hora		Actividad		
11:14 a. m.	dormida	dormida	dormida	dormida
12:03 p. m.	dormida	dormida	dormida	dormida
1:00 p. m.	dormida	dormida	dormida	dormida
2:00 p. m.	dormida	dormida	dormida	dormida
3:00 p. m.	dormida	dormida	dormida	dormida
<b>Observaciones generales</b> Se determinó como comportamiento normal: olfateando y observando sus alrededores, activas. Voc.Ex significa vocalización extraña.				

**Anexo 35.** Registro de actividad de ratones inoculados con 300 µg/g.

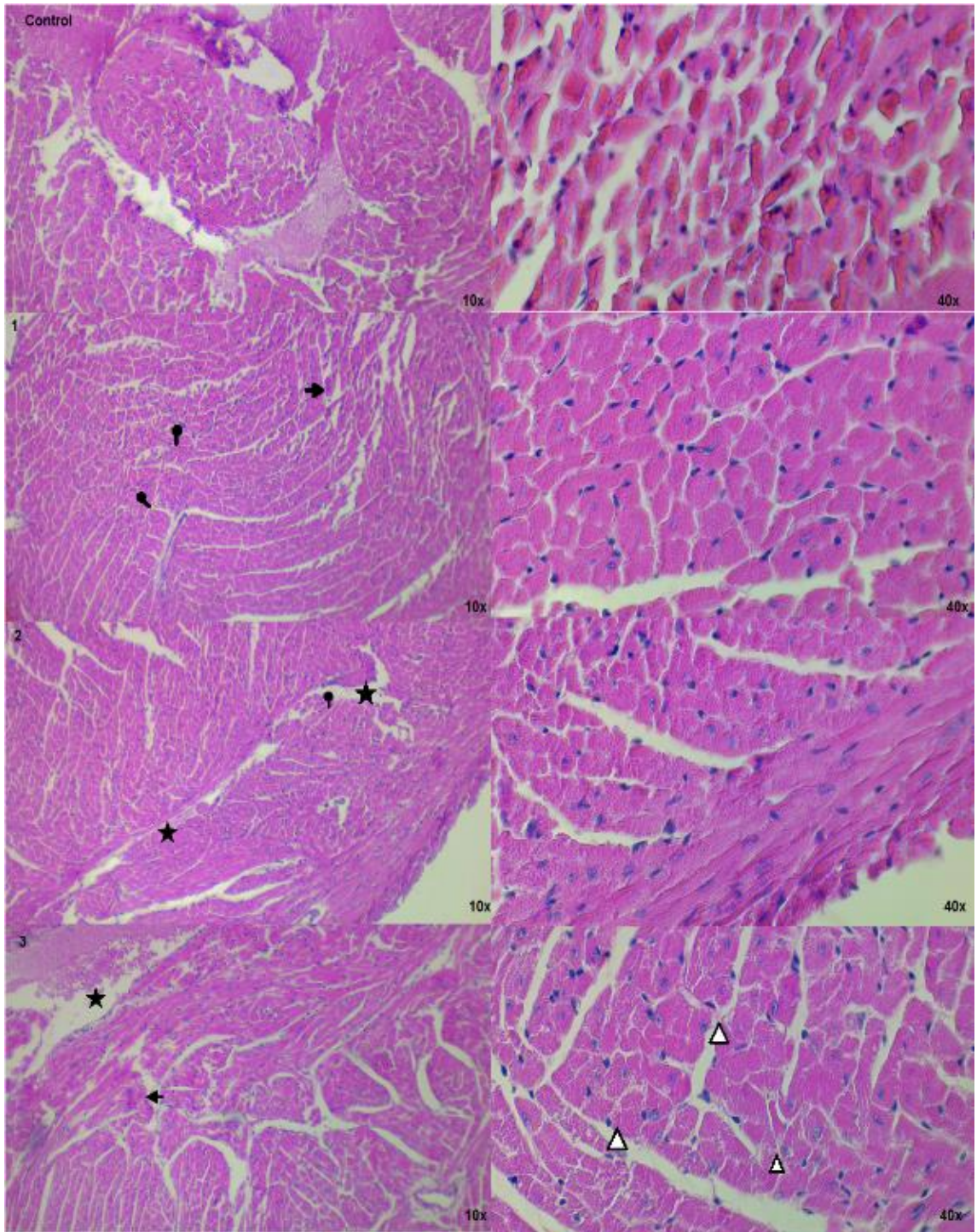
<b>DOSIS</b>	300 ug/g			
<b>FECHA</b>	17 de octubre 2017			
<b>HORA INICIO</b>	7:52 a. m.			
<b>CÓDIGO</b>	<b>Control 4</b>	<b>1.4</b>	<b>2.4</b>	<b>3.4</b>
<b>Hora inoculación</b>	7:58 a. m.	8:04 a. m.	8:03 a. m.	8:01

Peso (g)	25	26	27	28
<b>Min.</b>	<b>Actividad</b>			
0	normal	normal	acicalando herida	normal
5	normal	acicalando herida	ojos entrecerrados	normal
10	normal	inactiva	normal	ojos entrecerrados
15	normal	inactiva	normal	inactiva
20	normal	normal	normal	normal
25	normal	normal	normal	normal
30	normal	normal	normal	normal
<b>Hora</b>	<b>Actividad</b>			
9:15 a. m.	normal	normal	normal	normal
10:15 a. m.	dormida	dormida	dormida	dormida
11:15 a. m.	dormida	ojos entrecerrados	dormida	dormida
12:15 p. m.	dormida	normal	dormida	dormida
1:15 a. m.	dormida	dormida	normal	dormida
<b>Observaciones generales</b> Se determinó como comportamiento normal: olfateando y observando sus alrededores, activas. Al control no se le inoculó PBS por estar muy delgada, no se logró jalar pellejo para inocular.				

