

Perfil proteico del veneno de las dos especies de víboras de pestañas de Santander – Colombia,

Bothriechis khwargi y *Bothriechis klebbai* (Serpentes: Viperidae) *sensu* Arteaga et al., 2024

Jefferson Gabriel Mantilla Guzmán

Trabajo de Grado para Optar al Título de Biólogo

Director

Hermínul de Jesús Cano Calle

PhD en Química

Codirector

Juan David Bayona-Serrano

PhD en Toxinología

Tutor

Elson Ferley Meneses Pelayo

M.Sc. en Biología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Biología

2026

Yo juego para vos, mamá.

Agradecimientos

A mi madre, Marcela Guzmán Rincón, mi gratitud y amor no cabe en palabras. Todo lo que hago en la vida nace del deseo profundo de hacerla sentir orgullosa. En cada esfuerzo, en cada desvelo y en cada paso que doy, está su amor, su voz y su ejemplo. A mi padre, Nelson Mantilla Blanco, por su apoyo constante, por su ejemplo y por su fortaleza que me ha servido de refugio en los momentos más difíciles, quien representa el cimiento sobre el cual aprendí a mantenerme de pie. A mi hermana, Leidy Marcela Mantilla Guzmán, por acompañarme siempre, por escucharme con paciencia infinita y por comprenderme incluso cuando no supe explicarme. Gracias por estar, por cuidarme y por ser luz. A mi hermano, Nelson Jair Mantilla Guzmán, el Enano, quien camina conmigo. Gracias por ser mi motor diario, mi impulso constante y mi razón para seguir esforzándome por ser alguien en la vida. A Sayuri, mi compañera, mi amiga. Gracias por no dejarme solo nunca, por escucharme cuando el cansancio pesaba, por acompañarme en los días largos y por regalarme ideas, claridad y apoyo sincero. Este logro, también es tuyo; porque caminamos juntos. A doña Lucy, a don Rey, siempre están conmigo.

A mis compañeros del GEARS, a Elson, Doctor y amigo, eje fundamental en la realización de este proyecto, a Juan David Bayona, quien me corrige y constantemente me mejora, al profe Herminsul, sin su acompañamiento ese proyecto no se podría haber realizado, a la profe Martha Patricia Ramírez Pinilla por su amable compañía y correcciones a este proyecto. A mis compañeros de carrera, a Nathalia Ramirez, muchísimas gracias por la compañía y la ayuda, a Don Robinson, Doña Arelis, a Don Gonzalo, Don Rodri, Doña Irene, Rigo, Don David, Brayan, al profe Enrique Mejía, a Silvia del 103 a Silvia del 402, a Don Manuel, a la profe Stelia, al profesor Víctor Hugo Serrano. Al lugar que me vio formarme como biólogo y donde nació este proyecto, el CEBIO.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción.....	14
1.Objetivos	17
1.1. Objetivo General	17
1.2.Objetivos Específicos	17
2.Competencias.....	18
3.Materiales y métodos	19
3.1.Obtención y manejo del veneno	19
3.2. Fraccionamiento cromatográfico en fase reversa (RP – HPLC).....	20
3.2.1. Análisis cualitativo de los cromatogramas	21
3.3. Cuantificación de proteínas	21
3.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS – PAGE).....	23
3.5.Análisis de datos	24
3.5.1. Identificación de grupos proteicos	24
3.5.2. Análisis de datos de RP – HPLC y SDS-PAGE	24
4. Resultados.....	26
4.1. Manejo del veneno	26
4.2. Fraccionamiento cromatográfico del veneno.....	28
4.2.1. Sobreposición de cromatogramas <i>Bothriechis klebbai</i>	30
4.2.2.Sobreposición de cromatogramas <i>Bothriechis khwargi</i>	35
4.3. Cuantificación de proteínas del veneno.....	38

4.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida del veneno.....	43
4.4.1. Electroforesis del veneno crudo	43
4.4.2. Electroforesis de las fracciones de <i>Bothriechis klebbai</i>	44
4.4.3. Electroforesis de las fracciones de <i>Bothriechis khwargi</i>	46
4.5. Análisis de la variabilidad en el perfil proteico del veneno de las dos especies.....	47
4.5.1. Identificación de grupos proteicos	47
4.5.2. Análisis de datos de RP – HPLC y SDS-PAGE	55
5. Discusión	57
5.1. Complejidad y caracterización preliminar del veneno	57
5.2. Análisis multivariado.....	59
5.2.1. Variabilidad del veneno y el fuerte componente geográfico	59
5.2.2. Patrones de variación interespecíficos.....	62
5.2.3. Regiones Conservadas	62
5.3. Limitaciones Metodológicas	63
5.4. Implicaciones y potencial bioprospectivo	64
6. Conclusiones.....	65
Referencias Bibliográficas.....	67
Apéndices	76

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Información del MHN-UIS de los individuos de Bothriechis para el presente estudio</i> .19	
Tabla 2. <i>Gradiente de elución utilizado en cromatografía líquida en fase reversa</i>20	
Tabla 3. <i>Cantidades de veneno liofilizado obtenidas por individuo</i>26	
Tabla 4. <i>Cuantificación de proteínas del veneno crudo de los especímenes de Bothriechis mediante el método de Bradford</i>39	
Tabla 5. <i>Valores de absorbancia, concentración y volúmenes de carga correspondientes a fracciones proteicas de Bothriechis klebbai separadas por RP–HPLC</i>40	
Tabla 6. <i>Valores de absorbancia, concentración y volúmenes de carga correspondientes a fracciones proteicas de Bothriechis khwargi separadas por RP–HPLC</i>41	
Tabla 7. <i>Abundancia relativa (en % del total del proteoma del veneno) de las principales familias de proteínas presentes en los venenos de neonatos y adultos de B. schlegelii</i>49	
Tabla 8. <i>Composición proteica del veneno de B. schlegelii y su peso molecular</i>50	
Tabla 9. <i>Identificación de grupos proteicos de los individuos analizados de Bothriechis klebbai</i>53	
Tabla 10. <i>Identificación de grupos proteicos de los individuos analizados de Bothriechis khwargi</i>54	

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. <i>Individuos de Bothriechis klebbai (A-D) y Bothriechis khwargi (E-H) utilizados en el estudio</i>	27
Figura 2. <i>Cromatogramas individuales de los individuos de Bothriechis klebbai.</i>	29
Figura 3. <i>Cromatogramas individuales de los individuos de Bothriechis khwargi.</i>	30
Figura 4. <i>Cromatogramas sobrepuestos de los individuos de Bothriechis klebbai (A-B)</i>	31
Figura 5. (A). <i>Cromatogramas sobrepuestos de los individuos de Bothriechis klebbai (C-D); (B). total, de picos del individuo C</i>	32
Figura 6. <i>Cromatogramas sobrepuestos de los individuos de Bothriechis klebbai (A-C)</i>	33
Figura 7. <i>Cromatogramas sobrepuestos de los cuatro individuos de Bothriechis klebbai (A-D), con numeración de picos</i>	34
Figura 8. <i>Cromatogramas sobrepuestos de los tres individuos de Bothriechis khwargi (E-F-G)</i>	35
Figura 9. (A). <i>Cromatogramas sobrepuestos de los individuos de Bothriechis khwargi (E-H); (B). total, de picos del individuo E</i>	36
Figura 10. <i>Cromatogramas sobrepuestos de los cuatro individuos de Bothriechis khwargi (E-H), con numeración de picos</i>	37
Figura 11. <i>Curva de calibración con patrón de albúmina sérica bovina ($\geq 98\%$)</i>	38
Figura 12. <i>Perfil electroforético del veneno crudo en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%</i>	44
Figura 13. <i>Perfil electroforético de las fracciones recolectadas de HPLC de B. klebbai en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%</i>	45

- Figura 14. *Perfil electroforético de las fracciones recolectadas de HPLC de B. khwargi en gel de poliacrilamida SDS–PAGE al 12%.46*
- Figura 15. *Esquema del proceso de fraccionamiento de venenos mediante RP-HPLC. Se indican las regiones aproximadas de elución para las principales familias proteicas comúnmente detectadas en venenos de serpientes.47*
- Figura 16. *Esquema del fraccionamiento de venenos mediante RP-HPLC. Se indican las regiones aproximadas de elución para las principales familias proteicas en venenos de Bothriechis52*
- Figura 17. *Agrupamiento jerárquico de cluster de individuos de B. klebbai y B. khwargi según la distancia Bray–Curtis (correlación cofenética = 0.918).....55*

Lista de Apéndices

	pág.
Apéndice A. <i>Valores de la prueba de Mantel entre distancia geográfica y variación de perfil proteico</i>	76
Apéndice B. <i>Valores de la prueba de Mantel entre distancia geográfica y grupo de proteínas</i> .	76
Apéndice C. <i>Valores del análisis SIMPER</i>	76

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Termino
ACN	Acetonitrilo
g	Gramos
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
kDa	KiloDalton
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MS	Espectrometría de masas
mUA	Mili-Unidades de absorbancia
nm	Nanómetros
PM	Peso molecular
PLA2	Fosfolipasa A2
RP	Fase reversa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SVMP	Metaloproteasa de veneno de serpientes
SVSP	Serin proteasa de veneno de serpientes

TFA	Ácido trifluoroacético
V	Voltios
Vda	Vereda
WHO	Organización mundial de la salud
°C	Grados Celsius
MHN-UIS	Museo de Historia Natural de la Universidad Industrial de Santander

Resumen

Título: Perfil proteico del veneno de las dos especies de víboras de pestañas de Santander – Colombia, *Bothriechis khwargi* y *Bothriechis klebbai* (Serpentes: Viperidae) *sensu* Arteaga et al., 2024^{1*}

Autor: Jefferson Gabriel Mantilla Guzmán^{2*3*}

Palabras Clave: Venómica comparativa; Variabilidad bioquímica; Antiofídicos; SDS – PAGE; RP – HPLC

Descripción:

El conocimiento sobre la composición proteica del veneno en especies del género *Bothriechis* es limitado, particularmente en *Bothriechis khwargi* y *Bothriechis klebbai*, dos especies recientemente descritas y presentes en el departamento de Santander, Colombia. La ausencia de información sobre sus perfiles proteicos dificulta la comprensión de su diversidad bioquímica, limita sus posibles aplicaciones biomédicas y, además, obstaculiza el desarrollo de antiofídicos más eficaces. El presente estudio tuvo como objetivo determinar y comparar el perfil proteico del veneno de ambas especies. Para ello se analizaron ocho muestras, correspondientes a cuatro individuos por especie, depositadas en la Colección de Herpetología de la Universidad Industrial de Santander, obtenidas de ejemplares colectados a lo largo de sus distribuciones. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), para estimar la distribución de proteínas según su peso molecular. Se realizó cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) para obtener perfiles cromatográficos detallados que permitan evaluar su variabilidad intra e interespecífica. Los resultados muestran bandas conservadas en ambas especies, así como variaciones interespecíficas notorias en fracciones de peso molecular medio (40–70 kDa) y bajo (<30 kDa), lo que sugiere diferencias en la composición de toxinas con posibles implicaciones enzimáticas. Los perfiles cromatográficos revelaron alta similitud entre individuos de una misma especie provenientes de localidades cercanas, mientras que se observaron diferencias interespecíficas en el patrón de elución, reflejando cambios en la abundancia relativa de fracciones proteicas, especialmente en las zonas de elución de las desintegrinas, fosfolipasas (PLA2) y metaloproteinasas (SVMP). Este es el primer registro comparativo del perfil proteico en *B. khwargi* y *B. klebbai* que proporciona datos de referencia para investigaciones sobre la variabilidad proteica de sus venenos.

^{1*} Trabajo de Grado

^{2**} Facultad de Ciencias. ^{3**} Escuela de Biología. Biología. Director: Herminsul de Jesús Cano Calle. PhD en Química. Codirector: Juan David Bayona-Serrano. PhD en Toxinología. Tutor: Elson Meneses Pelayo. M.Sc. en Biología

Abstract

Title: Protein profile of the venom of the two species of eyelid vipers from Santander, Colombia, *Bothriechis khwargi* and *Bothriechis klebbai* (Serpentes: Viperidae) *sensu* Arteaga et al., 2024^{4*}

Author(s): Jefferson Gabriel Mantilla Guzmán^{5*}

Key Words: Comparative venomics; Biochemical variability; Antivenoms; SDS-PAGE; RP-HPLC

Description:

Knowledge about the protein composition of venom in species of the genus *Bothriechis* is limited, particularly in *Bothriechis khwargi* and *Bothriechis klebbai*, two recently described species found in the department of Santander, Colombia. The lack of information about their protein profiles hinders understanding of their biochemical diversity, limits their potential biomedical applications, and the development of more effective antivenoms. The aim of this study was to determine and compare the protein profile of the venom of both species. To this end, eight samples were analyzed, corresponding to four individuals per species, deposited in the Herpetology Collection of the Industrial University of Santander, obtained from specimens collected throughout their distributions. The samples were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) to estimate the distribution of proteins according to their molecular weight. Reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) was performed to obtain detailed chromatographic profiles that would allow the evaluation of their intra- and interspecific variability. The results show conserved bands in both species, as well as notable interspecific variations in medium (40–70 kDa) and low (<30 kDa) molecular weight fractions, suggesting differences in toxin composition with possible enzymatic implications. The chromatographic profiles revealed high similarity between individuals of the same species from nearby locations, while interspecific differences were observed in the elution pattern, reflecting changes in the relative abundance of protein fractions, especially in the elution zones of disintegrins, phospholipases (PLA2), and metalloproteinases (SVMP). This is the first comparative record of the protein profile in *B. khwargi* and *B. klebbai*, providing reference data for research on the protein variability of their venoms.

^{4*} Degree Work

^{5**} Faculty of Sciences. School of Biology. Biology. Director: Hermínsul de Jesús Cano Calle. PhD in Chemistry. Co-director: Juan David Bayona-Serrano. PhD in Toxinology. Tutor: Elson Meneses Pelayo. M.Sc. in Biology.

Introducción

El veneno de las serpientes es una adaptación trófica que responde a múltiples presiones selectivas para alcanzar un fenotipo optimizado a diversos entornos ecológicos (Chippaux, 2017; Mackessy, 2021). Como tal, el veneno es una mezcla compleja de proteínas, enzimas y péptidos que pueden tener efectos neurotóxicos, hemotóxicos o citotóxicos en los organismos afectados (Chippaux, 2017; Gutiérrez et al., 2009; Mackessy 2021). Esta capacidad de interferir en un sinnúmero de procesos biológicos ha generado gran interés de diversas áreas de la biología y la medicina (Calvete, Juárez, & Sanz, 2007), que ha impulsado el desarrollo de múltiples metodologías de laboratorio y estrategias analíticas para cuantificar su diversidad de compuestos y actividades biológicas (Calvete, 2017). Debido a esto, durante este siglo se han aislado y caracterizado una gran cantidad de toxinas presentes en el veneno de las serpientes, desvelando una miríada de mecanismos de acción y efectos bioquímicos (Calvete, 2011 2013, 2017; Fox & Serrano, 2007; Lomonte & Calvete. 2017). Dentro de los ofidios, los vipéridos constituyen la familia responsable del mayor número de casos de envenenamiento, tanto a nivel mundial como en Colombia, donde representan aproximadamente el 68% de los accidentes ofídicos (Prieto & Alvarado, 2021). Sus venenos se caracterizan por un predominio de toxinas de alto peso molecular, entre ellas fosfolipasas A2 (PLA2), metaloproteasas (SVMP), serinoproteasas y L-aminoácido oxidasas (LAO), involucradas en la desintegración de tejidos, alteraciones en la coagulación e, incluso, efectos neurotóxicos (Mackessy, 2021). Las manifestaciones clínicas incluyen fisiopatologías locales como dolor, sangrado, edema, necrosis y formación de ampollas y efectos sistémicos como alteraciones en la agregación plaquetaria y falla renal aguda (Gutiérrez et al., 2017; Mackessy, 2021; Otero-Patiño, 2009; Cardoso et al., 2003). En el Neotrópico, la mayoría de los estudios proteómicos del veneno de serpiente se han centrado en especies ampliamente

distribuidas de los géneros *Bothrops* y *Crotalus* que son los principales causantes de envenenamiento en humanos (Alape-Girón et al., 2008; Pla et al., 2017, Saviola et al., 2015; Schonour et al., 2015; Borja et al., 2025). Sin embargo, este sesgo epidemiológico ha causado que las toxinas de un gran número de especies de importancia médica de regiones específicas, hayan sido escasamente exploradas (Calvete, 2013). Esta falta de información representa un vacío de conocimiento que obstaculiza el desarrollo de tratamientos y el aprovechamiento del potencial bioprospectivo de estos venenos (Fox & Serrano, 2007; Borja et al., 2025).

El género *Bothriechis* (Peters. W, 1859), que incluye a las serpientes conocidas como víboras de pestañas, ha sido poco estudiado en comparación con otros géneros de la familia Viperidae, a pesar de que sus venenos contienen proteínas con un elevado potencial terapéutico y aplicaciones biomédicas (Gutiérrez et al., 2009). Este género, que distribuye desde el sur de México, hasta Perú y el oeste de Venezuela (Campbell & Lamar, 2004). Su veneno es rico en SVMP, PLA2 y SVSP, componentes relacionados a cuadros de hemorragia, miotoxicidad y coagulopatías diversas (Lomonte et al., 2008, 2012, 2014, Calvete et al., 2011; Prezotto-Neto et al., 2016). Estos efectos dermonecróticos y hemorrágicos hacen que los venenos del género *Bothriechis* sean potencialmente letales para el hombre (Campbell & Lamar, 2004). Además, los trabajos que han explorado sus venenos han detectado una amplia variación composicional a nivel intra e interespecífico, relacionada a factores tróficos, geográficos y ontogénicos (Lomonte et al., 2008, 2012, 2017; Pla et al., 2017). En 2024, Arteaga y colaboradores describieron a *Bothriechis khwargi* y *Bothriechis klebbai* como nuevas especies de víboras de pestañas presentes en el departamento de Santander, Colombia. Sin embargo, en el mismo año, Reyes-Velasco sugirió que esta división requiere un respaldo adicional, tanto morfológico como molecular, y propone que estas serpientes se consideren subespecies dentro del complejo *Bothriechis schlegelii*, en lugar de

especies independientes. En cualquiera de estos escenarios, la falta de información sobre el veneno de estas nuevas especies o subespecies plantea un desafío no solo para la biología evolutiva, sino también para la medicina y la toxicología aplicada, especialmente en el desarrollo de antiofídicos y la exploración de su potencial para la investigación biomédica a futuro (Pla et al., 2017). Considerando la elevada heterogeneidad reportada en los venenos de especies del género *Bothriechis* (Prezotto-Neto et al., 2016; Pla et al., 2017), sus diversos efectos fisiopatológicos y su potencial bioprospectivo, es de vital importancia catalogar y describir los venenos del género a lo largo de su espectro distribucional. Dada la presencia de dos poblaciones de *Bothriechis* en el departamento de Santander, es imperativo caracterizar el perfil de proteínas de sus venenos, ya que desconocer estos perfiles dificulta prever si los sueros antiofídicos disponibles en Colombia podrían reconocer y neutralizar eficazmente sus componentes. Además, se ha demostrado que diferencias en la composición del veneno pueden generar variabilidad significativa en el inmunorreconocimiento serológico, afectando la eficacia de los antiofídicos disponibles (Gutiérrez et al., 2009; Casewell et al., 2010; Lomonte & Calvete., 2017; Núñez et al., 2009).

