



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PRINCIPALES EN EL  
VENENO DE *TRIMORPHODON TAU* Y OTROS COLÚBRIDOS

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**RAÚL SÁNCHEZ GONZÁLEZ**

**TUTOR PRINCIPAL: DR. GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE**  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM  
**COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ALAGÓN CANO**  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM  
**COMITÉ TUTOR: DR. FAUSTO MÉNDEZ DE LA CRUZ**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, CD. MX.      MAYO, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PRINCIPALES EN EL  
VENENO DE *TRIMORPHODON TAU* Y OTROS COLÚBRIDOS

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**RAÚL SÁNCHEZ GONZÁLEZ**

**TUTOR PRINCIPAL: DR. GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE**  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM  
**COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ALAGÓN CANO**  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM  
**COMITÉ TUTOR: DR. FAUSTO MÉNDEZ DE LA CRUZ**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, CD. MX.      MAYO, 2019

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/0352/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de marzo de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Evolutiva** del alumno **SÁNCHEZ GONZÁLEZ RAÚL** con número de cuenta **517007617** con la tesis titulada **"Caracterización e identificación de proteínas principales en el veneno de *Trimorphodon tau* y otros colúbridos"**, realizada bajo la dirección del **DR. GERARDO ALFONSO CORZO BURGUETE**:

Presidente:	DR. OSCAR ALBERTO FLORES VILLELA
Vocal:	DR. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA
Secretario:	DR. ALEJANDRO ALAGON CANO
Suplente:	DR. HORACIO REYES VIVAS
Suplente:	DR. JOSÉ FEDERICO DEL RÍO PORTILLA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx. a 24 de abril de 2019

  
DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/VMVA/ASR/grf\*

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Primeramente, agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de maestría 779622 que se me proporcionó en el periodo correspondiente, y a la Dirección General de Asuntos del personal académico (DGAPA) por el apoyo del proyecto IN203118, el cual integra estos resultados. Agradezco también el apoyo técnico otorgado por la M. en C. Magdalena Hernández Ortiz y al Dr. Sergio Encarnación por los experimentos obtenidos en el equipo LC-MS/MS, Q Exactive Plus, con tecnología Orbitrap marca Thermo Scientific, el cual fue adquirido por el proyecto CONACYT-Infraestructura 2017 No. 280197.

Al Dr. Gerardo Corzo Burguete, tutor principal del presente trabajo, investigador titular del departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt- UNAM).

Al Dr. Alejandro Alagón Cano, comité tutor, investigador titular del departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt- UNAM).

Al Dr. Fausto Méndez de la Cruz, comité tutor, investigador titular del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBUNAM).

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

Al Dr. Gerardo Corzo, tutor de esta tesis y combativo futbolista del IBt. Gracias doc por su paciencia, la confianza y la fe incondicionales depositadas en alguien que sin saber bioquímica, se aventó a tutorarle una tesis de bioquímica.

A la M. en C. Adriana Benítez, quien fue mi madrina de posgrado, por las largas pláticas llenas de consejos y por su apoyo incluso desde antes del inicio de la maestría hasta el final.

A Meli Benard Valle y Edgar Neri Castro, tutores extraoficiales de esta tesis, por su paciencia, su liderazgo, sus asesorías y su disposición constante, quienes además, son cabecillas y responsables de toda una camada de investigadores nacionales en materia de venenos.

A todo el laboratorio 13 del departamento de medicina molecular y bioprocesos del IBt quienes me aguantaron y asesoraron con paciencia durante todo el trabajo de la tesis: Herlinda Clement, Iván Arenas, Alejandro Olvera “Pichón”, Germán Obed, Manuel Yañez, Félix Santana, Fernando Zamudio, María Jiménez, Felipe Olvera, Ignacio Veytia, Oscar Aguayo, Luis Román, Damaris Bolaños, Alondra Callejas, Irene Castillo, Marco Ibarra, Lilu Corrales, Fernando Losoya, Mitzi Amaro, Óscar Pérez, Jesús Hernández, Nico Elizalde, Roberto Ponce, David Benítez y Gibrán Rodríguez.

A mis padres, siempre presentes y apoyando de toda manera posible este proyecto.

A mi tía, Maru González, quien me recibió en su casa durante mi estancia en Cuernavaca y me asistió en todo lo que estuvo a su alcance.

A la M.Sc. Claudia Wesseloh, que incluso con distancia me apoyó y me auxilió cuando más necesité ayuda.

Al Biol. Abel Valenzuela, amigo herpetólogo desde hace más de 10 años, por darme ánimos y apoyo incondicional en todo momento.

A Pia, por su luz.

Al grupo de Becarios Conacyt Sin Censura (BCSC), un pintorezco y divertido congal de inadaptados sociales.

Entre los años de 1976 y 1982,  
en la Facultad de Química de la UNAM estudió mi mamá.

Su carrera quedó inconclusa,  
pero esta maestría con el presente trabajo  
vale también por su título.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>15</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
I. ORGANISMOS DE ESTUDIO Y EXTRACCIÓN DE VENENO .....	27
II. CUANTIFICACIÓN DE CONCENTRACIÓN Y CANTIDAD PROTEICA .....	29
III. ESTIMACIÓN DE PESO MOLECULAR POR ELECTROFORESIS SDS-PAGE.....	29
IV. FRACCIONAMIENTO DE COMPONENTES POR HPLC DE FASE REVERSA .....	30
V. CARACTERIZACIÓN Y ENSAYOS BIOLÓGICOS .....	31
VI. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	31
VII. ACTIVIDAD PLA <sub>2</sub> ESPECÍFICA .....	33
VIII. ESPECTROMETRÍA DE MASAS, MS/MS, MALDI-TOF .....	34
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
1.1 <i>Trimorphodon tau</i> .....	39
1.2 <i>Leptodeira splendida</i> .....	47
1.3 <i>Conophis lineatus</i> .....	51
1.4 <i>Oxybelis aeneus</i> .....	53
1.5 <i>Leptophis mexicanus</i> .....	58
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>61</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>74</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>76</b>

## RESUMEN

La familia Colubridae es la familia de ofidios más numerosa, la más radiada y la más ampliamente distribuida en todo el mundo, conteniendo dos terceras partes del total de especies de serpientes descritas. Incluye a las especies que poseen un tipo de dentición particular denominada opistoglifa, el cual presenta un par de dientes posteriores alargados y acanalados asociados a una glándula cefálica de veneno llamada glándula de Duvernoy. La información sobre la bioquímica, composición y farmacología del veneno de colúbridos es escasa, y la poca disponible se ha limitado a las especies de importancia clínica. Sin embargo, en los últimos años, el avance en las técnicas de estudio a la par de los métodos de extracción han aumentado gradualmente el entendimiento de los venenos de este grupo de serpientes, revelando proteomas altamente diversos y una extensa fuente de componentes moleculares y toxinas nuevas. En el presente trabajo se realizó una caracterización proteómica del veneno de *Trimorphodon tau*. Además, se identificaron y caracterizaron las proteínas principales de este veneno y otras provenientes de *Leptodeira splendida*, *Conophis lineatus*, *Oxybelis aeneus* y *Leptophis mexicanus* utilizando diversas técnicas: cromatografía líquida de alto rendimiento por fase reversa (HPLC-FR), SDS-PAGE, espectrometría de masas (MS / MS), y pruebas de actividad enzimática específica. El veneno de *T. tau* posee una composición general mayoritariamente de toxinas de tres dedos (3FTxs) y proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISPs); L-aminoácido Oxidasas (LAAOs); fosfolipasas (PLA<sub>2</sub>s), una de las cuales presenta actividad enzimática moderada; además de una pequeña fracción metaloproteasa (MP) con actividad baja; y proteínas de tipo Kunitz. Tanto los resultados de la composición general como los alineamientos de secuencias proteicas asemejan a los venenos de elápidos del viejo mundo con las funciones biológicas principales de parálisis muscular y parálisis respiratoria de la presa, reforzando la hipótesis que los clados de elápidos y colúbridos comparten un nodo basal filogenético distinto al de los vipéridos.

## ABSTRACT

The Colubridae family is the most numerous, radiated and widely distributed of ophidians. Includes two thirds of the total described snake species. It contains species that have a particular type of dentition, called opisthognathous, which presents a pair of elongated and grooved posterior teeth associated with a cephalic venom gland called Duvernoy gland. Information on the biochemistry, composition and pharmacology of colubrid venom is scarce, and the little available has been limited to species of medical concern. However, in recent years, the advance in the studying techniques, along with the extraction methods have gradually increased the understanding of the venoms of this group of snakes, revealing a high diversity of proteomes and an extensive source of molecular components and toxins. In the present work, a proteomic characterization of the venom of *Trimorphodon tau* was carried out. In addition, the main proteins of this venom and others from *Leptodeira splendida*, *Conopsis lineatus*, *Oxybelis aeneus* and *Leptophis mexicanus* were identified and characterized using several techniques: high performance liquid chromatography by reverse phase (RP-HPLC), SDS-PAGE, mass spectrometry (MS / MS), and specific enzymatic activity tests. The venom of *T. tau* has a general composition mostly of three finger toxins (3FTxs) and cysteine-rich secretory proteins (CRISPs); L-amino acid Oxidases (LAAOs); phospholipases (PLA<sub>2</sub>s), one of which exhibits moderate enzymatic activity; in addition to a small metalloprotease fraction (MP) with low activity; and Kunitz-type proteins. Both the results of the general composition and the alignments of protein sequences resemble the venom of old world elapids with the main biological function of muscular and respiratory paralysis of the prey, which reinforces the hypothesis that clades of elapids and colubrids share a basal phylogenetic node separated from the vipers.

## INTRODUCCIÓN

La evolución de la función tóxica de las serpientes y la diversificación de sus toxinas han sido siempre temas de considerable interés y debate. Sólo el 20% de las especies de serpientes denominadas avanzadas de la superfamilia Xenophidia (familias Atractaspididae, Colubridae, Elapidae y Viperidae) tienen sistemas de administración de veneno asociadas a piezas bucales, y convencionalmente, todas aquellas especies de serpientes avanzadas carentes de dientes frontales inoculadores se sitúan dentro de la familia Colubridae (Fry et al., 2003).

La familia Colubridae, dentro del suborden Serpentes, es la familia de serpientes más numerosa, la más radiada y la más ampliamente distribuida en todo el mundo, contiene dos terceras partes del total de especies de serpientes descritas en el mundo (Fig. 1) (Pincheira-Donoso et al., 2013). Por familia Colubridae, anteriormente se entendía a toda serpiente de la superfamilia Xenophidia no incluida en las tres familias de serpientes venenosas de relevancia médica, y aunque se admitía ser un grupo parafilético, no se ha podido llegar a un consenso taxonómico hasta hoy día. En los últimos años, este grupo se ha sometido a muchas reclasificaciones, resultando distribuida en y hacia varias familias que abarcan a las subfamilias Natricinae, Pseudoxenodontinae, Dipsadinae, Scaphiodontophiinae, Calamariinae, Grayiinae y Colubrinae, que representan el 50% de la fauna de ofidios descrita. Otras muchas especies de serpientes que presentan colmillos posteriores, alrededor de 361, han sido asignadas entre las familias Homalopsidae y Lamprophiidae; además, algunos autores consideran a las subfamilias Natricinae y Dipsadinae como familias propiamente. En el presente trabajo, se utilizará una definición generalista para el término de “colúbrido” para referirse a cualquiera de las familias dentro del grupo parafilético arriba descrito y no solo a la familia Colubridae en sentido estricto.

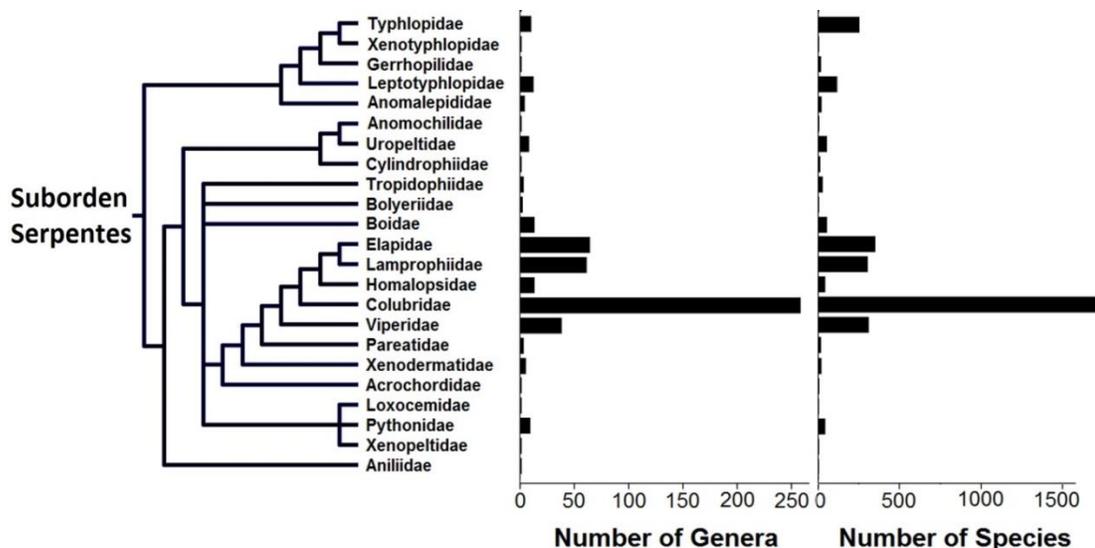


Figura 1 - Distribución filogenética de la diversidad de géneros y especies vivientes dentro de las familias descritas del suborden serpentes. Tomado y modificado de Pincheira-Donoso et al. (2013).

Pyron et al. (2013) propusieron para este grupo una filogenia basada en estimaciones taxonómicas en la que tomaron 12,896 pares de bases de 12 genes de secuencias de 4,161 especies. Esta filogenia provee información de todos los niveles superiores del orden Squamata, tomando en cuenta todas las familias y subfamilias reconocidas hasta entonces. Ellos confirman que una monofilia de la familia Colubridae y sus subfamilias es frágil y debatible, esto por la enorme radiación y divergencia que presenta este grupo entre sus especies en Asia y América; compartiendo sus nodos más cercanos e inmediatos con las familias Lamprophiidae y Elapidae (Fig. 2). Aún así, los autores mencionan que deberán hacerse más análisis para darle robustez a las relaciones filogenéticas que ellos proponen, advirtiendo la posibilidad de futuras variaciones en ellas conforme se utilicen más caracteres morfológicos y moleculares.

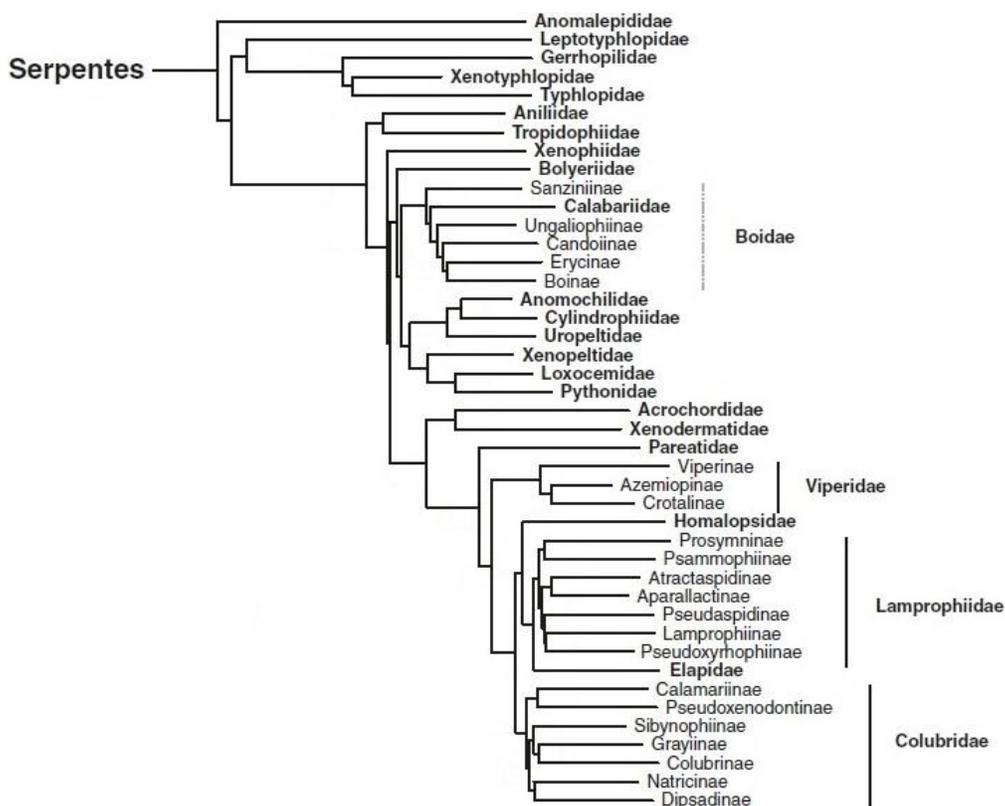


Figura 2 - Filogenia propuesta por Pyron et al. (2013) donde se muestra a la familia Colubridae compartiendo los nodos basales más cercanos con las familias Lamprophiidae y Elapidae. Tomado y modificado de Pyron et al. (2013).

Se consideraban a estos ofidios como no venenosos hasta los reportes de casos de envenenamientos severos causados por *Dipholidus typus* y *Rabdophis sp.* (Mittleman & Goris, 1978; Pope, 1958), esto debido a que alrededor de 760 especies de las serpientes avanzadas de dentición no proteroglifa ni solenoglifa también producen un veneno especializado (Fry et al., 2008; Mackessy, 2002a; Pyron et al., 2013; Vidal & Hedges, 2002). Son muchas las especies de colúbridos que poseen un tipo de dentición particular denominada opistoglifa, en el cual se sitúan un par de dientes posteriores alargados y acanalados asociados a una glándula cefálica especializada llamada glándula de Duvernoy (GVD) (Fig. 3) la cual es bilateral (Duvernoy, 1832; Dowling; 1978; Kardong, 2002).

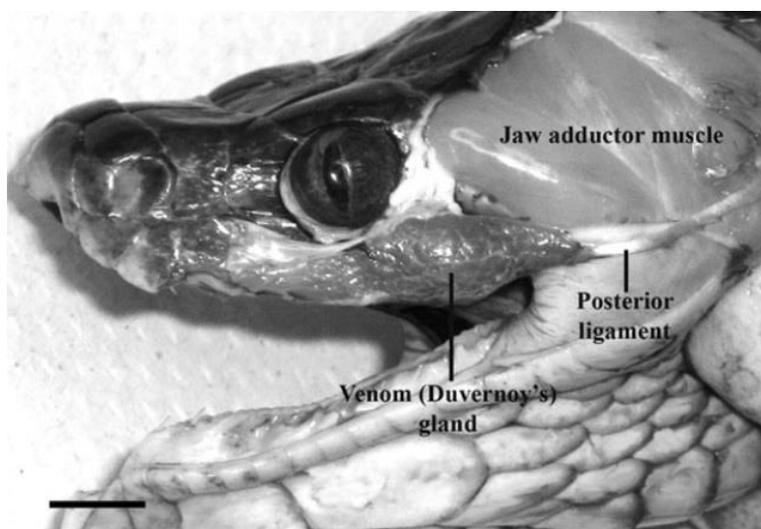


Figura 3 - Glándula de veneno de Duvernoy de *Boiga irregularis* (Colubridae). La glándula yace en una posición relativamente similar a aquellas de colmillos frontales, pero a diferencia de vipéridos, la glándula no está asociada a un músculo compresor. La administración del veneno se produce por la presión en contra de la piel de la presa de los músculos aductores de la mandíbula, y la glándula es retraída por el ligamento posterior. Tomado de Mackessy (2010a).

Diversos géneros de serpientes de la familia Colubridae que presentan este tipo de dentición con secreciones tóxicas están presentes en el continente americano: *Trimorphodon*, *Leptodeira*, *Oxybelis*, *Coniophanes*, *Hypsiglena*, *Leptophis*, *Clelia*, *Conophis*, *Heterodon*, *Imantodes*, *Nerodia*, *Rhadinaea*, *Oxyrophus*, *Stenorhina*, *Tantilla*, *Urotheca*, *Xenodon*, *Diadophis*, *Drymobius*, *Oxybelis*, por mencionar algunos (Brazil & Vellard, 1926; McKinstry, 1978; Taub, 1967). Este grupo de serpientes que presentan este tipo de dentición, es un ensamble heterogéneo de especies que evolucionaron de manera separada con variedades diversas y diferentes de secreciones orales que forman un grupo parafilético, a diferencia de las serpientes de las familias Viperidae y Elapidae que son monofiléticas (Kardong, 2002). Aunque se ha sugerido que se supla el término de “glándula de Duvernoy” en colúbridos por el de “glándula de veneno” (Fry et al., 2003), en este trabajo se considera la propuesta por Saviola et al. (2014)

utilizando el término “glándula de veneno de Duvernoy”, ya que mantiene el referente histórico (Taub, 1967) y remite a las características biológicas y evolutivas propias de la homología con la glándula de veneno de las serpientes de colmillos frontales.

La glándula de veneno de Duvernoy (GVD) es una glándula serosa o sero-mucosa situada en el área supralabial posterior de muchas especies de este grupo (Taub, 1967), poco se sabe de su rol biológico, excepto que en unas pocas especies es altamente venenosa matando a su presa (FitzSimons & Smith, 1958; Pope, 1958). Asimismo, el conocimiento sobre la evolución de esta glándula es limitado, aunque se piensa que derivó de algún tipo de glándula dental (Kochva, 1978). Kochva (1965) mostró que la GVD de los colúbridos existentes y las glándulas de veneno de vipéridos y elápidos se derivan del mismo tejido embrionario, que es la lámina dental del maxilar, una característica que se ha pensado que indica homología. Aunque es un carácter homólogo a las glándulas de veneno de vipéridos y elápidos, es anatómica y funcionalmente distinta (Figs. 4 y 5). Generalmente carece de una amplia reserva de secreción, su vaciado se realiza bajo un flujo de presión baja, y la secreción no es canalizada a través de colmillos huecos (Kardong, 2002).

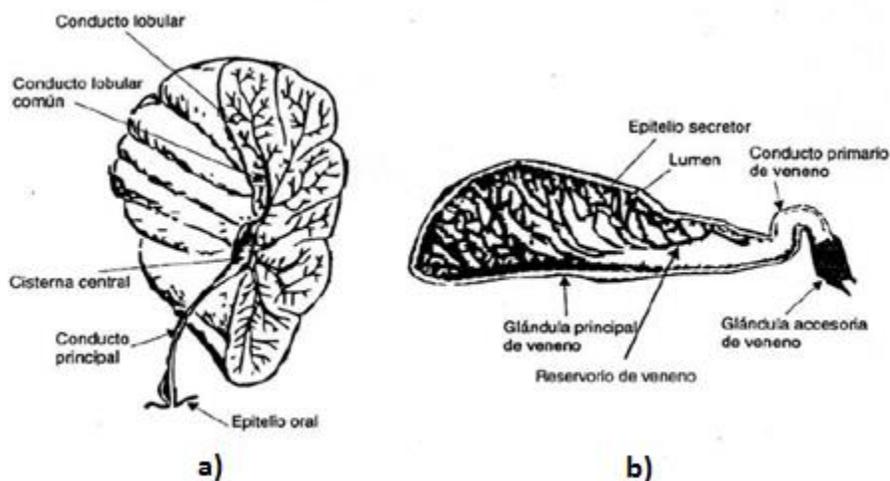


Figura 4 – Glándula de Duvernoy y glándula de veneno: Comparación entre colúbridos y vipéridos. a) En la figura se observa el arreglo del sistema de conductos internos de la glándula de Duvernoy, dichos conductos drenan el parénquima. Es un simple conducto que parte de la cisterna central dentro de la glándula y se extiende en el epitelio oral rodeando el diente maxilar posterior. b) Vista sagital de la glándula de veneno, se observa el epitelio secretor así como un reservorio grande de veneno (Weinstein y Kardong, 1994).