**Anexo 36.** Efectos del veneno en hígado de ratón bajo la dosis de 3.75  $\mu\text{g/g}$ .

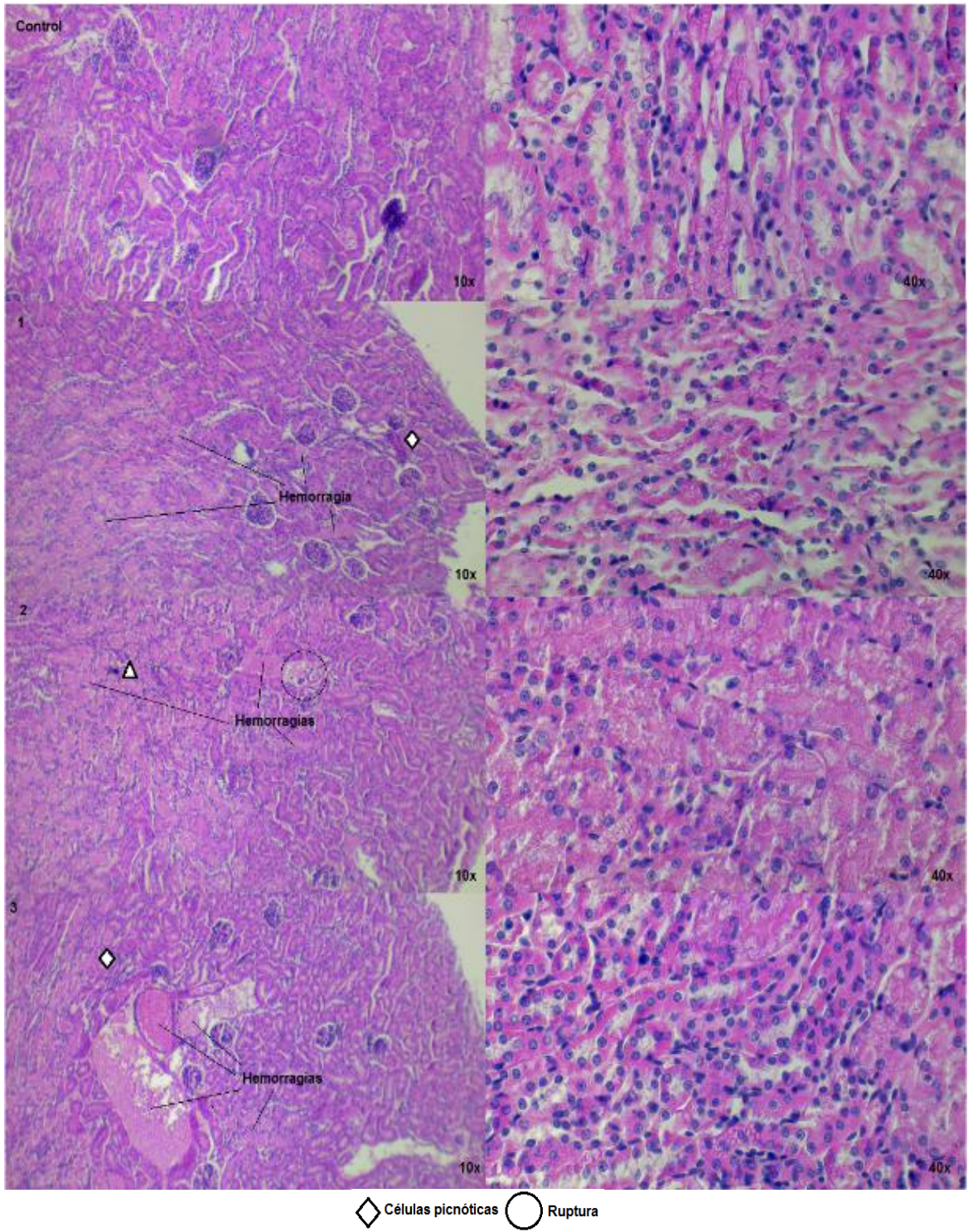


**Anexo 37.** Efectos del veneno en corazón de ratón bajo la dosis de 3.75 µg/g.

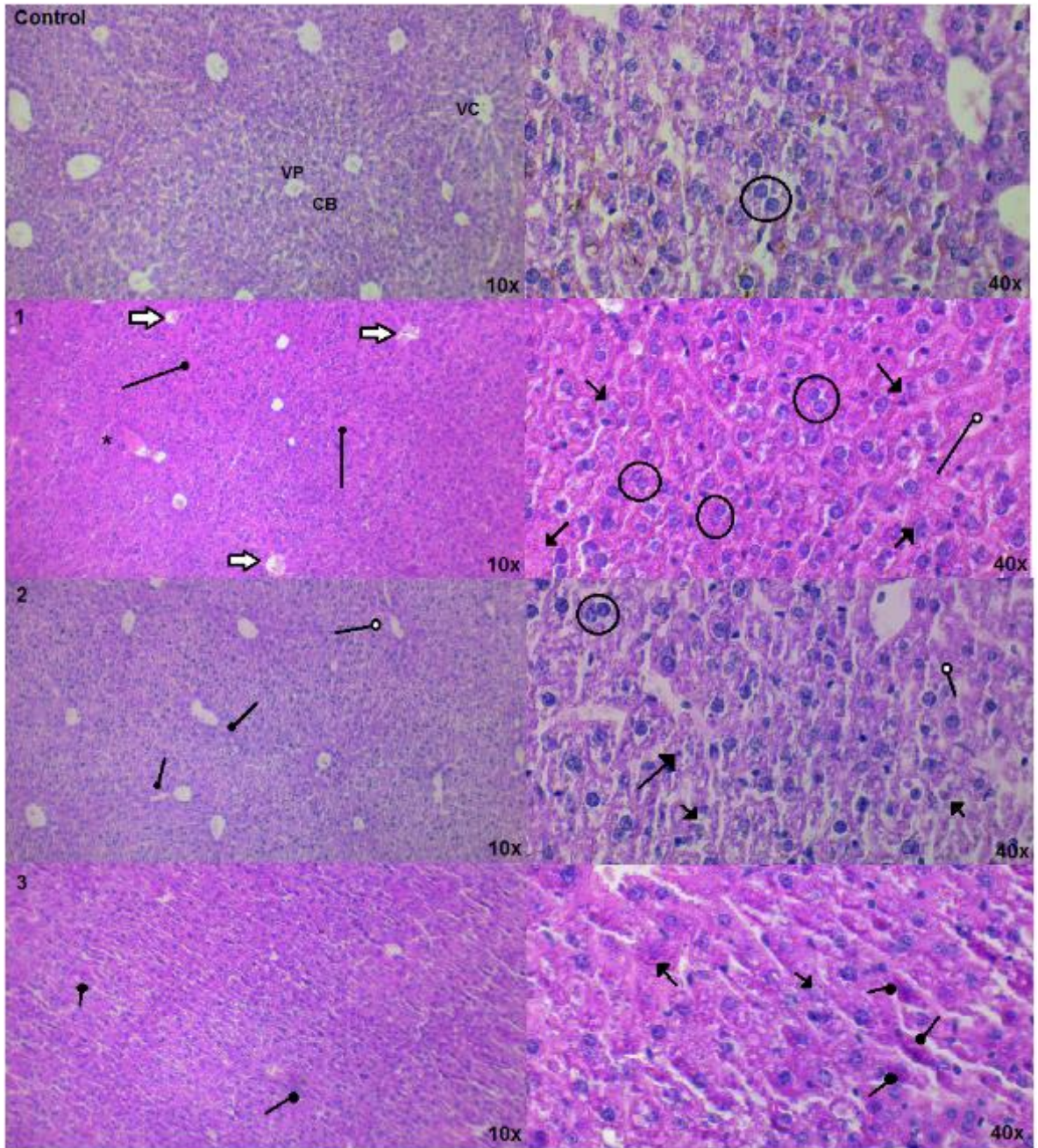


↑ Necrosis leve    ● Acumulación leve de leucocitos    △ Degradación miofibrilar    ★ Hemólisis