Debido a esto, nos propusimos caracterizar el perfil proteico de los venenos de *Bothriechis khwargi* y *Bothriechis klebbai* (*sensu* Arteaga et al., 2024) de Santander, Colombia, utilizando una aproximación proteómica. Esto permitirá una mejor caracterización bioquímica del veneno de estas especies, y aportar información para el potencial uso de sus proteínas en el desarrollo de tratamientos biomédicos, como inhibidores enzimáticos o agentes terapéuticos (Fox & Serrano, 2007). Además, los resultados obtenidos podrían contribuir a mejorar las estrategias de tratamiento en caso de accidentes ofídicos, optimizando la producción de antiofídicos específicos.

1. Objetivos

1.1. Objetivo General

Determinar el perfil proteico del veneno de las dos especies de víboras de pestañas de Santander – Colombia *Bothriechis khwargi* y *Bothriechis klebbai*.

1.2. Objetivos Específicos

Identificar el perfil proteico del veneno de las dos especies de víboras de pestañas de Santander – Colombia, mediante fraccionamiento cromatográfico en fase reversa.

Cuantificar el perfil proteico del veneno de las dos especies de víboras de pestañas de Santander – Colombia, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio.

Analizar la variabilidad en el perfil proteico del veneno de las dos especies de víboras de pestañas de Santander - Colombia.

2. Competencias

- Adquiere habilidades en técnicas avanzadas para la caracterización y análisis de venenos.
- Adquiere habilidades en el manejo de equipos de alta precisión (HPLC-RP y SDS-PAGE).
- Adquiere habilidades de interpretación de los resultados obtenidos, a los cuales les da un sentido biológico.
- Redacta y expone un informe final con rigor científico.

3. Materiales y métodos

3.1. Obtención y manejo del veneno

El veneno utilizado en este estudio se obtuvo cuatro individuos de *B. klebbai* y cuatro individuos de *B. khwargi* provenientes de la Colección Herpetológica del Museo de Historia Natural de la Universidad Industrial de Santander (MHN – UIS) (Tabla 1).

Tabla 1.

Información del MHN-UIS de los individuos de Bothriechis para el presente estudio

Individuo	Especie	Sexo	LRC	Localidad	Longitud	Latitud	Número de Catalogo
A	<i>B. klebbai</i>	Hembra	550	Gucamayo	-73.4910	6.2665	UIS-R – 5331
B	<i>B. klebbai</i>	Macho	546	Simacota	-73.3903	6.4647	UIS-R – 5338
C	<i>B. klebbai</i>	Macho	413	Santa Bárbara	-72.8940	7.0154	UIS-R – 5281
D	<i>B. klebbai</i>	Hembra	562	Santa Bárbara	-72.8949	7.0154	UIS-R – 5333
E	<i>B. khwargi</i>	Hembra	620	S.V.Chucurí	-73.3548	6.8836	UIS-R – 5190
F	<i>B. khwargi</i>	Hembra	620	S.V.Chucurí	-73.3541	6.8804	UIS-R – 5270
G	<i>B. khwargi</i>	Hembra	580	S.V.Chucurí	-73.3574	6.8878	UIS-R – 5279
H	<i>B. khwargi</i>	Hembra	424	S.V.Chucurí	-73.3981	6.8429	UIS-R – 5280

Nota. *Bothriechis klebbai* (A – D), (A) Vereda Cedrales, quebrada La Profunda; (B) Vereda El Salto; (C – D) Vereda Esparta; *Bothriechis khwargi*, Todos en San Vicente de Chucurí (E – H), (E – F) Vereda Morelia; (G) Vereda Chanchón; (H) Vereda Mérida Alta. LRC: Longitud rostro-cloaca.

El veneno de estos individuos estaba almacenado de forma individual, en crioviales esterilizados, en condiciones de ultracongelación a temperatura constante de -80 °C.

3.2. Fraccionamiento cromatográfico en fase reversa (RP – HPLC).

Se utilizaron 2 mg de veneno liofilizado de cada individuo, los cuales fueron rehidratados en 100 μ L de agua tipo 1 con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12,500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C, con el fin de eliminar cualquier material insoluble, siguiendo el protocolo establecido por Calvete et al. (2013). Se descartó el precipitado y se inyectaron 50 μ L de muestra dado el loop del sistema.

El sistema HPLC que se empleó fue un Hitachi Elite LaCrom® equipado con un detector L-2400 UV de alta sensibilidad ajustado para realizar la detección a una longitud de onda de 215 nm. La separación de las proteínas se llevó a cabo utilizando una columna Agilent Eclipse XDB – C18® (250 mm x 4.6 mm) con tamaño de partícula de 5 μ m. La fase móvil tuvo un flujo constante de 1 mL/min y la elución de las proteínas se realizó mediante un gradiente de dos fases: fase A (compuesta por agua tipo 1 con 0.1% de TFA) y fase B (compuesta por acetonitrilo con 0.1% de TFA) (Tabla 1).

Tabla 2.

Gradiente de elución utilizado en cromatografía líquida en fase reversa

A	B	Tiempo (min)
95 %	5 %	5
75 %	25 %	15
55 %	45 %	60
25 %	75%	10

Las fracciones cromatográficas fueron recolectadas manualmente, liofilizadas en el liofilizador de mesa Labcono Freeze Dryer® y almacenadas en condiciones de ultracongelación a -80 °C.

3.2.1. Análisis cualitativo de los cromatogramas

Los cromatogramas de cada individuo fueron analizados de manera independiente en el software OriginLab® (OriginLab Corporation, 2025) mediante la herramienta *Peak Analyzer*. Posteriormente, se realizó la sobreposición de los perfiles cromatográficos en el mismo software, con el fin de evaluar cualitativamente la presencia o ausencia de picos, así como las variaciones en sus abundancias relativas.

Con base en este análisis comparativo y considerando las limitaciones presupuestales del estudio, las fracciones seleccionadas para caracterización posterior se definieron siguiendo una estrategia orientada a maximizar la diversidad proteica capturada. Para ello, se identificó el individuo cuyo cromatograma integraba la mayor riqueza y variabilidad de picos, usándolo como un perfil representativo. Asimismo, para garantizar que ningún componente exclusivo de otros individuos fuera omitido, se incorporaron de manera complementaria aquellas fracciones específicas provenientes de los demás individuos que presentaban picos ausentes en el perfil representativo. Esta aproximación buscó abarcar de manera integral el espectro completo de la diversidad proteica detectada en las muestras analizadas.

3.3. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas totales en el veneno crudo y las fracciones cromatográficas se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford (1976). Para ello, se preparó el reactivo disolviendo 50 mg de Coomassie Brilliant Blue G – 250 en 25 mL de etanol al 95% (v/v) bajo

agitación constante, adicionando posteriormente 50 mL de ácido ortofosfórico al 85% (v/v) y aforando a 500 mL con agua tipo I, con filtración previa a su uso.

La curva de calibración se estableció utilizando albúmina sérica bovina ($BSA \geq 98\%$ de pureza) en un rango de 0 – 1000 $\mu\text{g/mL}$. La muestra control, compuesta por 200 μL de reactivo de Bradford se leyó por triplicado a 595 nm y ajustó la línea base del espectrofotómetro (Synergy HT®, BioTek) en cero. Se tomaron 20 μL de los patrones y se mezclaron con 180 μL del reactivo en microplacas de 96 pozos, midiéndose la absorbancia por triplicado a 595 nm tras agitación suave. Las concentraciones proteicas se determinaron mediante interpolación en la curva de regresión lineal ($Y = mX + b$; $R^2 \geq 0.95$), donde Y representa la absorbancia a 595 nm y X la concentración de BSA ($\mu\text{g/mL}$), aplicando los correspondientes factores de dilución.

La cuantificación de proteínas totales en las muestras de veneno crudo y fracciones de las especies de *Bothriechis* se realizó a partir de 1 mg de veneno liofilizado, rehidratado en 50 μL de agua tipo I y centrifugado a 12,500 rpm durante 10 minutos a 4 °C, de estos, se tomaron 20 μL de la muestra y se mezclaron con 180 μL del reactivo con agitación suave, en todas las lecturas se incluyó un control blanco, que consistió en 200 μL de reactivo.

Es importante considerar que el método de Bradford detecta principalmente proteínas con residuos de arginina, lisina e histidina, por lo que péptidos pequeños u otros compuestos presentes en el veneno (como carbohidratos, lípidos o metabolitos secundarios) no son reconocidos en la medición. Estas particularidades pueden generar ligeras subestimaciones del contenido proteico total.

3.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS – PAGE)

Las muestras de veneno crudo y fracciones seleccionadas con el método descrito en la sección 3.2.1. y que fueron liofilizadas se rehidrataron en 50 μ L de agua tipo 1 y se cuantificó su contenido proteico mediante el método de Bradford como se mencionó anteriormente.

Para la separación electroforética por SDS – PAGE se sembraron 10 μ g de proteína en cada pocillo. Las muestras fueron preparadas mezclando en proporción 1:1 el volumen de la muestra rehidratada en agua tipo 1 con buffer de carga 1X manteniendo la concentración de 10 μ g de proteína por pocillo. Las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y luego fueron enfriadas en hielo durante 5 minutos. Para el gel, se usó un método discontinuo de poliacrilamida, el gel concentrador al 5% y el gel de separación al 12% en moldes de 1mm de grosor. Se utilizó una cámara electroforética Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratorios®, 2020) aplicando un voltaje de 110 V durante 85 minutos.

Una vez se concluyó la corrida en la cámara electroforética, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R – 250 durante 1 hora, el exceso de azul de Coomassie fue removido mediante decoloración fuerte en una solución con 50% de metanol, 10% de ácido acético glacial y aforado con agua tipo I, durante 45 minutos con agitación suave, y decoloración débil en una solución con 5% de metanol, 10% ácido acético glacial y aforado con agua tipo I, durante 12 horas. Los geles se almacenaron en 50% de decolorante débil con 50% de agua tipo I. Como estándar de referencia para determinar el peso molecular, se emplearon marcadores *Prism Protein Marker* (Amresco, 2014), que cubren un rango de 18 a 130 kDa. Los geles se analizaron en los softwares ImageLab (Bio-Rad Laboratorios®, 2020) y Gel Analyzer (Lazar Jr. & Lazar Sr., 2023) y a partir de estos análisis se determinaron los pesos moleculares de las bandas, calculados con base en su migración relativa respecto al marcador proteico.

3.5. Análisis de datos

3.5.1. Identificación de grupos proteicos

Se identificaron los posibles grupos proteicos presentes en las muestras analizadas mediante la consulta de literatura especializada. La asignación de cada componente a un grupo de proteínas se basó en la integración de múltiples criterios analíticos. Estos incluyeron los parámetros cromatográficos de RP-HPLC (tiempo de elución, porcentaje de solución B y la polaridad inferida) (Lomonte & Calvete., 2017; Calvete et al., 2011), así como los pesos moleculares estimados mediante SDS-PAGE (Lomonte et al., 2008; Calvete et al., 2011; Pla et al., 2017). Los datos obtenidos a partir de ambas técnicas fueron contrastados para establecer correspondencias entre las fracciones cromatográficas y las bandas electroforéticas observadas.

Esta estrategia analítica permitió integrar información relativa a la hidrofobicidad y al peso molecular, facilitando la asignación putativa de cada pico o fracción a posibles grupos proteicos. La clasificación final se consensuó considerando estos criterios simultáneos y en concordancia con las fuentes de referencia consultadas.

3.5.2. Análisis de datos de RP – HPLC y SDS-PAGE

Se recopilaron los parámetros numéricos de los picos obtenidos del fraccionamiento cromatográfico, mediante un análisis manual con la herramienta *Peak Analyzer* del software OriginLab (OriginLab Corporation, 2025) en una matriz de datos (p. ej., área bajo la curva de los picos, centroide, tiempo en el que inició la elución, tiempo en que finalizó la elución).

Con lo anterior, se construyó una nueva matriz para los análisis multivariados en la que se integraron tanto la presencia y ausencia de cada pico como su correspondiente asignación a un grupo proteico específico. En esta matriz, el área bajo la curva se utilizó para representar la presencia de un pico, de modo que los valores distintos de cero se interpretaron como abundancias

relativas, mientras que los valores iguales a cero se consideraron como ausencia del pico. Esta estructura basada en abundancias continuas hizo pertinente el uso de índices de distancia (Bray & Curtis, 1957; Clarke, 1993).

A partir de la matriz de distancia obtenida, se construyó un análisis de conglomerados jerárquicos mediante el método UPGMA (Sokal & Michener., 1958), para evaluar la estructura general de agrupación entre los individuos. Este análisis permite reconocer la disposición jerárquica de similitudes en el espacio multivariado, detectando grupos naturales y relaciones entre los individuos (Sokal & Michener., 1958). La calidad del agrupamiento en relación con la matriz original se evaluó mediante el coeficiente de correlación cofenética, el cual cuantifica el grado en que la estructura jerárquica refleja las distancias originales entre las muestras (Sokal & Rohlf., 1962). Un valor elevado de este coeficiente indica una alta correspondencia entre el clúster y los datos multivariados, respaldando así la robustez del agrupamiento (Sokal & Rohlf., 1962).

Para determinar si la variación en el perfil de proteínas presentaba correspondencia con la distancia geográfica entre los individuos, se calcularon las distancias geodésicas empleando la fórmula de Haversine para estimar las distancias en kilómetros entre todos los pares de puntos (Sinnott., 1984), a partir de las coordenadas obtenidas de la base de datos de la colección herpetológica UIS (Tabla 1), correspondientes a los individuos de este estudio. Posteriormente, se aplicó una prueba de Mantel (Mantel., 1967; Legendre, P. & Legendre, L., 2012), contrastando la matriz de distancias con la matriz geográfica. Además, se evaluó si esta relación espacial dependía de grupos de proteínas específicos. Para ello, se aplicaron pruebas de Mantel a cada grupo.

Finalmente, para identificar qué familias proteicas explicaban las diferencias entre los grupos de individuos, se empleó un análisis SIMPER (Clarke.,1993). Este método descompone la disimilitud promedio entre individuos en función de la contribución de cada grupo de proteínas,

permitiendo determinar cuáles son responsables del mayor porcentaje de diferenciación (Clarke, & Warwick., 2001). Todos los análisis se realizaron en el software R v4.4.2 (R Core Team, 2024) mediante el lenguaje e interfaz gráfica de RStudio, utilizando los paquetes *cluster* (Maechler et al., 2025), *geosphere* (Hijmans., 2025) y *vegan* (Oksanen et al., 2025).

4. Resultados

4.1. Manejo del veneno

Las muestras de veneno de los individuos (Tabla 1, Figura 1), se transportaron en hielo seco hasta el Laboratorio de Espectrometría Atómica y Molecular (LEAM) en el parque tecnológico Guatiguará. Se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante dos horas, para posteriormente ser liofilizadas completamente en treinta horas en el liofilizador de mesa Labcono Freeze Dryer® (Tabla 3). El veneno liofilizado fue nuevamente almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

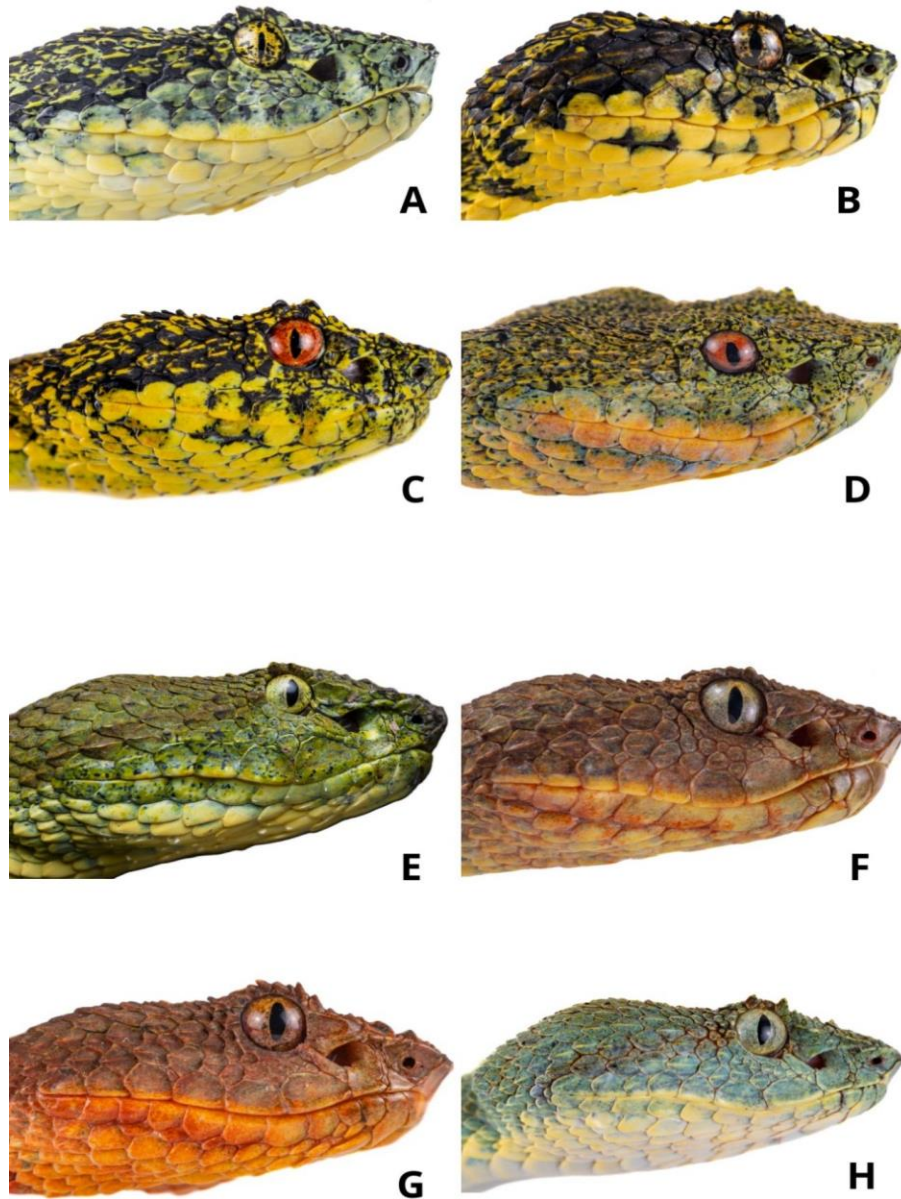
Tabla 3.