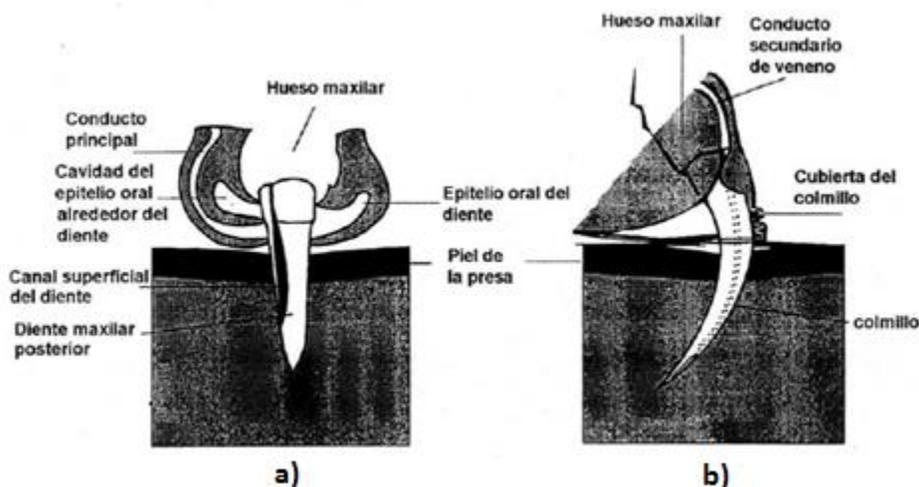


Figura 5 – Sistema dental inoculador de veneno: comparación entre colúbridos y vipéridos. a) Al penetrar en la piel de la presa, el epitelio oral permanece en la superficie y la secreción de Duvernoy escurre por el surco o canal del diente. b) Cuando el colmillo penetra la piel de la presa, la unión del conducto de veneno mantiene una alta presión y el veneno pasa sin obstrucción llegando a tejido profundo (Weinstein y Kardong, 1994).

A pesar de que la secreción proveniente de la GVD contiene toxinas, son pocas las especies de colúbridos que la utilizan para matar sus presas de manera rápida. Se maneja hasta hoy en día que la evolución de la glándula de veneno así como la evolución previa de los dientes inoculadores, comenzó en las especies de colúbridos, la GVD es el predecesor evolutivo de la glándula de veneno (Gans & Elliot, 1968; Kochva, 1978). Una serie morfológica construida ahora de la GVD muestra su transformación a la glándula de veneno de los vipéridos y elápidos (Kardong, 2002).

Taub (1967) analizó las glándulas salivales de 180 especies de serpientes, describió las glándulas de Duvernoy histológicamente y su variación intraespecífica, comparando sus patrones de similitud con los esquemas filogenéticos propuestos hasta entonces para la familia Colubridae (Fig. 6).

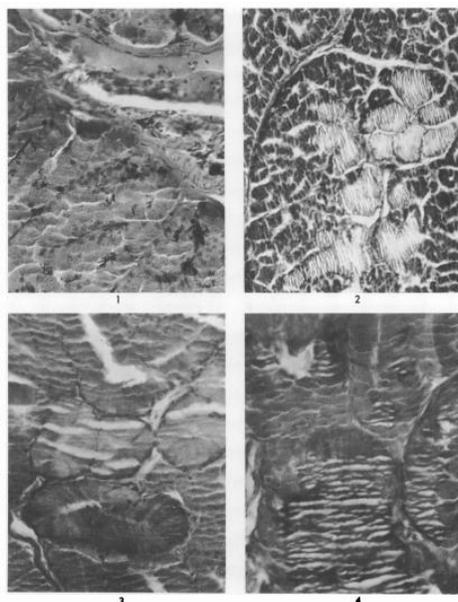


Figura 6 - Glándulas de Duvernoy. 1. *Pytas mucosus*, mostrando una amplia distribución de cromatóforos. El ducto principal está lleno de producto de secreción. 2. *Natrix cyclopion floridana*, mostrando distribución de células mucosas entre lóbulos. 3. *Thamnophis cyrtopsis*, mostrando distribución de lóbulos de células mucosas. 4. *Xenochrophis piscator*, mostrando las relativamente pocas células serosas. Tomado de Taub (1967).

La información sobre la bioquímica y farmacología de esta secreción oral es escasa para la mayoría de las especies dentro de este grupo, y la poca disponible detallada acerca de la composición química se limita para unas pocas especies que representan un potencial dañino para los seres humanos (Mackessy, 2002a). Sólo dos proteínas han sido secuenciadas en su totalidad, la alfa-colubritoxina, aislada del veneno de la culebra ratonera asiática *Coelognathus radiatus* (Fry et al., 2003), y la tigrina de la serpiente también asiática *Rabdophis tigrinus*, esta

última siendo una toxina de tres dedos (3FTx) con una extensión de siete aminoácidos N-terminal afín a las 3FTxs presentes en elápidos (Yamazaki et al., 2002).

Indistintamente de que posean una capacidad limitada para inyectar la suficiente cantidad de veneno para generar daños sistémicos y locales relevantes en seres humanos, se especula que los venenos de los colúbridos sean altamente eficientes dentro del contexto ecológico apropiado de cada especie, significando que sus venenos pueden ser tan ricos y diversos en proteínas, péptidos y toxinas como aquellos provenientes de las especies de relevancia médica (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016). Los venenos de los colúbridos representan una extensa fuente de componentes moleculares y toxinas nuevas (Mackessy, 2002a, 2002b). En el mundo ocurren cientos de accidentes ofídicos con este grupo de serpientes que presentan cuadros variables de envenenamiento, algunos muy agresivos debido a la acción de sus toxinas capaces de producir alteraciones locales y sistémicas (Frayre-Torres et al., 2006; Peñuela-Gómez, 2010; Rodríguez-Acosta et al., 2006). Este tipo de envenenamiento se ha conocido por más de 100 años, sin embargo no parece tener importancia en medios divulgativos, aparentemente debido a las deficiencias en la identificación de las especies en cuestión así como la falta de registro y notificación de los accidentes a pesar de que han llegado a causar decesos (Ferlan et al, 1983; Jackson, 2003; Mittleman & Goris, 1978); también hay estudios que registran efectos de envenenamientos locales y sistémicos en condiciones de laboratorio (Hiestand & Hiestand, 1979; Kornalik et al., 1978; Rodríguez-Robles, 1992; Rosenberg, 1992). Un aspecto importante acerca del porqué las especies opistoglifas y su veneno ha sido históricamente poco estudiado es por el tiempo intensivo requerido en las técnicas de colecta del veneno, en relación a los bajos volúmenes del mismo obtenidos de muchas de las especies (Hill & Mackessy, 2000).

Existe un número de componentes compartidos entre los venenos de los colúbridos con aquellos de vipéridos y elápidos, y conforme se conozca más sobre el tema es posible que surjan más similitudes así como divergencias. El veneno de los colúbridos es un carácter homólogo con el resto de las serpientes venenosas de colmillos frontales, pero su composición molecular así como su función biológica presumen ser diferentes, algunos venenos muestran una alta toxicidad ante ratones, y otros frente a aves, reptiles y/o anuros solamente (Gans, 1978; Rosenberg et al., 1985; Jansen, 1987; Vest, 1981; Fry et al., 2008).

Comparados con los venenos de serpientes de colmillos frontales, la riqueza de componentes en el proteoma de las serpientes opistoglifas tiende a ser menos compleja (Ching et al., 2006, 2012; Mackessy, 2002a; Weldon & Mackessy, 2009), pero se ha observado una alta variación entre especies. Se han encontrado proteínas pertenecientes a al menos ocho familias proteicas diferentes; las metaloproteasas (MP) y proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP) hasta ahora están como componentes mayoritarios. Las especies que presentan MPs se tratan del tipo P-III similares a las de los vipéridos; y algunas especies presentan 3FTxs estructuralmente similares a aquellas halladas en venenos de elápidos (Saviola et al., 2014).

Hasta ahora, los resultados de los estudios del veneno de este grupo de serpientes sugieren que la toxicidad más alta se presenta ante presas nativas locales, indicando una posible tendencia a la especialización, ha sido reconocida la capacidad letal del veneno de algunas de estas especies de colúbridos frente a especies presa (como roedores) y frente a presas nativas locales (Mackessy, 2002a). Se han determinado las dosis letales mínimas para *Philodryas patagoniensis* con palomas, conejillos de indias, conejos y ranas (*Leptodactylus* sp.) donde las palomas resultaron ser las más sensibles (Martins, 1917). Secreciones de la GVD de *Drymobius bifossatus* resultaron tóxicas para palomas, conejos, ranas y conejillos de indias, y una vez más

las palomas fueron las más sensibles; siendo sus efectos descritos principalmente neurotóxicos; el veneno de *Herpetodryas carinatus* produjo una parálisis progresiva que fue letal ante palomas, conejillos de indias, conejos y sapos (*Bufo* sp.), ranas (*Hyla* sp.) y serpientes (*Bothrops* sp.); mientras que el veneno de *Xenodon merriemii* no fue tóxico para las palomas y los conejos; pero sí para ranas arborícolas del género *Hyla* sp. (Brazil & Vellard, 1926).

Son relativamente pocos los constituyentes enzimáticos que comparten ambos grupos de serpientes de colmillos frontales y colmillos posteriores. Las proteasas con actividad frente a la caseína y otros sustratos generales se encuentran comúnmente entre los venenos de colúbridos, pero muchas enzimas comunes en venenos como las serinoproteasas, fosfodiesterasas y otras nucleasas, L-aminoácido oxidasas, acetilcolinesterasas, fosfolipasas y otras se presentan mucho menos distribuidas en ellos. Han sido caracterizadas y aisladas muy pocas proteínas de sus venenos, principalmente por sus bajos volúmenes ya que es difícil obtenerlo (Kamiguti et al, 2000; Weinstein & Kardong, 1994).

En los últimos años, se han desarrollado avances en las técnicas de estudio a la par de los métodos de extracción, que han aumentado gradualmente el entendimiento de los venenos de este grupo de serpientes. Se han identificado características similares al del veneno de serpientes de colmillos frontales para diversas especies, pero debido posiblemente a la inmensa diversidad taxonómica de los colúbridos, una variedad de estrategias de composición han sido reveladas, resultando en proteomas altamente diversos (Mackessy, 2002a, 2010). Además, los colúbridos opistoglifos pertenecen a linajes evolutivos muy diferentes de vipéridos, elápidos y demás serpientes de colmillos frontales, disponiendo de un alto potencial para el descubrimiento de proteínas hasta ahora desconocidas, y proporcionando un mayor entendimiento de las amplias tendencias evolutivas entre las serpientes venenosas (Saviola et al., 2014).

En México, existen alrededor de 393 especies descritas de serpientes que representan el 11.4% de la riqueza total de herpetofauna en el país, siendo la familia Colubridae la más grande y diversa dentro del orden Serpentes conteniendo 35 géneros y 133 especies, 58 (43.6%) de las cuales son endémicas al territorio nacional (Flores-Villela & Canseco-Márquez, 2004).

*Trimorphodon tau* (Cope, 1870) está descrita como una especie ovípara de tamaño mediano y cuerpo moderadamente robusto, llegando a alcanzar una longitud hocico-cloaca de 695 mm (Fig. 7). Se encuentra ampliamente distribuída a lo largo de la Vertiente de la Sierra Madre Occidental, Oriental y Sierra Madre del Sur (Fig. 8). Son conocidos de la Planicie costera y desde la Meseta Central en las colinas de de la Cuenca del Balsas y Tepalcatepec, hasta el Istmo de Tehuantepec, en Oaxaca. Su alimentación generalmente es a base de lagartijas llegando a alimentarse de mamíferos pequeños en cautiverio y posiblemente en vida silvestre (Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayén, 2010).

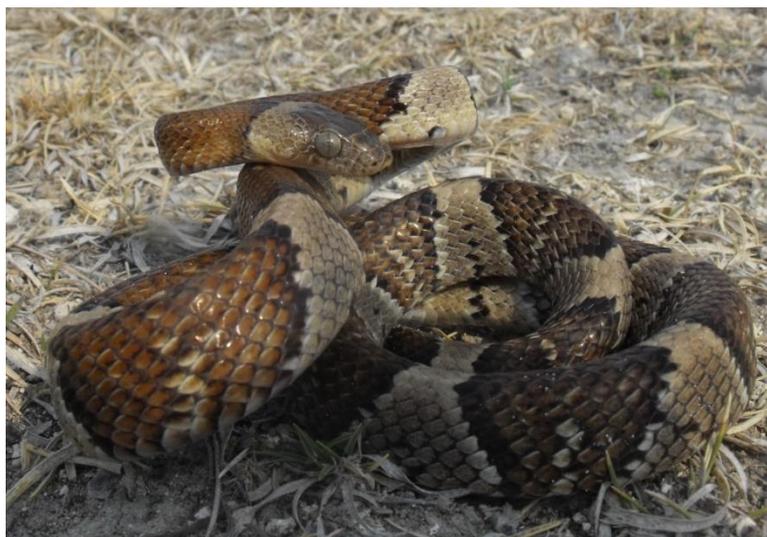


Figura 7 – *Trimorphodon tau*, ejemplar juvenil, Huehuetlán el Chico, Puebla. Fotografía propia del autor.

El espécimen que se utilizó pertenece a la colección interna del herpetario del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Es un espécimen macho, adulto, de edad desconocida con número de registro IBt-041.

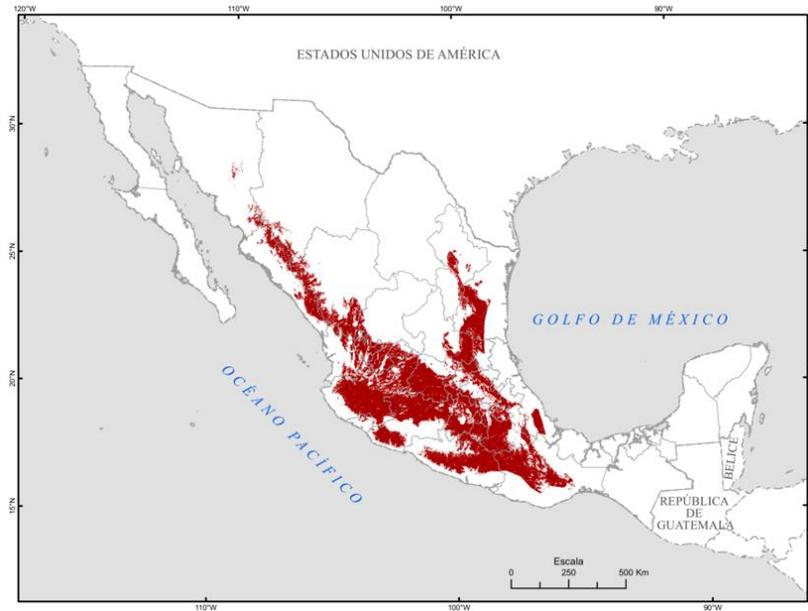


Figura 8 – Área de distribución geográfica de *T. tau*. Tomado de Ochoa-Ochoa et al., 2006.

## ANTECEDENTES

Vest (1981) reporta hemorragia localizada y hemorragia sistémica en ratones tras inocularles secreción tóxica de la glándula de Duvernoy de *Thamnophis elegans*, el cual fue liofilizado y reconstituido en solución salina, presentándose muerte por paro respiratorio 150 minutos después de inyectar dosis letales. Jansen (1987) sugiere una acción mionecrótica de la secreción tóxica de la glándula de Duvernoy.

Rosenberg et al. (1985) indica que dosis subletales de la secreción oral de *Spalorosophis diadiema*, *Malpolon monspessulanus* y *Thamnophis sirtalis* inoculadas en ratones de laboratorio provocaron parálisis, trastornos respiratorios e inmovilización parcial.

Ramjan y Fry (1991) caracterizaron los venenos de seis especies de colúbridos (*Boiga dendrophila*, *B. cynodon*, *B. drapezii*, *B. irregularis*, *B. trigonata* y la saliva de *Pytas carinatus*) utilizando cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC/MS). Aislaron y secuenciaron dos toxinas de 25,044 Da (CRISP) y 8,769 Da (3FTx) de *Boiga dendrophila*.

Encontraron que las secuencia N-terminal de las proteínas que se presentaban en *B. drapezii*, *B. irregularis* y *B. trigonata*, con masas moleculares de 24,938, 25,167 y 24,720 Da respectivamente se presentaba de igual manera en diversas isoformas también en la saliva de *Pytas carinatus*, tratándose de una proteína secretora rica en cisteína (CRISP). Con la obtención de mRNA de la glándula, reportan que presenta una secuencia homóloga en el N-terminal con la helotermina, una metaloproteína que actúa en contra de los receptores de rianodina y bloquea la salida de  $Ca^{2+}$  (Mochca-Morales et al., 1990 ; Morrissette et al., 1995), así como con proteínas

tipo CRISP de mamíferos y proteínas relacionadas con patogénesis en plantas y otras similares en insectos.

Otro péptido de 8,769 Da del veneno de *B. dendrophila*, reveló homología con una toxina de tres dedos ( $\alpha$ -colubritoxina) de *Coelognathus radiatus*, con isoformas presentes en todas las especies antes mencionadas, incluyendo a *P. carinatus*, lo que puede indicar un soporte a la hipótesis que en algunos colúbridos se dio la preferencia a la constricción como método de captura y sumisión de la presa con la subsecuente pérdida de la glándula de Duvernoy, en donde las proteínas presentes en la saliva se tratan de proteínas ancestrales.

Hill y Mackessy (2000) caracterizaron el veneno colectado de 12 especies de colúbridos, en los cuales encontraron que la mayoría presenta actividad proteolítica y fosfodiesterasa en *Amphiesma stolata*, *Diadophis punctatus*, *Heterodon nausicus kennerlyi*, *H. n. nausicus* y *Thamnophis elegans vagrans*. *Boiga irregularis* presenta acetilcolinesterasa tanto en saliva como en el veneno. Se encontró actividad de alta fosfolipasa A2 (PLA<sub>2</sub>) en *Trimorphodon biscutatus lambda* y moderada en *Boiga dendrophila*, *Diadophis punctatus* y *Heterodon nausicus nausicus*. Actividad proteasa en componentes de *Amphiesma stolata*, *Hydrodynastes gigas*, *Tantilla nigriceps* y *Thamnophis elegans vagrans*. Se encontraron secuencias proteicas de masas moleculares aproximadamente de 26 kDa en *H. gigas*, *H. torquata* y *T. biscutatus*, y un componente 3.5 kDa en *T. nigriceps*, el cual presenta una aparente presencia homóloga de un factor de crecimiento del endotelio vascular del ser humano.

Mackessy (2002a) compiló una lista de algunas de las enzimas hasta entonces encontradas en estudios del veneno de especies de diversos colúbridos (Cuadro 1).

Cuadro 1 – Tipos de proteínas por superfamilia con actividad enzimática hasta entonces encontradas y caracterizadas en veneno de colúbridos, la especie en las que se encuentran y si también se encuentran presentes en Viperidae y Elapidae. Tomado de Mackessy (2002a).

<b>Enzima</b>	<b>Especie</b>	<b>Viperidae</b>	<b>Elapidae</b>
<b>Acetilcolinesterasa</b>	<i>Nerodia sipedon</i>	Sí	Sí
	<i>Alsophis portoricensis</i>		
	<i>Boiga dendrophila</i>		
	<i>Boiga blandingi</i>		
	<i>Boiga irregularis</i>		
	<i>Boiga dendrophila</i>		
<b>Fosfolipasa A2</b>	<i>Dispholidus typus</i>	Sí	Sí
	<i>Thelotornis capensis</i>		
	<i>Boiga dendrophila</i>		
	<i>Diadophis punctatus regalis</i>		
	<i>Leptodeira annulata</i>		
	<i>Malpodon monspessulatus</i>		
	<i>Rhabdophis subminiata</i>		
<i>Trimorphodon biscutatus lambda</i>			
<b>Fosfodiesterasa y fosfatasas</b>	<i>Boiga dendrophila</i>	Sí	Sí
	<i>Pituophis lelanoleucus sayi*</i>		
<b>Metaloproteasas</b>	<i>Leptodeira annulata</i>	Sí	Sí
	<i>Dispholidus typus</i>		
	<i>Hydrodynastes gigas</i>		
	<i>Philodryas olfersii</i>		
<b>Serinoproteasas</b>	<i>Philodryas olfersii</i>	Sí	Sí

\*Hallada en saliva, no en veneno

Fry et al. (2003), utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa, analizaron los venenos de diversas especies que representan a los clados de serpientes más avanzados (Atractaspididae, Colubrinae, Elapidae, Homalopsinae, Natricinae, Psammophiinae, Pseudoxyrhophiinae, Xenodontinae y Viperidae) que incluyen a 22 especies de colúbridos, las cuales mostraron una variedad menor de componentes que los atractaspídidos, vipéridos y elápidos. En el veneno de la especie *Dispholidus typus* se encontró la enzima activadora de protrombina, en el resto se encontró que en la mayoría están presentes proteínas con masas moleculares y tiempos de retención consistentes con 3FTxs ausentes en venenos de vipéridos. El estudio reveló una considerable diversidad de proteínas en los venenos de los colúbridos,

alertando sobre su potencial para investigaciones que pueden ir desde la evolución de las serpientes, su farmacología, desarrollo de medicamentos y medicina clínica.

Fue hasta el 2003 que se obtuvo la primera secuencia completa de una proteína proveniente de las secreciones orales de un colúbrido, la  $\alpha$ -colubritoxina de *Coelognathus radiatus*, una serpiente sin dentición opistoglifa, comunmente vendida como mascota. Se reportó que este péptido se comporta como una neurotoxina postsináptica en preparación neuromuscular de biventer cervicis de pollo, con una estructura total de 79 aminoácidos y una masa de 8,498 Da, con actividad antagónica en receptores nicotínicos. Presenta la estructura característica de 3FTx, péptidos previamente considerados como exclusivos a elápidos, indicando que posiblemente esta familia de toxinas fue reclutada en la composición química de las serpientes avanzadas tempranamente en su historial evolutivo (Fry et al., 2003).