**Anexo 38.** Efectos del veneno en riñones de ratón bajo la dosis de 3.75  $\mu\text{g/g}$ .

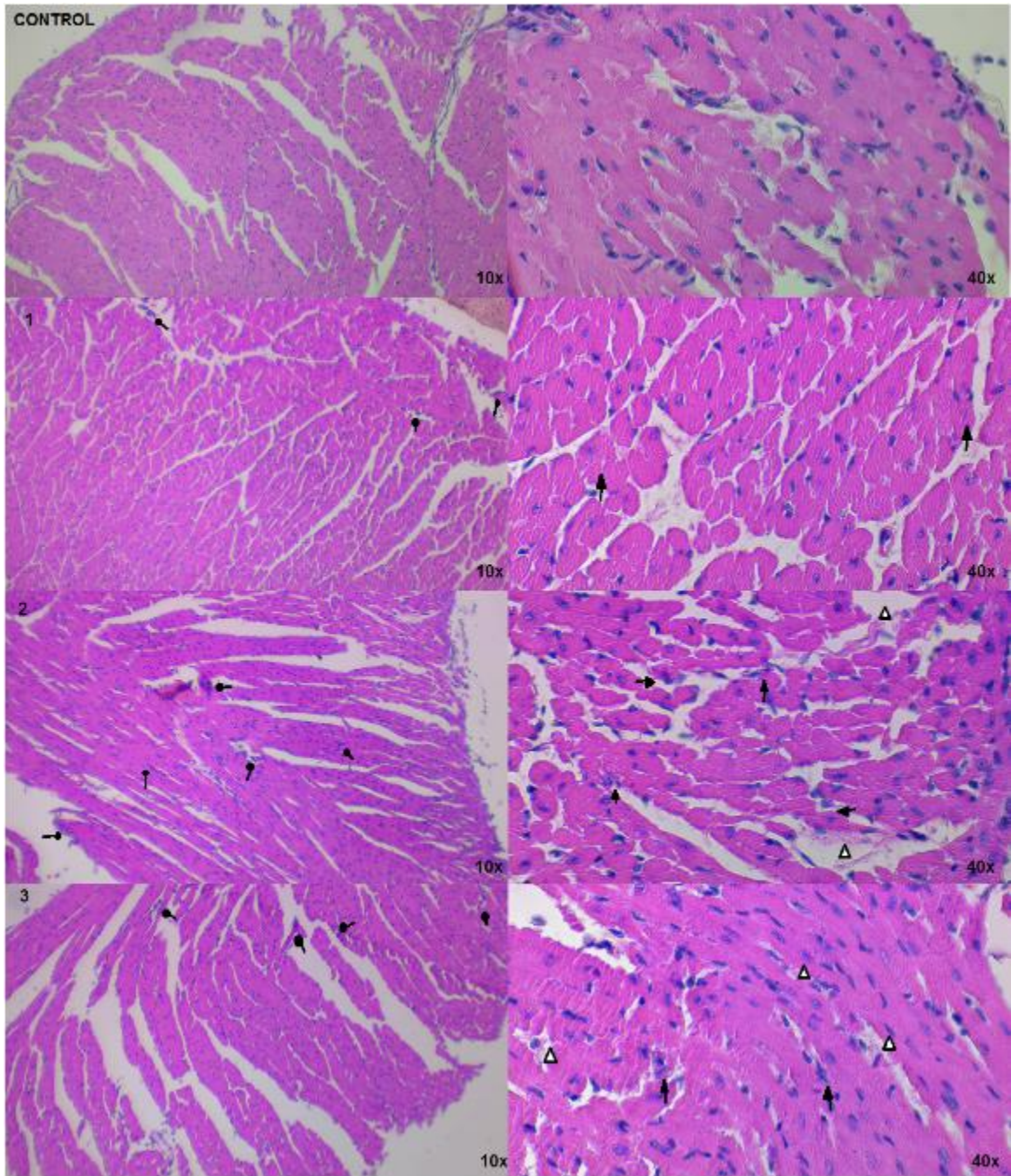


**Anexo 39.** Efectos del veneno en hígado de ratón bajo la dosis de 5 µg/g.



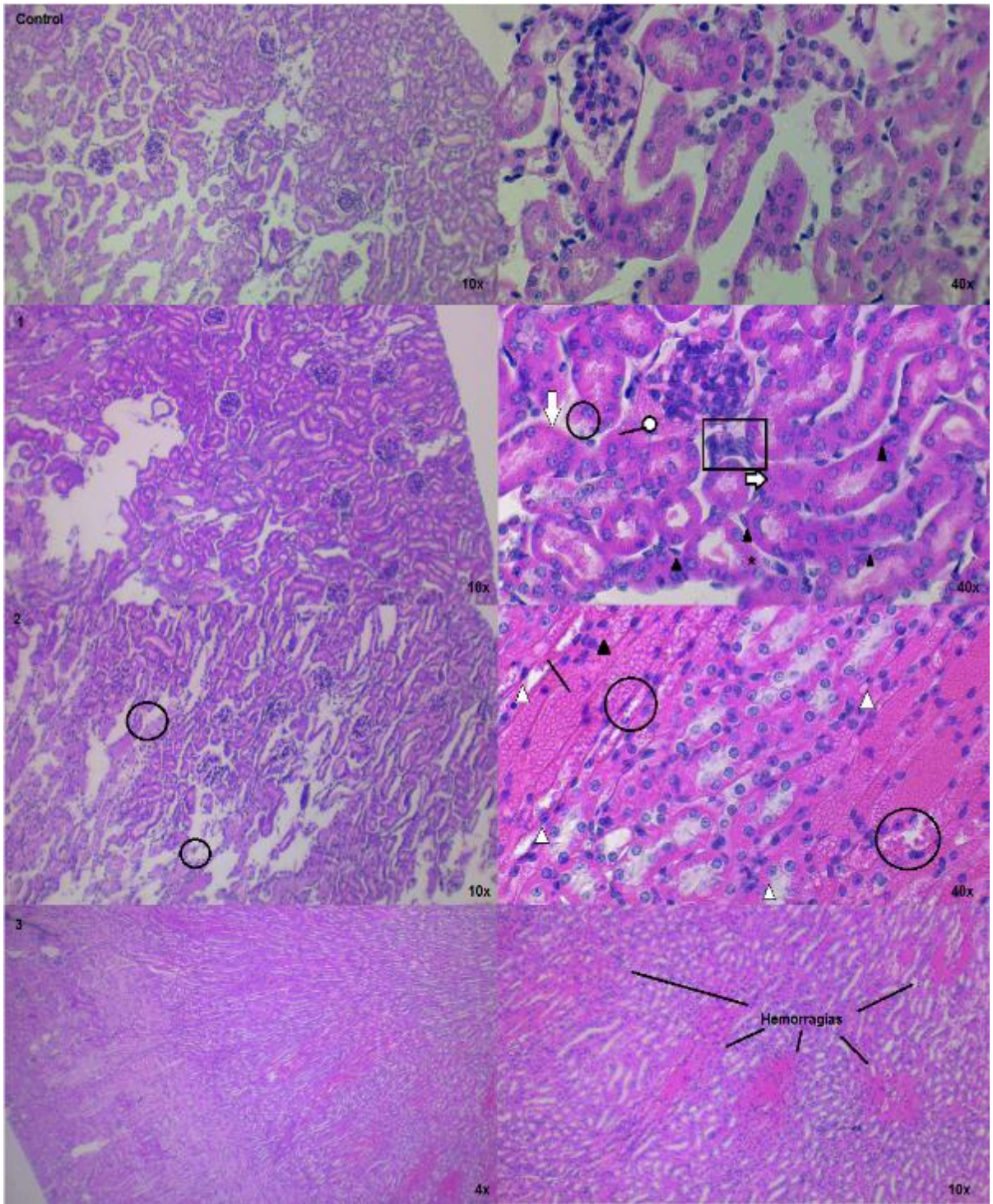
● Signos de apoptosis temprana      ⇒ Sangre (congestión) en venas central y/o vena porta      \* Degeneración del contenido citoplásmico      ○ Células binucleadas      ▲ Áreas con necrosis      ⊙ Hemorragias