Cantidades de veneno liofilizado obtenidas por individuo

Individuo	Total, liofilizado (mg)
A	16,24
B	14,18
C	9,42
D	13,45
E	19,15
F	12,25
G	13,18
H	18,21

Figura 1.

Individuos de Bothriechis klebbai (A-D) y Bothriechis khwargi (E-H) utilizados en el estudio



Nota. Ejemplares provenientes de la Colección Herpetológica del Museo de Historia Natural de la Universidad Industrial de Santander (MHN–UIS). (A–D) Correspondientes a *Bothriechis klebbai*: (A) Vereda Cedrales, quebrada La Profunda, municipio de Guacamayo, Santander; (B) Simacota,

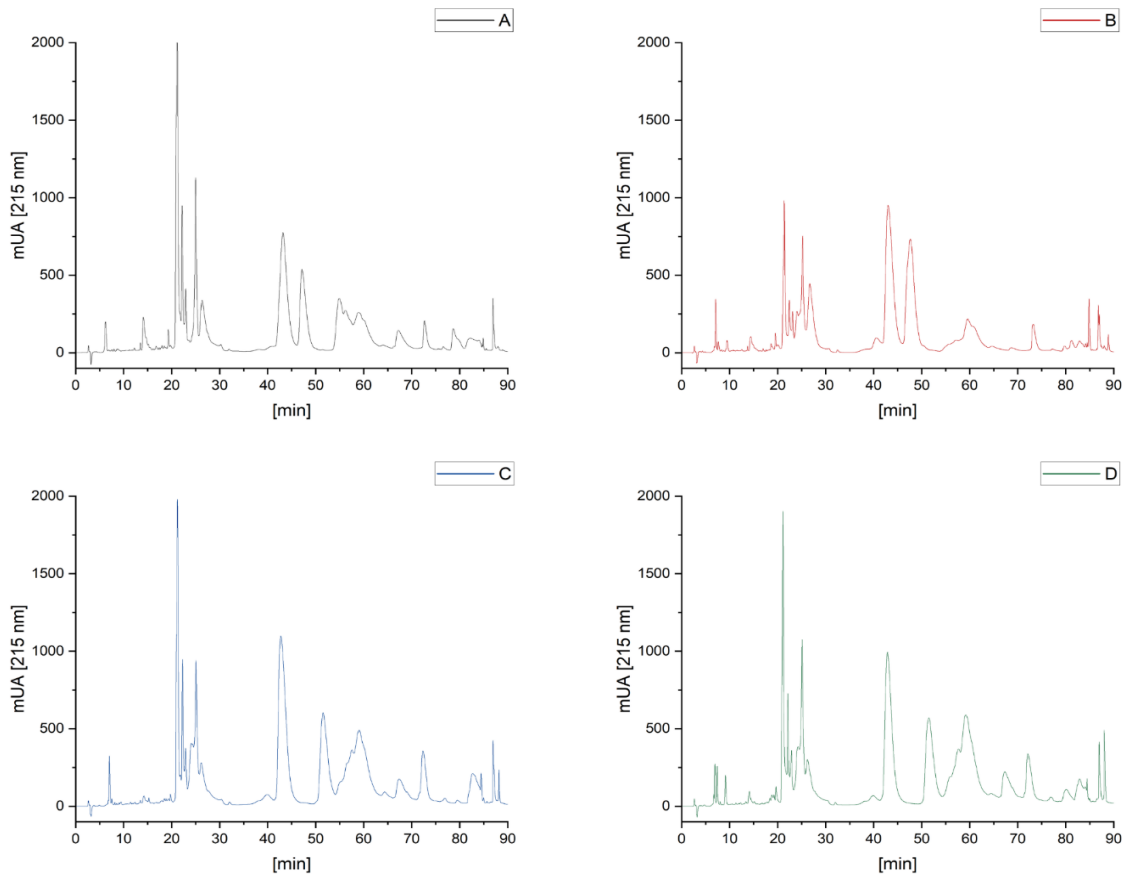
Santander; (C) Vereda Esparta, municipio de Santa Bárbara, Santander; (D) Vereda Esparta, municipio de Santa Bárbara, Santander. (E–H) Correspondientes a *Bothriechis khwargi*, recolectados en San Vicente de Chucurí, Santander: (E) Vereda Morelia, sector El Boquerón; (F) Vereda Morelia, sector El Boquerón; (G) Vereda Chanchón, sector Los Medios; (H) Vereda Mérida Alta, sector Varsovia. Todas las imágenes corresponden a los ejemplares cuyos venenos fueron utilizados en los análisis experimentales. Fotografías: Elson Meneses Pelayo.

4.2. Fraccionamiento cromatográfico del veneno

Se obtuvo el perfil cromatográfico de los individuos del género *Bothriechis* bajo las condiciones de gradiente previamente establecidas (Tabla 2, ver cromatogramas individuales en las figuras 2 y 3).

Figura 2.

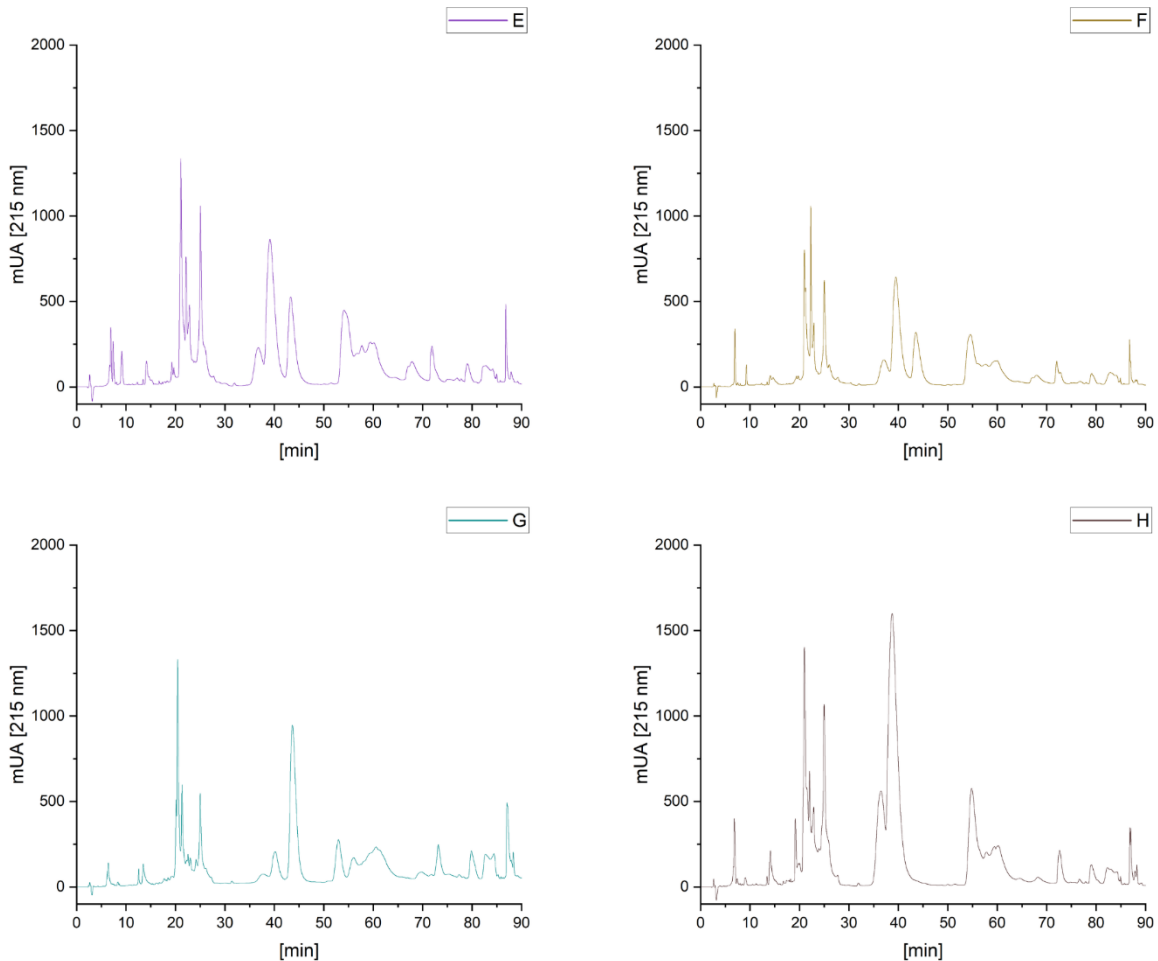
Cromatogramas individuales de los individuos de Bothriechis klebbai.



Nota. (A) Vereda Cedrales, quebrada La Profunda, municipio de Guacamayo, Santander; (B) Simacota, Santander; (C) Vereda Esparta, municipio de Santa Bárbara, Santander; (D) Vereda Esparta, municipio de Santa Bárbara, Santander.

Figura 3.

Cromatogramas individuales de los individuos de Bothriechis khwargi.



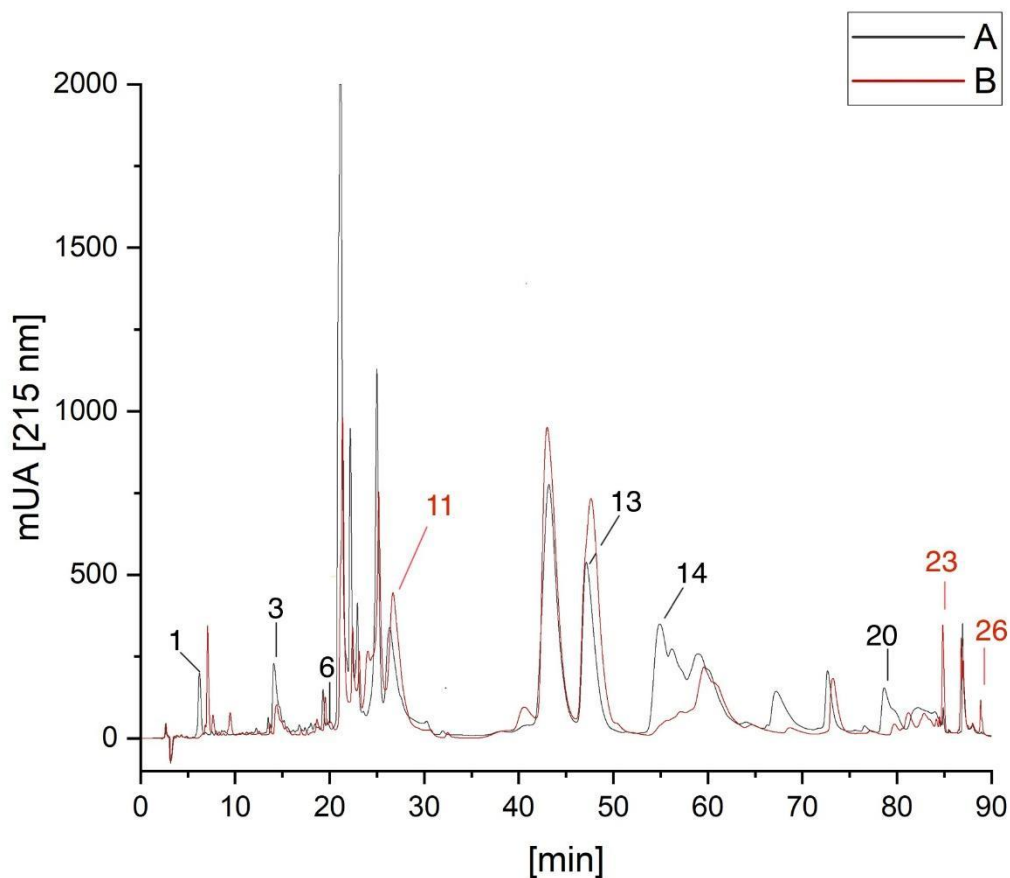
Nota. (E) Vereda Mérida Alta, sector Varsovia; (F) Vereda Chanchón, sector Los Medios; (G) Vereda Morelia, sector El Boquerón; (H) Vereda Morelia, sector El Boquerón.

4.2.1. Sobreposición de cromatogramas *Bothriechis klebbai*

Se observaron patrones de elución distintivos que presentaron a priori asociación cualitativa con la localidad de origen de las muestras (Figura 4).

Figura 4.

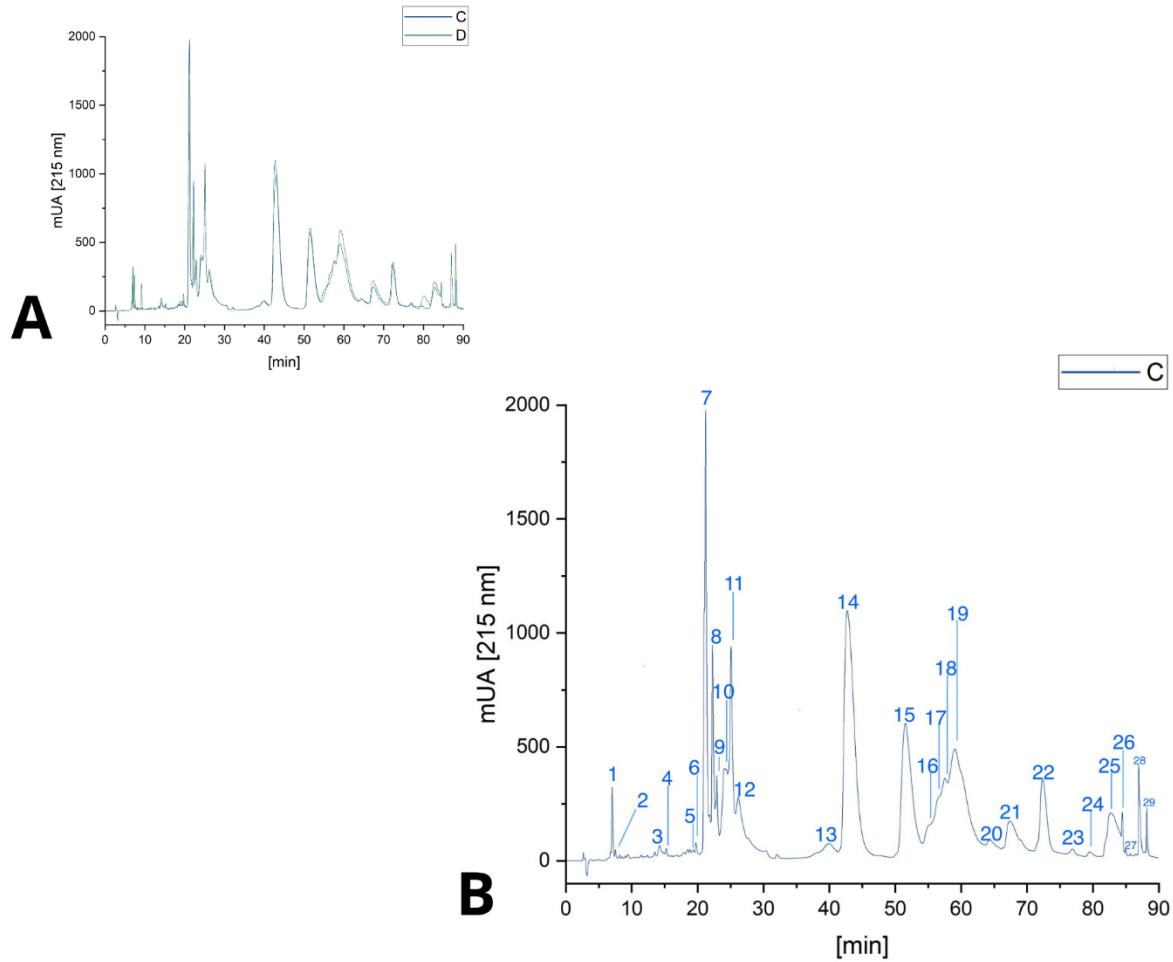
Cromatogramas sobrepuestos de los individuos de Bothriechis klebbai (A-B)



Los individuos A (Guacamayo) y B (Simacota), presentan un patrón de elución globalmente homogéneo. No obstante, se observan variaciones en la abundancia relativa de los picos 3A, 11B y 20A, así como la presencia exclusiva de los picos 1A y 14A en el individuo A, los cuales no se detectaron en B.

Figura 5.

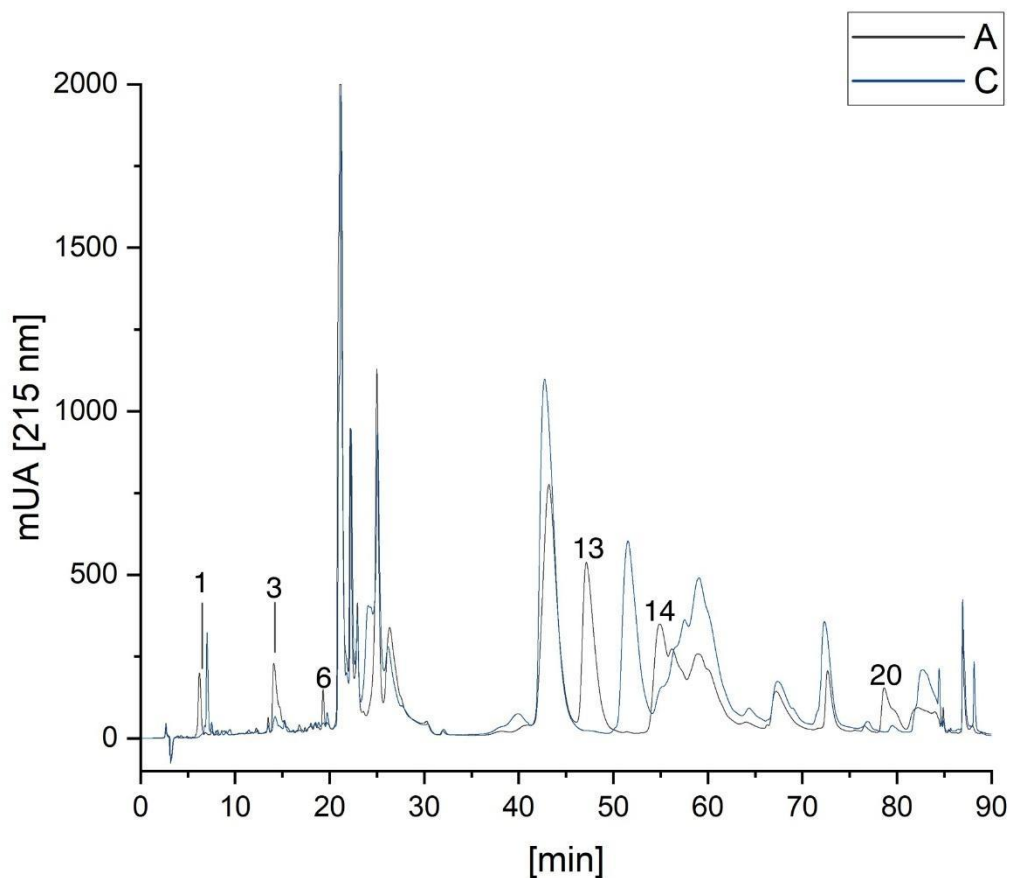
(A). Cromatogramas sobrepuestos de los individuos de *Bothriechis klebbai* (C-D); (B). total, de picos del individuo C



Los individuos C y D, ambos provenientes del municipio de Santa Bárbara, presentaron un patrón de elución indistinguible entre sí (Figura 5A). El individuo que recogió la mayor variabilidad en el número de picos entre los cuatro analizados fue el individuo C, con un total de 29 picos (Figura 5B). El patrón de elución es altamente homogéneo, coherente con la sobreposición cromatográfica observada previamente entre los individuos A y B (Figura 4).