Arce (2004) comparó el efecto tóxico con cantidades equivalentes de secreciones orales y venenos inyectados de cuatro especies de colúbridos, *Trimorphodon tau*, *Trimorphodon biscutatus*, *Oxybelis fulgidus* y *Salvadora bairdi*; y cuatro especies de vipéridos *Crotalus basiliscus*, *C. triseriatus*, *Agkistrodon bilineatus* y *Sistrurus ravus*, concluyendo que ambos grupos presentaron daños a órganos vitales aunque el grupo de vipéridos de una manera más rápida y eficiente asociados a un mejor aparato inoculador y a una mayor toxicidad en ratones.

Huang y Mackessy (2004) dan a conocer el primer reporte del aislamiento, purificación, caracterización bioquímica y secuencia parcial de una PLA<sub>2</sub> del veneno de un colúbrido, denominada como trimorfina. La masa fue determinada por espectrometría en formato MALDI-TOF en 13,996 Da, y una secuencia de N-terminal de 50 residuos de aminoácidos. Esta secuencia N-terminal, comparada con las secuencias de otras 86 PLA<sub>2</sub>s indica que la trimorfina

se trata de una PLA<sub>2</sub> del tipo IA, compartiendo los residuos que son altamente conservados en PLA<sub>2</sub>s IA presentes en venenos de elápidos, que indica una cercanía a PLA<sub>2</sub>s de serpientes marinas y elápidos australianos.

Ching et al. (2006) registraron datos de proteínas putativas presentes en el transcriptoma y su presencia en el proteoma del veneno de *Philodryas olfersii*. Revelaron que las metaloproteasas (MP) son los transcritos más abundantes, y que además presentan el sitio conservado en el motivo de unión al zinc (HEXXHXXGXXH) encontrándose igualmente dominios de la región desintegrina con los motivos DCD ó ECD, y una secuencia de la región rica en cisteína, homólogas a aquellos precursores de metaloproteasas P-III, más afines a las MP's presentes en elápidos y atractaspídidos que aquellas presentes en vipéridos. Las serinoproteasas (SP) fueron detectadas por medio de secuencias similares a tripsina, que es la proteína precursora. Lectinas tipo C (CTL) y proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP) también detectadas por secuencias homólogas; y el precursor de un péptido natriurético (NP) muy similar aquel presente en Viperidae por homología en su precursor BPP/CNP, incluyendo al péptido señal, el linker y el CNP.

Otra 3FTx se aisló, se secuenció y se obtuvo su cristal estructural del veneno de *Boiga dendrophila* denominada denmotoxina por Pawlak et al. (2006). La denmotoxina es un polipéptido monomérico de 77 aminoácidos con cinco puentes disulfuro. Presentó una potente actividad neuromuscular postsináptica igualmente en la preparación neuromuscular de biventer cervicis de ave que inhibe de manera irreversible las contracciones nerviosas *in-vitro*.

Igualmente, Pawlak et al. (2009) reportan otra 3FTx de *Boiga irregularis*, la cual compone aproximadamente el 10% del total de proteína en el veneno. Estructuralmente está

constituída por dos subunidades, la subunidad A de  $8,379.6 \pm 0.2$  Da; y la subunidad B de  $8,677.8 \pm 0.1$  tratándose de una asociación covalente y única entre las 3FTx, ambas subunidades unidas por un puente disulfuro. Cada una de las subunidades tiene una 11va Cys y son sustancialmente diferentes a aquellas denominadas  $\kappa$ -neurotoxinas, las únicas 3FTxs diméricas, y presenta una alta neurotoxicidad postsináptica específica a la unión neuromuscular en aves.

Otra 3FTx fue hallada en el veneno de *Oxybelis fulgidus*, la fulgimotoxina, con una actividad altamente neurotóxica a lagartijas, no así a ratones. La fulgimotoxina, monomérica, presenta los 5 puentes disulfuro regulares de las 3FTx no convencionales, y tiene el motivo conservado de las toxinas de colúbridos (CYTLY) y un segmento conservado homólogo con 3FTxs hallados en *Boiga* sps. y *Oxybelis* sps. (WAVK) en el bucle II (Heyborne & Mackessy, 2013).

Amalid et al. (2011) caracterizaron las actividades proteolíticas y neurotóxicas de las toxinas de las secreciones orales de *Helicops angulatus*, describiendo e identificando una proteína secretora rica en cisteína (CRISP) nombrada helicopsina, la cual mostró una actividad neurotóxica letal provocando parálisis respiratoria en ratones. Los autores sugieren que esta puede ser evidencia de una extensa variedad de potentes neurotoxinas presentes en la superfamilia Colubroidea.

Junqueira-de-Azevedo et al. (2016) realizan una compilación general y un análisis de los diferentes enfoques proteómicos y transcriptómicos que se han abordado hasta el momento en los avances en el estudio del veneno de colúbridos, concluyendo aspectos importantes con implicaciones biológicas y evolutivas:

- Para la mayoría de las especies de colúbridos, especialmente en la subfamilia Dipsadinae, las metaloproteasas en el veneno son componentes que predominan tanto en el transcriptoma como en el proteoma. Todas las secuencias de estos componentes descritas en Colubridae pertenecen a la clase metaloproteasas P-III, que incluyen pre- y pro-dominios, un dominio catalítico de metaloproteinasa, un dominio tipo desintegrina y un dominio rico en cisteína. La ausencia de metaloproteasas P-II, P-I y desintegrinas de código corto, muestra consistencia con la hipótesis que esas proteínas evolucionaron dentro de la familia Viperidae de un gen P-III antecesor, posterior a la separación filogenética. A pesar de una gran diversidad entre las metaloproteasas en colúbridos, se comparte un ancestro común con las metaloproteasas P-III de elápidos y actractaspídidos.
- Las PLA<sub>2</sub>s aparentemente no representan unos de los componentes principales en los venenos de los colúbridos y se han hallado en pocas especies. *Trimorphodon biscutatus* presenta una PLA<sub>2</sub> tipo IA, mientras que en *Dispholidus typus*, *Oxyrhopus guibei* y *Leioheterodon madagascarensis* se han hallado del tipo IIE (Fry et al., 2012).
- Transcritos de lectinas tipo C resultan abundantes en venenos de colúbridos en transcriptoma, con secuencias anidadas en los clados de Elapidae y Viperidae.
- Se pensaba que la crotamina estaba restringida para el género *Crotalus*. Sin embargo, genes de crotamina y defensinas homólogas han sido halladas en otros géneros de vipéridos y en transcritos de glándulas de veneno en niveles relativamente altos de

expresión en el transcriptoma de los colúbridos *Thamnodynastes strigatus* y *Phalotris mertensi*.

Cuadro 2. Compilación de componentes detectados en proteomas de veneno de colúbridos hasta 2016. LAAO: L-amino oxidasas; PLA<sub>2</sub>: Fosfolipasas tipo A2; MP: Metaloproteasas; SP: Serinoproteasas; 3FTx: Toxinas de tres dedos; CRISP: Proteínas secretoras ricas en cisteína; CTL: Lectinas tipo C; DEFEN: Defesinas; KUN-1: Proteínas Kunitz tipo 1.

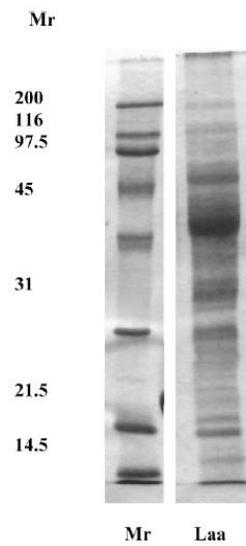
COMPONENTE	Especie	REFERENCIA
<b>Enzimáticos</b>		
<b>LAAO</b>	<i>Phalotris mertensi</i>	Campos et al, 2016.
<b>PLA<sub>2</sub></b>	<i>Trimorphodon biscutatus</i>	Huang y Mackessy, 2004.
<b>MP</b>	<i>Boiga irregularis</i> , <i>Borikenophis portoricensi</i> , <i>Cerberus rynchops</i> , <i>Dispholidus typus</i> , <i>Hypsiglena</i> sp., <i>Philodryas olfersii</i> , <i>Thamnodynastes strigatus</i>	McGivern et al, 2014; Mackessy et al., 2006; Pawlak et al., 2009; Weldon y Mackessy, 2010; 2012; OmPraba et al., 2010; Fry et al., 2008; 2012; Kamiguti et al., 2000; Petras et al., 2015; Ching et al., 2006; 2012.
<b>SP</b>	<i>Phalotris mertensi</i>	Campos et al, 2016.
<b>No enzimáticos</b>		
<b>3FTx</b>	<i>Boiga dendrophila</i> , <i>Boiga irregularis</i> , <i>Coleognathus radiatus</i> , <i>Oxybelis fulgidus</i> , <i>Trimorphodon biscutatus</i>	Pawlak et al., 2006; Lumsden et al., 2005; McGivern et al., 2014; Mackessy et al., 2006; Pawlak et al., 2009; Fry et al., 2003; Heyborne y Mackessy, 2013; Peichoto et al., 2012; Huang y Mackessy, 2004.
<b>CRISP</b>	<i>Boiga irregularis</i> , <i>Borikenophis portoricensi</i> , <i>Cerberus rynchops</i> , <i>Helicops angulatus</i> , <i>Hypsiglena</i> sp., <i>Hypsiglena torquata</i> , <i>Philodryas baroni</i> , <i>Philodryas olfersii</i> , <i>Philodryas patagoniensis</i> , <i>Thamnodynastes strigatus</i> , <i>Trimorphodon bistuctatus</i>	Pawlak et al., 2006; Lumsden et al., 2005; McGivern et al., 2014; Weldon y Mackessy, 2010; 2012; OmPraba et al., 2010; Estrella et al., 2011; Petras et al., 2015; Peichoto et al., 2012; Fry et al., 2012; Ching et al., 2006; 2012.
<b>CTL</b>	<i>Cerberus rynchops</i> , <i>Hypsiglena</i> sp., <i>Philodryas olfersii</i> , <i>Thamnodynastes strigatus</i>	OmPraba et al., 2010; Petras et al., 2015; Fry et al., 2012; Ching et al., 2006.
<b>DEFEN</b>	<i>Phalotris mertensi</i>	Campos et al, 2016.
<b>KUN-1</b>	<i>Phalotris mertensi</i>	Campos et al, 2016.

Los venenos de los diferentes grupos de serpientes venenosas comparten algunos componentes, pero aquellos que no son compartidos resultan altamente diferentes en su composición química, posiblemente a sus distintos roles biológicos, lo cual puede arrojar novedosos compuestos químicos de interés para la medicina y farmacología humanas (Kardong, 2002).

Una de las caracterizaciones más completas hasta ahora del veneno de un colúbrido, es para *Leptodeira annulata*, colúbrido de la subfamilia Dipsadinae, especie de hábitos semi arborícolas que habita desde el sur de México hasta el norte de Argentina. Mebs (1968) registró actividades PLA<sub>2</sub>, PDE y proteolíticas *in vitro*. Más adelante, Lemoine et al. (2004) encontraron una diversidad de componentes muy amplia en el veneno de *Leptodeira annulata ashmeadii* observada en su separación proteica por SDS-PAGE (Fig. 9), reportan igualmente neurotoxicidad y una alta actividad hemorrágica *in vivo*, y separando los componentes por cromatografía de intercambio iónico hallaron actividad hemorrágica en embriones de pollo y ratón por inyecciones intraperitoneal y subcutánea; y alteraciones neurotóxicas variadas como disnea, pérdida de equilibrio, parálisis en extremidades posteriores, parálisis flácida, contracciones abdominales, bradipnea, agresividad, dolor, parestesia y relajación de esfínter urinario.

Torres-Bonilla et al., (2016) evaluaron más a detalle las actividades enzimáticas y los efectos neuromusculares en el veneno de *Leptodeira annulata* en mamíferos y aves con resultados interesantes, reportan bloqueo neuromuscular moderado en la preparación de biventer cervicis de pollo; despolarización leve en membrana muscular en las preparaciones de nervio frénico de ratón; y alta actividad metaloproteasa en azocaseína y baja actividad fosfolipasa.

Figura 9 - SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 20 %. Mr: Marcador de peso molecular (kDa); Laa: Veneno completo de *Leptodeira annulata ashmeadii* (cantidad proteica no especificada por los autores). Tomado de Lemoine et al. 2004.



## JUSTIFICACIÓN

La mayoría de la investigación referente a venenos ha tenido un enfoque tradicionalmente antropocéntrico, restringiéndola a serpientes de colmillos frontales de relevancia médica por sus efectos adversos en la salud humana. Éstas representan una pequeña proporción de las especies existentes de las serpientes avanzadas, y en consecuencia, una gran parte de la biodiversidad de serpientes que presentan veneno no ha sido sistemáticamente evaluada de la misma manera, dejando un vacío de conocimiento en el repertorio de proteínas, toxinas y péptidos que éstas poseen.

Ya que los colúbridos son más diversos y de una radiación evolutiva distinta del resto de las serpientes venenosas, el estudio y la comprensión de la composición de su veneno es imperativo para entender la evolución del veneno mismo entre serpientes; y es una fuente inexplorada y extensa de novedosos componentes con hasta ahora desconocido potencial farmacológico.

En México, la familia Colubridae es la más grande y diversa dentro del orden Serpentes conteniendo 35 géneros y 133 especies, 58 de las cuales son endémicas al territorio nacional (Flores-Villela & Canseco-Márquez, 2004). La investigación se limita a su ecología, taxonomía y biogeografía, la información disponible publicada sobre la composición química de su veneno o su potencial farmacológico es escasa, por no decir inexistente.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Caracterizar e identificar el tipo de componentes proteicos principales que constituyen el veneno de *Trimorphodon tau*, y otros presentes en el veneno de *Leptodeira splendida*, *Conophis lineatus*, *Oxybelis aeneus* y *Leptophis mexicanus*.

### Objetivos particulares

Determinar el perfil proteico del veneno de *T. tau* e identificar las familias proteicas a la que pertenecen sus principales proteínas.

Obtener secuencias aminoacídicas de las proteínas que componen al veneno de *T. tau* y determinar sus principales actividades enzimáticas.

Determinar el perfil proteico del veneno de *Leptodeira splendida*, *Conophis lineatus*, *Oxybelis aeneus* y *Leptophis mexicanus* e identificar las familias proteicas a las que pertenecen.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### I. Organismos de estudio y extracción de veneno

Se obtuvieron secreciones de veneno de diversas especies de colúbridos opistoglifos (descritos más adelante). Los ejemplares “ordeñados”: a) pertenecieron taxonómicamente a la familia Colubridae; b) presentaron dentición del tipo opistoglifa y glándulas de Duvernoy; c) presentaron viabilidad para coleccionar secreciones por medio de la técnica de estimulación parasimpaticomimética.

Se utilizó la técnica de colecta directa propuesta por Hill y Mackessy (Hill & Mackessy, 2000) que fue el método más eficiente para obtener las secreciones de la glándula de Duvernoy libre de materiales ajenos. Con este método se evita sacrificar a los organismos, permite realizar repetidas extracciones a la misma serpiente y se pueden obtener los volúmenes relativamente más altos de su veneno.

Para facilitar la colecta y prevenir lesiones a la serpiente y al colector, se utilizó clorhidrato de ketamina como anestesia, seguida por estimulación de secreción con pilocarpina-HCl parasimpaticomimética. Una dosis de 22  $\mu\text{g}$  de ketamina/g del peso corporal de la serpiente se administró vía subcutánea (intramuscular en serpientes adultas de talla grande) en un volumen de 50 – 750  $\mu\text{L}$  (dependiendo del tamaño de la serpiente: el volumen mínimo es mejor). La inyección se aplicó con una jeringa de insulina de 50 unidades subcutáneamente en la superficie lateral de la piel anterior al corazón (típicamente en el primer 10–20 % de la longitud); la inmovilización usualmente se presentó entre los 20 – 30 minutos posteriores a la aplicación. En la superficie contralateral, a la misma distancia de la cabeza, una dosis de 6  $\mu\text{g}$  de pilocarpina/g del peso corporal total de la serpiente se administró intramuscularmente en un volumen similar

posterior a los efectos anestésicos requeridos; la secreción oral glandular comenzó aproximadamente 5 minutos después y fue precedida por una secreción mucosa oral.

La recolección del veneno se realizó colocando dorsalmente a la serpiente con el hocico abierto, acoplando capilares de 50  $\mu\text{L}$  dentro de la lámina dental alrededor del diente posterior acanalado (Fig. 10). Las muestras de secreción se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL o 2 mL.

Esta técnica demostró presentar diversas ventajas: 1) el manejo de la serpiente es más fácil y es más seguro para el ejemplar y para el colector; 2) el producto obtenido, tanto en volumen como en masa es típicamente suficiente para sus análisis subsecuentes; y 3) la contaminación con materiales exógenos como saliva, sangre y epitelio es baja. Son desconocidos los efectos de la estimulación parasimpáticomimética sobre la composición proteica del veneno, aunque hay datos de estimulación parótida con roedores que sugieren que no es alterada (Marmary et al., 1987).

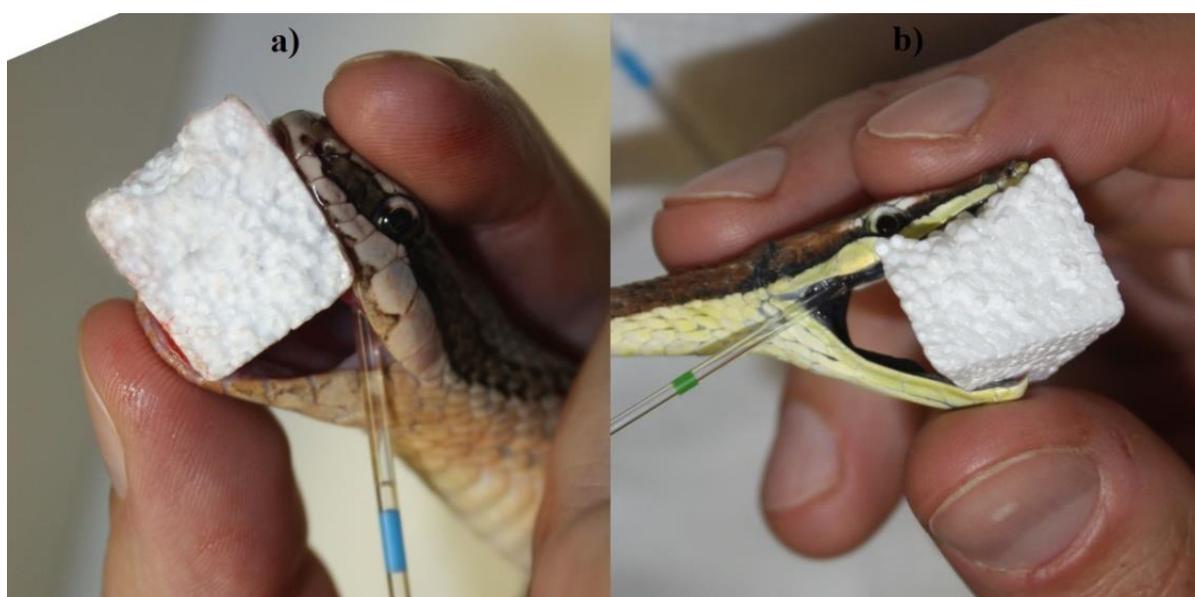


Figura 10 – Colecta de veneno en capilares. a) *Conopsis lineatus*; b) *Oxybelis aeneus*.

## **II. Cuantificación de concentración y cantidad proteica**

Una vez obtenida la muestra de veneno del colúbrido, esta se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm para separar todos aquellos componentes que no son propios del veneno tales como sangre, detritos celulares, epitelio y secreciones mucosas (Fry et al., 2003; Huang & Mackessy, 2004).

El sobrenadante se tomó de la muestra centrifugada y se diluyó en acetato de amonio 20mM pH 4.7, el cual es un amortiguador volátil que permite suspender la muestra cuantas veces sea necesario manteniendo las propiedades de las proteínas; además permite cuantificar por absorbancia a 280 nm y es compatible como amortiguador para fases móviles de cromatografía líquida (Berman et al., 2008). El volumen utilizado del amortiguador de acetato de amonio varió dependiendo de la cantidad de veneno obtenido, cuidando de no diluir demasiado la muestra.

Se cuantificó el contenido proteico por método de espectrofotometría a una absorbancia de 280 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000.

Esta técnica se adapta muy bien a los rendimientos consistentemente bajos obtenidos de venenos de colúbridos: al ser poco específica, que lee a partir de la luz absorbida por las fenilalaninas, los triptófanos y tirosinas presentes en las proteínas, posee un rango de sensibilidad de 50 µg/mL a 2 mg/mL, permite recuperar la muestra cuantificada, su costo es bajo y posibilita una reproducibilidad a largo plazo (Aitken & Learmonth, 1996; Berman et al., 2008; Noble & Bailey, 2009; Webster, 1970).

## **III. Estimación de peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Esta técnica, denominada SDS-PAGE, permite el análisis de la proteína en su forma nativa o desnaturalizada. Mediante la electroforesis es posible separar las moléculas biológicas

en dependencia fundamentalmente de su carga bajo la influencia de un campo eléctrico que provoca la migración de solutos iónicos hacia el cátodo o ánodo dependiendo de su carga neta, peso molecular y estructura tridimensional. Esta técnica permite estimar el peso molecular (PM) de una proteína, comparando su movilidad electroforética con la de proteínas de PM conocido. Se utilizaron geles de poliacrilamida (PAGE) de donde se puede obtener información básica de complejidad protéica de los venenos con sólo 5 – 40 µg de veneno crudo (Brunelle & Green, 2014; Lomonte, 2007).

En este caso se realizaron geles de poliacrilamida para proteínas al 12.5% en condiciones reductoras (SDS-PAGE), utilizando marcadores de peso molecular de la marca Bio-Rad con amplitud de rango de 2 – 250 kDa. La tinción de los geles se realizó con azul brillante de Coomassie R250 de Bio-Rad por 4–6 horas, posteriormente se destiñó con una solución compuesta por 10% de isopropanol y 10% de ácido acético en un lapso de 4–6 horas.

#### **IV. Fraccionamiento de componentes por HPLC de fase reversa**

Esta técnica de cromatografía líquida, denominada Cromatografía Líquida de Alta Resolución, es posiblemente la más utilizada en el estudio de las proteínas. Separa a los componentes en orden de hidrofobicidad, separando a las moléculas de las más polares a las menos polares. La separación cromatográfica se realiza por fase reversa, la cual tiene como principio el de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar y una fase estacionaria apolar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil (Fry et al., 2003). En este caso, se utilizó una columna analítica C18 (Vydac #218TP; 300 Å, 5 µm, 4.6 mm i.d. x 250 mm) en un gradiente de solución A de acetonitrilo de 0 a 60% + 0.1% de ácido

trifluoroacético (TFA) con solución B de agua tetradestilada estéril + 0.1% de TFA en 60 min a un flujo de 1 mL/min acompañado de una lectura de espectrofotometría a 230 nm y otra a 280 nm de absorbancia.

Seguido a lo anterior, las fracciones se colectan manualmente al salir del detector en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL o 2 mL.