**Anexo 40.** Efectos del veneno en corazón de ratón bajo la dosis de 5  $\mu\text{g/g}$ .



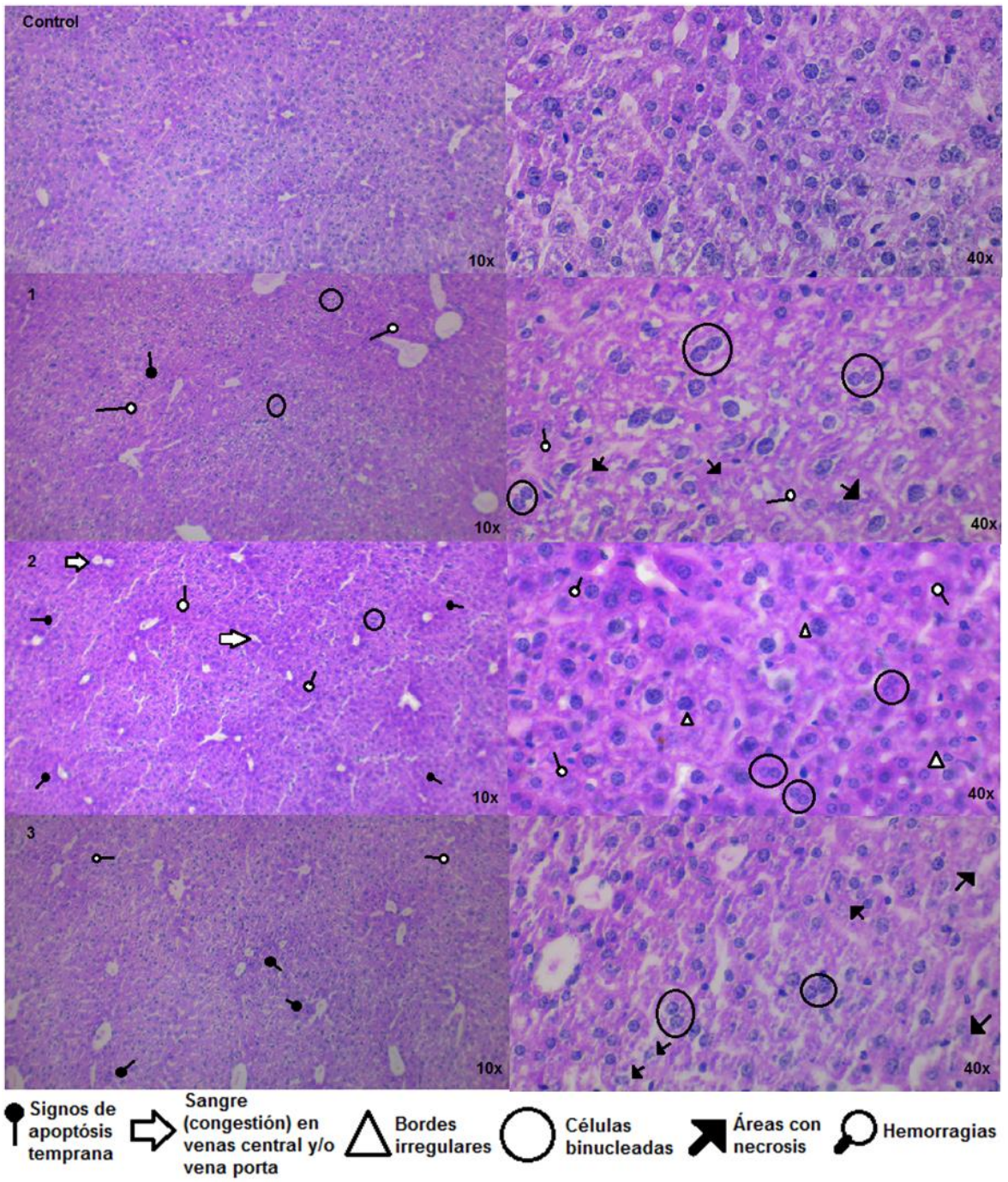
▲ Necrosis leve    ○ Trombosis    ● Acumulación leve de leucocitos    △ Degradación miofibrilar

