



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

CARACTERIZACIÓN INTEGRAL Y ANÁLISIS DE ESPECIFICIDAD DEL  
VENENO DE LA SERPIENTE DE CORAL *Micrurus browni browni*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

MELISA BENARD VALLE

TUTOR PRINCIPAL

Dr. ALEJANDRO ALAGÓN CANO, IBt-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. LOURIVAL DOMINGOS POSSANI POSTAY, IBt-UNAM

Dr. JESÚS ENRIQUE JIMÉNEZ FERRER, CIBIS-IMSS

Cuernavaca, Morelos. Septiembre de 2020



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.

*“There is grandeur in this view of life, with its several powers, having been originally breathed into a few forms or into one; and that, whilst this planet has gone cycling on according to the fixed law of gravity, from so simple a beginning endless forms most beautiful and most wonderful have been, and are being, evolved.”*

Charles R. Darwin

Dedico esta tesis a mi papá Carlos Bénard y a mi abuelo Ramón Valle, quienes me mostraron el apasionante mundo de la ciencia y que me han guiado, y siguen acompañándome, en este camino.

## AGRADECIMIENTOS

Antes que nadie a mi hermana, Paulina Bénard, la mejor amiga que he tenido y tendré; a mi mamá, Luz María Valle, la persona más dulce que conozco; y a mi cuñado Eduardo Berrón y su familia. Gracias por siempre estar ahí, por nunca dejarme caer, por tenerme muchísima paciencia en mis locuras y berrinches. Gracias por el amor y la compañía incondicional y por un millón de cosas más.

Agradezco profundamente a mi tutor, el Dr. Alejandro Alagón, quien ha sido desde hace años un gran maestro y amigo y me ha apoyado constantemente tanto académica como personalmente.

A los integrantes de mi comité tutorial, el Dr. Lourival Possani y el Dr. Enrique Ferrer por tantas aportaciones a este trabajo y a mi desarrollo académico y personal. Gracias por su gran disposición, ayuda y buenos consejos.

A los integrantes de mi comité sinodal y de examen profesional: El Dr. Lourival Possani, la Dra. Rosana Sánchez, la Dra. Claudia Rodríguez, el Dr. Lorenzo Segovia, el Dr. Stephen Mackessy, el Dr. Enrique Ferrer, el Dr. Enrique Morett y el Dr. Sergio Encarnación, por todas sus revisiones y aportaciones al desarrollo de mi proyecto y la escritura de esta tesis.

Muy especialmente a Edgar Neri, por ser un gran amigo; por miles de pláticas y discusiones; por cientos de consejos y buenos momentos; por ser un apoyo y ejemplo constante sin los cuales este trabajo hubiera sido imposible.

Con mucho cariño a Alejandro Olvera, por tantos consejos, pláticas y regaños. Por toda su ayuda y, por supuesto, su amistad.

A mis estudiantes, Luis Román, Manuel Yañez, Gibrán Rodríguez y Luis García y a mis estudiantes extraoficiales, Belem García, Mafer Hernández y Raúl Hernández. Gracias por aguantar mis olvidos y distracciones, por toda su ayuda y dedicación y por tantas cosas que hemos aprendido juntos.

A todos los integrantes del grupo del Dr. Alagón: Irving Archundia, Arlene Calderón, Héctor Cardoso, Irene Castillo, Alid Guadarrama, Andrea Colis, Mitzy Amaro, Fernando Losoya, Nicolás Elizalde, Roberto Ponce y muchos otros. Grandes amigos y colaboradores, de los que he aprendido muchísimo a través de los años. Por esto y además por su apoyo técnico en el laboratorio a Angélica Linares, Felipe Olvera, Manuela Ávila, Daniel Gama y Ricardo Mondragón.

Al Dr. Gerardo Corzo y su grupo, muy en particular a Jesús Borrego, Iván Arenas y Andreí Montero. Gracias por la amistad, y por todo el cariño, consejos y buenos momentos. También a Herlinda Clement y Carmen Segura por su apoyo técnico y administrativo.

Al Dr. Bruno Lomonte y su equipo en el Instituto Clodomiro Picado, en Costa Rica, por su gran colaboración tanto en este como en muchos otros proyectos. Gracias por su incomparable disposición, ánimo y paciencia.

Al grupo del Dr. Enrique Ferrer del CIBIS-IMSS. Muy particularmente a Jonathan Orduño, Jonathan Cortés, Arturo Pérez y a la Dra. Maribel Herrera por toda su ayuda y consejos durante el montaje de las preparaciones neuromusculares. ¡Gracias por acompañarme a jugar al Dr. Frankenstein!