## **V. Caracterización y ensayos biológicos**

Las fracciones colectadas fueron secadas al vacío en un centrífuga -secador Savant-SpeedVac para eliminar el acetonitrilo, y posteriormente fueron suspendidas en H<sub>2</sub>O tetradestilada estéril para cuantificar la concentración proteica y conservar las muestras para futuros ensayos de actividad enzimática, espectrometría de masas, y secuenciación peptídica.

## **VI. Ensayos de actividad enzimática**

**a) Fosfolipasa** – Se utilizó el modelo de placa rodamina yema de huevo agar según Habermann y Hardt (1972):

- 1.- Se obtuvo una yema de huevo, completamente libre de la clara.
- 2.- Posteriormente, se pesó y diluyó la yema con 0.1 M Tris-HCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 % Triton X-100 en un volumen de 150 mL, para tener una concentración final de la yema del 20 % (P/V) pH 8.
- 3.- Se mezcló con un agitador magnético durante 10 min y se centrifugó a baja velocidad (1,500 rpm) por 5 min. Finalmente se tomó solo el sobrenadante.

Preparación de la placa de agarosa con rodamina-yema:

- 1.- Se fundió 0.1 g de agarosa en 10 mL de 0.2 M Tris/HCl pH 8.

- 2.- A la agarosa se añadió 1 mL de 10 mM CaCl<sub>2</sub>
- 3.- Se agregaron 8 mL de Rodamina 6G al 0.1 %
- 4.- 100 mL Triton X-100
- 5.- Se añadieron 2 mL de yema de huevo

La mezcla se adicionó a una caja Petri dejando gelificar la agarosa para por último perforar los pozos con una punta de micropipeta de 200 µL donde se aplicaron las muestras. Para este ensayo se utilizaron 3 µg de veneno completo de *Micrurus fulvius* como control positivo (+) y agua desionizada como control negativo (-).

b) **Proteasa** – Para detectar la actividad metaloproteasa de componentes presentes en el veneno, se utilizó el modelo de Zimograma en Gelatina y Caseína.

- 1- Se prepararon dos geles SDS-PAGE al 12 %, uno con 0.1 % de gelatina y el otro con 0.1 % caseína. La gelatina se disolvió en agua y la caseína primero se alcalinizó con 20 µl de 10M NaOH y posteriormente se le añadió agua. Durante la preparación de las soluciones para el gel, la gelatina y la caseína se incubaron a 37° C para una mejor disolución.
- 2- Se prepararon las muestras en el buffer de carga (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 40% Glicerol, 0.003% Azul de bromofenol).
- 3- La electroforesis se corre a 20mA hasta que las bandas proteicas se separen a lo largo del gel.
- 4- Después de la electroforesis, el gel se lavó con el buffer de renaturalización (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2.5% Tritón X-100) durante 30 minutos, se realizan dos lavados. Este paso tiene como función remover el SDS presente en el gel.

- 5- Se añade el buffer de lavado (50 mM Tris-HCl pH 8.0) cada 15 min, se realizan dos lavados. Este paso tiene como función remover el Tritón presente en el gel.
- 6- El gel es incubado en el buffer de activación (50 mM Tris-HCl pH8.0, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>) durante 20 h a 37° C.
- 7- El gel es teñido por 1h con 0.4 % Azul de Coomassie R-250 (diluido con 40 % Metanol, 10 % Ácido acético). Posteriormente, es desteñidos con la solución 40 % Metanol, 10 % Ácido acético por 30 min.

## VII. Actividad específica PLA<sub>2</sub>

Para la determinación de la actividad fosfolipasa específica, se utilizó el procedimiento titulométrico con yema de huevo como sustrato (Shiloah et al., 1973). Una unidad de fosfolipasa se define como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de ácido graso por minuto a pH 8 y 25°C en 3 ml de una solución al 10% (P/V) de yema de huevo en 0.1 M de NaCl.

### 1. Preparación de la solución de yema de huevo 10%:

#### a.) solución estándar 150 mL

	[ ] stock	[ ] trabajo	Vol. a añadir
NaCl	5 M	0.1 M	3 mL
CaCl <sub>2</sub>	0.1 M	0.01 M	15 mL
Triton X 100	20%	0.5%	3.75 mL

#### b.) Se pesa la yema de huevo y se afora con solución estándar hasta 10% (ej. 14 g – 140 mL)

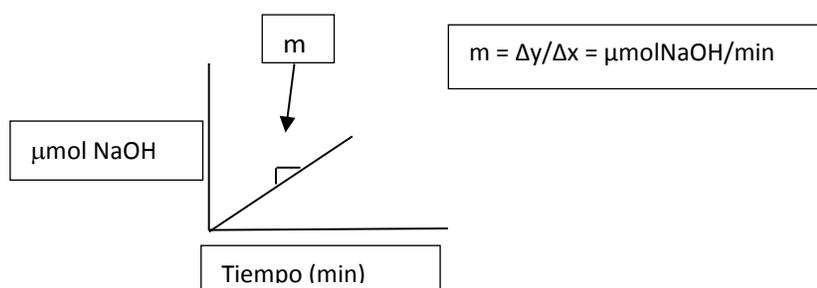
#### c.) Agitar durante 10 min.

#### d.) Centrifugar a 1,500 rpm (380G) durante 5 min y recuperar el sobrenadante.

### 2. En 500 $\mu$ L de solución de yema de huevo 10% mantener una agitación constante bajo ligero burbujeo de Nitrógeno.

### 3. Llevar la solución a un pH 8.05 con NaOH 50mM.

4. Agregar 1  $\mu\text{L}$  de veneno [1mg/mL]\*
5. Cuando el pH llegue a 7.99 agregar un vol. de NaOH 50 mM (entre 1 y 5  $\mu\text{L}$ ) suficiente para recuperar el pH superior a 8.0.
6. Medir el tiempo transcurrido desde la adición de NaOH hasta que el pH vuelva a bajar a 7.99
7. Repetir hasta obtener 5 mediciones.
8. Hacer el procedimiento por triplicado.
9. Obtener la pendiente resultante de graficar la cantidad ( $\mu\text{mol}$ ) de NaOH en función del tiempo (min).



10. La pendiente ( $m$ ) representa la cantidad de NaOH consumida por minuto. La actividad del veneno se reporta en unidades que se definen como  $\mu\text{mol}$  de NaOH consumidas por minuto ( $m = U$ ).
11. Sacar promedio de las tres pendientes y calcular la actividad específica definida como unidades por mg de veneno.

\*La concentración de veneno puede modificarse con el fin de que el ensayo tenga un comportamiento lineal.

### VIII. Espectrometría de masas MS/MS

Las muestras fueron reducidas con dithiothreitol (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA), alquiladas con iodoacetamida (Sigma-Aldrich) y digeridas *in gel* con tripsina (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin; Madison, WI, USA). En la digestión de la muestra se

utilizó una solución que contiene bicarbonato de amonio 50 mM (pH 8.2) con incubación de 18 horas a temperatura de 37°C.

#### **a) Análisis espectrométrico**

Los péptidos producidos por clivaje enzimático fueron desalados con Zip Tip C18 (Millipore; Billerica, MA, USA) y aplicados en un sistema LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) compuesto de una bomba ACCELA (Thermo-Fisher Co.; San Jose, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) con fuente de ionización tipo nano-electrospray (ESI).

En la cromatografía de líquidos de nano flujo en línea se utilizó un sistema gradiente de 5-80% de solvente B (acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) con un tiempo de corrida de 120 minutos utilizando una columna capilar RP-C18 hecha en casa (0.75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 20 cm de largo). El flujo del sistema fue de 300 nanolitros/minuto.

El escaneo total de iones (Full Scan) fue realizado en el analizador Orbitrap con un poder de resolución de masas (Resolution Power;  $\text{RP}=\text{m}/\text{FWHM}$ ) de 60,000. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma de-pendiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas (se fragmentaron iones con carga  $z^{2+}$ ,  $z^{3+}$  y  $z^{4+}$ ) con un ancho de aislamiento de 2.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 10 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 500 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 90 segundos.

## **b) Búsqueda en el Protein Data Bank (PDB) e identificación de proteínas**

La identificación de proteínas se realizó con los datos espectrométricos en formato .raw en el programa Proteome Discoverer 1.4. (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) a través del motor de búsqueda Sequest HT. Para la búsqueda de identidad se utilizó la base de datos de proteínas Trimorphodon descargado de uniprot y SwissProt. Se utilizó un FDR-False Discovery Rate (Mínimo) de 0.01 y FDR 0.05 (Máximo) además de la base de datos invertida (Decoy database) como herramienta del programa de validación “Percolator”. La tolerancia máxima de diferencia de masas moleculares del ion precursor comparados con los valores teóricos contra experimentales (precursor mass tolerance) fue de 20 ppm y la tolerancia para los fragmentos obtenidos por disociación del ion precursor (fragment mass tolerance) fue de 0.6 Da. Para la búsqueda automática fueron establecidas modificaciones constantes (carbamidometilación de cisteínas (C) y variables como oxidación de metioninas (M) y desaminación de asparagina (N) y glutamina (Q).

## RESULTADOS

Se obtuvieron las secreciones orales de 5 especies: *Trimorphodon tau*, *Leptodeira splendida*, *Conophis lineatus*, *Oxybelis aeneus* y *Leptophis mexicanus*. Las especies de las que mayor volumen y cantidad proteica se obtuvieron fueron *T. tau* y *C. lineatus*, con 6.2 mg y 2.7 mg de veneno respectivamente. Es importante mencionar que para los casos de *T. tau* y *L. splendida* se juntaron tres y dos ordeñas consecutivas con el fin de tener la mayor cantidad de veneno para realizar los análisis subsiguientes (Cuadro 3).

Cuadro 3 - Identificación para cada uno de los especímenes ordeñados (I.D.); su peso corporal vivo al momento de la extracción; el número de ordeñas que le fueron realizadas; y su respectivo rendimiento en cantidad proteica total ( $\mu\text{g}$ ). Estas fueron las cantidades totales iniciales con las que se trabajó todo el proceso que se describe a continuación para cada especie.

Especie	I.D.	Peso (g)	No. de ordeñas	Cantidad proteica total ( $\mu\text{g}$ )
<i>Trimorphodon tau</i>	Trta01	372	3	6,200
<i>Leptodeira splendida</i>	Lesp01	56.5	2	2,200
<i>Conophis lineatus</i>	Coli01	275	1	2,745
<i>Oxybelis aeneus</i>	Oxae01	50	1	315
<i>Leptophis mexicanus</i>	Leme02	55	1	98

En una estimación inicial del peso molecular de los componentes del veneno de las 5 especies por SDS-PAGE se observaron similitudes y diferencias en las secreciones individuales. Los venenos de *Leptodeira splendida* y *Conophis lineatus* son los que se observan con mayor diferencia de las demás por las bandas proteicas que presentan en comparación con las demás especies. *L. splendida* presenta seis bandas proteicas que oscilan entre los 20 y 50 kDa, mientras que *C. lineatus* presenta cuatro en una escala únicamente de entre los 30 y 40 kDa. Mientras que los venenos de *Trimorphodon tau*, *Oxybelis aeneus* y *Leptophis mexicanus* parecen presentar una relativa similitud, con la presencia de tres bandas bien definidas, una de alto peso molecular

entre los 50 y 75 kDa; otra de entre 20 y 25 kDa y otra de entre los 12 y 15 kDa. Cabe hacer mención que no se utilizó la misma cantidad proteica en todos debido a los bajos rendimientos de *O. aeneus* y *L. mexicanus* (Fig. 11).

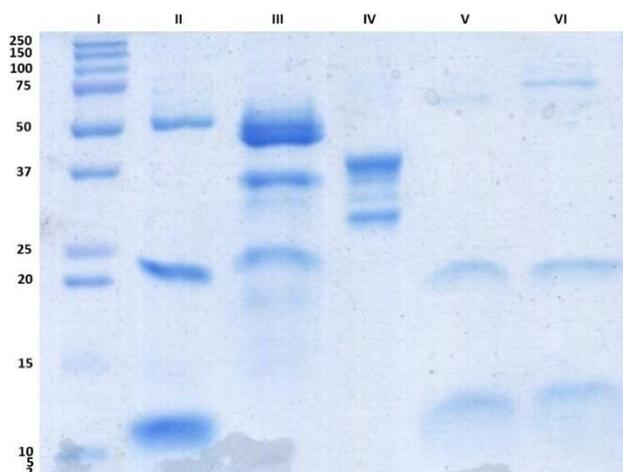


Figura 11. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12.5%. I: Marcador de peso molecular (kDa); II: *T. tau* (10 µg); III: *Leptodeira splendida* (10 µg); IV: *C. lineatus* (10 µg); V: *O. aeneus* (5 µg); VI: *Leptophis mexicanus* (8 µg).

Los resultados de actividades proteasa y fosfolipasa dieron positivo mediante un halo de actividad únicamente para el veneno de *Trimorphodon tau* en ambos ensayos (Figs. 12 y 13) en donde a cada placa se le aplicó 5 µg de veneno completo por pozo, esta prueba se realizó por triplicado.

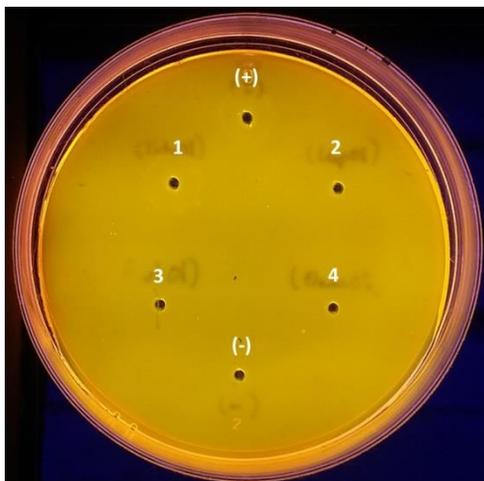


Fig. 12 – Ensayo de actividad proteasa en placa de caseína + zinc. (+): Veneno completo de *Bothrops asper* (5 µg); 1: Veneno completo de *T. tau* (5 µg); 2: Veneno completo de *L. splendida* (5 µg); 3: Veneno completo de *C. lineatus*; 4: Veneno completo de *O. aeneus* (5 µg); (-) Acetato de amonio 20 mM (5 µL).

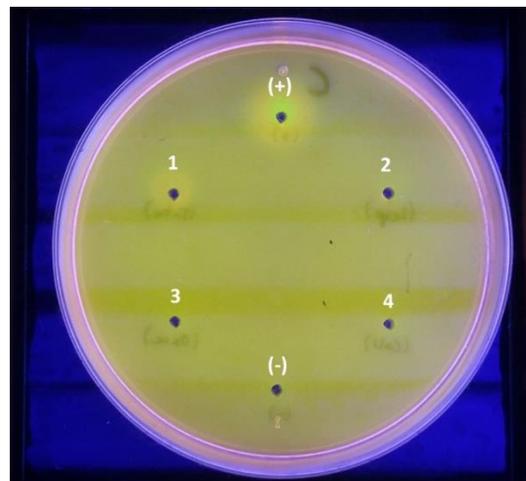


Fig. 13 – Ensayo de actividad fosfolipasa en placa de rodamina yema huevo agar. (+): Veneno completo de *Micrurus fulvius* (1 µg); 1: Veneno completo de *T. tau* (5 µg); 2: Veneno completo de *L. splendida* (5 µg); 3: Veneno completo de *C. lineatus*; 4: Veneno completo de *O. aeneus* (5 µg); (-) Acetato de amonio 20 mM (5 µL).

### 1.1 *Trimorphodon tau*

Se observan 6 bandas proteicas claramente marcadas. Las dos más altas revelan proteínas con una masa molecular alrededor de los 55,000 y 70,000 Da; una de alrededor de 26,000 Da; una de 16,000 Da; una de 13,000 Da; y otra de 12,000 Da. Llama la atención aquella que se marca con la menor masa molecular, es notoria por la manera en que se tiñó indicando una alta concentración, pudiendo tratarse de diversas proteínas en conjunto (Fig. 14).

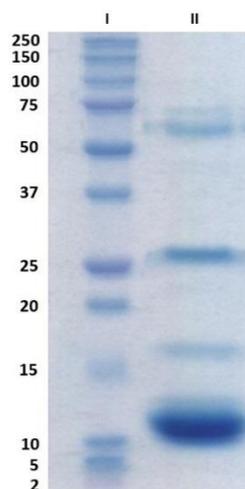


Figura 14. Gel SDS-PAGE 12.5%. I. Marcador de peso molecular (kDa); II. 20 µg de veneno completo de *T. tau*.

El ensayo de actividad metaloproteasa en zimograma de caseína, mostró que esta actividad se presenta en una banda proteica que se ubica en el gel con una masa molecular de alrededor de 37 kDa (Fig. 15) la cual es eluida en la fracción #6 del HPLC (Fig. 16). Las bandas proteicas en el zimograma de caseína se ven desplazadas por aproximadamente 10 kDa menos en comparación con los ensayos por SDS-PAGE, esto puede deberse a las condiciones no reductoras en las que se mide el peso proteico en el zimograma, ya que la banda que presenta actividad endoproteasa está situada virtualmente en el peso de alrededor de 47 – 50 kDa, lo cual es más acorde con la masa molecular reportada para MPs en venenos de ofidios y en los resultados obtenidos de las mismas proteínas en estimaciones por electroforesis en condiciones reductoras.

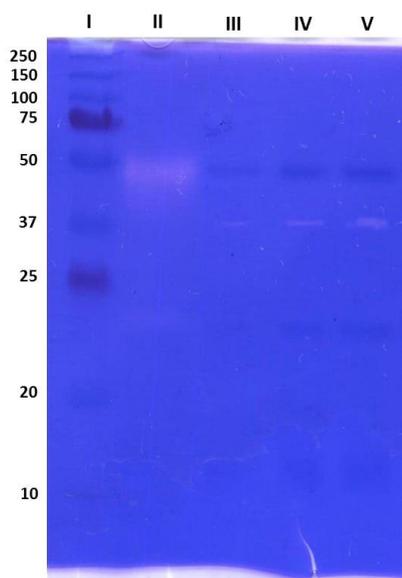


Fig. 15. Zimograma en gel de acrilamida SDS-PAGE 12 % con sustrato caseína + zinc. I: Marcador de peso molecular; II: Veneno completo de *Bothrops asper* (20  $\mu$ g); III: Veneno completo de *Trimorphodon tau* (10  $\mu$ g); IV: Veneno completo de *T. tau* (15  $\mu$ g); V: Veneno completo de *T. tau* (20  $\mu$ g).

El perfil cromatográfico y el fraccionamiento del veneno de *T. tau* se efectuó por HPLC-FR en una columna analítica C<sub>18</sub> con la elusión en un gradiente de 0 a 60% de acetonitrilo + 0.1% TFA en un flujo de 1ml/min (Fig. 16). Las fracciones colectadas fueron secadas al vacío y resuspendidas en H<sub>2</sub>O para su cuantificación proteica. Las fracciones 2, 4, 5 y 6 fueron las de mayor rendimiento (Cuadro 4). A todas las fracciones se les estimó su masa molecular por electroforesis en SDS-PAGE (Fig. 17) y se les efectuó un ensayo de actividad PLA<sub>2</sub> específico (Fig. 18) para determinar qué componente es el que presenta esta actividad previamente detectada.

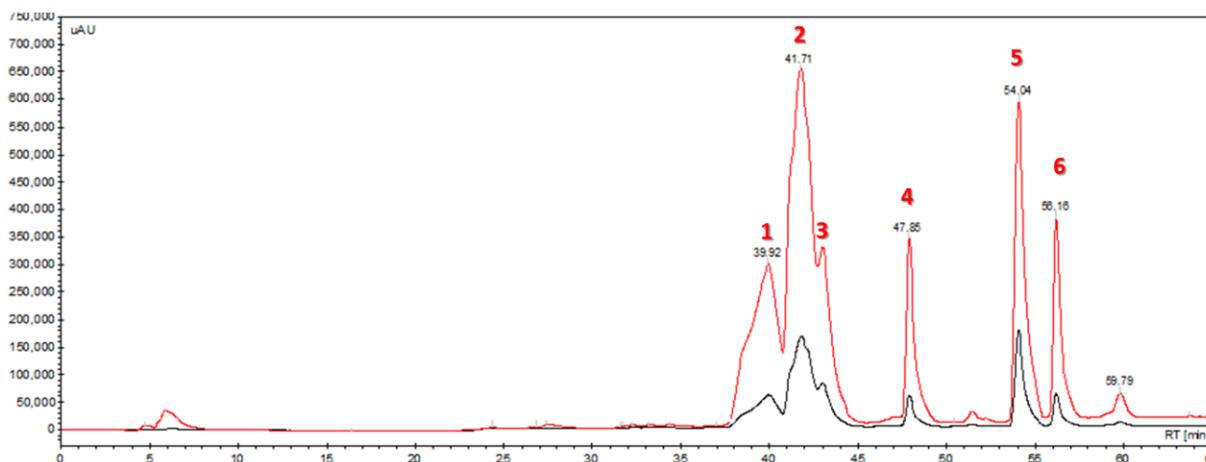


Figura 16 – Cromatograma de 400  $\mu\text{g}$  del veneno completo de *Trimorphodon tau*, la línea roja indica la lectura de absorbancia a 230 nm; la negra indica la lectura de absorbancia a 280 nm. Se observan 6 principales picos a partir de 37' que fueron colectados. Eje X (tiempo): 0 – 65; eje Y (absorbancia): 0 - 750,000 uAU.

Cuadro 4. Aspectos generales del fraccionamiento del veneno completo de *T. tau* por HPLC-FR (400  $\mu\text{g}$ ). Fr #: Número de fracción; T. Retención: Tiempo de retención del pico eluido; Total ( $\mu\text{g}$ ) (A 280nm): Total de cantidad proteica recuperada de la colección, dato obtenido mediante cuantificación manual por espectrofotometría a 280 nm; Porcentaje de recuperación: La cantidad recuperada por colección expresada en valor de porcentaje con respecto a la cantidad de veneno completo obtenido; Área bajo la curva (A 280nm)[%]: Cantidad de proteína calculada en el área bajo la curva de los picos de cada una de las fracciones, expresada en valor de porcentaje con respecto a la cantidad proteica total.