**Anexo 41.** Efectos del veneno en riñones de ratón bajo la dosis de 5 µg/g.

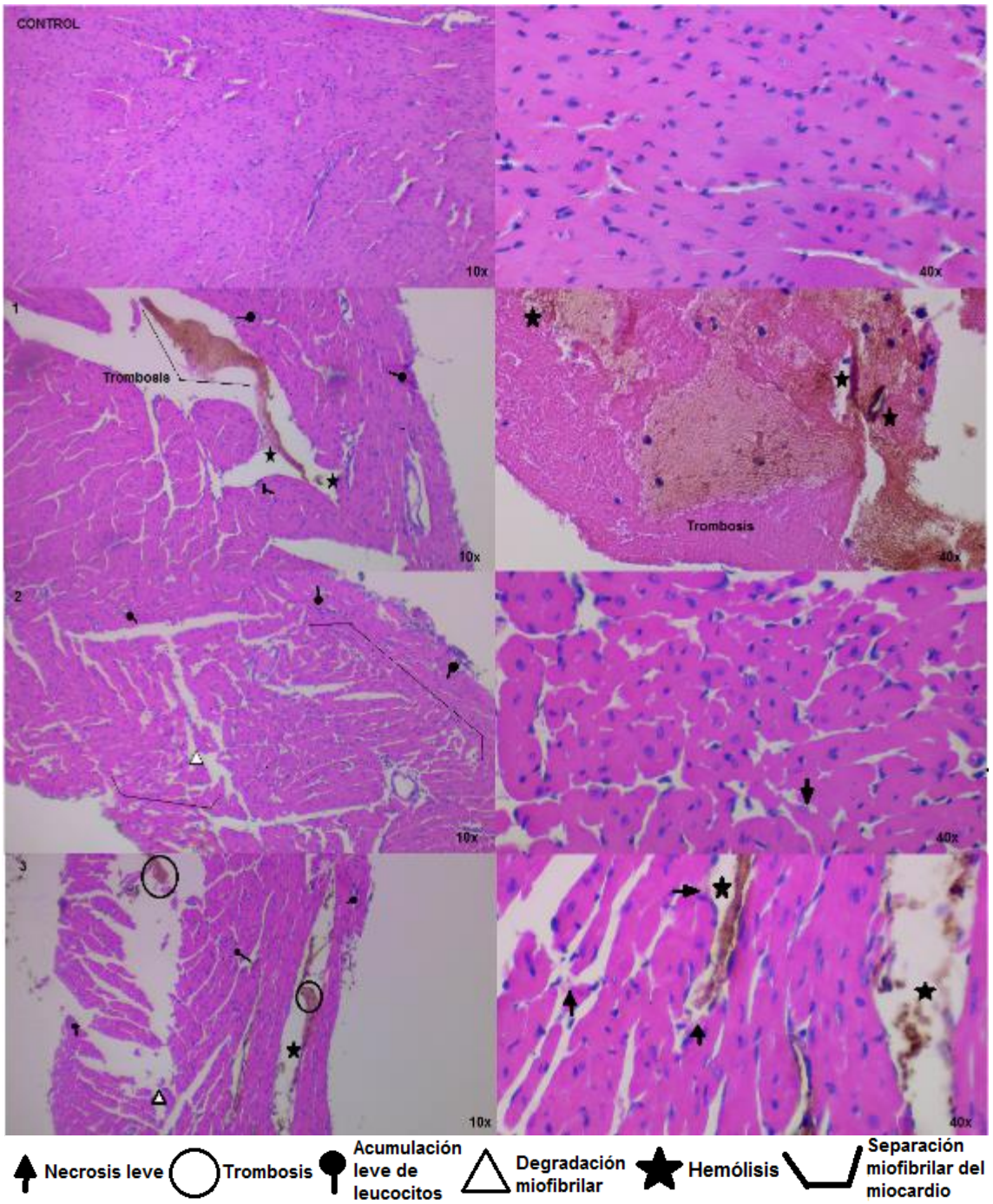


\* Borde discontinuo    ▲ Células picnóticas    △ Necrosis    ○ Ruptura de tubo proximal    ⇨ Engrosamiento/hinchazón    ⊖ Eritrocitos glomerulares    | Áreas con hemorragias    □ Área desconocida

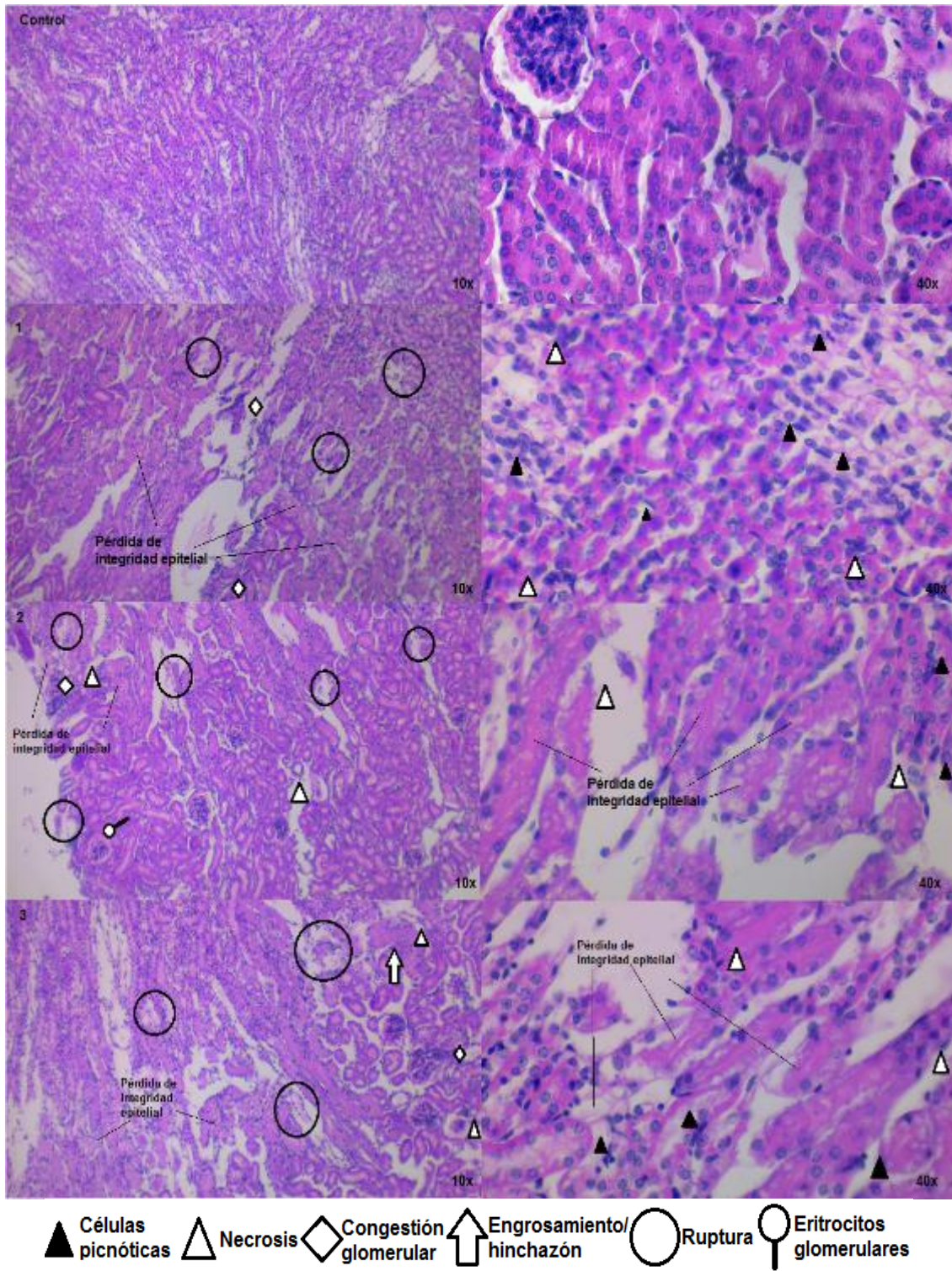
**Anexo 42.** Efectos del veneno en hígado de ratón bajo la dosis de 50 µg/g.