Figura 6.

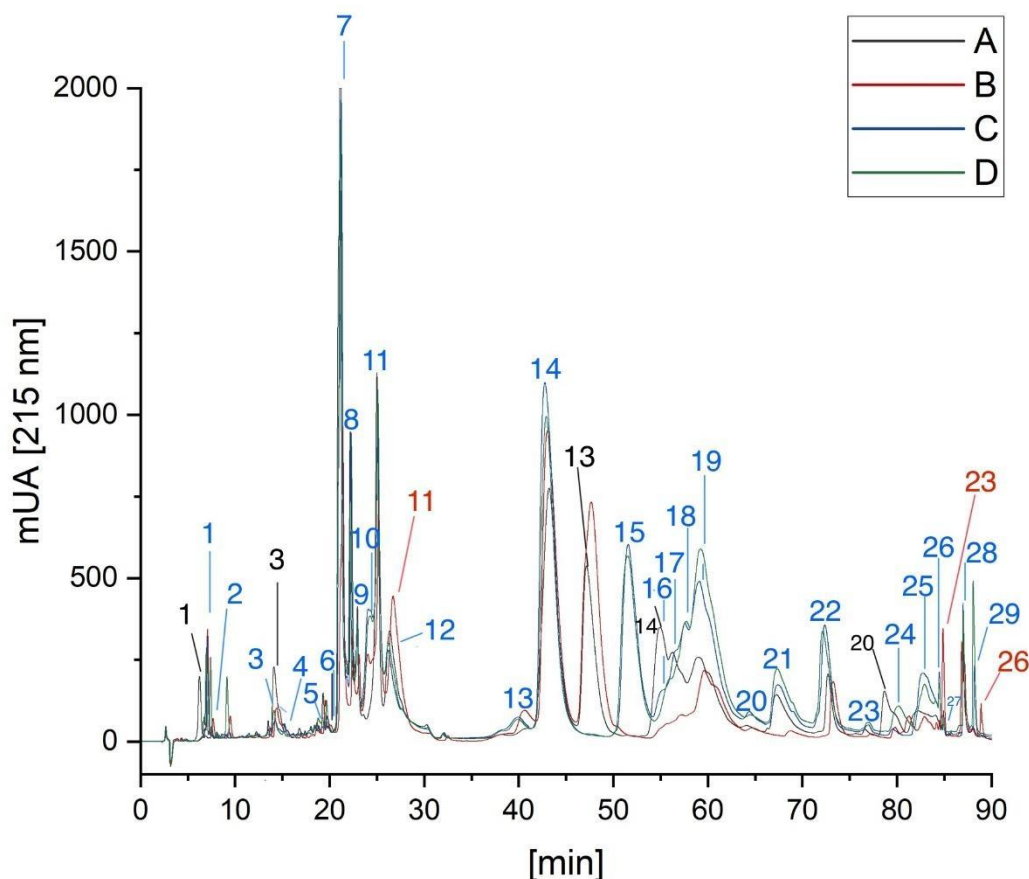
Cromatogramas sobrepuestos de los individuos de Bothriechis klebbai (A-C)



En la sobreposición cromatográfica entre los individuos A y C (Figura 6), pertenecientes a la misma especie, pero geográficamente distantes, se evidencian variaciones en la abundancia relativa de los picos 3A, 6A, 20A, 1C, 2C, 25C, 26C, 28C y 29C (Revisar Figura 5B). Además, la muestra A presenta eluciones exclusivas en los picos 1, 13 y 14.

Figura 7.

Cromatogramas sobrepuestos de los cuatro individuos de Bothriechis klebbai (A-D), con numeración de picos



Nota. Picos de A en color negro, picos de B en color rojo, picos de C en color azul.

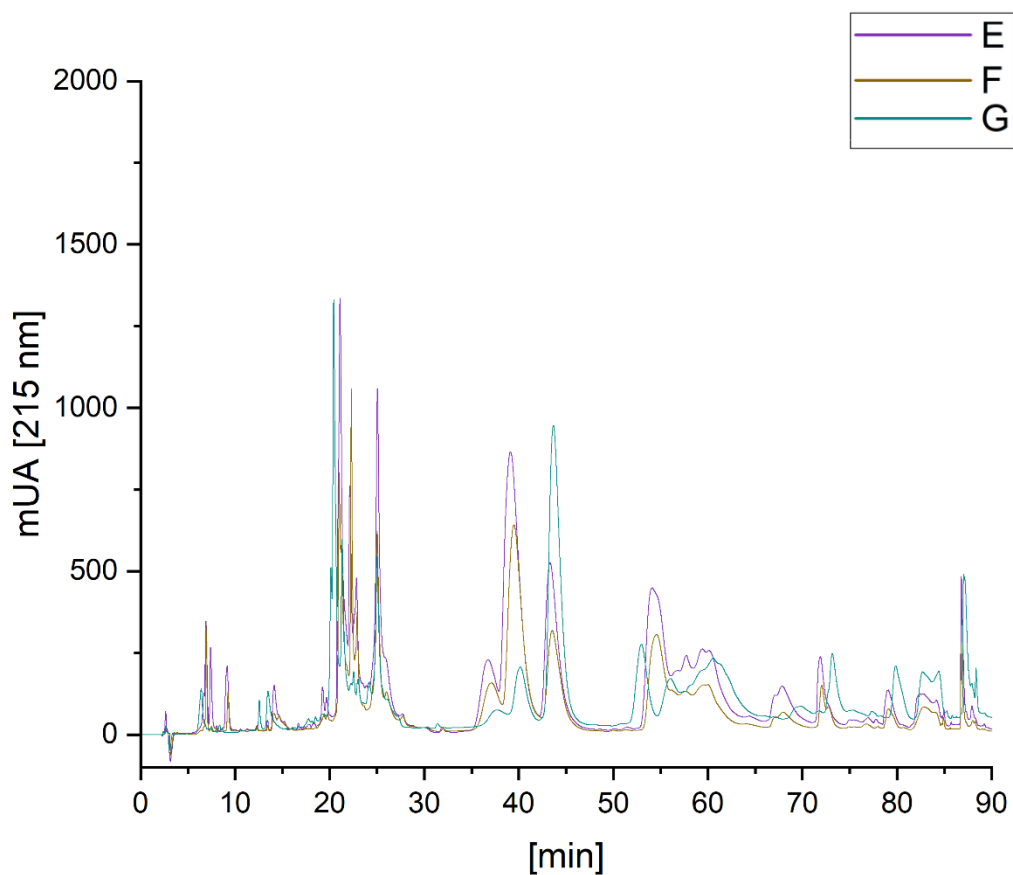
A partir de los perfiles cromatográficos individuales, se construyó un perfil conglomerado representativo de *Bothriechis klebbai*. Para ello, se integraron los picos característicos detectados en los individuos A (1, 3, 13, 14, 20) y B (11, 23, 26), junto con el total de picos del individuo C, que aportó la mayor diversidad del grupo. Este perfil integrado resume la variabilidad observada entre las muestras y constituye una referencia del patrón de elución de la especie.

4.2.2. Sobreposición de cromatogramas *Bothriechis khwargi*

Se observaron patrones de elución distintivos que presentaron a priori asociación cualitativa con la localidad de origen de las muestras (Figura 8).

Figura 8.

Cromatogramas sobrepuestos de los tres individuos de Bothriechis khwargi (E-F-G)

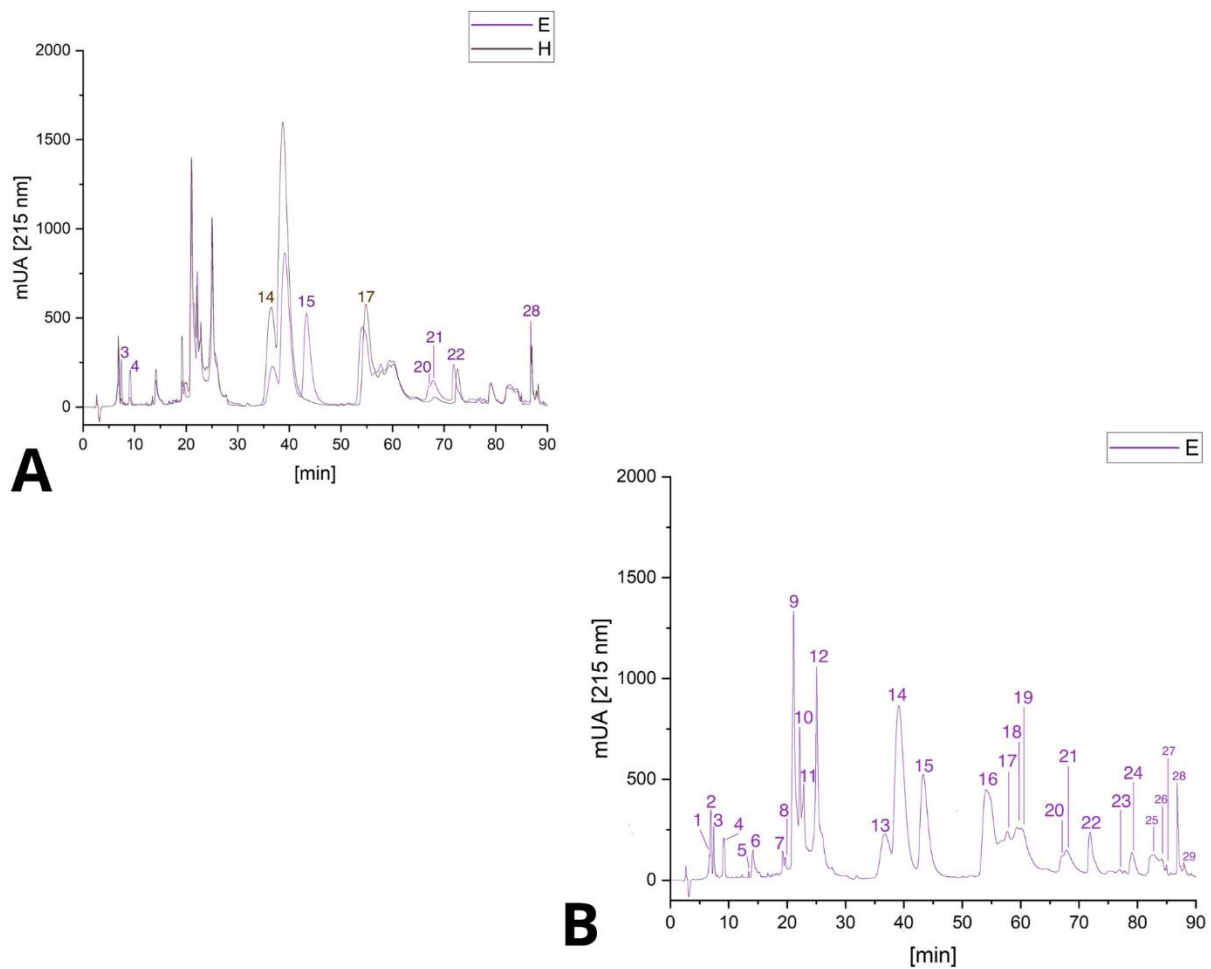


Nota. Los tres individuos provienen de localidades geográficamente próximas: E y F pertenecen a la misma localidad, mientras que G procede de una zona muy cercana.

Los perfiles cromatográficos de los individuos E, F y G muestran una elevada homogeneidad (Figura 8), pese a la variación intraespecífica observada en la abundancia relativa de los picos. No obstante, las eluciones son conservadas y similares entre sí.

Figura 9.

(A). Cromatogramas sobrepuestos de los individuos de *Bothriechis khwargi* (E-H); (B). total, de picos del individuo E

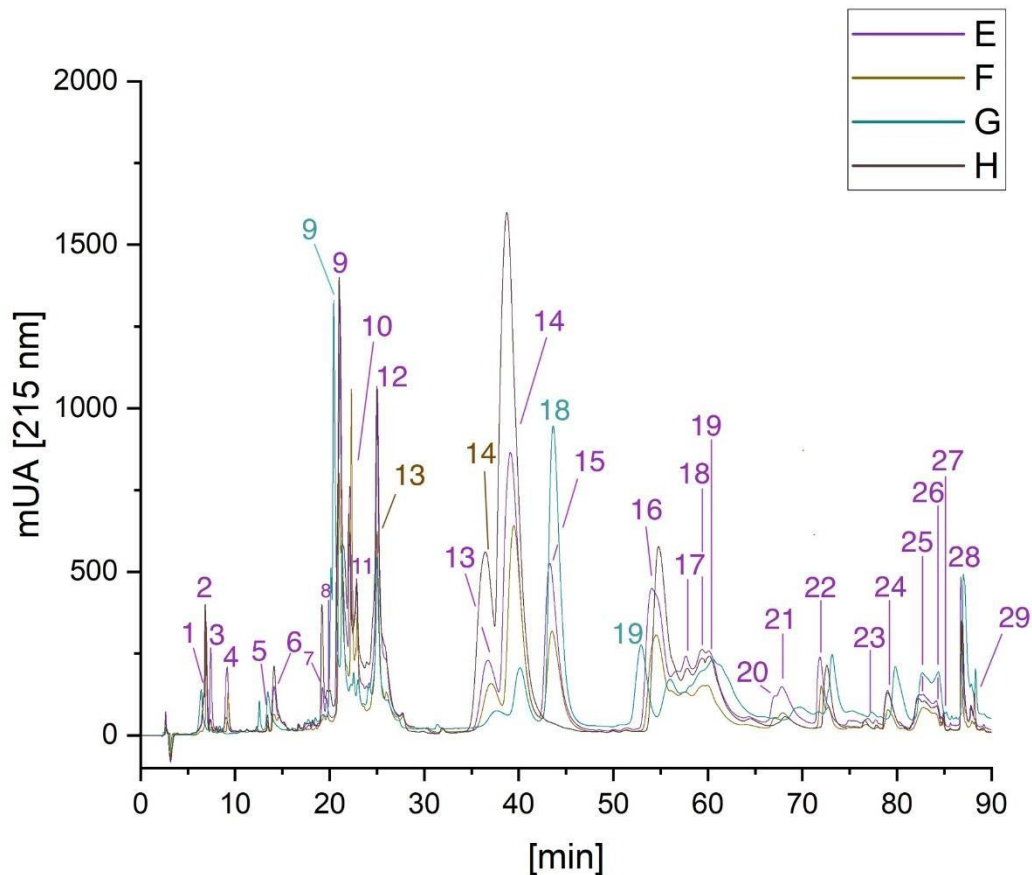


Si bien se observan variaciones en la absorbancia relativa de las eluciones proteicas, destaca la ausencia del pico 15E en la muestra H (Figura 9A), que sí está presente en los demás

individuos (Figura 8 y 9A). Como se muestra en la Figura 9B, el individuo E presentó la mayor riqueza de picos entre los cuatro analizados de *B. khwargi*, con un total de 29 eluciones.

Figura 10.

Cromatogramas sobrepuestos de los cuatro individuos de Bothriechis khwargi (E-H), con numeración de picos



A partir de los perfiles cromatográficos individuales, se construyó un perfil conglomerado representativo de *Bothriechis khwargi*. Para ello, se integraron los picos característicos detectados en los individuos H (13, 14) y G (9, 18, 19), junto con el total de picos del individuo E, que aportó

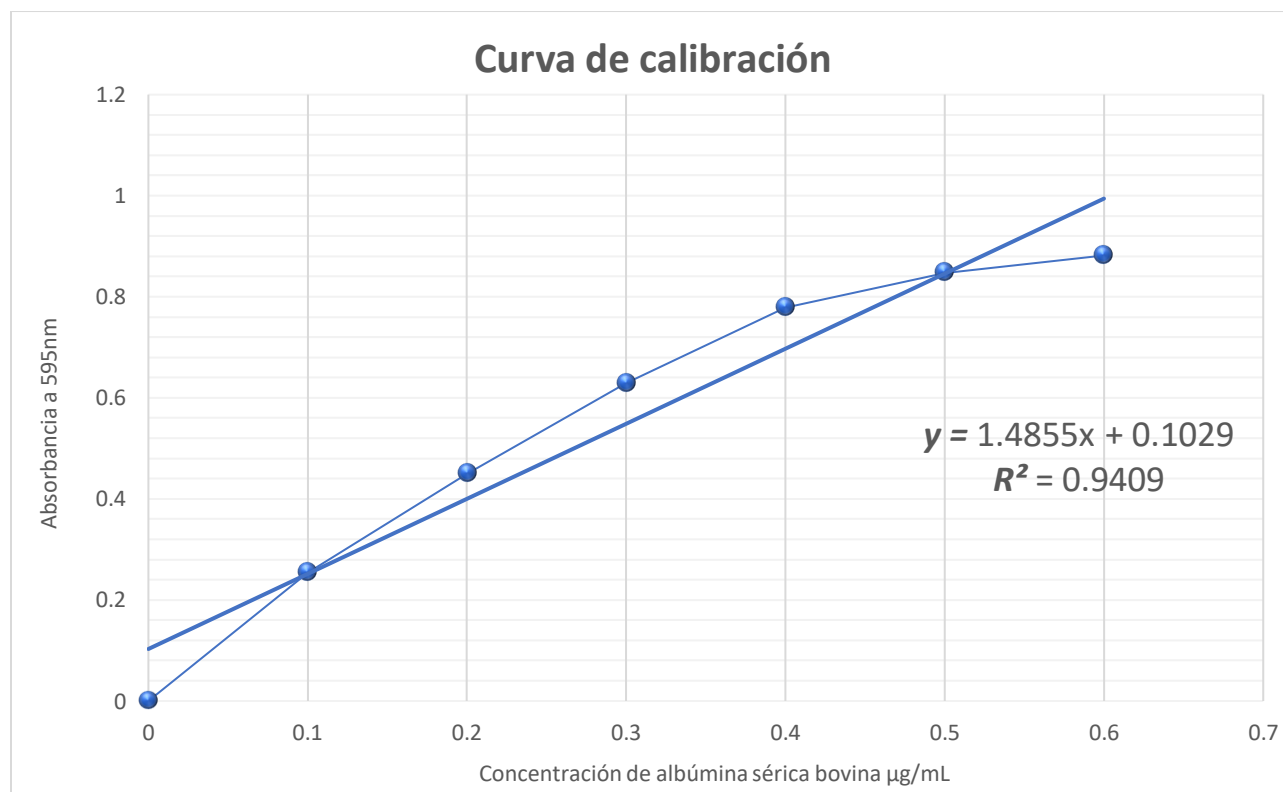
la mayor diversidad del grupo. Este perfil resume la variabilidad observada entre las muestras y constituye una referencia del patrón de elución de la especie.