Fr #	T. Retención	Total ( $\mu\text{g}$ ) (A 280nm)	Porcentaje de recuperación (%)	Área bajo la curva (A 280nm)[%]
1	39.9'	83	20.8	19.2
2	41.7'	100	25	16.5
3	43.4'	58	14.5	12.5
4	47.8'	24	5.9	10.5
5	54.4'	88	21.9	24.0
6	56.2'	19	4.9	11.4
	<b>Total</b>	<b>372</b>	<b>92.9</b>	<b>94.1</b>

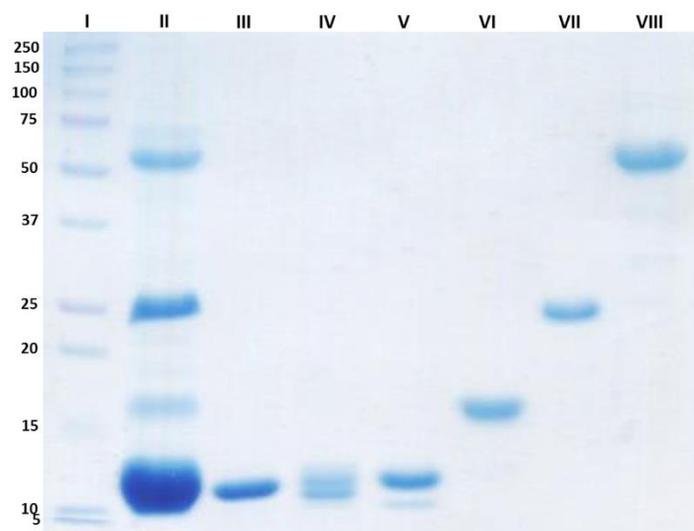


Figura 17. SDS-PAGE 12.5% en condiciones reductoras. I: Marcador de peso molecular (kDa); II: Veneno completo de *T. tau* (10  $\mu$ g); III: Fracción 1 (5  $\mu$ g); IV: Fracción 2 (5  $\mu$ g); V: Fracción 3 (5  $\mu$ g); VI: Fracción 4 (5  $\mu$ g); VII: Fracción 5 (5  $\mu$ g); VIII: Fracción 6 (5  $\mu$ g).

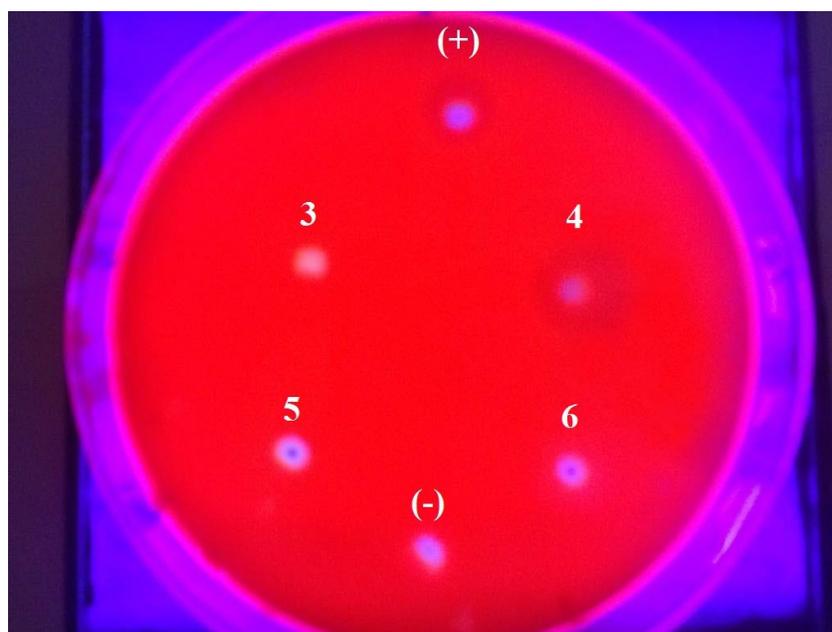


Figura 18 - Ensayo de actividad fosfolipasa de placa rodamina yema de huevo agar. (+): Veneno completo de *Micrurus browni* como control positivo (5  $\mu$ g); 3: Fracción 3 de *T. tau* (5  $\mu$ g); 4: fracción 4 de *T. tau* (5  $\mu$ g); 5: Fracción 5 de *T. tau*; 6: Fracción 6 de *T. tau* (5  $\mu$ g); (-)  $H_2O$  como control negativo (5  $\mu$ L).

La fracción #4, la cual tiene un peso estimado en banda de  $\approx 16,000$  Da, presentó actividad fosfolipasa en la placa de rodamina yema de huevo agar. Su actividad específica se obtuvo en 227.63 U/mg en la prueba titulométrica de sustrato de yema de huevo (Fig. 19).

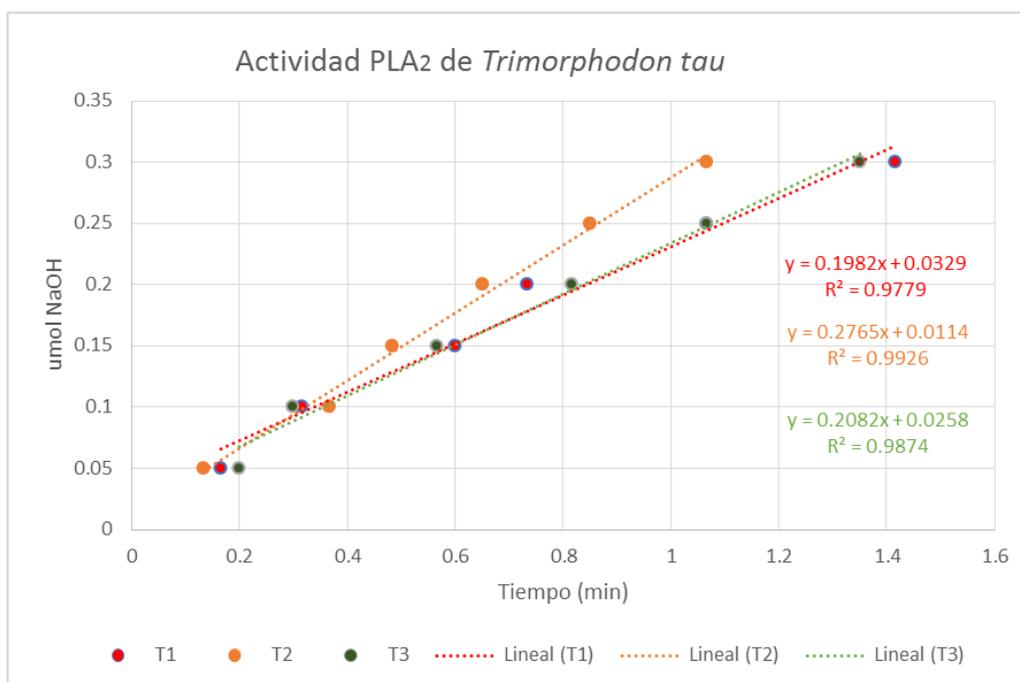


Figura 19 - Ensayo titulométrico de actividad PLA<sub>2</sub> específica, compuesto por tres repeticiones (T) cada pendiente (y) representa una repetición. Las unidades mol ( $\mu\text{mol}$ ) de NaOH (eje Y) consumidas a lo largo del tiempo (eje X) son el resultado de la liberación de ácido graso tras la catálisis enzimática de fosfolípidos de la yema de huevo por la fosfolipasa aislada del veneno.

Las secuencias parciales, en términos generales, arrojaron identidades con proteínas muy similares a algunas anteriormente descritas parcialmente en *Trimorphodon biscutatus lambda* y otras diversas especies de colúbridos, que a su vez presentan homologías compartidas y anidadas más con los venenos de elápidos que con los de vipéridos (Ramjan & Fry, 1991; Bryan G. Fry, Wüster, et al., 2003; Huang & Mackessy, 2004).

De cada fracción se obtuvieron secuencias parciales provenientes de uno o más péptidos distintos (Cuadro 5). Se seleccionaron aquellos que presentaron identidad por arriba del 70 % con una cobertura significativa (>70 %) con proteínas de estructura y función similares y organismos pertenecientes al mismo Phylum (Cuadro 6). Con esta información y tomando como base el área bajo la curva de los picos eluidos por HPLC-FR, se calcularon los porcentajes de la composición general del veneno de esta especie (Fig. 20).

Cuadro 5. Secuencias parciales halladas en los péptidos aislados de las fracciones colectadas por HPLC-FR del veneno de *T. tau*.

<b>FRACCIÓN #1</b>	
<b>Secuencia péptido 1</b>	NRSPQCFIEDRTCPTAGPGER
<b>FRACCIÓN #2</b>	
<b>Secuencia péptido 2.1</b>	GCAKTCPTAGPGERNRSPQCFIEDRQAIGPPFTRSPQCFIEDRTCPTAGPGERVK VKCCYSPR
<b>Secuencia péptido 2.2</b>	RSVLDFAFYGCYCGSGGSGTPVDDLDR
<b>Secuencia péptido 2.3</b>	GTAVDDLDRCCQVHDNCYGEAEKLGCPYLTLYKCEAAV CNCDLVAANCFAGAPYIDANYNVNLKERQ
<b>FRACCIÓN #3</b>	
<b>Secuencia péptido 3.1</b>	GPVIEQGC VATCPQFR
<b>Secuencia péptido 3.2</b>	QTCGASAKGRPT
<b>FRACCIÓN #4</b>	
<b>Secuencia péptido 4</b>	SYTCSERNVNCEGDNDECGAFVCECDRVA AICFARNLENDER
<b>FRACCIÓN #5</b>	
<b>Secuencia péptido 5.1</b>	CPASCFCHNKKCPASCFCHNK
<b>Secuencia péptido 5.2</b>	NVDFDSESPR
<b>Secuencia péptido 5.3</b>	RSVRPTASNMLKSGPTCGDCPSACDNGLCTNPCLREDKFTNCK
<b>FRACCIÓN #6</b>	
<b>Secuencia péptido 6.1</b>	ATSNPKHVIVGAGMSGLSAAAYVLAGAGHEVTVLEASERAGGR
<b>Secuencia péptido 6.2</b>	IPCEPQDVK

Cuadro 6. Familias proteicas por identidad de las fracciones peptídicas obtenidas del veneno de *Trimorphodon tau*. Se indica el número de fracción; el porcentaje de identidad; la familia proteica a la que pertenece; el nombre de la proteína y la especie de la que proviene. 3FTx: Toxina de tres dedos; PLA<sub>2</sub>: Fosfolipasa; Kunitz-type: Proteína tipo Kunitz; CRISP: Proteína secretora rica en cisteína; LAAO:L-aminoácido oxidasa; MP: Metaloproteasa. S.N: Sin nombre específico.

Fracción	Péptido	Identidad (%)	Familia proteica	Nombre proteína	Especie origen
1	1	100	3FTx	3FTx-Tri3	<i>Trimorphodon biscutatus lambda</i>
2	2.1	70	3FTx	Irditoxin	<i>Boiga irregularis</i>
	2.2	100	PLA <sub>2</sub>	S.N.	<i>Micrurus dumerilii</i>
	2.3	81	PLA <sub>2</sub>	Acidic phospholipase A2 CM-I	<i>Naja mossambica</i>
3	3.1	100	3FTx	Kappa-3-bungarotoxin	<i>Bungarus multicinctus</i>
	3.2	100	Kunitz-type	Kunitz-type serine protease inhibitor B5	<i>Daboia siamensis</i>
4	4	92	PLA <sub>2</sub>	Trimorphin	<i>Trimorphodon biscutatus lambda</i>
5	5.1	100	CRISP	Pseudechetoxin	<i>Pseudechis australis</i>
	5.2	100	CRISP	S.N.	<i>Protobothrops flavoviridis</i>
	5.3	84	CRISP	Cysteine-rich venom protein TRI1	<i>Trimorphodon biscutatus</i>
6	6.1	100	LAAO	S.N.	<i>Trimeresurus stenjnegeri</i>
	6.2	100	svMP	S.N.	<i>Bothrops erythromelas</i>

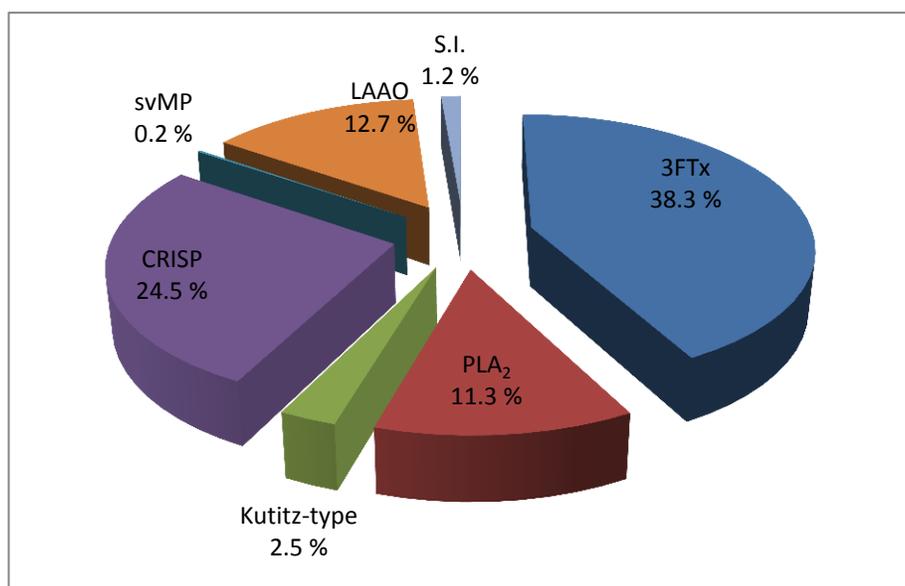


Figura 20 - Composición general del veneno de *T. tau* en porcentajes con base en la identificación de los componentes del área bajo la curva de las fracciones eluidas por HPLC-FR a A280nm. 3FTx: Toxinas de tres dedos, PLA<sub>2</sub>: Fosfolipasas A2; Kunitz-type: Proteínas tipo Kunitz; CRISP: Proteínas de veneno ricas en cisteína; SVMP: Metaloproteasas; S.I: componentes aún no identificados.

## 1.2 *Leptodeira splendida*

El espécimen fue colectado de vida silvestre en Temixco, Morelos. Fue donado a la colección viva del herpetario del IBt-UNAM.

La separación proteica por electroforesis del veneno completo muestra 21 bandas marcadas en una escala desde los  $\approx 5,000$  Da hasta los  $\approx 250,000$  Da, lo que revela una amplia diversidad de componentes proteicos. Hay presencia más marcada y notoria para aquellos componentes de alrededor de 50 kDa; una en la masa de 36 kDa; dos en los alrededores de 26 y 27 kDa; una de 18 kDa; una de 16 kDa; y otra en los 14 kDa (Fig. 21).

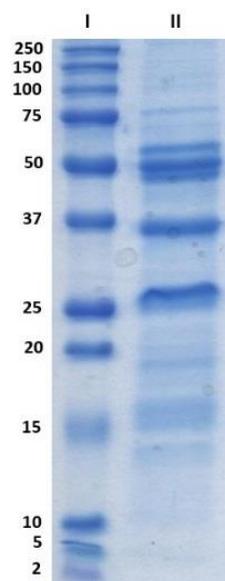


Figura 21 - SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 12.5%. I: Marcador de peso molecular (kDa); II: Veneno completo de *Leptodeira splendida* (10  $\mu$ g).

La espectrometría de masas realizada a las proteínas recuperadas directamente del gel (Cuadro 7) expuso identidades de proteínas de veneno ricas en cisteína (CRISP) para aquellas proteínas en el orden de  $\approx 26,000$  Da en banda de electroforesis; de ficolina-lectina para las proteínas en el orden de  $\approx 36,000$  Da; y de flavoamino oxidasas aquellas en el orden de  $\approx 50,000$  Da (Cuadro 8).

Cuadro 7. Secuencias parciales halladas en los péptidos aislados de las bandas recuperadas del gel de poliacrilamida del veneno de *L. splendida*.

BANDA ≈26,000 Da	
Secuencia péptido 1	CPASCFCHNK
Secuencia péptido 2	CTLNHSPR
Secuencia péptido 3	MEWYSEAASNAER
BANDA ≈36,000 Da	
Secuencia péptido 1	RQDGSVNFYRQGSEFWLGNDK
BANDA ≈50,000 Da	
Secuencia péptido 1	AFDWGSR
Secuencia péptido 2	VIEIQNDR

Cuadro 8. Identidad de los péptidos obtenidos del veneno de *Leptodeira splendida*. Se indica la banda del que procede el péptido (Fig. 8); el péptido correspondiente; el porcentaje de identidad; la familia proteica a la que pertenece; el nombre de la proteína; y la especie de la que proviene. CRISP: Cisteine Rich Secretory Protein.

Banda (Da)	Péptido	Identidad	Familia proteica	Nombre proteína	Especie origen
≈26,000	1	100%	CRISP	CRVP ophanin	<i>Ophiophagus hannah</i>
	2	100%	CRISP	CRVP	<i>Echis coloratus</i>
	3	100%	CRISP	CRVP tigrin	<i>Rhabdophis tigrinus tigrinus</i>
≈36,000	1	100%	Ficolina lectina	Ryncolin-4	<i>Cerberus rynchops</i>
≈50,000	1	100%	Lipasa	Putative lysosomal acid lipase	<i>Crotalus adamanteus</i>
	2	100%	Flavoamino oxidasa	L-amino-acid oxidase	<i>Crotalus adamanteus</i>

Aquellos péptidos aislados de la banda de ≈26,000 Da, dieron identidades para proteínas tipo CRISP halladas en el veneno de las especies *Ophiophagus hannah*, elárido nativo de India y el sureste asiático; *Pseudechis porphyriacus*, elárido nativo de Australia; *Pseudechis australis*, elárido nativo igualmente de Australia; *Demansia vestigiata*, elárido originario de Australia y Papúa Nueva Guinea; *Protobothrops jerdonii*, vipérido nativo de India, Nepal, Myanmar, China y Vietnam; *Echis coloratus*, vipérido de Medio Oriente y Egipto; *Rhabdophis tigrinus tigrinus*, colúbrido nativo del este y el sureste asiático; *Dispholidus typus*, colúbrido nativo de el África subsahariana; *Trimorphodon biscutatus*, colúbrido nativo de México; y *Telescopus dhara*, otro colúbrido nativo del oeste asiático.

El péptido obtenido de la banda de  $\approx 36,000$  Da presenta identidad a una ficolina lectina presente en el veneno de *Cerberus rynchops*, un colúbrido nativo de las costas asiáticas y Australia.

Los péptidos obtenidos de la banda de  $\approx 50,000$  Da, presentan identidad a lipasas y monoamino oxidasas presentes en el veneno de *Crotalus adamanteus*, *C. atrox*, *C. durissus cumanensis* y *Sistrurus catenatus edwardesi*, todas ellas vipéridos nativos de Norteamérica y Sudamérica.

El fraccionamiento de los principales componentes se realizó por HPLC-FR con  $160 \mu\text{g}$  de muestra del veneno, en una columna analítica C18 con la elusión en un gradiente de 0 a 60% de acetonitrilo + 0.1% TFA en un flujo de  $1\text{mL}/\text{min}$  (Fig. 22). Las fracciones colectadas fueron suspendidas en  $\text{H}_2\text{O}$  para su cuantificación en concentración proteica y la estimación de su peso molecular por SDS-PAGE (Fig. 23); los rendimientos de las fracciones eluidas con sus respectivos tiempos de retención se muestran en el cuadro 9.

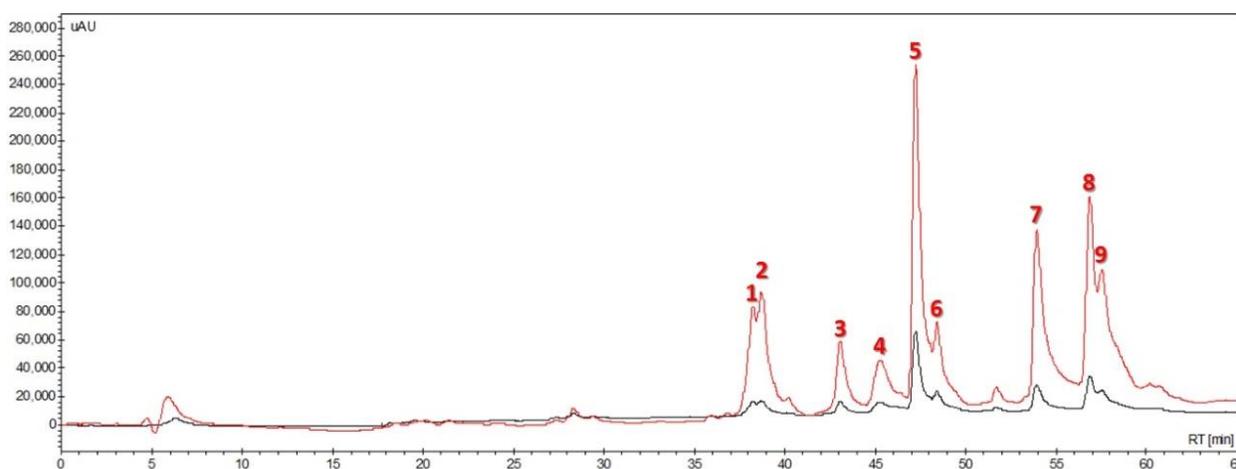


Figura 22. Cromatograma con las principales fracciones colectadas del veneno de *L. splendida*. Línea negra indica la lectura a 280 nm de absorción, línea roja indica la lectura a 230 nm. Se observan 9 principales picos a partir de 37' que fueron colectados. Eje X (tiempo): 0 – 65; eje Y (absorbancia): 0 - 280,000 uAU.

Se observa una alta complejidad en la composición del veneno, en el que las fracciones siguen mostrando una alta asociación entre varios constituyentes proteicos.

Cuadro 9. Fueron colectadas nueve principales fracciones observadas. Se muestran sus respectivos tiempos de retención en minutos (TR); el volumen de H<sub>2</sub>O en el que fueron resuspendidas (μL) y las cantidades totales obtenidas (μg).

<b>Fracción</b>	<b>TR (min)</b>	<b>Concentración (mg/mL) [H<sub>2</sub>O μL]</b>	<b>Total (μg)</b>
1	37.59	0.12 [20]	2.4
3	42.59	0.24 [20]	4.8
4	44.76	0.27 [20]	5.4
5	46.68	0.68 [20]	13.6
6	48.43	0.27 [20]	5.4
7	53.68	0.66 [20]	13.2
8	56.69	0.50 [20]	10
9	57.51	0.81 [20]	16.2

A excepción de la fracción uno (1), de la que no se obtuvo una cantidad suficiente, las fracciones eluidas por HPLC fueron separadas por electroforesis, revelando que están compuestas por más constituyentes proteicos de diferentes masas moleculares (Fig. 23).

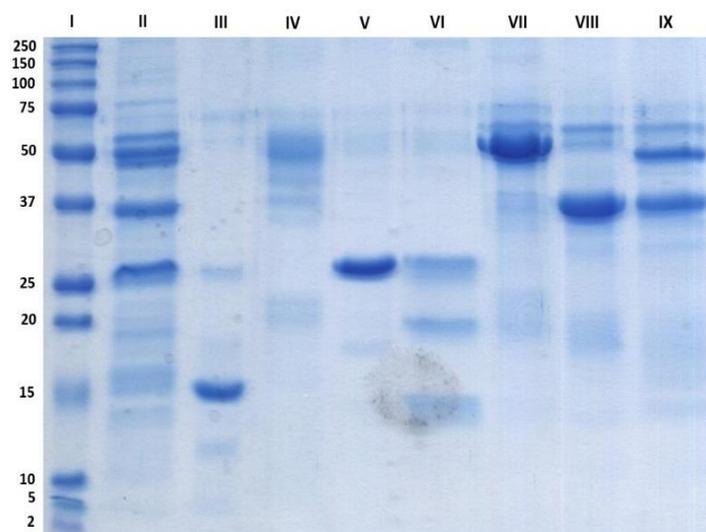


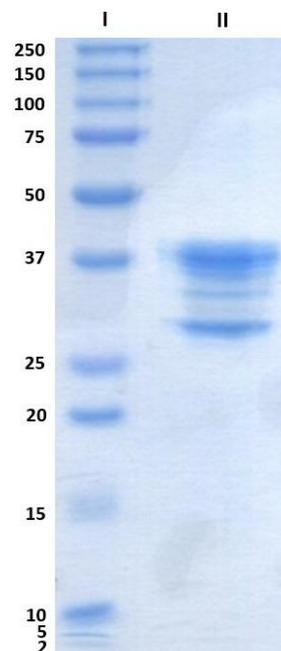
Figura 23 - SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 12.5% en condiciones desnaturalizantes y reductoras. I: Marcador de peso molecular (kDa); II: Veneno completo (10  $\mu$ g); III: fracción 3 (4.8  $\mu$ g); IV: fracción 4 (5  $\mu$ g); V: fracción 5 (5  $\mu$ g); VI: fracción 6 (5  $\mu$ g); VII: fracción 7 (5  $\mu$ g); VIII fracción 8 (5  $\mu$ g); IX: fracción 9 (5  $\mu$ g).