**Anexo 43.** Efectos del veneno en corazón de ratón bajo la dosis de 50 µg/g.



**Anexo 44.** Efectos del veneno en riñones de ratón bajo la dosis de 50 µg/g.



**Anexo 45.** Medidas ataques modelos de plasticina.

<b>No</b>	<b>Color</b>	<b>Ataque</b>	<b>Ubicación corporal (cm)</b>	<b>Largo (mm)</b>
66	B	1	23.5	4.5
68	B	1	1.3	2.1
		2	7	2.3
5	B	1	1	2.2
		2	1.5	3.2
		3	4	5.6
53	B	1	15	2.2
		2	21	4
59	B	1	5.7	5.4
20	B	1	5	5.9
		2	12	7.2
		3	22	5.9
23	B	1	2.7	3.6
		2	6	3.1
29	B	1	0	1.7
		2	3.3	2.7
		3	8	6.1
		4	17	1
32	B	1	21.5	2.3
76	B	1	2	3.6
89		1	2	4
		2	4	1.7

14	B	1	0	2.6
		2	2.5	9.9
8	B	1	2	4.6
		2	2	4.7
11	B	1	0	3.1
26	B	1	2	2.5
75	C	1	11.5	4.3
77	C	1	10.7	2.5
		2	9.5	2.8
81	C	1	5.5	6.2
		2	10.1	4
86	C	1	4.9	3.4
		2	5.3	4.4
		3	22	4.3
31	C	1	15	1.7
42	C	1	0.9	4.1
		2	3.2	4.5
12	C	1	7.5	3.6
		2	7.5	5
		3	7.5	5.9
		4	19.7	2.5
		5	19.7	2.8
15	C	1	2	9.2
47	C	1	20	3.5

		2	21	2.2
55	C	1	9	3
		2	12.8	4.2
		3	20.5	3.3
		4	22	3.6
58	C	1	2	2.2
		2	19.8	4.6
19	C	1	13	2.7
		2	14.3	2.5
25	C	1	19	1
		2	18	2.9
35	C	1	3.5	1.8
62	C	1	1	3.3
		2	1.4	4.5
		3	2.3	2.7
		4	2.5	4.6
		5	3	4.1
		6	3.1	4.1
		7	3.2	3.5
		8	7	4
2	C	1	0.5	6.6
38	C	1	1.8	9.2
			7	5.9
		2	13.5	4.3

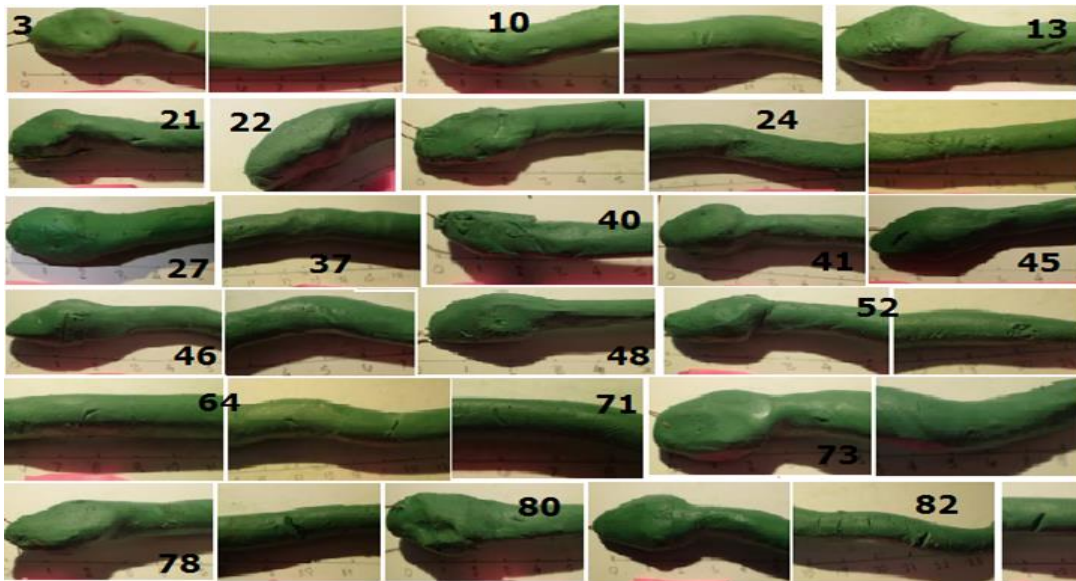
30	C	1	1.6	5.2
		2	1	3.4
84	V	1	12	2.4
37	V	1	14	3.5
41	V	1	3	3.5
		2	3	4.1
10	V	1	1.5	2
		2	1.5	3.5
		3	1.5	4.2
		4	1.5	5.7
		5	10	3.4
46	V	1	0.5	3.9
		2	1.3	11.9
		3	1.3	4.6
		4	5.5	3.2
		5	9.5	9.2
52	V	1	2.3	3.1
		2	20	4.3
21	V	1	3.5	3.3
27	V	1	1.5	4.2
		2	2	4.2
64	V	1	8	3.6
		2	12	4
		3	15.5	5.6
73	V	1	1	1
		2	3.5	1.8