4.3. Cuantificación de proteínas del veneno

La curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA), utilizada como referencia para la determinación de concentraciones, presentó un coeficiente de $R^2 = 0.94$, confirmando una relación lineal adecuada entre la absorbancia y la concentración en el rango de 0 – 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 11).

Figura 11.

Curva de calibración con patrón de albúmina sérica bovina ($\geq 98\%$).



Nota. La curva de calibración se construyó con estándares de BSA (0 – 1000 $\mu\text{g/mL}$) medidos por triplicado a 595 nm en microplaca en un espectrofotómetro (Synergy HT, BioTek). El ajuste lineal

presentó un coeficiente de $R^2 = 0.94$, evidenciando la relación directa entre la concentración proteica y la absorbancia.

Los análisis evidenciaron concentraciones relativamente homogéneas entre réplicas (Tabla 4), con valores que oscilaron entre 0.72 y 0.88 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Esta consistencia permitió estandarizar los volúmenes de carga y las diluciones de buffer aplicadas en los ensayos de SDS-PAGE, asegurando condiciones comparables entre muestras.

Tabla 4.

Cuantificación de proteínas del veneno crudo de los especímenes de Bothriechis mediante el método de Bradford.

Muestra	Absorbancia	Abs – Blanco	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Volumen de la muestra (μL)	Volumen buffer carga 1X (μL)
Blanco	0.430				
A	1.801	1.371	0.85	11.71	8.29
B	1.667	1.237	0.77	13.1	6.9
C	1.717	1.287	0.8	12.55	7.45
D	1.841	1.411	0.88	11.36	8.64
E	1.661	1.231	0.76	13.17	6.83
F	1.603	1.173	0.72	13.88	6.12
G	1.673	1.243	0.77	13.03	6.97
H	1.679	1.249	0.77	12.96	7.04

Nota. Las concentraciones se calcularon a partir de la curva de calibración con BSA. Los volúmenes indicados corresponden a la preparación para una carga de 20 μL en SDS-PAGE.

Las fracciones seleccionadas bajo el criterio que se detalla en la sección 3.4, fueron cuantificadas. El objetivo fue estandarizar una carga de 10 μg de proteína por fracción en el gel de electroforesis. Los valores de absorbancia, concentración y los volúmenes de muestra y buffer de

carga utilizados se presentan para *Bothriechis klebbai* y *Bothriechis khwargi* en las Tablas 5 y 6, respectivamente. Para las fracciones con una cantidad total de proteína $\geq 10 \mu\text{g}$, el volumen de muestra se ajustó con buffer de carga 1X para alcanzar la carga óptima en un volumen final de 20 μL por pocillo. Cuando la proteína total fue inferior a 10 μg , se cargó la totalidad del volumen disponible para priorizar la representatividad de los componentes en el perfil electroforético.

Tabla 5.

Valores de absorbancia, concentración y volúmenes de carga correspondientes a fracciones proteicas de Bothriechis klebbai separadas por RP-HPLC.

Individuo	Fracción	Absorbancia	Abs – Blanco	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Volumen de la muestra (μL)	Volumen buffer carga 1X (μL)	Proteínas por fracción (μg)
Blanco		0.556					
A	1	1.034	0.478	0.25	18	2	4.55
	3	1.094	0.538	0.30	18	2	5.27
	6	1.088	0.532	0.29	18	2	5.20
	13	2.458	1.902	1.21	8.26	11.74	10
	14	2.206	1.650	1.04	9.60	10.40	10
	20	1.628	1.072	0.65	15.33	4.67	10
B							
B	11	1.144	0.588	0.33	18	2	5.87
	23	1.340	0.784	0.45	18	2	8.25
	26	1.260	0.704	0.40	18	2	7.28
Blanco		0.407					
C							
C	1	0.836	0.429	0.22	18	2	3.95
	2	0.924	0.517	0.27	18	2	5.01
	3	0.906	0.499	0.26	18	2	4.79
	4	0.858	0.451	0.23	18	2	4.21
	5	0.882	0.475	0.25	18	2	4.50
	6	0.820	0.413	0.20	18	2	3.75
	7	0.858	0.451	0.23	18	2	4.21
	8	0.852	0.445	0.23	18	2	4.14
	9	0.830	0.423	0.21	18	2	3.87
	10	0.940	0.533	0.28	18	2	5.21
	11	0.894	0.487	0.25	18	2	4.65
	12	0.958	0.551	0.30	18	2	5.42
	13	1.084	0.677	0.38	18	2	6.95
	14	1.202	0.795	0.46	18	2	8.38
	15	2.474	2.067	1.32	7.56	12.44	10

16	2.406	1.999	1.27	7.83	12.17	10
17	1.508	1.101	0.67	14.88	5.12	10
18	1.736	1.326	0.82	12.12	7.88	10
19	1.842	1.435	0.89	11.15	8.85	10
Blanco	0.505					
20	2.982	2.477	1.598	6.26	13.74	10
21	1.248	0.743	0.430	18	2	7.75
22	1.621	1.116	0.681	14.66	5.34	10
23	1.538	1.033	0.626	15.97	4.03	10
24	0.934	0.429	0.219	18	2	3.95
25	1.004	0.499	0.266	18	2	4.79
26	2.296	1.791	1.136	8.80	11.20	10
27	0.964	0.459	0.239	18	2	4.31
28	0.946	0.441	0.227	18	2	4.09
29	1.016	0.511	0.274	18	2	4.94

Nota. Nota. Cada conjunto de fracciones corresponde a una medición independiente realizada con su respectivo blanco. Los valores de $Abs - Blanco$ y la cuantificación de proteínas de cada individuo se calcularon utilizando únicamente el blanco asociado a esa medición. Las secciones correspondientes a cada medición (blanco + fracciones procesadas con ese mismo blanco) se indican mediante sombreado diferenciado en la tabla.

Tabla 6.

Valores de absorbancia, concentración y volúmenes de carga correspondientes a fracciones proteicas de Bothriechis khwargi separadas por RP-HPLC.

Individuo	Fracción	Absorbancia	Abs – Blanco	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Volumen de la muestra (μL)	Volumen buffer carga 1X (μL)	Proteínas por fracción (μg)
Blanco		0.525					
E	1	1.034	0.509	0.273	18	2	4.92
	2	1.026	0.501	0.267	18	2	4.82
	3	1.034	0.509	0.273	18	2	4.92
	4	1.038	0.513	0.276	18	2	4.96
	5	1.002	0.477	0.251	18	2	4.53
	6	1.041	0.516	0.278	18	2	5.00
	7	1.024	0.499	0.266	18	2	4.79
	8	1.032	0.507	0.272	18	2	4.89
	9	1.014	0.489	0.259	18	2	4.67
	10	1.012	0.487	0.258	18	2	4.65
	11	1.052	0.527	0.285	18	2	5.13
	12	1.278	0.753	0.437	18	2	7.87
	13	2.054	1.529	0.960	10.42	9.58	10

14	2.240	1.715	1.085	9.21	10.79	10
15	2.622	2.097	1.342	7.45	12.55	10
16	2.668	2.143	1.373	7.28	12.72	10
17	1.738	1.213	0.747	13.38	6.62	10
18	1.990	1.465	0.916	10.91	9.09	10
19	2.018	1.493	0.935	10.69	9.31	10
Blanco	0.525					
20	1.742	1.217	0.749	13.33	6.67	10
21	1.840	1.315	0.815	12.26	7.74	10
22	1.476	0.951	0.570	17.52	2.48	10
23	1.068	0.543	0.296	18	2	5.33
24	1.714	1.189	0.731	13.68	6.32	10
25	1.684	1.159	0.710	14.07	5.93	10
26	1.280	0.755	0.438	18	2	7.90
27	1.036	0.511	0.274	18	2	4.94
28	1.010	0.485	0.257	18	2	4.62
29	1.036	0.511	0.274	18	2	4.94
Blanco	0.562					
G						
9	0.978	0.416	0.210	18	2	3.79
18	2.650	2.088	1.336	7.48	12.52	10
19	2.168	1.606	1.011	9.88	10.12	10
H						
13	1.008	0.446	0.230	18	2	4.15
14	1.064	0.502	0.268	18	2	4.83

Nota. Cada conjunto de fracciones corresponde a una medición independiente realizada con su respectivo blanco. Los valores de *Abs – Blanco* y la cuantificación de proteínas de cada individuo se calcularon utilizando únicamente el blanco asociado a esa medición. Las secciones correspondientes a cada medición (blanco + fracciones procesadas con ese mismo blanco) se indican mediante sombreado diferenciado en la tabla.

Los datos de cuantificación revelaron una amplia variación en la concentración de proteínas entre las diferentes fracciones cromatográficas. Para la mayoría de las fracciones de alto peso molecular o más abundantes, fue posible ajustar la carga a los 10 µg deseados (p. ej., fracciones 13-20 de *B. klebbai*, individuo A; fracciones 13-22 de *B. khwargi*, individuo E). Sin embargo, las fracciones correspondientes a proteínas de menor abundancia o que eluyeron temprano en la cromatografía, presentaron concentraciones bajas, resultando en una cantidad total de proteína inferior a 10 µg (p. ej., numerosas fracciones del individuo C de *B. klebbai* y del

individuo G de *B. khwargi*). En estos casos, se cargó la totalidad del volumen de la fracción disponible para asegurar la representación de estos componentes en el análisis electroforético. Esta estrategia permitió construir perfiles comparativos que reflejan tanto las proteínas mayoritarias como los componentes minoritarios de los venenos.

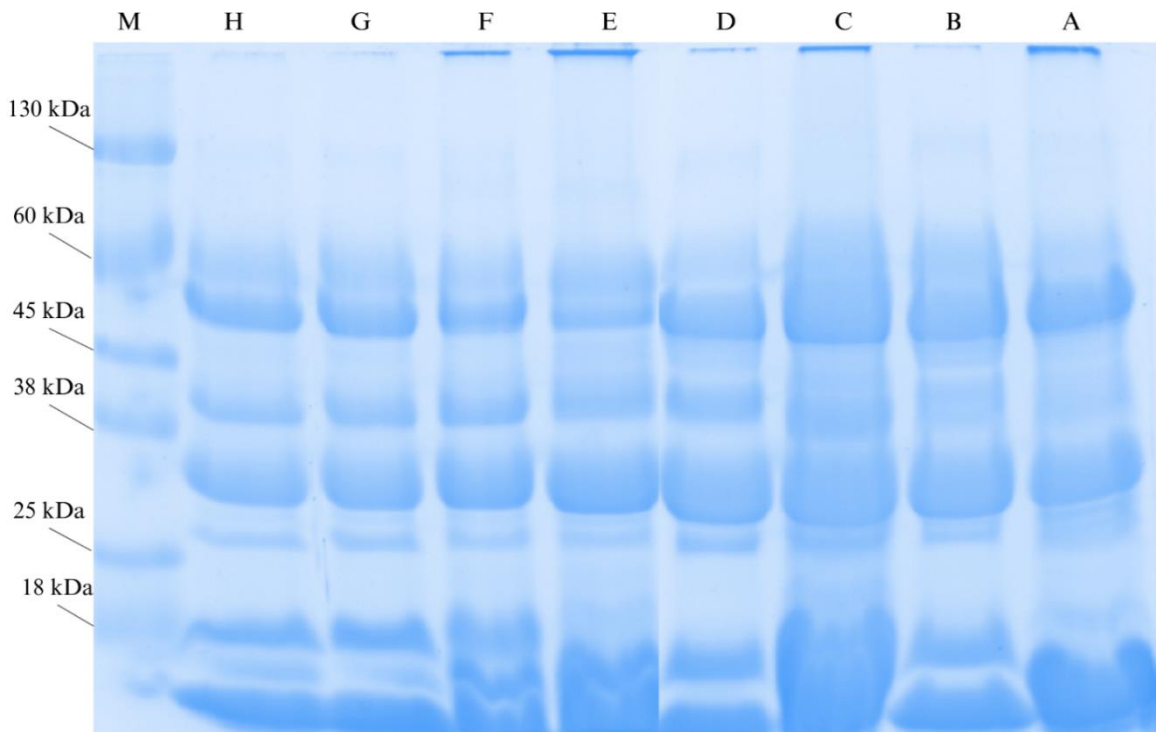
4.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida del veneno

4.4.1. Electroforesis del veneno crudo

Los perfiles electroforéticos de los venenos crudos de las dos especies de *Bothriechis*, cuyas concentraciones se reportan en la sección 4.3, Tabla 4, fueron analizadas en geles de poliacrilamida al 12% (SDS–PAGE). Mostraron un patrón general semejante entre los individuos analizados, con una mayor concentración de proteínas en la región comprendida entre 18 y 45 kDa, donde se localizaron la mayoría de las bandas (Figura 12). Asimismo, se detectaron bandas definidas en torno a 60 kDa hasta los 130 kDa, presentes en la mayoría de las muestras.

Figura 12.

Perfil electroforético del veneno crudo en gel de poliacrilamida SDS–PAGE al 12%.



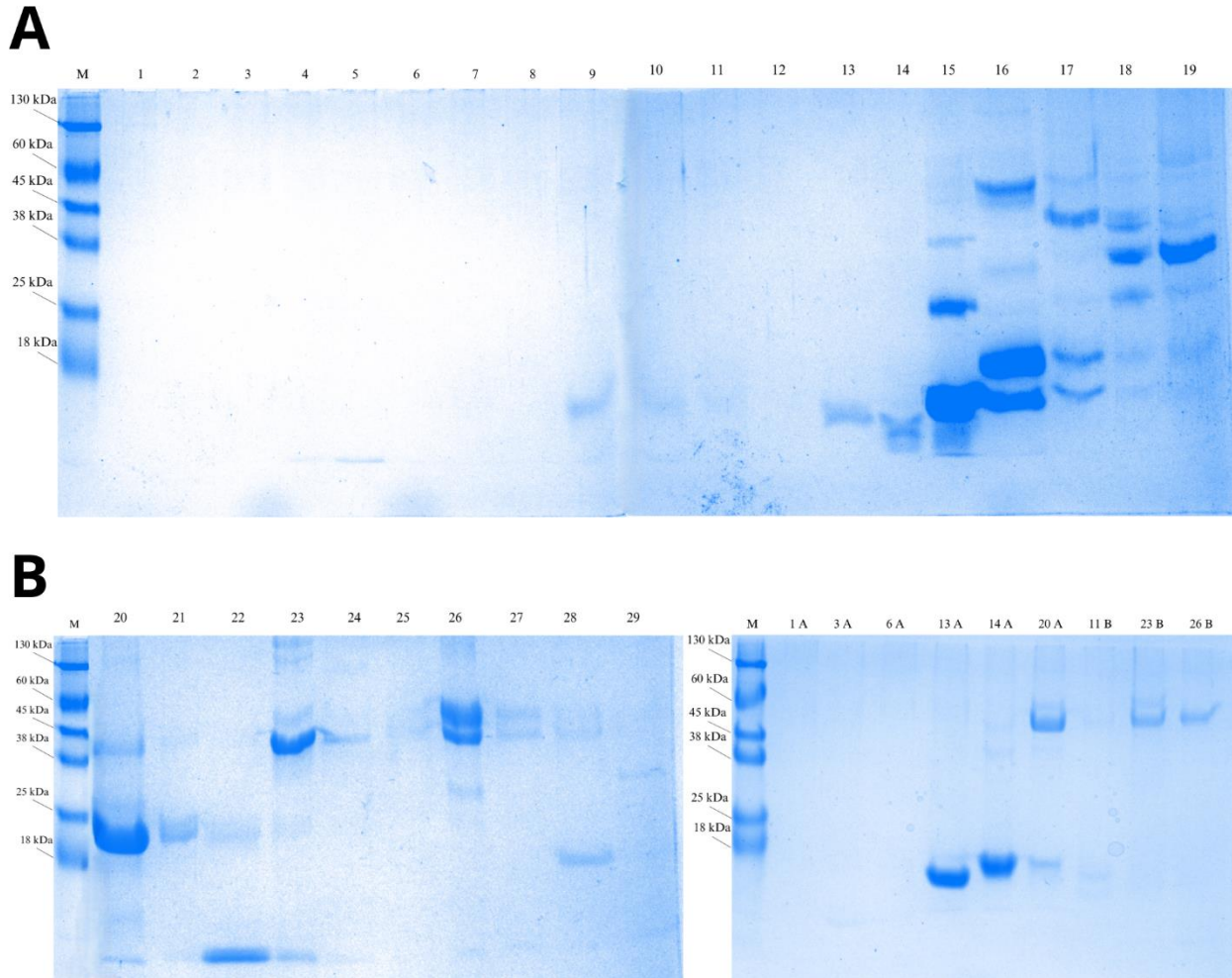
Nota. Valores en el marcador de peso molecular (M) expresados en kDa, de venenos crudos de individuos de *Bothriechis klebbai* (A – D) y *Bothriechis khwargi* (E – H).

4.4.2. Electroforesis de las fracciones de *Bothriechis klebbai*

Las fracciones obtenidas del RP–HPLC, seleccionadas con la metodología descrita en la sección 3.2.1, a partir del perfil cromatográfico conglomerado (Figura 7) y cuyas concentraciones se reportan en la sección 4.3 – Tabla 5, fueron analizadas en geles de poliacrilamida al 12% (SDS–PAGE).

Figura 13.

Perfil electroforético de las fracciones recolectadas de HPLC de B. klebbai en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%.



Nota. Valores en el marcador de peso molecular (M) expresados en kDa, fracciones obtenidas de HPLC del veneno de *Bothriechis klebbai*, revisar Figura 7.