### 1.3 *Conophis lineatus*

Se trató de un individuo sin sexar, adulto, colectado en campo, de edad desconocida con aproximadamente 2 años de estancia en cautiverio.

La separación proteica y su estimación de masa molecular por SDS-PAGE mostró un veneno con varias bandas bien marcadas que abarcan masas moleculares de entre los  $\approx 30,000$  a los  $\approx 40,000$  Da (Fig. 24).

Figura 24. SDS-PAGE 12.5%. I: Marcador de peso molecular (kDa); II: Veneno completo de *Conophis lineatus* (7 µg).



El fraccionamiento de los principales componentes se realizó por HPLC-FR de 160 µg, en una columna analítica C18 con la elusión en un gradiente de 0 a 60% de acetonitrilo + 0.1% TFA en un flujo de 1mL/min. Fueron colectadas tres fracciones principales, todas ellas eluidas después del min 45 (Fig. 25).

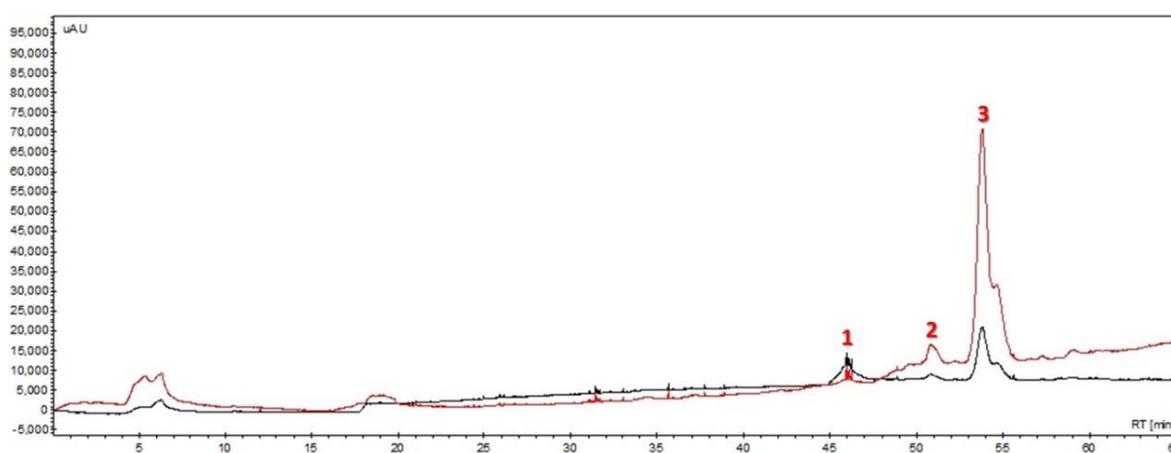


Figura 25. Cromatograma con las principales fracciones colectadas del veneno de *C. lineatus*. Línea negra indica la lectura a 280 nm de absorción, línea roja indica la lectura a 230 nm. Se observan 3 principales picos a partir de 45' que fueron colectados. Eje X (tiempo): 0 – 65; eje Y (absorbancia): 0 - 95,000 uAU.

Las concentraciones proteicas de las fracciones colectadas fueron muy bajas, impidiendo que se realizara una estimación de su peso molecular por SDS-PAGE y otros estudios posteriores (Cuadro 10).

Cuadro 10. Fueron colectadas tres principales fracciones observadas. Se muestran sus respectivos tiempos de retención en minutos (TR); el volumen de H<sub>2</sub>O en el que fueron resuspendidas [ $\mu$ L] y las cantidades totales obtenidas ( $\mu$ g).

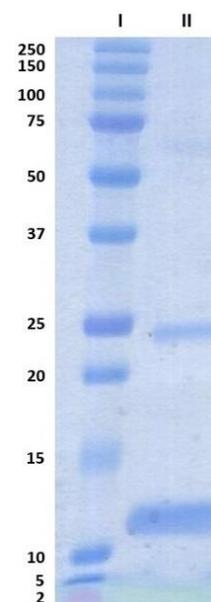
<b>Fración</b>	<b>TR (min)</b>	<b>Concentración (mg/mL) [H<sub>2</sub>O <math>\mu</math>L]</b>	<b>Total (<math>\mu</math>g)</b>
1	45.50	0.05 [20]	1
2	50.69	0.03 [20]	0.6
3	53.28	0.04 [20]	0.8

#### *1.4 Oxybelis aeneus*

El espécimen se halló en la colección viva del herpetario de Octolab. Se trató de un individuo adulto, colectado en campo, de edad desconocida con aproximadamente 1 año de estancia en cautiverio.

En el gel, el veneno completo contiene dos bandas bien marcadas en la masa molecular de  $\approx$ 12,000 y los  $\approx$ 25,000 Da; y una tenuemente marcada en la masa molecular de  $\approx$ 62,000 Da (Fig. 26).

Figura 26. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida 12.5%. I: Marcador de peso molecular (kDa); II: Veneno completo de *Oxybelis aeneus* (10 µg).



La espectrometría de masas realizada a los diferentes péptidos hallados en dos porciones de las bandas recuperadas directamente del gel (Cuadro 11) expuso identidades de 3FTx para aquellas proteínas en el orden de  $\approx 11,000$  Da en banda de electroforesis; y de proteínas CRISP en la banda del orden de  $\approx 24,000$  Da (Cuadro 12).

Cuadro 11. Secuencias parciales halladas en los péptidos aislados de las bandas recuperadas del gel de poliacrilamida del veneno de *L. splendida*.

<b>BANDA <math>\approx 11,000</math> Da</b>	
Secuencia péptido 1	ICYTLYK
Secuencia péptido 2	GCPTAGPDER
<b>BANDA <math>\approx 24,000</math> Da</b>	
Secuencia péptido 1	RSVSPTASNMLK GSTATPYK
Secuencia péptido 2	PTASNMLKMEWYSEAASNAER
Secuencia péptido 3	CPATCFER

Cuadro 12. Identidad de los péptidos obtenidos del veneno de *O. aeneus*. Se indica la banda del que procede el péptido; el péptido correspondiente; el porcentaje de identidad; la familia proteica a la que pertenece; el nombre de la proteína; y la especie de la que proviene. CRISP: Cysteine Rich Secretory Protein.

Banda (Da)	Péptido	Identidad	Familia proteica	Nombre proteína	Especie origen
≈11,000	1	100%	3FTx	Toxin 3FTx-Tel4	<i>Telescopus dhara</i>
	2	100%	3FTx	Fulgimotoxina	<i>Oxybelis fulgidus</i>
≈24,000 Da	1	100%	CRISP	CRVP LEI1	<i>Leioheterodon madagascariensis</i>
	2	100%	CRISP	CRVP TRI1	<i>Trimorphodon biscutatus</i>
	3	100%	CRISP	CRVP pseudetoxin-like	<i>Oxyuranus microlepidotus</i>

Aquellos péptidos aislados de la banda de ≈11,000 Da, presentan identidades para proteínas tipo 3FTx halladas en el veneno de las especies *Telescopus dhara*, especie de colúbrido originario de la península arábiga y el norte de África; *Boiga dendrophila* y *Coelognathus radiatus*, especies de colúbridos ambas originarias del sureste asiático; *Oxybelis fulgidus*, colúbrido originario del sur y sureste de México, Centroamérica y norte de Sudamérica; y *Trimorphodon biscutatus*, colúbrido originario de México.

Los péptidos presentes y aislados de la banda de ≈24,000 Da presentan identidades para proteínas tipo CRISP procedentes del veneno de una alta diversidad de serpientes de cuatro diferentes familias. *Leioheterodon madagascariensis*, de la familia Lamprophiidae, originaria de Madagascar y las Islas Comoro. Para la familia elapidae se encuentran *Ophiophagus hannah*, *Naja kaouthia*, originarias del sur, este y sureste asiático; *Oxyuranus microlepidotus*, *O. scutellatus scutellatus*, *Pseudonaja textilis*, de Australia; *Naja atra*, del sur de China y Taiwán; y *Laticauda semifasciata*, serpiente marina que habita el oeste del océano Pacífico. Dentro de la familia Colubridae se encontraron identidades con *Trimorphodon biscutatus*, originaria de México; *Erythrolamprus poecilogyrus*, de la región centro-este de Sudamérica; *Rabdophis tigrinus*, originaria del sur y sureste asiático; *Dispholidus typus*, restringida al África

Subsahariana; y *Telescopus dhara*, originaria de la península arábiga y norte de África. Y dentro de la familia Viperidae se encontraron identidades con *Sistrurus catenatus edwardesii*, *Crotalus atrox*, de México y EUA; *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, del sureste de EUA; y *Vipera berus*, de todo Europa occidental hasta el este de Asia.

El fraccionamiento de los principales componentes se realizó por HPLC fase reversa de 100 µg de veneno, en una columna analítica C18 con la elución en un gradiente de 0 a 60% de acetonitrilo + 0.1% TFA en un flujo de 1mL/min (Fig. 27). Las fracciones colectadas fueron suspendidas en H<sub>2</sub>O para su cuantificación en concentración proteica (Cuadro 13) y la estimación de su peso por SDS-PAGE.

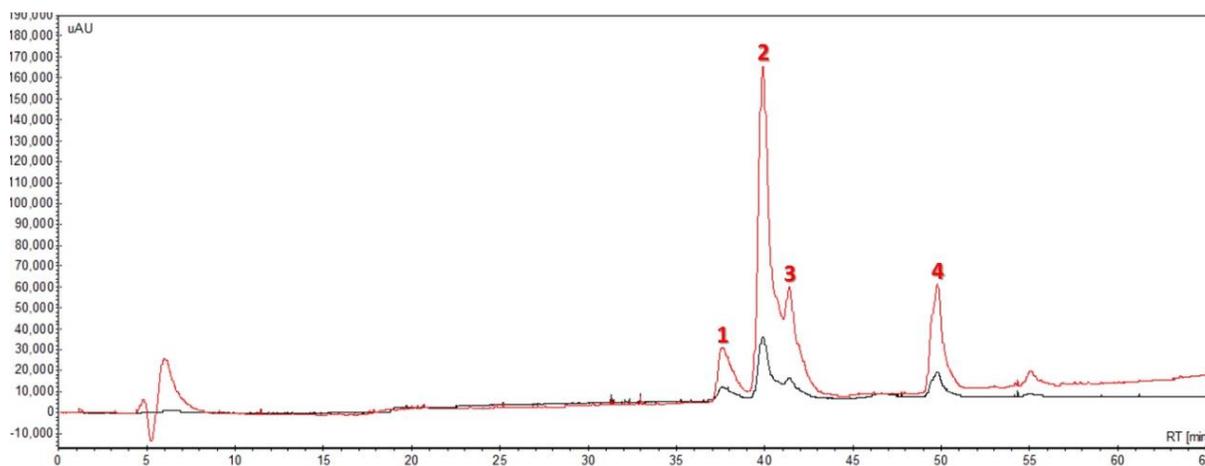


Figura 27. Cromatograma del veneno completo de *O. aeneus*, la línea roja indica la lectura de absorbancia a 230 nm; la negra indica la lectura de absorbancia a 280 nm. Se observan 3 principales picos a partir de 37' que fueron colectados. Eje X (tiempo): 0 – 65; eje Y (absorbancia): 0 - 190,000 uAU.

Cuadro 13. Se muestran los cuatro picos eluidos colectados con sus respectivos tiempos de retención en minutos (TR); el volumen de H<sub>2</sub>O en el que fueron resuspendidas [μL] y las cantidades totales obtenidas de proteína (μg).

Fracción	TR (min)	Concentración (mg/mL) [H <sub>2</sub> O μL]	Total (μg)
1	36.45	0.42 [20]	8.4
2	38.03	0.74 [40]	29.6
3	40.12	0.47 [20]	9.4
4	48.70	0.45 [20]	9

Las fracciones se sometieron a separación proteica por electroforesis. Tres de los cuatro picos eluidos marcaron una masa molecular de  $\approx 11,000$  Da; el cuarto lo hizo en el orden de  $\approx 25,000$  Da (Fig. 28).

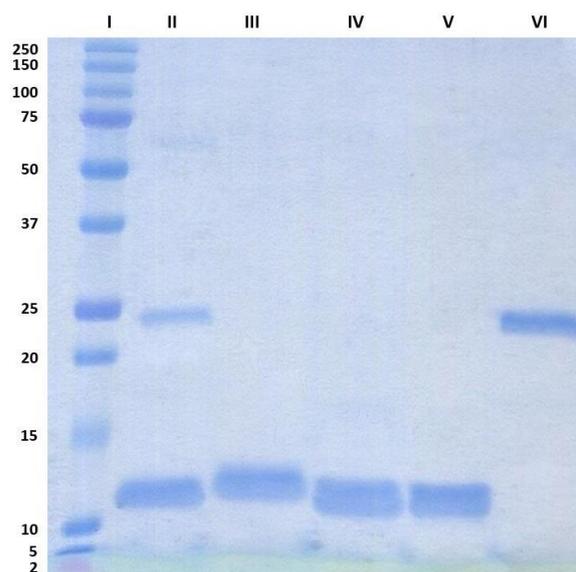


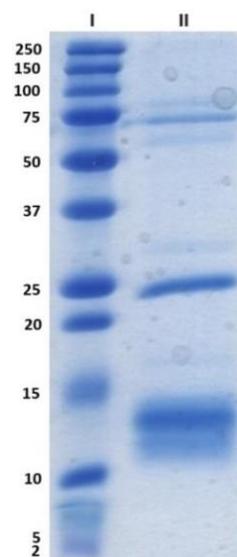
Figura 28. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida 12.5%. I: Marcador de peso molecular (kDa); II: Veneno completo de *Oxybelis aeneus* (10 μg); III: fracción 1 (5 μg); IV: fracción 2 (5 μg); V: fracción 3 (5 μg); VI: fracción 4 (5 μg).

### 1.5 *Leptophis mexicanus*

Se trató de un individuo sin sexar, adulto, colectado en campo, de edad desconocida con aproximadamente 1 año y medio de estancia en cautiverio.

De las 5 especies a las que se extrajo veneno, en este trabajo, el espécimen de *Leptophis mexicanus* fue la de menor rendimiento en volumen y cantidad proteica, con un total aproximado de 98 µg. La estimación de las masas moleculares por SDS-PAGE, reveló seis bandas proteicas bien definidas de ≈11,000 Da - ≈14,000 Da; ≈25,000 Da; y ≈75,000 Da; y otras cuatro poco definidas en las masas de ≈16,000 Da; ≈30,000; ≈60,000; y ≈80,000 Da (Fig. 29).

Figura 29. SDS-PAGE con gel de poliacrilamida al 12.5 %. I: Marcador de peso molecular (kDa); II: Veneno completo de *Leptophis mexicanus* (10 µg).



El fraccionamiento de los principales componentes se realizó por HPLC fase reversa de 56 µg, en una columna analítica C18 con la elusión en un gradiente de 0 a 60% de acetonitrilo + 0.1% TFA en un flujo de 1mL/min. Se colectaron al vacío cuatro fracciones principales (Fig. 30) de las cuales solo tres dieron concentraciones suficientes para su separación proteica y la estimación de su masa molecular por SDS-PAGE (Fig. 31) y Cuadro 14.

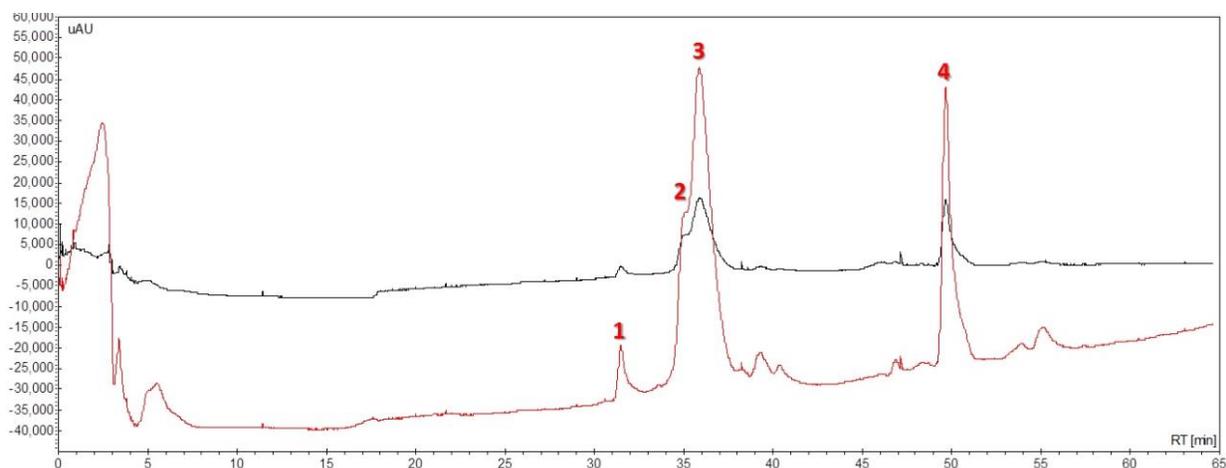


Figura 30. Cromatograma del veneno completo de *L. mexicanus*. La línea roja indica la lectura de absorbancia a 230 nm; la negra indica la lectura de absorbancia a 280 nm. Se observan 4 principales picos a partir de 31' que fueron colectados. Eje X (tiempo): 0 – 65; eje Y (absorbancia): -40,000 - 60,000 uAU.

Cuadro 14. Los rendimientos de las fracciones colectadas del veneno de *L. mexicanus*. Se muestran sus respectivos tiempos de retención en minutos (TR); el volumen de H<sub>2</sub>O en el que fueron suspendidas [ $\mu$ L] y las cantidades totales obtenidas ( $\mu$ g).

Fracción	TR (min)	Concentración (mg/mL) [H <sub>2</sub> O $\mu$ L]	Total ( $\mu$ g)
1	31.25	0.14 [20]	2.8
2	34.33	0.36 [20]	7.2
3	35.33	0.90 [20]	18
4	49.33	0.23 [20]	4.6

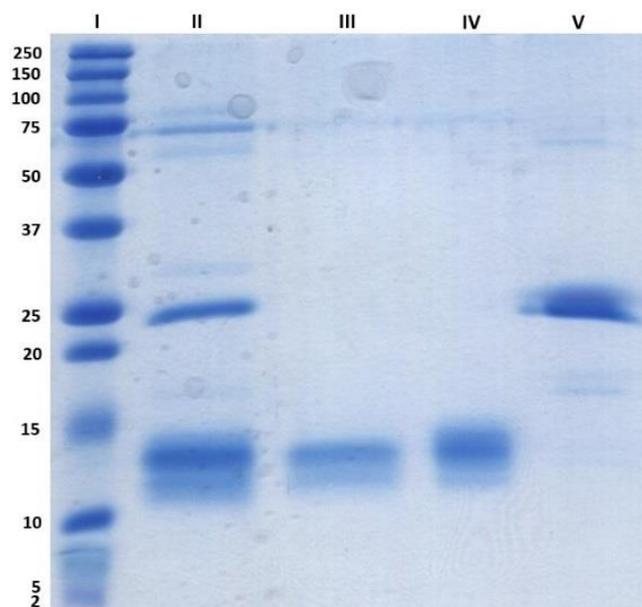


Figura 31. SDS-PAGE con gel de poliacrilamida al 12.5 %. I: Marcador de peso molecular (kDa); II: Veneno completo de *Leptophis mexicanus* (10  $\mu$ g); III: fracción 2 (5  $\mu$ g); IV: fracción 3 (5  $\mu$ g); V: fracción 4 (4.6  $\mu$ g).

## DISCUSIÓN

Con el presente estudio, a pesar de los bajos volúmenes de veneno obtenidos que limitaron la identificación definitiva de muchos componentes proteicos, se reveló una interesante diversidad molecular en las especies analizadas, reafirmando el potencial inexplorado del veneno de este grupo de serpientes. Con el gradual mejoramiento en las técnicas de extracción e identificación que se ha venido presentando en los últimos años, la eventual caracterización de todos los elementos que componen el veneno de estas especies irán llenando los vacíos de información. En este proyecto, la extracción de veneno permitió obtener información relevante para todas las especies que abarcaron este estudio; ya que con los resultados obtenidos de las masas moleculares por medio de la electroforesis proteica, los datos proteómicos MS/MS, los ensayos de actividad enzimática y también por los tiempos de retención cromatográfica, se hizo un acercamiento para identificar la naturaleza proteica y funcional de los componentes sin tener que llegar a un análisis estructural 100% de secuenciación.

De *Trimorphodon tau* se consiguió una cantidad total de 6.2 mg, el cual fue el espécimen del que más cantidad de veneno se pudo obtener, realizándose con éste tres ordeñas seriadas repartidas en un lapso de ocho meses, siendo un espécimen adulto y robusto de 372 g de peso. Del resto de las especies se obtuvo una cantidad menor acorde a su masa corporal, teniendo a los bajos volúmenes de veneno obtenido como el primer obstáculo para poder realizar un estudio integral y definitivo de todos los componentes proteicos presentes en sus secreciones glandulares. Obtener volúmenes suficientes acumulando el producto de las ordeñas al mismo individuo demanda tiempo, ya que el espécimen no debe ser sometido a más de una ordeña en un lapso de 3 meses por el estrés que provoca la manipulación y por el riesgo fisiológico que

implica la aplicación de los fármacos en su ordeña (Hill & Mackessy, 2000; Huang & Mackessy, 2004).

Con excepción de *Conopsis lineatus*, las proteínas CRISP se hallaron en los venenos de todas las especies aquí estudiadas, siendo estas proteínas un elemento de carácter evolutivo basal en los venenos de casi todos los reptiles, ya que comparten una estructura conservada y han estado presentes en casi todos los proteomas de los venenos reportados en la mayoría de las serpientes del grupo toxicofera con variaciones mínimas. Muchos autores las califican como probablemente una de las familias proteicas más abundantes presentes en las líneas filogenéticas previas a la separación del clado Viperidae del grupo restante Colubroidea (B. Fry, 2005; B. G. Fry et al., 2008; Weinstein et al., 2011).