		3	4.3	4.1
71	V	1	6	3.4
78	V	1	0	4
		2	9.5	7.2
80	V	1	3.5	3.3
		2	3.6	3.3
82	V	1	1.5	2.8
		2	9	4.8
		3	22	18.5
		4	22	3.7
		5	22	4.9
3	V	1	1	4.9
		2	1.3	3.4
		3	7.5	2.9
40	V	1	1.5	6.5
		2	1.5	4.9
		3	1.5	3.6
		4	1.5	6.3
48	V	1	1.5	3.3
		2	2	2.7
45	V	1	0.5	8.2
13	V	1	1	4.3
			2	5.9
		2	4	3.4
			5	4.7
22	V	1	0	3.4

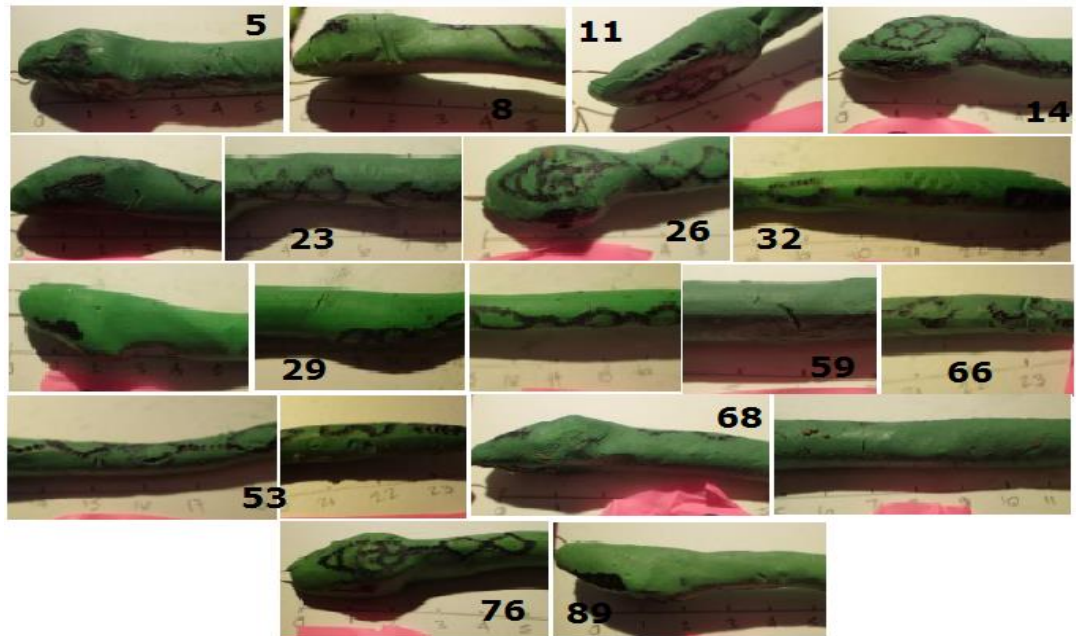
24	V	1	0	3.7
			2	6.2
		2	7.5	3.1
		3	12.5	3.1

---

**Anexo 46.** Ataques registrados en modelos de plasticina verde.



**Anexo 47.** Ataques registrados en los modelos de plasticina con patrón *Bothriechis aurifer*.



**Anexo 48.** Diferencias en la coloración del veneno de *Bothriechis aurifer*.



**Anexo 49.** Poza en Parque Ecológico Gucumatz – Ranchitos del Quetzal en donde fueron encontrados la mayoría de individuos.



**Anexo 50.** Ba 4 muestreado en cautiverio.



**Anexo 51.** Parámetros fisicoquímicos del agua de la poza donde fueron encontrados la mayoría de individuos.

	1	2	3	Promedio	Poza
Caudal m <sup>3</sup> /s	0.69	0.94	0.65	0.76±0.16	-
Temperatura (°C)	16.77±0.05	17.93±0.21	18.07±0.11	17.35±0.58	16.90
Oxígeno disuelto (%)	86.03±1.42	86.47±1.52	84.97±0.42	86.25±0.22	84.30
Concentración de oxígeno (mg/L)	8.41±0.14	8.10±0.09	7.99±0.03	8.26±0.16	8.15
Conductividad (uS)	54.67±0.15	56.13±1.77	52.07±2.17	55.40±0.73	42.50
Salinidad (uS)	64.87±0.15	65.13±1.70	59.50±2.31	65±0.13	50.03
Nitrato (mg/L)	0.57±0.81	1.57±0.38	0.67±0.91	1.07±0.50	2.30
Nitrito (mg/L)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Fosfato (mg/L)	0.47±0.29	0.92±0.32	0.09±0.10	0.70±0.22	0.39
Sulfato (mg/L)	0.67±1.15	3.00±3.00	0.00	1.83±1.17	0.00

	Muy bueno
	Bueno
	Regular
	Pobre

Se obtuvo el promedio de los tres puntos por transecto y el promedio de los tres transectos para determinar el estado general del río dentro del parque. Por aparte, se presentan los datos medidos en una poza estacional ubicada dentro del sendero que lleva al río dentro del parque.