Las fracciones iniciales (1–12) no mostraron bandas detectables; sin embargo, a partir de la fracción 13 se observaron bandas bien definidas (Figura 13). Estas se concentraron principalmente entre 18 y 50 kDa, aunque también se registraron proteínas de mayor peso molecular (~60–130 kDa) en varias fracciones. En las fracciones 15 a 21, 23, 26, 27, 20A, 23B, la

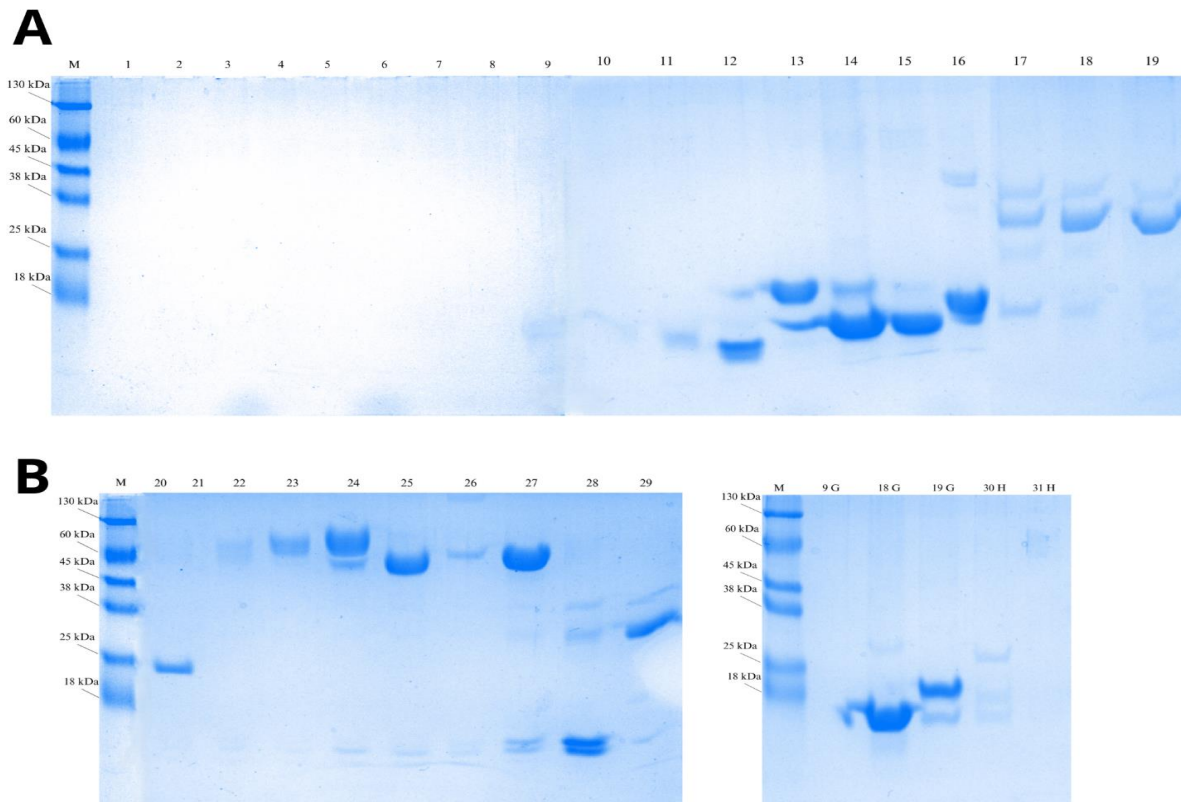
fracción recolectada presentó múltiples bandas, lo que evidencia simultaneidad de proteínas eluyendo en un mismo intervalo.

4.4.3. Electroforesis de las fracciones de *Bothriechis khwargi*

Las fracciones obtenidas del RP-HPLC, seleccionadas con la metodología descrita en la sección 3.2.1, a partir del perfil cromatográfico conglomerado (Figura 10) y cuyas concentraciones se reportan en la sección 4.3 – Tabla 6, fueron analizadas en geles de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE).

Figura 14.

Perfil electroforético de las fracciones recolectadas de HPLC de B. khwargi en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%.



Nota. Valores en el marcador de peso molecular (M) expresados en kDa, fracciones obtenidas de HPLC del veneno de *Bothriechis khwargi*, revisar Figura 10.

Las fracciones iniciales (1–10) no mostraron bandas detectables; sin embargo, a partir de la fracción 11 se observaron bandas bien definidas (Figura 14). Las bandas predominantes se ubicaron en el rango de 18 a 50 kDa, complementadas por componentes de mayor peso molecular (~60–130 kDa) distribuidos en varias fracciones. Las fracciones 12–19, 24, 28, 29, así como las fracciones específicas 19G y 30H, exhibieron más de una banda, lo que confirma la presencia de múltiples proteínas eluyendo al mismo tiempo.

4.5. Análisis de la variabilidad en el perfil proteico del veneno de las dos especies

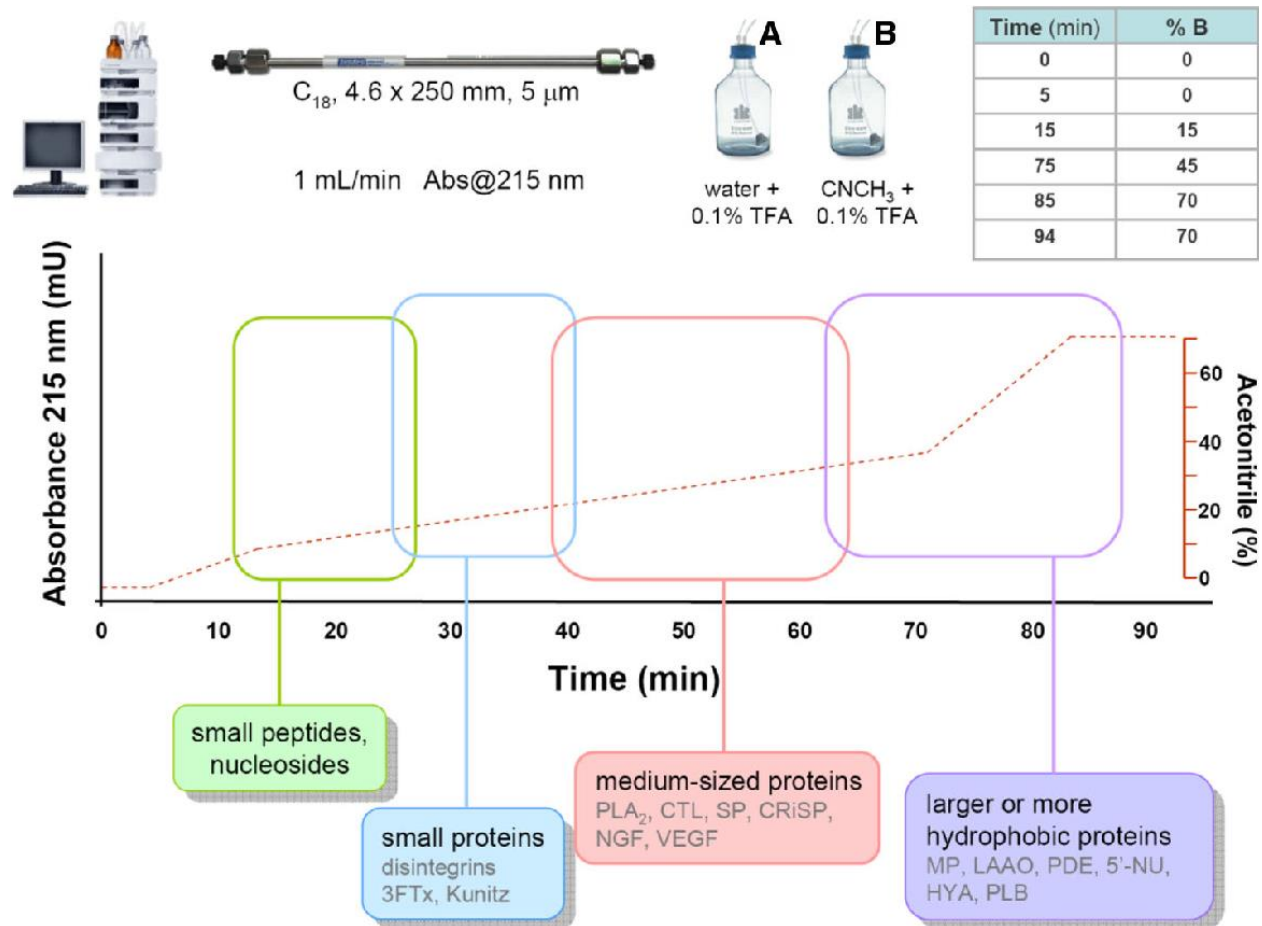
4.5.1. Identificación de grupos proteicos

La asignación de los picos cromatográficos a posibles grupos proteicos se realizó integrando la información obtenida del patrón de elución con las características bioquímicas previamente reportadas para las principales familias de toxinas descritas en venenos de vipéridos. Los tiempos de elución, interpretados en función del incremento de ACN en el gradiente, permitieron inferir la presencia de grupos de proteínas de distinta hidrofobicidad, ya que los componentes más polares eluyeron en las primeras etapas de la corrida cromatográfica, mientras que los más hidrofóbicos lo hicieron en fases tardías (Figura 15).

Figura 15.

Esquema del proceso de fraccionamiento de venenos mediante RP-HPLC. Se indican las

regiones aproximadas de elución para las principales familias proteicas comúnmente detectadas en venenos de serpientes.



Nota. En el diagrama se indican los rangos aproximados de elución asociados a diferentes grupos de toxinas según su polaridad: componentes altamente polares, como péptidos y nucleótidos, eluyen entre 10 a 25 minutos; inhibidores de tipo Kunitz y otras proteínas pequeñas se observan típicamente entre 25 a 40 minutos; proteínas de tamaño medio incluyendo CRISP, PLA₂ y SVSP, eluyen entre 40 a 65 minutos; y proteínas de mayor tamaño o mayor hidrofobicidad, como las SVMP y LAO, aparecen entre 60 a 90 minutos. Figura reproducida y adaptada de Lomonte y Calvete., 2017).

Con el fin de contextualizar los resultados derivados de la elución por gradiente y comprender la posible correspondencia entre los picos cromatográficos y las familias de toxinas presentes en el veneno, se incorporó información proteómica previamente reportada para especies del género *Bothriechis*. La Tabla 7 presenta la comparación de las abundancias relativas de las principales familias de proteínas en el proteoma de los venenos de neonatos y adultos de *B. schlegelii*.

Tabla 7.

Abundancia relativa (en % del total del proteoma del veneno) de las principales familias de proteínas presentes en los venenos de neonatos y adultos de B. schlegelii.

Familia proteica	Adulto	Neonato
BPP	13.4	15.9
svVEGF	-	2.8
Kazal	8.3	-
PLA ₂	43.8	12.1
CRISP	2.1	11.3
SVSP	5.8	20.6
LAO	8.9	3.4
CTL	-	-
SVMP	17.7	8.1

Nota. Tabla tomada y adaptada de *Proteomic analysis of venom variability and ontogeny across the arboreal palm-pitvipers (genus Bothriechis)* (Pla et al., 2017) y *Snake venomomics and antivenomics of the arboreal neotropical pitvipers Bothriechis lateralis and Bothriechis schlegelii* (Lomonte et al., 2008). Las familias proteicas incluidas son: BPP (péptidos potenciadores de bradicinina), svVEGF (factor de crecimiento endotelial vascular del veneno), Kazal (inhibidores

tipo Kazal), PLA₂ (fosfolipasas A₂), CRISP (proteínas ricas en cisteína), SVSP (proteasas serínicas de veneno), LAO (oxidases de L-aminoácidos), CTL (lectinas tipo C) y SVMP (metaloproteinasas de veneno).

Teniendo en cuenta los cromatogramas obtenidos en este estudio (sección 4.2, Figuras 2–10), fue posible realizar una aproximación funcional compatible a las familias de proteínas potencialmente presentes en las muestras de veneno analizadas.

La asignación se fundamentó en la comparación de los tiempos de retención observados en la cromatografía RP-HPLC con los patrones de elución previamente descritos para toxinas de Viperidae en la literatura especializada (Figura 15 y Tabla 7), así como con esquemas de elución ampliamente utilizados en estudios venómicos (por ejemplo, Lomonte & Calvete, 2017). En este contexto, los perfiles obtenidos sugieren la presencia de determinadas familias proteicas.

La integración de estas líneas de evidencia permitió proponer una asignación putativa y consistente de las principales familias proteicas probablemente presentes en los venenos analizados, en concordancia con lo reportado en estudios previos del género *Bothriechis* (Pla et al., 2017; Lomonte et al., 2008).

El análisis se complementó con los resultados obtenidos mediante SDS-PAGE (sección 4.4), lo que permitió refinar la asignación al integrar el peso molecular estimado de cada fracción, con lo reportado en la literatura (Tabla 8).

Tabla 8.

Composición proteica del veneno de B. schlegelii y su peso molecular

Familia proteica	Peso molecular (kDa)
Kazal	6
PN tipo C	2

PLA ₂	12 – 18
CRISP	24
Serin proteinasa	32, 33, 38
LAO	48
SVMP PIII-Zn ⁺²	52 – (>110)
SVMP PI-Zn ⁺²	23

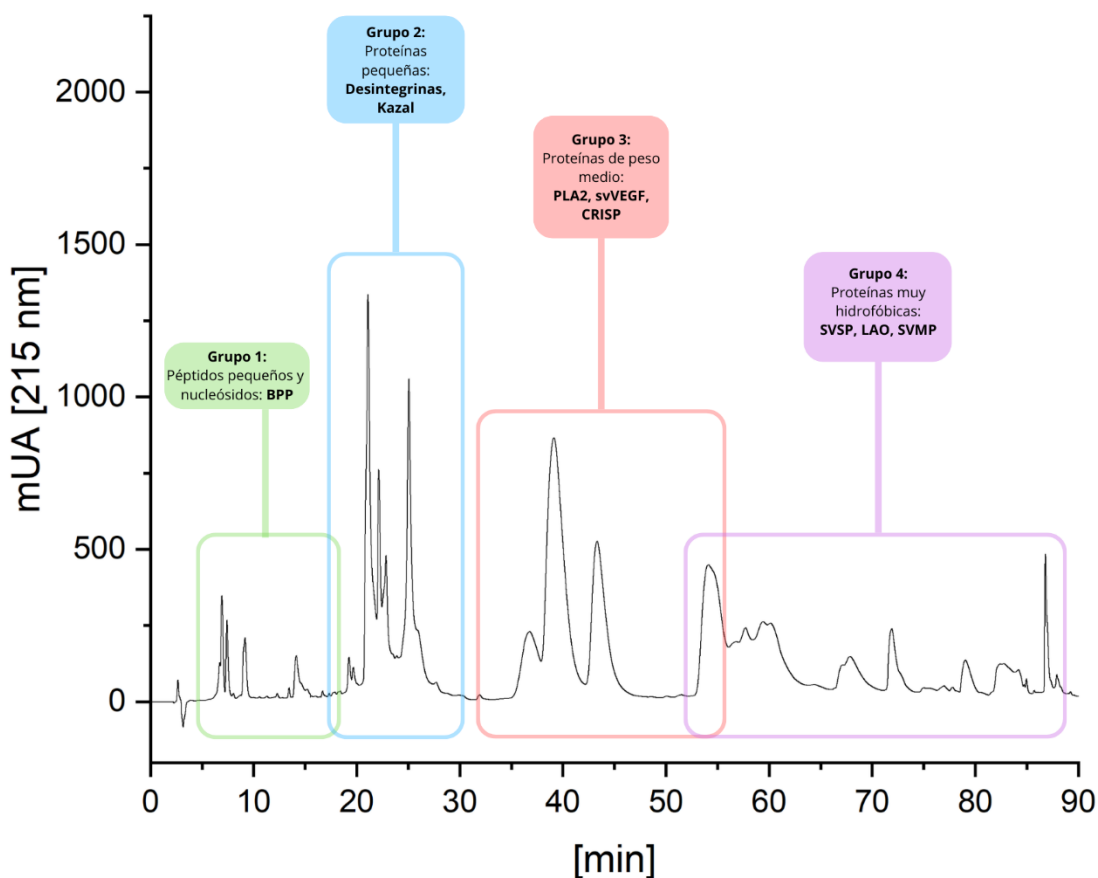
Nota. Tabla reproducida y adaptada de *Proteomic analysis of venom variability and ontogeny across the arboreal palm-pitvipers (genus Bothriechis)*, por D. Pla, L. Sanz, M. Sasa, M. E. Acevedo, Q. Dwyer, J. Durban, A. Pérez, Y. Rodríguez, B. Lomonte y J. J. Calvete, 2017, *Toxicon*, 138, pp. 68–79. Los valores de peso molecular se presentan bajo condiciones no y reductoras, según lo reportado por los autores.

Las bandas observadas se compararon con los rangos característicos de las principales familias proteicas reportadas en la literatura: PLA₂ (~12–18 kDa), SVSP (~32–38 kDa), CRISP (~24–28 kDa), LAO 48 kDa) y SVMPs, cuyo rango abarca desde ~20 kDa en las clases P-I hasta más de 100 kDa en las clases P-III. La coincidencia entre peso molecular e hidrofobicidad en la elución cromatográfica, permitió reducir la ambigüedad en la asignación.

Esta comparación permitió evaluar la correspondencia entre los patrones de elución observados y las familias proteicas reportadas en estudios previos. En conjunto, la integración del patrón de elución, el perfil electroforético y las referencias bibliográficas permitió proponer una asignación consistente, sugiriendo la presencia grupos proteicos específicos presentes en las muestras analizadas (Figura 16).

Figura 16.

Esquema del fraccionamiento de venenos mediante RP-HPLC. Se indican las regiones aproximadas de elución para las principales familias proteicas en venenos de Bothriechis



Nota. En el diagrama se indican los rangos aproximados de elución asociados a diferentes grupos de toxinas según su polaridad, peso molecular y gradiente de elución reportado en la Tabla 2: componentes altamente polares y de bajo peso molecular, como péptidos y nucleótidos, eluyen entre 7 y 16 minutos; inhibidores de tipo kazal, desintegrinas y otras proteínas pequeñas se observan entre 16 y 27 minutos; proteínas de tamaño medio incluyendo CRISP, PLA₂ y svVEGF eluyen entre 27 y 55 minutos; y proteínas de mayor tamaño o mayor hidrofobicidad, como: SVSP, LAO y SVMPPs, aparecen entre 52 y 90 minutos.

Así mismo, se procedió con la determinación del perfil de proteínas de los venenos de la víbora de pestañas de Santander, Colombia (Tabla 9, Tabla 10)

Tabla 9.

Identificación de grupos proteicos de los individuos analizados de Bothriechis klebbai

Grupo de proteínas	Familia de proteínas	Proteínas	Peso molecular (kDa)	Pico cromatográfico correspondiente	PM, Banda electroforética correspondiente
Grupo 1	BPP	-	-	C (1 – 4)	-
		-	-	A (1 y 3)	-
Grupo 2	Kazal	-	6	C (5 – 12)	-
	svVEGF	svVEGF	-	B (11)	-
Grupo 3	PLA ₂	-	12 – 18	C (13 – 18)	C13: 18 kDa C14: 16 kDa
	CRISP	-	24	A (13 y 14)	A13: 16 kDa A14: 18 kDa
Grupo 4	SVSP	-	32, 33, 38	C (19 – 29) A (20) B (23 y 26)	C19: 36 kDa C20: 38 y 23 kDa C23: 130, 48 y 38 kDa
	LAO	-	48		C26: 38 a 60 kDa
	SVMP	SVMP	52 – (>110)		A20: 48 kDa
		PIII-Zn ⁺²	23		B23 y 24: 52 kDa
	SVMP	23			
	PI-Zn ⁺²				

Nota. La asignación de los grupos de proteínas se determinó mediante la elución de picos cromatográficos, el rango de pesos moleculares asociados y la caracterización previa de familias

proteicas presentes en venenos del género *Bothriechis*. PM, peso molecular. Las letras A, B y C, corresponden a individuos de *B. klebbai* utilizados en este estudio, revisar Figura 1, 7 y 13.