En venenos de colúbridos, junto con las toxinas de tres dedos (3FTxs) las proteínas CRISP representan unos de los componentes mayoritarios, pudiendo tener una actividad importante en el envenenamiento de sus presas, aunque aún no se ha establecido con precisión la función de la gran mayoría de estas proteínas en venenos de reptiles (Heyborne & Mackessy, 2010; Campos et al., 2016; Junqueira-de-Azevedo et al., 2016; Saviola et al., 2014). En este estudio, fueron consistentes en sus masas moleculares reportadas hasta ahora de 24,000 – 26,000 Da y sus tiempos de retención registrados para todos los venenos en reptiles, infiriendo que se hallaron con estas evidencias de su presencia también en *Leptophis mexicanus*, a la que por la cantidad de veneno insuficiente no se le pudo realizar espectrometría de masas para obtener secuencias parciales, pero la separación proteica por electroforesis y por cromatografía de fase reversa muestran componentes proteicos con las características distintivas que evidencian por anticipado la presencia de estas proteínas (Figs. 27 y 28).

Las secuencias parciales obtenidas de proteínas CRISP en el veneno de *Trimorphodon tau* y en el de *Oxybelis aeneus* dieron identidad para una amplia diversidad de sitios consenso en venenos de los elápidos australianos *Oxyuranus microlepidotus*, *Pseudonaja textilis*, *Oxyuranus scutellatus scutellatus*, *Pseudechis porphyriacus*, *P. australis* y *P. papuanus*; el vipérido japonés *Protobothrops flavoviridis*; dos colúbridos africanos, *Dispholidus typus* y *Telescopus dhara*; uno sudamericano, *Erythrolamprus poecilogyrus*; y uno norteamericano, *Trimorphodon biscutatus*, a la cual se le halló una función bloqueadora de la contracción de músculo liso (Yamazaki & Morita, 2004); mientras que en *O. aeneus* se hallaron identidades CRISP de venenos de *Naja atra* y *Naja kaouthia*, elápidos del sur de Asia.

Esta familia de proteínas comparten una estructura conservada común, con lo que podría suponerse que las encontradas en el presente estudio en los veneno de *T. tau* y *O. aeneus* podrían poseer una función biológica bloqueadora de contracción muscular por similitud. Estas mismas proteínas CRISP en los géneros *Pseudechis*, *Protobothrops*, *Trimorphodon* y *Dispholidus* se encontraron en el veneno de *Leptodeira splendida*; además de otros de la familia Elapidae, *Ophiophagus hannah* y *Demansia vestigiata*; y un vipérido, *Echis coloratus*. Igualmente, en el veneno de *Oxybelis aeneus* se hallaron las mismas identidades proteicas, con la particularidad de *Leioheterodon madagascariensis*, serpiente de la familia Lamprophiidae originaria de Madagascar; y varios vipéridos, entre ellos *Sistrurus catenatus*, *Vipera verus*, *Crotalus atrox*, *Agkistrodon piscivorus*; y el elápidos marino *Laticauda semifasciata*. Todas estas identidades compartidas halladas en las proteínas CRISP, indican la posibilidad de la presencia de por lo menos una isoforma en todas las familias de serpientes que presentan secreciones tóxicas, y formando en Colubridae una parte representativa de la composición general de su veneno.

La separación proteica, la estimación de su masa molecular por SDS-PAGE y la secuenciación parcial de algunos de los péptidos, mostraron una marcada presencia de 3FTxs en *Trimorphodon tau* y *Oxybelis aeneus*. Esta familia proteica representa toda una diversidad de estructuras y funciones biológicas, resultado de una dinámica evolutiva originaria en venenos de elápidos. Estas toxinas, hasta ahora no han sido aisladas ni caracterizadas en el proteoma de venenos de vipéridos, por el contrario, en venenos de colúbridos constituyen el principal tipo de componente hasta la fecha, que se diferencian de las convencionales plesiomórficas de 10 cisteínas de los elápidos por la presencia o ausencia de dos o tres residuos de cisteína, de 10 cisteínas (Ching et al., 2006; B. Fry, 2005; Fry et al., 2012; Junqueira-de-Azevedo et al., 2016).

Los resultados en este estudio parecen indicar la presencia de muchas isoformas de toxinas de 3FTxs en *Trimorphodon tau*, *Oxybelis aeneus* y posiblemente en *Leptophis mexicanus*, revelados por su masa aparente similar entre ellas estimada por electroforesis en SDS-PAGE de  $\approx 11,000$  Da (Figs. 12; 26; y 27) que presentan corrimientos en gel anómalos por encima de sus posibles masas reales de  $\approx 8,000$  -  $\approx 9,000$ ; tiempos de retención igualmente similares entre ellas y consistentes con 3FTxs; y secuencias parciales que dieron identidades significativamente afines a 3FTxs en *T. tau* y *O. aeneus* reportadas en el veneno de especies de colúbridos de los géneros *Boiga*, *Telescopus*, *Coelognathus*, *Oxybelis* y *Trimorphodon*; y el elápidio asiático *Bungarus multicinctus*.

Con los sitios conservados en secuencias parciales obtenidas por MS/MS, se pudo realizar un acercamiento por identidad y confirmar la ubicuidad de estas toxinas en los venenos de la mayoría de los colúbridos. Entre estas, dentro de las identidades estuvieron presentes la alfa colubritoxina, aislada del veneno de *Coelognathus radiatus*, caracterizada como una potente neurotoxina post sináptica con propiedades reversibles antagónicas competitivas en el receptor

de acetilcolina en aves (Fry et al., 2003); y la fulgimotoxina, la cual es monomérica y fue aislada del veneno de *Oxybelis fulgidus*, tratándose de una 3FTx poco convencional de 8,141 Da de masa que presenta una alta actividad tóxica para lagartijas; no así para ratones. Presenta los 5 puentes disulfuro regulares de las 3FTxs no convencionales, y tiene el motivo conservado de las toxinas de colúbridos (CYTLY) y un segmento conservado homólogo con 3FTxs hallados en serpientes de los géneros *Boiga* y *Oxybelis* (WAVK) en el bucle II (Heyborne & Mackessy, 2013). *O. fulgidus* se trata de una especie hermana de *O. aeneus*, y para ambas hay hábitos alimentarios reportados muy similares en los que figuran lagartijas como parte de su dieta, siendo un buen preámbulo para especular que en el veneno de *O. aeneus* podría encontrarse una isoforma de fulgimotoxina de igual toxicidad para sus presas nativas. Igualmente, se halló una alta identidad con la Kappa-3-bungarotoxina, neurotoxina postsináptica que se une e inhibe los receptores nicotínicos de acetilcolina con una alta afinidad ( $IC_{50} < 100$  nM) en el ganglio ciliar de aves, encontrada y aislada en el veneno de *Bungarus multicinctus*, serpiente de la familia elapidae nativa al sur de China y el sureste asiático (Chiappinelli et al., 1990).

Es importante resaltar que una de las secuencias parciales de los péptidos aislados de *T. tau* y de *O. aeneus* dieron identidad para una de las subunidades de otra de las formas no convencionales de 3FTxs, la irditoxina, una 3FTx dimérica, aislada y caracterizada del veneno de *Boiga irregularis*, a la cual se le describió una alta actividad neurotóxica específica a reptiles y aves, produciendo parálisis flácida, disnea e hiperventilación en gekos; y parálisis, disnea y un cuadro de cuello lánguido en aves (Pawlak et al., 2009); mientras que identidad para ambas subunidades de la irditoxina se hallaron en péptidos de *O. aeneus*. Los resultados obtenidos en este trabajo, arrojaron que las 3FTxs constituyen mayoritariamente la composición general del veneno de *Trimorphodon tau* representando el 29.5 % de éste (Fig. 18), estando presentes de

igual manera en forma aparentemente significativa en los venenos de *O. aeneus* y *Leptophis mexicanus*, otorgando robustez a los reportes que la diversificación y presencia de estas toxinas se ve favorecida en los venenos de la familia Colubridae, planteando de nuevo la necesidad de la caracterizaciones biológica y bioquímica de los venenos de este grupo de serpientes.

La particularidad de la presencia de fosfolipasas (PLA<sub>2</sub>) y su actividad enzimática en el veneno de *Trimorphodon tau* resalta de entre el resto de las especies analizadas, en las cuales no se hallaron, sin embargo, *Leptodeira splendida* y *Leptophis mexicanus* presentaron bandas proteicas por SDS-PAGE que podrían tratarse igualmente de componentes este grupo proteico. Las PLA<sub>2</sub> han sido halladas y aisladas de todas las especies de serpientes de importancia médica, y representan el grupo proteico con mayor diversidad de estructuras, actividades biológicas y funciones en venenos de serpientes, y se asumía que la mayoría de las especies de colúbridos no las poseían, sin embargo, actividades PLA<sub>2</sub> han sido detectadas en *Dispholidus typus*, *Thelotornis capensis*, *Boiga dendrophila*, *Diadophis punctatus regalis*, *Leptodeira annulata*, *Malpolon monspessulanus*, *Rabdophis subminiata* y *Trimorphodon biscutatus lambda* (Broaders & Ryan, 1997; DuBourdieu et al., 1987; Durkin et al., 1981; Ferlan et al., 1983; Hill & Mackessy, 2000; Rosenberg et al., 1985; Sanz et al., 2008; Torres-Bonilla et al., 2016; Fry, 2005; Huang & Mackessy, 2004; Tasoulis & Isbister, 2017).

Las PLA<sub>2</sub> del grupo I han sido encontradas principalmente en venenos de elápidos y han ido haciendo presencia en venenos de colúbridos, con actividades neurotóxicas resultado del daño inducido al botón sináptico, y actividades enzimáticas más afines a funciones digestivas y como factores de dispersión (Campos et al., 2016; Lazo et al., 1998; Saviola et al., 2014; Singh et al., 2000). La proteína eluida en la cuarta fracción del cromatograma en el veneno de *T. tau* al minuto 47.8 (Fig. 14) y que presentó una masa molecular en gel de  $\approx 16,000$  Da (Fig. 15) es la

proteína que mostró la actividad fosfolipasa, y las secuencias parciales obtenidas, entre ellas una del N-terminal mostró una identidad a la trimorfina, una PLA<sub>2</sub> tipo IA previamente aislada y caracterizada del veneno de *Trimorphodon biscutatus lambda* con masa estimada de 13,996 Da (Huang & Mackessy, 2004). Los 83 residuos obtenidos de esta PLA<sub>2</sub> muestran identidades y por lo tanto, relaciones filogenéticas a PLA<sub>2</sub>s de elápidos marinos asiáticos del género *Laticauda*; y a *Ophiophagus hannah*, elárido de la India y el sureste asiático. En este estado del estudio y sin la secuencia y la estructura completas de la proteína, sería aventurado concluir que esta PLA<sub>2</sub> es homóloga o una isoforma de aquellas presentes en elápidos marinos y asiáticos, sin embargo, varios son los estudios en que se refuerza cada vez más la hipótesis en que la familia Elapidae y Colubridae están anidados en un nodo basal inmediato en común (Pyron et al., 2013; Vidal & Hedges, 2002).

Otras PLA<sub>2</sub>s halladas en la segunda fracción del veneno de *T. tau* no presentaron actividad en las pruebas enzimáticas específicas, fueron encontradas y aisladas presentando masas estimadas y tiempos de retención distintas, marcando masas por SDS-PAGE de ≈12,000 Da - ≈16,000 Da y eluidas por HPLC en el minuto 41.7 a la par con péptidos de 3FTxs y péptidos Kunitz, que junto con las secuencias parciales obtenidas dan identidad a PLA<sub>2</sub>s acídicas, una con homología a una PLA<sub>2</sub> presente en el veneno de *Micrurus dumerilii*, coral sudamericano, de la cual su caracterización muestra una fuerte miotoxicidad e induce edema en ratones (Rey-Suárez et al., 2017); otra, del veneno de *Naja mossambica*, elárido africano cuya PLA<sub>2</sub> con la que mostró identidad tiene efectos mionecróticos, actividad hemolítica indirecta y bloquea estímulos en nervio frénico en ratones (Lin et al., 1987; Kini & Evans, 1987); y otra que dio identidad con una PLA<sub>2</sub> básica del veneno de *Trimeresurus gramineus*, nativa del sur de la India. Es posible la presencia de este tipo de PLA<sub>2</sub>s también en el veneno de *Leptodeira*

*splendida*, detectadas previamente ya en *L. annulata* (Torres-Bonilla et al., 2016), ya que exhibe bandas proteicas por SDS-PAGE estimadas de  $\approx 12,000$  Da y con fracciones en su cromatograma propias de estas proteínas, las cuales no se pudieron someter a pruebas de caracterización biológica ni de secuenciación por la limitante de la cantidad obtenida de su veneno. Se ha debatido sobre el uso de pruebas enzimáticas específicas más sencibles para detectar la presencia de PLA<sub>2</sub>s y su actividad en venenos de colúbridos, que podría resultar en el aumento de la presencia de estas proteínas en sus venenos (Benard et al., 2015).

Es evidente en los resultados que de las especies estudiadas en el presente trabajo, *Leptodeira annulata* fue la especie que presenta la mayor diversidad de componentes proteicos. La separación proteica por SDS-PAGE marca 21 bandas que se distribuyen en un espectro que va de los  $\approx 10,000$  Da hasta los  $\approx 250,000$  Da; el cromatograma por HPLC muestra 9 fracciones distintas que eluyen desde el minuto 38, hasta el minuto 57.5; que a su vez, estas fracciones colectadas evidencian una composición compleja tras someterse a separación proteica por electroforesis a cada una de ellas (Figs. 19; 20; y 21). A pesar no haberse detectado actividades enzimáticas específicas, es posible que se deba a las bajas cantidades utilizadas para su detección; o bien a la sensibilidad de los sustratos utilizados, ya que se tiene el antecedente de que el veneno de *Leptodeira annulata* es muy similar en su perfil electroforético y presenta actividades PLA<sub>2</sub>, PDE y metaloproteasa; así también como actividad hemorrágica en aves y mamíferos (Mebs, 1968; Lemoine et al., 2004; Torres-Bonilla et al., 2016) tratándose ésta de una especie del mismo género con hábitos alimentarios similares, y existiendo una alta similaridad entre sus perfiles electroforéticos (Fig. 30) podría anticiparse la presencia de las mismas actividades enzimáticas y neurotóxicas, complementando con la identificación por alineamiento de secuencias parciales con la presencia de proteínas CRISP que poseen una variedad muy

amplia de efectos neurotóxicos por bloqueos o despolarizaciones de canales dependientes de voltaje; una ficolina lectina con identidad a *Cerberus rynchops*, serpiente de la familia Homalopsidae nativa del sur y el sureste asiático; una lipasa que presenta identidad a *Crotalus adamanteus*, vipérido norteamericano; y una L-aminoácido oxidasa con identidad a crotalinos norteamericanos de los géneros *Crotalus* y *Sistrurus*.

Las cantidades obtenidas tanto del total del veneno, como de las fracciones menos hidrofóbicas correspondientes a las proteínas de  $\pm 10,000$  Da impidieron obtener secuencias parciales de estas proteínas, que presentan características analíticas propias de 3FTxs, hasta ahora presentes en venenos de la mayoría de colúbridos. Las actividades neurotóxicas y de bloqueo neuromuscular detectadas en *L. annulata* (Lemoine et al., 2004; Torres-Bonilla et al., 2016) corresponden a la actividad clásica de 3FTxs, pudiendo indicar igualmente la alta probabilidad de su presencia en los venenos de otras serpientes del género *Leptodeira*.

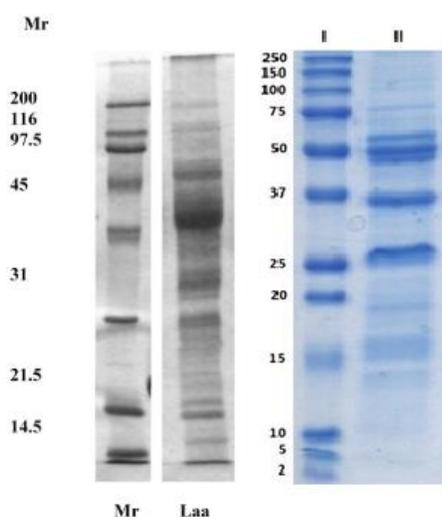


Figura 30 – Izquierda: SDS-PAGE en condiciones reductoras en gel de acrilamida al 20%. Mr: Marcador de peso molecular (kDa); Laa: Veneno completo de *Leptodeira annulata ashmeadii* (cantidad proteica no especificada por los autores). Tomado de Lemoine et al. 2004. Derecha: SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 12.5%. I: Marcador de peso molecular (kDa); II: Veneno completo de *Leptodeira splendida* (10  $\mu$ g).

Está bien documentado que las L-aminoácido oxidasas (LAAOs) son componentes diversos y abundantes en venenos de serpientes, son flavoproteínas diméricas con masas moleculares que oscilan entre los 110 kDa a los 140 kDa. Sus secuencias son muy similares entre los venenos de diferentes especies, reportadas en especies de importancia médica de las familias Viperidae y Elapidae. Aunque su función aún no está del todo entendida en estas especies, se ha observado que inducen la apoptosis, presentando citotoxicidad, interferencias en la agregación plaquetaria, hemorragia, hemólisis, edema y por lo mismo, están sujetas a una extensiva investigación exploratoria sobre posibles aplicaciones antimicrobianas, antiparasíticas y anti actividad del VIH (Benard et al., 2015; Costa et al., 2014; Mackessy, 2002<sup>a</sup>), todo lo anterior, del veneno de vipéridos. Poco se ha documentado sobre la presencia de LAAOs en colúbridos. *Boiga cyanea*, *B. dendrophila*, *B. irregularis*, *Salvadora grahamiae*, *Tantilla nigriceps*, *Trimorphodon biscutatus lambda*, *Diadophis punctatus regalis* y *Hypsiglena torquata texana* son los colúbridos que han presentado LAAOs en el proteoma de su veneno, en su mayoría sin actividad enzimática detectada.

Las LAAOs formaron una parte relevante del veneno de *Trimorphodon tau*, ocupando un porcentaje a la par de las PLA<sub>2</sub> por su abundancia, más no en diversidad. Un solo péptido aislado de la fracción eluida al minuto 56' junto con una MP, forma el 12.7 % de la composición general del veneno de esta especie (Fig. 15). Los 43 residuos aminoacídicos obtenidos, dieron 100 % de identidad para una LAAO de *Trimeresurus stejnegeri*, vipérido asiático, la cual se presume produce diversas actividades biológicas como hemorragia, hemólisis, edema, apoptosis de las células del endotelio vascular, actividades antimicrobiana y antiparasitaria, así como regulación de la agregación plaquetaria. Una extensiva revisión y caracterización biológica de las posibles LAAOs presentes aún desconocidas en venenos de colúbridos podría tener repercusiones

interesantes en la búsqueda de proteínas con aplicación farmacológica, siendo estas proteínas unas de las que presentan un alto potencial de aplicación terapéutica (Costa et al., 2014; Pereañez et al., 2014; Saviola et al., 2014).

Uno de los componentes minoritarios hallado en *T. tau* fue un péptido Kunitz, el cual hasta el momento sería el primero reportado en el veneno de un colúbrido. De la fracción obtenida por el HPLC, eluye junto con una 3FTx con un tiempo de retención de 41.7' y una PLA<sub>2</sub> con actividad neurotóxica. Ambas escalas son consistentes con los reportes de estos péptidos, al mismo tiempo de que se ha observado que estos tres componentes pueden formar complejos poco comunes, unidos por enlaces no covalentes compuestos por una  $\alpha$ -neurotoxina de  $\pm 8,000$  Da; una PLA<sub>2</sub> neurotóxica de  $\pm 16,000$  Da; y un péptido Kunitz inhibidor de serín proteasa de  $\pm 7,000$  Da. Este complejo oligomérico, denominado *taicatoxina*, bloquea canales de Ca<sup>2+</sup> y fueron aislados del veneno de *Oxyuranus scutellatus scutellatus* (Brown et al., 1987; Possani et al., 1992). Estos tres elementos fueron aislados de la segunda fracción eluida por HPLC del veneno de *T. tau*, y existe la posibilidad de haber encontrado una isoforma de la taicatoxina. De uno de los péptidos hallados en esa fracción, se obtuvo identidad para una PLA<sub>2</sub> de *Trimeresurus gramineus*, clasificada como una PLA<sub>2</sub> básica, con una masa molecular estimada de 15,700 Da; y el péptido Kunitz hallado muestra identidad con uno aislado del veneno de *Daboia siamensis*, el cual es un inhibidor de serín proteasa con actividad contra quimotripsina (Guo et al., 2013). Los péptidos aislados en el veneno de *T. tau* podrían indicar la presencia de un isómero de taicatoxina, no obstante, es necesaria la caracterización biológica y la estequiometría de este componente para corroborar o descartar su presencia.

Se sabe poco acerca de metaloproteasas (MPs) en colúbridos más allá de que sean las responsables de hemorragias en los casos de envenenamiento por alguno de ellos, y se cuenta

con reportes de una alta actividad proteolítica frente a caseína del veneno de algunos: *Leptodeira annulata*, *Dispholidus typus*, *Philodryas olfersii* y *Hydrodynastes gigas* (Mebs, 1968; Grasset & Schaafsma, 1940; Hill & Mackessy, 2000; Robertson & Delpierre, 1969). La actividad metaloproteasa en el veneno de *T. tau* fue detectada en sustrato de caseína, al contrario de no detectarse en sustrato de gelatina. Esta actividad, apenas manifiesta, se muestra que en el zimograma la efectúa alguna proteína catalítica en el orden de los  $\approx 38,000$  Da en un corrimiento en condiciones no reductoras (Fig. 13), dicha banda proteica se estima en  $\approx 46,000$  Da por SDS-PAGE en condiciones reductoras (Fig. 15), coincidiendo con metaloproteasas de un colúbrido halladas previamente en el veneno de *Philodryas olfersii*, las cuales mostraron igualmente actividades fibrinogenolítica y fibrinolítica (Mackessy, 2002a). La identidad de esta proteasa mostró un emparejamiento de secuencias parciales con metaloproteasas de los vipéridos *Bothrops erythromelas* y *Protobothrops favoviridis*, sin embargo, es de reconocerse que los nueve residuos aminoacídicos obtenidos no son concluyentes para determinar una identidad precisa; no obstante se tiene la evidencia de la presencia de actividad metaloproteasa en el veneno de *T. tau* con actividad similar a svMPs de vipéridos.

El veneno de la especie *Conopsis lineatus* fue el más distinto en su perfil al del resto, las proteínas de su veneno abarcan un espectro de masas relativamente reducido comprendido en componentes que van desde los  $\approx 28,000$  Da a los  $\approx 37,000$  Da (Fig. 22) y el cromatograma muestra únicamente tres picos de relativamente alta hidrofobicidad hasta después del 45 % de B (Fig. 23). No existe estudio alguno publicado sobre la bioquímica o la caracterización de su veneno, un único reporte publicado por Johanboeke (1974) describe una sintomatología de dolor intenso localizado, edema, y hemorragia persistente tras su mordedura.