Tabla 10.

Identificación de grupos proteicos de los individuos analizados de Bothriechis khwargi

Grupo de proteínas	Familia de proteínas	Proteínas	Peso molecular (kDa)	Pico cromatográfico correspondiente	PM, Banda electroforética correspondiente
Grupo 1	BPP	-	-	E (1 – 6)	-
Grupo 2	Kazal	-	6	E (7 – 12)	-
	svVEGF	svVEGF	-	F (13) G (9)	- -
Grupo 3	PLA ₂	-	12 – 18	E (13 – 17)	E13 – 15: 18 kDa
	CRISP	-	24	F (14) G (18 y 19)	E16: 24 kDa G18: 18kDa G19: 24kDa
Grupo 4	SVSP	-	32, 33, 38	E (18 – 29)	E17-18-19: 38 kDa
	LAO	-	48		E17: 23 kDa
	SVMP	SVMP	52 – (>110)		E20:23 kDa
		PIII-Zn ⁺²			E24: 60 a 85 kDa
	SVMP PI-Zn ⁺²	23	E25: 48 kDa		

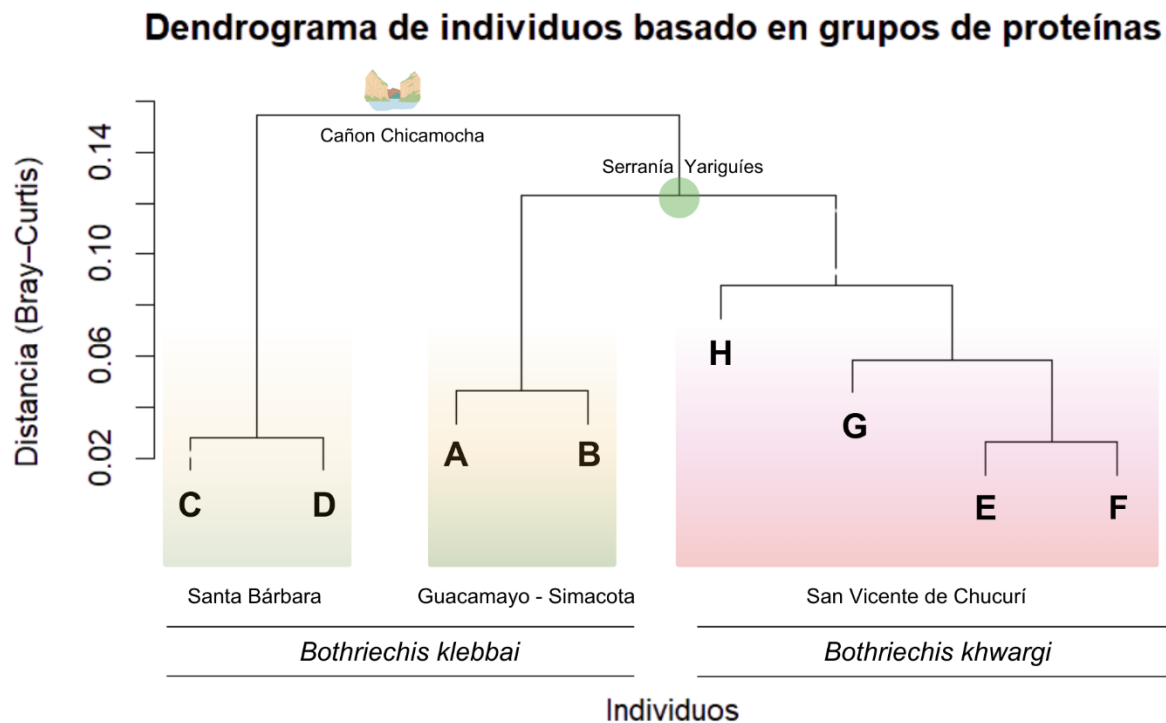
Nota. La asignación de los grupos de proteínas se determinó mediante la elución de picos cromatográficos, el rango de pesos moleculares asociados y la caracterización previa de familias proteicas presentes en venenos del género *Bothriechis*. PM, peso molecular. Las letras E, F y G, corresponden a individuos de *B. khwargi* utilizados en este estudio, revisar Figura 1, 10 y 14.

4.5.2. Análisis de datos de RP – HPLC y SDS-PAGE

El agrupamiento se realizó utilizando múltiples índices de distancias (p. ej., Gower, Euclidiana, Bray–Curtis). La estructura jerárquica basada en el índice de Bray-Curtis (Bray & Curtis, 1957; Clarke, 1993) mostró el mejor ajuste, con una correlación cofenética de 0.918, indicando una representación fiel de las distancias originales entre individuos (Figura 17).

Figura 17.

Agrupamiento jerárquico de cluster de individuos de B. klebbai y B. khwargi según la distancia Bray–Curtis (correlación cofenética = 0.918)



Nota. El cluster se construyó utilizando el índice Bray–Curtis aplicado a la matriz basada en el área bajo la curva de cada pico proteico (presencia = área, ausencia = 0). El método agrupamiento utilizado fue UPGMA.

Para determinar si la variación en la composición proteica presentaba correspondencia con la distancia geográfica se aplicó la prueba de Mantel, contrastando la matriz de distancias Bray–Curtis con la matriz geográfica de distancias geodésicas empleando la fórmula de Haversine. La prueba arrojó una correlación positiva ($r = 0.415$) y significativa ($p = 0.0373$) (Apéndice A). Existe un patrón espacial en la variación del perfil proteico según la localidad de origen de los individuos. Esto indica que los individuos que se encuentran más alejados geográficamente tienden a presentar mayores diferencias en sus perfiles proteicos. La distribución nula confirmó que el valor observado excede los cuantiles superiores esperados por azar, apoyando la existencia de una estructura espacial robusta, en las diferencias de los perfiles proteicos entre individuos.

Además, se evaluó si esta relación espacial dependía de grupos proteicos específicos. Entre todas las familias evaluadas, únicamente el grupo de proteínas 4 mostró una correlación significativa con la distancia espacial ($r = 0.558$, $p = 0.029$), indicando que su presencia o abundancia varía de manera sistemática a lo largo del gradiente geográfico, mientras que las demás familias no exhibieron patrones espaciales significativos. No obstante, el grupo de proteínas número 3 exhibió una correlación espacial marginal ($r = 0.224$, $p = 0.1027$), lo que sugiere una tendencia de asociación con la distancia espacial, dado que su valor de p se aproxima al nivel de significancia alpha ($p = 0.05$) (Apéndice B).

El análisis SIMPER permitió identificar las posibles familias proteicas que más contribuyen a la disimilitud entre *B. khwargi* y *B. klebbai*. La mayor parte de esta disimilitud es explicada por los grupos de proteínas 2, 3 y 4, los cuales aportan el 47,5%, 29,3% y 14,9% de la variación interespecífica, respectivamente (= 92% en conjunto) (Apéndice C).

En conjunto, estos resultados demuestran la existencia de un patrón espacial estructurado en la variación de los perfiles proteicos, donde el lugar de procedencia, se asocia con diferencias

composicionales específicas, particularmente en los grupos proteicos que más contribuyen a la diferenciación interespecífica.

5. Discusión

5.1. Complejidad y caracterización preliminar del veneno

El género *Bothriechis* es un grupo de ofidios con hábitos arborícolas distribuidas en América central y parte del norte de Sudamérica, adaptadas a hábitats montañosos y tropicales, con una cola prensil y colores llamativos (Campbell & Lamar, 2004). El análisis inicial mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) de sus venenos, reveló una alta complejidad proteica en las muestras evaluadas, mediante el gradiente de elución (Tabla 2) adaptado de Pla et al. (2017). Este gradiente se seleccionó, para permitir estandarizar el procedimiento dentro del marco conceptual de la venómica de serpientes (Calvete et al., 2007).

La riqueza de picos observada, con un máximo de 29 en los individuos más representativos de cada especie (individuo C de *B. klebbai*, Figura 5B; individuo E de *B. khwargi*, Figura 9B), coincide con lo reportado para otras especies de vipéridos (Lomonte et al., 2008; Pla et al., 2017). PLA2, SVMP, SVSP y LAO, enzimas responsables de una amplia gama de efectos: desde desintegración tisular, alteraciones hemostáticas y citotoxicidad local (dolor, edema, hemorragia, necrosis, formación de ampollas), hasta complicaciones sistémicas como coagulopatías o falla renal aguda (Gutiérrez et al., 2009; Mackessy, 2021; Otero-Patiño, 2009). No obstante, se detectaron diferencias cualitativas en la disposición, intensidad y tiempos de retención de los picos respecto a patrones previamente descritos para otras especies del género (Pla et al., 2017; Fernández et al., 2016).

Estos resultados fueron corroborados por los perfiles electroforéticos del veneno crudo (Figura 12), donde se detectó una alta densidad de bandas entre 18 y 45 kDa, compatibles con

PLA2, SVSP y SVMP de bajo peso molecular (P-I), así como la aparición de bandas entre 60 y 130 kDa confirman la presencia de proteínas más grandes, como SVMP de clases P-II, P-III y LAO, de acuerdo con reportes previos para vipéridos (Gutiérrez et al., 2009; Lomonte & Calvete 2017; Lomonte et al., 2008, 2012).

El análisis de fracciones individuales mediante SDS-PAGE reveló múltiples bandas por fracción cromatográfica. Este patrón indica que lo que eluye como un “pico” cromatográfico aparentemente homogéneo corresponde, en realidad, a una mezcla de proteínas con hidrofobicidad similar, pero con distintos pesos moleculares (p. ej., fracciones 15–21, 23, 26 y 27 en *B. klebbai*, Figura 13; fracciones 12–19, 24, 28 y 29 en *B. khwargi*, Figura 14). Este fenómeno puede deberse a la expresión de isoformas, un sello distintivo de la amplia variación de los venenos (Casewell et al., 2014). Estas isoformas, aunque estructuralmente semejantes, pueden tener afinidades ligeramente diferentes por sus blancos fisiológicos (p.ej., distintos factores de coagulación o hemopatologías), permitiendo al veneno atacar múltiples vías en la presa de manera simultánea y sinérgica, a la vez que dificulta la evolución de resistencia por parte de ésta (Madrigal et al., 2012, Aguilar et al., 2007, Borja et al., 2005). La observación de fracciones correspondientes a grupos proteicos clave (como las SVMP o las PLA2) que presentan varias bandas por fracción, sugiere que este mecanismo de diversificación ha sido particularmente activo en estas especies, modelando su arsenal tóxico con múltiples isoformas, sugiriendo adaptación activa a las presiones ecológicas locales (Moura-da-Silva et al., 2003; Alape-Girón et al., 2008; Casewell et al., 2014).

Por otro lado, las primeras 12 fracciones de *B. klebbai* (Figura 13) y 10 de *B. khwargi* (Figura 14) no mostraron bandas electroforéticas. Esto puede deberse a que en esos tiempos de elución suelen encontrarse BPPs e inhibidores tipo Kazal, que pueden no resolverse

adecuadamente en SDS-PAGE debido a su tamaño o concentración (Lomonte et al., 2008; Lomonte & Calvete, 2017; Niño-Pérez, 2018).

5.2. Análisis multivariado

5.2.1. Variabilidad del veneno y el fuerte componente geográfico

La composición del veneno en especies del género *Bothriechis* ha sido documentada como altamente variable, tanto a nivel interespecífico como intraespecífico, especialmente cuando se consideran poblaciones separadas geográficamente (Pla et al., 2017). Esta variabilidad ha sido asociada a factores ecológicos como disponibilidad de presas, microhábitat, presiones selectivas locales y procesos históricos de aislamiento (Lomonte et al., 2014). Los venenos del género se caracterizan por la presencia predominante de SVMP y PLA2, además de SVSP y péptidos vasoactivos, aunque la proporción y diversidad de estas familias puede diferir profundamente entre especies (Fernández et al., 2010; Pla et al., 2017; Lomonte et al., 2014). Estos patrones reflejan la plasticidad evolutiva que caracteriza a los vipéridos, cuyos venenos no son entidades estáticas, sino sistemas biológicos dinámicos adaptados a nichos locales (Mackessy., 2021; Jackson., 2003; Prezotto-Neto et al., 2016).

Ejemplos claros de esta divergencia se han documentado previamente en *Bothriechis nigroviridis*, cuyo proteoma está dominado por PLA₂ tipo crotoxina (38%) y péptidos vasoactivos (37%), además de una ausencia notable de SVMP, un patrón atípico para el género (Fernández et al., 2010). De manera contrastante, *B. lateralis* presenta una marcada abundancia de SVMP (55%), mientras que *B. schlegelii* exhibe predominancia de PLA2 (44%), lo que evidencia diferencias profundas en estrategias de depredación y ecología funcional interespecífica (Lomonte et al., 2008). A ello se suman hallazgos recientes que amplían aún más la complejidad del género, como la identificación de once familias proteicas en *B. supraciliaris*, incluyendo péptidos de poliglicina

e inhibidores de metaloproteasas descritos por primera vez en el género, y una proporción elevada de BPP, SVSP y PLA2, lo que subraya una alta especialización funcional (Lomonte et al., 2012). Asimismo, *B. schlegelii* ha demostrado poseer proteínas similares a inhibidores tipo Kazal capaces de modular la actividad de la tripsina, lo que apunta a un rol adaptativo en la eficiencia digestiva más que en la letalidad directa del veneno (Fernández et al., 2016). En conjunto, estos antecedentes demuestran que los venenos de *Bothriechis* están profundamente moldeados por su ecología, su historia evolutiva y las funciones específicas requeridas por cada especie.

Los hallazgos del presente estudio sobre *Bothriechis khwargi* y *Bothriechis klebbai* se inscriben claramente dentro de este marco general de variabilidad. La marcada homogeneidad cromatográfica observada entre individuos provenientes de localidades próximas como C y D de *B. klebbai* en Santa Bárbara, y E, F y G de *B. khwargi* en San Vicente de Chucurí sugieren la existencia de perfiles proteicos localmente estabilizados, posiblemente determinados por presiones ecológicas compartidas y flujos génicos más continuos dentro cada región. Sin embargo, el patrón cambia significativamente al considerar individuos provenientes de zonas más aisladas, el individuo H de *B. khwargi*, procedente de una vereda distante dentro del mismo municipio, carece del pico 15E observado en los otros ejemplares. Aunque esta diferencia sea cualitativamente sutil, tiene relevancia biológica y coincide con estudios previos que demuestran variaciones composicionales detectables incluso entre poblaciones separadas por distancias geográficas modestas (Aguilar et al., 2007; Núñez et al., 2009; Calvete et al., 2011).

Este patrón se hace aún más evidente con los resultados del cluster jerárquico (Figura 17), se observa una separación espacial de individuos según su procedencia geográfica. Los individuos A-B (provenientes de Guacamayo y Simacota) se posicionan juntos, lo cual es consistente con su proximidad en la vertiente oriental de la Serranía de los Yariguíes, mientras que los individuos de

B. khwargi asociados a la vertiente occidental (San Vicente de Chucurí, individuos E,F,G,H, Figura 1) forman un grupo diferenciado, y que, a su vez, se agrupan en Serranía de los Yarigués (Figura 17), y es que la segregación de los individuos C-D, individuos provenientes de Santa Bárbara es notable, están separados del resto por el Cañón del Chicamocha en la geografía y de igual forma en el cluster (Figura 17), esto sugiere que barreras geográficas de gran escala pueden modular divergencias fenotípicas en la composición del veneno, probablemente a través de aislamiento poblacional y adaptación local a presiones ecológicas particulares. La prueba de Mantel aporta soporte cuantitativo a esta interpretación, demostrando una correlación significativa entre distancia geográfica y disimilitud del veneno ($r = 0.415$; $p = 0.0373$), lo que confirma que el lugar de procedencia es un factor determinante en la diferenciación composicional observada.

Estos resultados se alinean con lo encontrado por Pla et al. (2017) en especies centroamericanas de *Bothriechis*, donde se documentó una fuerte divergencia intra e interespecífica. La literatura también indica que las presiones selectivas tróficas, barreras geográficas y variaciones de los nichos en gradientes altitudinales impulsan cambios intra e interespecíficos en el veneno (Fry, 2015; Alape-Girón et al., 2008). Incluso la cantidad de veneno inoculada puede modular la manifestación funcional de su actividad enzimática (Gomes et al., 2010), lo que refuerza la idea de que los venenos son rasgos altamente integrados, tanto desde perspectivas bioquímicas como ecológicas. Siendo que la composición de los venenos puede llegar a presentar variación intraespecífica, relacionada a factores, genéticos, estacionales, de dieta, sexo y distribución geográfica (Chippaux et al., 1991; Moura-da-Silva et al., 2003; Prezotto-Neto et al., 2016). Esta variabilidad en los venenos puede conllevar a cambios en las características clínicas de los envenenamientos, por lo que envenenamientos de poblaciones específicas pueden llegar a requerir tratamientos diferentes (Gutiérrez et al., 2009).

Los hallazgos presentados confirman que la variación geográfica es un factor central en la arquitectura del veneno en *Bothriechis*, incluso a escalas regionales relativamente pequeñas. Las similitudes observadas dentro de localidades específicas, contrastadas con divergencias entre poblaciones aisladas, encajan plenamente con el modelo de diversificación venómica impulsada por la ecología y la geografía. Comprender estos procesos no solo es esencial para entender la historia natural del género, sino también para optimizar estrategias terapéuticas, considerando que los antiofídicos pueden ver comprometida su eficacia ante divergencias locales en la composición del veneno (Pla et al., 2017; Gutiérrez et al., 2009).

5.2.2. Patrones de variación interespecíficos

El análisis SIMPER (Apéndice C) indicó que los grupos proteicos 2, 3 y 4 explican el 92 % de la disimilitud total entre las especies, lo que sugiere una modulación fenotípica del veneno asociada a la especialización trófica. Y es que, la separación de los individuos A–B respecto a *B. khwargi* de San Vicente de Chucurí en el clúster de la Serranía de los Yariguíes parece estar relacionada con diferencias altitudinales, ya que A y B fueron registrados a mayores elevaciones (1.827–2.100 m s. n. m.) que *B. khwargi* (927–1.570 m s. n. m.). Este patrón, consistente con los individuos C–D de Santa Bárbara (>1.800 m s. n. m.), sugiere una tendencia en la ocupación de nichos a lo largo del gradiente altitudinal, proporcionando un marco ecológico para la diferenciación observada.

5.2.3. Regiones Conservadas

El análisis de los cromatogramas mostró que la variabilidad no se distribuye uniformemente. La región inicial (≈ 7 –16 min), correspondiente a componentes muy polares y de bajo peso molecular como BPP e inhibidores tipo Kazal (Grupos 1 y 2; Tablas 9 y 10), presentó un alto grado de conservación entre las especies, a su vez, la ausencia de bandas visibles en SDS-

PAGE de estas fracciones es consistente con su bajo peso molecular o con concentraciones reducidas. Esta región conservada ha sido reportada en estudios intra e interespecíficos de otros vipéridos (Madrigal et al., 2012), lo que sugiere que estas moléculas podrían tener funciones más regulatorias o conservadas en la interacción depredador-presa, estando sujetas a menores presiones selectivas direccionales (Fernández et al., 2016).

5.3. Limitaciones Metodológicas

Es imperativo reconocer las limitaciones de este estudio para contextualizar sus hallazgos y trazar el rumbo de investigaciones futuras. La estrategia de asignación de grupos proteicos, aunque robusta al integrar técnicas bioquímicas (hidrofobicidad - peso molecular) y consultar literatura especializada, sigue siendo una aproximación inferencial. Sin la aplicación de espectrometría de masas (MS), no es posible una identificación inequívoca a nivel peptídico. Y es que la MS (ESI-MS/MS) habría permitido, una identificación precisa, discriminando entre isoformas que co-eluyen y tienen pesos moleculares similares, también un análisis en secuenciador Edman para determinar cuantitativamente la presencia de las proteínas (Lomonte & Calvete, 2017; Calvete, 2007, 2013; Lomonte et al., 2014). Y con esto, poder medir con absoluta precisión las diferencias de abundancia de proteínas entre especies e individuos, superando las aproximaciones semicuantitativas basadas en el área bajo la curva de los picos cromatográficos obtenidos. Con estas metodologías y la reportada variabilidad del veneno dentro del género *Bothriechis*, es fundamental continuar la exploración y ahondar en sus detalles. Es obligatorio, asimismo, desarrollar y optimizar el tratamiento del accidente ofídico (Gutiérrez et al., 2009) ya que cada una de las variaciones por poblaciones específicas tiene impacto en términos clínicos y deberían contar con el desarrollo de antiofídicos locales.

Es así que la ausencia de datos de MS, o secuenciación, si bien, dadas las limitaciones instrumentales y de presupuesto del presente estudio, representan la principal brecha del mismo. Por lo tanto, estos perfiles proteicos deben considerarse como determinaciones preliminares y de referencia, que establecen una base sólida y priorizada para futuros análisis integrales que incluyan la utilización de MS y/o secuenciación peptídica.

5.4. Implicaciones y potencial bioprospectivo

Los accidentes ofídicos son un problema de salud pública potencialmente letales debido a sus efectos tóxicos y se considera una problemática altamente desatendida que afecta principalmente países tropicales y subtropicales (OMS, 2023; Prieto & Alvarado, 2021). Colombia es el país que más registra casos de accidentes ofídicos después de México y Brasil, siendo que, para el año 2021 se registraron en el portal SIVIGILA 4.778 casos de accidente ofídico (Prieto & Alvarado, 2021). Las personas más afectadas son los habitantes de zonas rurales alejadas a centros poblados y relacionados a trabajos del campo (Prieto & Alvarado, 2021; Walteros et al., 2014). Para la salud pública y la toxicología clínica, la marcada variabilidad geográfica intra e interespecífica constituye una evidencia contundente contra la práctica de utilizar venenos de una sola localidad y/o especie en específico para la producción de antiofídicos, asumir que el veneno de una población es representativo de toda la especie, incluso familia puede conducir al desarrollo de sueros antiofídicos con una cobertura neutralizante incompleta (Chippaux et al., 1991). Para garantizar la eficacia terapéutica, es imperativo que la producción de antiofídicos, o al menos su evaluación preclínica, utilice una mezcla de venenos que capture la diversidad geográfica de *B. khwargi* y *B. klebbai*. Además, se debe evaluar rigurosamente la capacidad de los antivenenos polivalentes existentes (diseñados principalmente contra *Bothrops spp*) para neutralizar las variantes de toxinas presentes en estas especies (Gutiérrez et al., 2009).

En el ámbito de la bioprospección, la riqueza y alta complejidad proteica identificada posiciona a estos venenos como bibliotecas naturales de compuestos bioactivos con un inmenso potencial farmacológico. Cada familia de toxinas representa un arsenal de herramientas moleculares perfeccionadas por la evolución para interferir con precisión en rutas fisiológicas específicas. Las fracciones cromatográficas y electroforéticas aquí identificadas constituyen el punto de partida ideal para futuros proyectos de purificación, secuenciación, análisis mediante espectrometría de masas, y evaluación de bioactividad en ensayos específicos, abriendo una nueva frontera para el descubrimiento de fármacos a partir del subexplotado patrimonio bioquímico de Colombia.

6. Conclusiones

Con el reporte del perfil de proteínas presente en el veneno de las víboras de pestañas de Santander, se amplió el conocimiento toxinológico de las especies de víboras de importancia clínica en Colombia.

Los venenos de *B. khwargi* y *B. klebbai* exhiben una complejidad proteica considerable, con perfiles dominados por las familias de toxinas características de los vipéridos (PLA2, SVMP, SVSP, LAO, CRISP), con una riqueza de picos y bandas que sugiere una gran diversidad de isoformas.

La geografía es un factor determinante en la variación del veneno (Mantel $r = 0.415$; $p = 0.0373$). Se observa una alta homogeneidad composicional entre individuos de localidades cercanas, mientras que la distancia geográfica se correlaciona significativamente con un aumento en la divergencia de los perfiles proteicos, lo que sugiere una adaptación local.

Los hallazgos subrayan la necesidad de incorporar el concepto de variabilidad geográfica en el desarrollo y evaluación de antiofídicos para garantizar una neutralización de espectro total.

Además, la riqueza molecular identificada posiciona a estos venenos como fuentes valiosas para la bioprospección, abriendo un nuevo capítulo en la toxinología de las víboras de pestañas de Colombia.

Referencias Bibliográficas

- Aguilar, I., Guerrero, B., Maria Salazar, A., Girón, M. E., Pérez, J. C., Sánchez, E. E., & Rodríguez-Acosta, A. (2007). Individual venom variability in the South American rattlesnake *Crotalus durissus cumanensis*. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 50(2), 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.03.012>
- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., & Calvete, J. J. (2008). Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *Journal of proteome research*, 7(8), 3556–3571. <https://doi.org/10.1021/pr800332p>
- Amresco. (2014). *Prism Protein Marker* (Cat. No. 1B1349-500UL) [Protein molecular weight marker]. VWR Amresco Chemicals.
- Arteaga, A., Pyron, R. A., Batista, A., Vieira, J., Pelayo, E. M., Smith, E. N., Barrio, C. L., Koch, C., Agne, S., Valencia, J. H., Bustamante, L., & Harris, K. J. (2024). Systematic revision of the Eyelash Palm-Pitviper *Bothriechis schlegelii* (Serpentes, Viperidae), with the description of five new species and revalidation of three. *Evolutionary Systematics*, 8(1), 15–64. <https://doi.org/10.3897/evolsyst.8.114527>
- Bio-Rad Laboratories, Inc. (2020). *Image Lab* (Version 6.1.0) [Software]. Bio-Rad Laboratories, Inc. <https://www.bio-rad.com>
- Borja, M., Castañeda-Gaytán, G., Alagón, A., Strickland, J. L., Parkinson, C. L., Gutiérrez-Martínez, A., Rodríguez-López, B., Zarzosa, V., Lomonte, B., Saviola, A. J., Fernández, J., Smith, C. F., Hansen, K. C., Pérez-Robles, A., Castañeda-Pérez, S., Hirst, S. R., Olvera-

- Rodríguez, F., Fernández-Badillo, L., Sigala, J., Jones, J., ... Neri-Castro, E. (2025). Venom variation and ontogenetic changes in the *Crotalus molossus* complex: Insights into composition, activities, and antivenom neutralization. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, 290, 110129. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2025.110129>
- Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27(4), 326–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>
- Calvete, J. J., Juárez, P., & Sanz, L. (2007). Snake venomomics: Strategies and applications. *Journal of mass spectrometry*, 42, 1405–1414. <https://doi.org/10.1002/jms.1242>
- Calvete, J. J. (2011). Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert Review of Proteomics*, 8(6), 739-758. <https://doi.org/10.1586/epr.11.61>
- Calvete, J. J. (2013). Snake venomomics: from the inventory of toxins to biology. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 75, 44–62. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.03.020>
- Calvete, J. J. (2017). Venomomics: integrative venom proteomics and beyond. *The Biochemical Journal*, 474(5), 611-634. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160577>
- Campbell, J. A., & Lamar, W. W. (2004). The venomous reptiles of the Western Hemisphere (Vol. 1-2). *Cornell University Press*.
- Caswell, N. R., Wagstaff, S. C., Wüster, W., Cook, D. A., Bolton, F. M., King, S. I., Pla, D., Sanz, L., Calvete, J. J., & Harrison, R. A. (2014). Medically important differences in snake

- venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(25), 9205–9210. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405484111>
- Chippaux, J. P., Williams, V., & White, J. (1991). Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 29(11), 1279–1303. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90116-9](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90116-9)
- Chippaux, J. P. (2017). Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(6), e0005662. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005662>
- Clarke, K. R., (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18: 117-143. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x>
- Clarke, K. R. and Warwick, R.M. (2001). Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation. 2nd Edition, *PRIMER-E, Ltd.*, Plymouth Marine Laboratory, Plymouth.
- Fernández, J., Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., Sanz, L., & Lomonte, B. (2016). Characterization of a novel snake venom component: Kazal-type inhibitor-like protein from the arboreal pitviper *Bothriechis schlegelii*. *Biochimie*, 125, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.03.004>
- Fernández, J., Lomonte, B., Sanz, L., Angulo, Y., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2010). Snake venomomics of *Bothriechis nigroviridis* reveals extreme variability among palm pitviper venoms: different evolutionary solutions for the same trophic purpose. *Journal of proteome research*, 9(8), 4234–4241. <https://doi.org/10.1021/pr100545d>
- Fox, J. W., & Serrano, S. M. (2007). Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-derivatives currently

- involved in therapeutic or diagnostic applications. *Current pharmaceutical design*, 13(28), 2927–2934. <https://doi.org/10.2174/138161207782023739>
- Fry, B. (Ed.). (2015). *Venomous reptiles and their toxins: evolution, pathophysiology and biodiscovery*. Oxford University Press.
- Gomes, A., Bhattacharjee, P., Mishra, R., Biswas, A. K., Dasgupta, S. C., & Giri, B. (2010). Anticancer potential of animal venoms and toxins. *Indian journal of experimental biology*, 48(2), 93–103.
- Gower, J. C. (1966). Some Distance Properties of Latent Root and Vector Methods Used in Multivariate Analysis. *Biometrika*, 53(3/4), 325–338. <https://doi.org/10.2307/2333639>
- Gutiérrez, J. M., Lomonte, B., León, G., Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M., Sanz, L., Angulo, Y., & Calvete, J. J. (2009). Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *Journal of proteomics*, 72(2), 165–182. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.008>
- Gutiérrez, José María. (2011). Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 51(1), 1-16. Recuperado en 25 de septiembre de 2025, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482011000100001&lng=es&tlng=es.
- Hijmans, R. J. (2025). *geosphere: Spherical Trigonometry* (R package version 4.4.2). <https://CRAN.R-project.org/package=geosphere>
- Instituto Nacional de Salud. Portal SIVIGILA. Web. 2022. Consultado 17 de septiembre de 2024. Disponible en: <http://portalsivigila.ins.gov.co/>

- Jackson, K. (2003). The evolution of venom-delivery systems in snakes. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 137(3), 337–354. <https://doi.org/10.1046/j.1096-3642.2003.00052.x>
- Lazar, I., Jr., & Lazar, I., Sr. (2023). *GelAnalyzer* (Version 23.1.1) [Software]. <http://www.gelalyzer.com/>
- Legendre, P. and Legendre, L. (2012). Numerical Ecology, Developments in Environmental Modelling. *3rd Edition, Elsevier*, Amsterdam, 419.
- Lomonte, B., & Calvete, J. J. (2017). Strategies in 'snake venomomics' aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 23, 26. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0117-8>
- Lomonte, B., Escolano, J., Fernández, J., Sanz, L., Angulo, Y., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2008). Snake venomomics and antivenomics of the arboreal neotropical pitvipers *Bothriechis lateralis* and *Bothriechis schlegelii*. *Journal of proteome research*, 7(6), 2445–2457. <https://doi.org/10.1021/pr8000139>
- Lomonte, B., Fernández, J., Sanz, L., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2014). Venomous snakes of Costa Rica: Biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomomics. *Journal of Proteomics*, 105, 323–339. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.020>
- Lomonte, B., Tsai, W. C., Bonilla, F., Solórzano, A., Solano, G., Angulo, Y., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2012). Snake venomomics and toxicological profiling of the arboreal pitviper *Bothriechis supraciliaris* from Costa Rica. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 59(5), 592–599. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.01.005>

- Mackessy, S. P. (2021). Reptile venoms and toxins: Unlimited opportunities for basic and applied research. En Mackessy, S. P. (Ed), *Handbook of venoms and toxins of reptiles* (2.^a ed., pp. 3–18). CRC Press.
- Madrigal, M., Sanz, L., Flores-Díaz, M., Sasa, M., Núñez, V., Alape-Girón, A., & Calvete, J. J. (2012). Snake venomomics across genus *Lachesis*. Ontogenetic changes in the venom composition of *Lachesis stenophrys* and comparative proteomics of the venoms of adult *Lachesis melanocephala* and *Lachesis acrochorda*. *Journal of proteomics*, 77, 280–297. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.09.003>
- Maechler, M., Rousseeuw, P., Struyf, A., Hubert, M., & Hornik, K. (2025). *cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions* (R package version 4.4.2). <https://CRAN.R-project.org/package=cluster>
- Mantel N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research*, 27(2), 209–220.
- Moura-da-Silva, A. M., Della-Casa, M. S., David, A. S., Assakura, M. T., Butera, D., Lebrun, I., Shannon, J. D., Serrano, S. M., & Fox, J. W. (2003). Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. *Archives of biochemistry and biophysics*, 409(2), 395–401. [https://doi.org/10.1016/s0003-9861\(02\)00598-2](https://doi.org/10.1016/s0003-9861(02)00598-2)
- Niño Pérez, R. (2018). Análisis comparativo del contenido proteico de venenos de serpientes de la familia Viperidae de diferentes regiones de Colombia mediante el empleo de cromatografía líquida y electroforesis (*Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá*).

Núñez, V., Cid, P., Sanz, L., De La Torre, P., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2009). Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. *Journal of Proteomics*, 73(1), 57–78. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.07.013>

Organización Mundial de la Salud. (2021). Mordeduras de serpientes venenosas. Organización Mundial de la Salud. Consultado 17 de septiembre del 2024. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>

OriginPro, Version Number (2025). OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.

Otero-Patiño R. (2009). Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 54(7), 998–1011. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.001>

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., & Wagner, H. (2025). *vegan: Community Ecology Package* (R package version 4.4.2). <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

Peters, W. (1859). Über die von Hrn. Dr. Hoffmann in Costa Rica gesammelten und an das Königl. Zoologische Museum gesandten Schlangen. *Monatsberichte der Königlichen Preußischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin*, 1859, 275–278.

Pla, D., Sanz, L., Sasa, M., Acevedo, M. E., Dwyer, Q., Durban, J., Pérez, A., Rodríguez, Y., Lomonte, B., & Calvete, J. J. (2017). Proteomic analysis of venom variability and ontogeny across the arboreal palm-pitvipers (genus *Bothriechis*). *Journal of Proteomics*, 152, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.10.006>

- Prezotto-Neto, J. P., Kimura, L. F., Alves, A. F., Gutiérrez, J. M., Otero, R., Suárez, A. M., & Barbaro, K. C. (2016). Biochemical and biological characterization of *Bothriechis schlegelii* snake venoms from Colombia and Costa Rica. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 241(18), 2075-2085. <https://doi.org/10.1177/1535370216660214>
- Prieto, F., & Alvarado, P. (2021). Informe de evento Accidente Ofídico INS.
- Sokal, R.R., & Michener, C.D. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas science bulletin*, 38, 1409-1438.
- R Core Team. (2024). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Reyes-Velasco, J. (2024). A revision of recent taxonomic changes to the eyelash palm pitviper, *Bothriechis schlegelii* (Serpentes, Viperidae). *Herpetozoa*, 37, 305–318. <https://doi.org/10.3897/herpetozoa.37.e131965>
- Saviola, A.J., Pla, D., Sanz, L., Castoe, T.A., Calvete, J.J., Mackessy, S.P., 2015. Comparative venomomics of the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) from Colorado: identification of a novel pattern of ontogenetic changes in venom composition and assessment of the immunoreactivity of the commercial antivenom. *J. Proteomics* 121, 28–43. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.015>.
- Schonour, R.B., Huff, E.M., Holding, M.L., Claunch, N.M., Ellsworth, S.A., Hogan, M.P., Wray, K., McGivern, J., Margres, M.J., Colston, T.J., Rokyta, D.R., 2020. Gradual and discrete ontogenetic shifts in rattlesnake venom composition and assessment of hormonal and ecological correlates. *Toxins (Basel)* 12. <https://doi.org/10.3390/toxins12100659>.
- Sinnott, R. W. (1984) Virtues of the Haversine. *Sky & Telescope*, 68, 158.

Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. (1962). The Comparison of Dendrograms by Objective Methods.

Taxon, 11(2), 33–40. <https://doi.org/10.2307/1217208>

Walteros, D., Paredes, A., & León, L. J. (2014). Protocolo de Vigilancia en Salud Pública:

Accidente Ofídico. *Bogotá: Ministerios de Salud y Protección Social-Instituto Nacional de Salud, Grupo de Enfermedades Transmisibles Equipo de Zoonosis.*

Apéndices

Apéndice A.

Valores de la prueba de Mantel entre distancia geográfica y variación de perfil proteico

Parámetro	Valor
Método	Pearson
Numero de permutaciones	10.000
Estadístico Mantel (r)	0.415
<i>p</i>	0.0373
Cuantil 90% del modelo nulo	0.272
Cuantil 95% del modelo nulo	0.361
Cuantil 97.5% del modelo nulo	0.443
Cuantil 99% del modelo nulo	0.523

Apéndice B.

Valores de la prueba de Mantel entre distancia geográfica y grupo de proteínas

Parámetro	r	Valor (p)
Método		Pearson
Numero de permutaciones		10.000
Estadístico Mantel		
Grupo 1	-0.211	0.756
Grupo 2	-0.040	0.555
Grupo 3	0.316	0.1027
Grupo 4	0.458	0.036

Apéndice C.

Valores del análisis SIMPER

Grupo	Contribución promedio	Desviación estándar	Ratio	Media A	Media B	Acumulado (%)
-------	-----------------------	---------------------	-------	---------	---------	---------------

3	0.1020	0.02476	4.119	3687.0	3672.0	47.5
4	0.0629	0.03745	1.680	2987.0	3144.9	29.3
2	0.03199	0.02647	1.209	2305.1	2793.8	14.9
1	0.01782	0.00361	4.936	353.0	351.0	8.3

Nota. A = *B. khwargi*; B = *B. klebbai*