Tanto la masa molecular estimada por SDS-PAGE, como los tiempos de elusión de sus componentes, así como la sintomatología descrita, son consistentes con parámetros para serían proteasas presentes convencionalmente en venenos de vipéridos (Deshimaru et al., 1996; Kini, 2006; Matsui et al., 1998), pero poco frecuentes en venenos de serpientes de la familia Elapidae (Jin et al., 2006a, 2006b, 2006c, 2007; Miller et al., 2005). Estos componentes activadores de protrombina están haciéndose presentes también en venenos de colúbridos, pero no de manera común, una en *Hypsiglena torquata texana*; y otra en *Philodryas olfersii*, ambas presentando una masa de  $\approx 36,000$  Da y actividades fibrinolítica y hemorrágica moderada (R. M. Kini, 2006; Mackessy, 2002a, 2002b). Estudios subsecuentes y su caracterización biológica son necesarios para determinar dichas aproximaciones.

De *Leptophis mexicanus* se obtuvo un rendimiento muy bajo, impidiendo la aplicación de una metodología para obtener datos concluyentes de identidades de las proteínas presentes en su veneno. No obstante, sus perfiles electroforético y cromatográfico dan pauta a especular sobre la naturaleza de sus componentes, presentando similitudes y diferencias con el resto de las especies estudiadas en este trabajo. Dada la marcada presencia de proteínas en las masas de  $\approx 11,000$  Da;  $\approx 12,000$  Da;  $\approx 13,000$  Da y  $\approx 14,000$  Da similares a aquellas igualmente teñidas en gel por SDS-PAGE en *Trimorphodon tau* y *Oxybelis aeneus*, se podría especular sobre su posible naturaleza como 3FTx, dada su ubicuidad en venenos de colúbridos; y PLA<sub>2</sub>, que son los únicos componentes resultado de este estudio que presentan ese rango de masas moleculares y tiempos de retención. Tomando como base los parámetros mencionados, las proteínas tipo CRISP, LAAO y MP.

## CONCLUSIONES

Los bajos volúmenes y la baja cantidad proteica son un obstáculo para el estudio del veneno de los colúbridos y, desafortunadamente, la técnica de Hill y Mackessy (2000) resultó agresiva para varios de los especímenes estudiados al someterlos a estrés fisiológico.

La composición general del veneno de *Trimorphodon tau* consiste en 38% de 3FTx; 24.5% de CRISP, 12.7% de LAAO; 11.3% de PLA<sub>2</sub>; 2.5% de péptidos Kunitz; 0.2% de MP; y 2.1% de componentes aún sin identificar.

El veneno de *Trimorphodon tau* es relativamente menos complejo que el de serpientes de colmillos frontales, con menor número de componentes y una dominancia relativa de toxinas de tres dedos (3FTx) con identidad a elápidos asiáticos y australianos; y proteínas de veneno ricas en cisteína (CRISP) con identidad igualmente mayoritaria a elápidos australianos.

El veneno de *T. tau* presenta una baja actividad metaloproteasa, apenas detectable en caseína y actividad enzimática fosfolipasa moderada de una proteína análoga a otra previamente detectada en *T. biscutatus*.

Las secuencias homólogas encontradas hasta ahora en el veneno de *T. tau* comparten secuencias parciales similares con aquellas proteínas presentes en el veneno de elápidos más que con el de otros grupos de serpientes venenosas, particularmente con elápidos asiáticos, elápidos marinos del Pacífico y sureste asiático, así como con elápidos australianos; esto apoya la hipótesis hasta ahora más aceptada, la cual sugiere que los clados de Colubridae y Elapidae se separaron después del clado Viperidae conservando y compartiendo los reclutamientos génicos de los componentes de su veneno.

Se hallaron proteínas CRISP en el veneno de *Leptodeira splendida*; así como proteínas con identidad a una ficolina lectina; una lipasa; y LAAO.

Se hallaron 3FTXs y CRISP en el veneno de *Oxybelis aeneus*.

## LITERATURA CITADA

- Aitken, A., & Learmonth, M. (1996). Protein Determination by UV Absorption. En J. M. Walker (Ed.), *The Protein Protocols Handbook* (pp. 3–6). Totowa, NJ: Humana Press.
- Amalid, E., Sánchez, E. E., Galán, J. A., Tao, W. A., Guerrero, B., Navarrete, L. F., & Rodríguez-Acosta, A. (2011). Characterization of toxins from the broad-banded water snake *Helicops angulatus* (Linnaeus, 1758): isolation of a cysteine-rich secretory protein, Helicopsin. *Archives of toxicology*, 85(4), 305–313.
- Benard, Melisa & Neri, Edgar & Fry, Bryan & Boyer, L & Cochran, Chip & Alam, Mehtab & Jackson, Timothy & Paniagua, Dayanira & Olvera-Rodríguez, F & Koludarov, Ivan & Sunagar, Kartik & Alagón, A. (2015). *Venomous Reptiles and Their Toxins Evolution, Pathophysiology and Biodiscovery*.
- Berman, E. S. F., Fortson, S. L., Checchi, K. D., Wu, L., Felton, J. S., Wu, K. J. J., & Kulp, K. S. (2008). Preparation of Single Cells for Imaging/Profiling Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(8), 1230–1236.
- Brazil, V., & Vellard, J. (1926). Contribuicao ao estudo das glandulas das serpentes aglyphas. *Memórias do Instituto Butantan*, III, 301–3025.
- Broaders, M., & Ryan, M. F. (1997). Enzymatic properties of the Duvernoy's secretion of Blanding's tree snake (*Boiga blandingi*) and of the mangrove snake (*Boiga dendrophila*). *Toxicon*, 35(7), 1143–1148.
- Brown, A., Yatani, A., Lacerda, A., Gurrola, G., & Possani, L. (1987). Neurotoxins that act selectively on voltage-dependent cardiac calcium channels. *Circulation research* (Vol. 61).
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods in Enzymology* (1a ed., Vol. 541). Elsevier Inc.
- Campos, P. F., Andrade-Silva, D., Zelanis, A., Paes Leme, A. F., Rocha, M. M. T., Menezes, M. C., ... Junqueira-de-Azevedo, I. (2016). Trends in the Evolution of Snake Toxins Underscored by an Integrative Omics Approach to Profile the Venom of the Colubrid *Phalotris mertensi*. *Genome biology and evolution*, 8(8), 2266–2287.
- Ching, A. T. C., Paes Leme, A. F., Zelanis, A., Rocha, M. M. T., Furtado, M. D. F. D., Silva, D. A., ... Junqueira-De-Azevedo, I. (2012). Venomics profiling of *Thamnodynastes strigatus* unveils matrix metalloproteinases and other novel proteins recruited to the toxin arsenal of rear-fanged snakes. *Journal of Proteome Research*, 11(2), 1152–1162.
- Ching, A. T. C., Rocha, M. M. T., Paes Leme, A. F., Pimenta, D. C., de Fátima D. Furtado, M., Serrano, S. M. T., ... Junqueira-de-Azevedo, I. (2006). Some aspects of the venom proteome of the Colubridae snake *Philodryas olfersii* revealed from a Duvernoy's (venom) gland transcriptome. *FEBS Letters*, 580(18), 4417–4422.

- Costa, T. R., Burin, S. M., Menaldo, D. L., de Castro, F. A., & Sampaio, S. V. (2014). Snake venom L-amino acid oxidases: An overview on their antitumor effects. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 20(1), 1–7.
- Deshimaru, M., Ogawa, T., Nakashima, K. ichi, Nobuhisa, I., Chijiwa, T., Shimohigashi, Y., ... Ohno, M. (1996). Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases. *FEBS Letters*, 397(1), 83–88.
- DuBourdieu, D. J., Kawaguchi, H., & Shier, W. T. (1987). Molecular weight variations in the diversity of phospholipase A2 forms in reptile venoms. *Toxicon*, 25(3), 333–343.
- Durkin, J. P., Pickwell, G. V., Trotter, J. T., & Shier, W. T. (1981). Phospholipase A2 electrophoretic variants in reptile venoms. *Toxicon*, 19(4), 535–546.
- Ferlan, I., Ferlan, A., King, T., & Russell, F. E. (1983). Preliminary studies on the venom of the colubrid snake *Rhabdophis subminatus* (red-necked keelback). *Toxicon*, 21(4), 570–574.
- FitzSimons, D. C., & Smith, H. M. (1958). Another Rear-Fanged South African Snake Lethal to Humans. *Herpetologica*, 14(4), 198–202.
- Flores Villela, O. (1993). Herpetofauna Mexicana. Special Publications Carnegie Museum of Natural History, (17): 1-73.
- Flores-Villela, O. & L. Canseco-Márquez. (2004). Nuevas especies y cambios taxonómicos para la herpetofauna de México. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.),20(2):115-144.
- Flores-Villela, O. y U. O. García-Vázquez. 2014. Biodiversidad de reptiles en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, Supl. 85: S467-S475.
- Frayre-Torres, M. J., Sevilla-Godínez, E., Orozco-Valerio, M. D. J., Armasc, J., & Celis, A. (2006). Mortalidad por contacto traumático con serpiente y lagarto venenosos. México, 1979-2003. *Gaceta Medica de Mexico*, 142(3), 209–213.
- Fry, B. G. (2005). From genome to “venome”: Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Research*, 15(3), 403–420.
- Fry, B. G., Lumsden, N. G., Wüster, W., Wickramaratna, J. C., Hodgson, W. C., & Manjunatha Kini, R. (2003). Isolation of a Neurotoxin (a-colubritoxin) from a Nonvenomous Colubrid: Evidence for Early Origin of Venom in Snakes. *Journal of Molecular Evolution*, 57(4), 446–452.
- Fry, B. G., Scheib, H., Junqueira de Azevedo, I., Silva, D. A., & Casewell, N. R. (2012). Novel transcripts in the maxillary venom glands of advanced snakes. *Toxicon*, 59(7–8), 696–708.
- Fry, B. G., Scheib, H., van der Weerd, L., Young, B., McNaughtan, J., Ramjan, S. F. R., ... Norman, J. A. (2008). Evolution of an Arsenal. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(2), 215–246.

- Fry, B. G., Wüster, W., Ryan Ramjan, S. F., Jackson, T., Martelli, P., & Kini, R. M. (2003). Analysis of Colubroidea snake venoms by liquid chromatography with mass spectrometry: evolutionary and toxinological implications. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(18), 2047–2062.
- Grasset, E., & Schaafsma, A. W. (1940). Studies on the Venom of the “Boom-slang” (*Dispholidus typus*). *South African Medical Journal*, 14, 236–241.
- Guo, C.-T., Mcclean, S., Shaw, C., Rao, P.-F., Ye, M.-Y., & Bjourson, A. (2013). Purification, characterization and molecular cloning of chymotrypsin inhibitor peptides from the venom of Burmese *Daboia russelii siamensis*. *Peptides* (Vol. 43).
- Habermann, E., & Hardt, K. L. (1972). A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Analytical Biochemistry*, 50(1), 163–173.
- Heyborne, W. H., & Mackessy, S. P. (2010). Cysteine-rich Secretory Proteins in Reptile Venoms, (January).
- Heyborne, W. H., & Mackessy, S. P. (2013). Identification and characterization of a taxon-specific three-finger toxin from the venom of the Green Vinesnake (*Oxybelis fulgidus*; family Colubridae). *Biochimie*, 95(10), 1923–1932.
- Hiestand, P., & R. Hiestand, R. (1979). *Dispholidus typus* (boomslang) snake venom: Purification and properties of the coagulant principle. *Toxicon* (Vol. 17).
- Hill, R. E., & Mackessy, S. P. (2000). Characterization of venom (Duvernoy’s secretion) from twelve species of colubrid snakes and partial sequence of four venom proteins. *Toxicon*, 38(12), 1663–1687.
- Huang, P., & Mackessy, S. P. (2004). Biochemical characterization of phospholipase A2 (trimorphin) from the venom of the Sonoran Lyre Snake *Trimorphodon biscutatus lambda* (family Colubridae). *Toxicon*, 44(1), 27–36.
- I. Rosenberg, H., Bdolah, A., & Kochva, E. (1985). Lethal factors and enzymes in the secretion from Duvernoy’s gland of three colubrid snakes. *The Journal of experimental zoology* (Vol. 233).
- Jackson, K. (2003). The evolution of venom-delivery systems in snakes. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 137(3), 337–354.
- Jin, Y., Lee, W.-H., & Zhang, Y. (2007). Molecular cloning of serine proteases from elapid snake venoms. *Toxicon*, 49, 1200–1207.
- Jin, Y., Lee, W., & Zhang, Y. (2006a, octubre 20). Bungarus multicinctus putative serine protease mRNA, partial cds.
- Jin, Y., Lee, W., & Zhang, Y. (2006b, octubre 20). Naja atra putative serine protease mRNA, partial cds.

- Jin, Y., Lee, W., & Zhang, Y. (2006c, octubre 20). Ophiophagus hannah thrombin-like serine protease mRNA, complete cds.
- Junqueira-de-Azevedo, I. L. M., Campos, P. F., Ching, A. T. C., & Mackessy, S. P. (2016). Colubrid venom composition: An-omics perspective. *Toxins*, 8(8), 1–24.
- Kamiguti, A., Theakston, D., Sherman, N., & Fox, J. (2000). Mass spectrophotometric evidence for P-III/P-IV metalloproteinases in the venom of the Boomslang (*Dispholidus typus*). *Toxicon*, 38(11), 1613–1620.
- Kardong, K. V. (2002). Colubrid Snakes and Duvernoy's "Venom" Glands. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 21(1–2), 1–19.
- Kini, R., & J Evans, H. (1987). Structure function relationship of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipases A2. *The Journal of biological chemistry*, 262, 14402–14407.
- Kini, R. M. (2006). Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 34(4–5), 200–204.
- Kornalik, F., Táborská, E., & Mebs, D. (1978). Pharmacological and biochemical properties of a venom gland extract from the snake *Thelotornis kirtlandi*. *Toxicon*, 16(6), 535–542.
- Lazo, F., Rodríguez, E., & Yarlequé, A. (1998). Evaluación comparativa de dos métodos para determinar la actividad de fosfolipasa en veneno de serpientes. *Revista de Biología Tropical.*, 5, 98–102.
- Lemoine, K., Girón, M., Aguilar, I., Navarrete, L., & Rodríguez-Acosta, A. (2004). Proteolytic, Hemorrhagic, and Neurotoxic Activities Caused by *Leptodeira annulata ashmeadii* (Serpentes: Colubridae) Duvernoy's Gland Secretion. *Wilderness and Environmental Medicine*, 15, 82–89.
- Lomonte, B. (2007). Electroforesis en Gel de Poliacrilamida. *Inmunología General: Manual de Laboratorio*, 90–99.
- Mackessy, S. P. (2002a). Biochemistry and Pharmacology of Colubrid Snake Venoms. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 21(1–2), 43–83.
- Mackessy, S. P. (2002b). Toxinology of colubrid snakes: biology, venoms and envenomation. Introduction to the special volume. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews*, 21(1&2), vii–ix.
- Mackessy, S. P. (2010). *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press.
- Matsui, T., Sakurai, Y., Fujimura, Y., Hayashi, I., Oh-Ishi, S., Suzuki, M., ... Titani, K. (1998). Purification and amino acid sequence of halystase from snake venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*, a serine protease that cleaves specifically fibrinogen and kininogen. *European Journal of Biochemistry*, 252(3), 569–575.
- McKinstry, D. M. (1978). Evidence of toxic saliva in some colubrid snakes of the United States. *Toxicon*, 16(6), 523–534.

- Miller, D. J., Filippovich, I., St. Pierre, L., Lavin, M. F., Sorokina, N., Marsh, N., & Masci, P. P. (2005). Comparative Analysis of Prothrombin Activators from the Venom of Australian Elapids. *Molecular Biology and Evolution*, 22(9), 1853–1864.
- Mittleman, M. B., & Goris, R. C. (1978). Death Caused by the Bite of the Japanese Colubrid Snake *Rhabdophis tigrinus* (Boie) (Reptilia, Serpentes, Colubridae). *Journal of Herpetology*, 12(1), 109.
- Noble, J. E., & Bailey, M. J. A. (2009). Quantitation of Protein. En *Methods in Enzymology* (1a ed., Vol. 463, pp. 73–95). Elsevier Inc.
- Ochoa-Ochoa, L., O. Flores-Villela, U. García-Vázquez, M. Correa-Cano y L. Canseco-Márquez. 2006. Áreas Potenciales de distribución de la herpetofauna de México. Especie: *Trimorphodon tau*, escala 1:1000000. Museo de Zoología "Alfonso L. Herrera, Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Pawlak, J., Mackessy, S. P., Fry, B. G., Bhatia, M., Mourier, G., Fruchart-Gaillard, C., ... Kini, R. M. (2006). Denmotoxin, a three-finger toxin from the colubrid snake *Boiga dendrophila* (Mangrove Catsnake) with bird-specific activity. *The Journal of biological chemistry*, 281(39), 29030–29041.
- Pawlak, J., Mackessy, S. P., Sixberry, N. M., Stura, E. A., Le Du, M. H., Ménez, R., ... Kini, R. M. (2009). Irditoxin, a novel covalently linked heterodimeric three-finger toxin with high taxon-specific neurotoxicity. *The FASEB Journal*, 23(2), 534–545.
- Peñuela-Gómez, S. M. (2010). El abandono en la investigación toxicológica de los colúbridos opistoglifos. En *Mem. Conf. Interna Med. Aprovech. Fauna Silv. Exót. Conv.* (Vol. 0, pp. 24–26).
- Pereañez, J. A., Camilo-Patiño, A., & Henao-Castañeda, I. C. (2014). Toxinas provenientes de venenos de serpiente: blancos terapéuticos, herramientas en investigación biomédica y agentes con potencial terapéutico. *Curare*, 1(1), 49–60.
- Pincheira-Donoso, D., Bauer, A. M., Meiri, S., & Uetz, P. (2013). Global Taxonomic Diversity of Living Reptiles. *PLoS ONE*, 8(3), 1–10.
- Pope, C. H. (1958). Fatal Bite of Captive African Rear-Fanged Snake (*Dispholidus*). *Copeia*, 1958(4), 280.
- Possani, L. D., Martin, B. M., Yatani, A., Mochca-Morales, J., Zamudio, F. Z., Gurrola, G. B., & Brown, A. M. (1992). Isolation and physiological characterization of taicatoxin, a complex toxin with specific effects on calcium channels. *Toxicon*, 30(11), 1343–1364.
- Pyron, R., Burbrink, F. T., & Wiens, J. J. (2013). A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1), 93.
- Ramjan, S. F. R., & Fry, B. G. (1991). Characterisation of the Venom from Six Species of Colubrids and the Partial Sequence of Two Novel Protein Toxins.

- Rey-Suárez, P., Núñez, V., Saldarriaga-Córdoba, M., & Lomonte, B. (2017). Primary structures and partial toxicological characterization of two phospholipases A2 from *Micrurus mipartitus* and *Micrurus dumerilii* coral snake venoms. *Biochimie*, *137*, 88–98.
- Robertson, S. S. D., & R Delpierre, G. (1969). Studies on African snake venoms—IV Some enzymatic activities in the venom of the boomslang *Dispholidus typus*. *Toxicon* (Vol. 7).
- Rodríguez-Acosta, A., Lemoine, K., Navarrete, L., Girón, M. E., & Aguilar, I. (2006). Experimental ophitoxemia produced by the opisthoglyphous lora snake (*Philodryas olfersii*) venom. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *39*(2), 193–197.
- Rodríguez-Robles, J. A. (1992). Notes on the Feeding Behavior of the Puerto Rican Racer, *Alsophis portoricensis* (Serpentes: Colubridae). *Journal of Herpetology*, *26*(1), 100–102.
- Rosenberg, H. I. (1992). An Improved Method for Collecting Secretion from Duvernoy's Gland of Colubrid Snakes. *Copeia*, *1992*(1), 244–246.
- Sanz, L., Escolano, J., Ferretti, M., Biscoglio, M. J., Rivera, E., Crescenti, E. J., ... Calvete, J. J. (2008). Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. *Journal of Proteomics*, *71*(1), 46–60.
- Saviola, A. J., Peichoto, M. E., & Mackessy, S. P. (2014). Rear-fanged snake venoms: an untapped source of novel compounds and potential drug leads. *Toxin Reviews*, *33*(4), 185–201.
- Shiloah, J., Klibansky, C., & DeVries, A. (1973). Phospholipase isoenzymes from *Naja naja* venom. Purification and partial characterization. *Toxicon*, *11*, 481–490.
- Singh, S. B., Armugam, A., Kini, R. M., & Jeyaseelan, K. (2000). Phospholipase A2 with Platelet Aggregation Inhibitor Activity from *Austrelaps superbus* Venom: Protein Purification and cDNA Cloning. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *375*(2), 289–303.
- Tasoulis, T., & Isbister, G. K. (2017). A review and database of snake venom proteomes. *Toxins*, *9*(9).
- Taub, A. M. (1967). Comparative histological studies on Duvernoy's gland of colubrid snakes. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, *138*(1), 1–50.
- Torres-Bonilla, K. A., Schezaro-Ramos, R., Floriano, R. S., Rodrigues-Simioni, L., Bernal-Bautista, M. H., & Alice da Cruz-Höfling, M. (2016). Biological activities of *Leptodeira annulata* (banded cat-eyed snake) venom on vertebrate neuromuscular preparations. *Toxicon*, *119*, 345–351.
- Vest, D. K. (1981). The toxic Duvernoy's secretion of the wandering garter snake, *Thamnophis elegans vagrans*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, *19*(6), 831–839.

- Vidal, N., & Hedges, S. B. (2002). Higher-level relationships of caenophidian snakes inferred from four nuclear and mitochondrial genes. *Comptes Rendus Biologies*, 325(9), 987–995.
- W Lin, W., L Chang, P., Y Lee, C., & J Joubert, F. (1987). Pharmacological study on phospholipases A2 isolated from *Naja mossambica mossambica* venom. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life sciences* (Vol. 11).
- Webster, G. C. (1970). Comparison of direct spectrophotometric methods for the measurement of protein concentration. *Biochimica et biophysica acta*, 207(2), 371–373.
- Weinstein, S. A., & Kardong, K. V. (1994). Properties of duvernoy's secretions from opisthoglyphous and aglyphous colubrid snakes. *Toxicon*, 32(10), 1161–1185.
- Weinstein, S. a., Warrell, D. a., White, J., & Keyler, D. E. (2011). *An Overview of the Artificial Assemblage, the Colubridae. "Venomous" Bites from Non-Venomous Snakes.*
- Weldon, C., & Mackessy, S. (2009). Biological and proteomic analysis of venom from the Puerto Rican Racer (*Alsophis portoricensis*: Dipsadidae). *Toxicon* (Vol. 55).
- Yamazaki, Y., Koike, H., Sugiyama, Y., Motoyoshi, K., Wada, T., Hishinuma, S., ... Morita, T. (2002). Cloning and characterization of novel snake venom proteins that block smooth muscle contraction. *European Journal of Biochemistry*, 269(11), 2708–2715.
- Yamazaki, Y., & Morita, T. (2004). Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon*, 44(3), 227–231.