Al Dr. Jason Strickland de la *University of South Alabama* por su gran colaboración para realizar el análisis del transcriptoma de *M. browni* y muchos otros proyectos presentes y futuros.

Al Dr. Stephen Mackessy, Kaye Hollman, Cassie Olmstead y familia por recibirme alegre y calurosamente en su país y su casa. Gracias por la amistad y enseñanzas. También al grupo de investigación del Dr. Mackessy, en la *University of Northern Colorado*, especialmente a Cara Smith y Tanner Harvey.

Al Dr. Possani y los integrantes de su laboratorio, en especial Fernando Zamudio, Timoteo Olamendi, Rita Restano y Jimena Cid, por todas las asesorías, apoyo técnico y académico, y por su gran colaboración al desarrollo de este y muchos otros de mis proyectos.

Por su ejemplo, consejos, revisiones y colaboraciones, entre muchas otras cosas, a la Dra. Leslie Boyer, el Dr. Adolfo de Roodt, el Dr. Estuardo López y el Dr. Bryan Fry.

Al Dr. Miguel Borja y sus estudiantes, por la amistad y las colaboraciones presentes y futuras.

Al Dr. Alejandro Carbajal por sus consejos y asesoría para el montaje de las preparaciones neuromusculares.

Muchas gracias a aquellos que colaboraron durante colectas y prácticas de campo, para obtener muestras o ejemplares indispensables para este trabajo: Roberto Mora y familia, Rafael Aguilar, Pablo Cobos y Manuel Varela.

Por su apoyo técnico y administrativo, agradezco a los integrantes de la unidad de cómputo del IBt, en especial a Juan Manuel Hurtado y David Castañeda, y la unidad de docencia del IBt, en especial a Antonio Bolaños.

Agradezco también a las serpientes y animales de laboratorio cuyas vidas y venenos fueron donados a este proyecto.

Finalmente, agradezco el financiamiento otorgado por parte del Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) como beca mixta y de doctorado (# 290496) a nombre de Melisa Bénard y el proyecto CONACyT-FORDECyT # 303045 “Venenos y antivenenos” a nombre del Dr. Alejandro Alagón. También por parte del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-PAPIIT) con el proyecto # IN207218, otorgado al Dr. Alejandro Alagón.

## TABLA DE CONTENIDO

Agradecimientos .....	iii
Índice de Figuras .....	viii
Índice de Tablas .....	ix
Resumen .....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	4
2. Marco Teórico .....	5
2.1. Epidemiología y cuadro clínico de los envenenamientos por coralillo .....	5
2.2. Aparato venenoso y Taxonomía del género <i>Micrurus</i> .....	6
2.3. Composición y mecanismo de acción de los venenos de coralillo .....	7
2.3.1. PLA <sub>2</sub> con actividad neurotóxica .....	7
2.3.2. 3FTx presentes en venenos de elápidos.....	10
2.4. El papel biológico de los venenos de coralillo .....	11
2.5. <i>Micrurus browni</i> o coralillo de Brown: Descripción y distribución .....	12
3. Antecedentes.....	15
3.1. Composición de los venenos de coralillos .....	15
3.2. Neurotoxicidad y efectos <i>in vivo</i> .....	16
3.3. Toxinas aisladas de venenos de coralillos .....	17
3.4. Conocimiento actual de los venenos de coralillos mexicanos.....	18
4.1. Hipótesis .....	22
4.2. Objetivo general .....	22
4.3. Objetivos particulares .....	22
5. Metodología.....	24
5.1. Obtención y procesamiento de venenos .....	24
5.2. Cuantificación de proteínas .....	24
5.2.1. Absorbancia a 280 nm .....	24
5.2.2. Método del ácido bicinconínico .....	25
5.3. Estrategia metodológica .....	25
5.4. Caracterización proteómica .....	26
5.4.1. RP - HPLC.....	26
5.4.2. SDS – PAGE .....	26
5.4.3. Espectrometría de masas en tándem (MALDI-TOF-TOF) .....	27
5.4.4. Determinación de Masa Molecular por espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS) .....	28

5.4.5. Determinación de secuencias N-terminales por degradación de Edman.....	28
5.5. Análisis Transcriptómico.....	28
5.6. Caracterización bioquímica .....	29
5.6.1. Fraccionamiento por cromatografía de Intercambio catiónico. ....	29
5.6.2. Procesamiento de fracciones .....	29
5.6.3. Actividad enzimática de PLA <sub>2</sub> .....	29
5.7. Análisis de especificidad <i>In vivo</i> .....	31
5.7.1. Modelo murino .....	31
5.7.2. Modelo reptil .....	32
5.8. Análisis de especificidad <i>Ex vivo</i> .....	32
5.8.1. Preparación de nervio frénico – diafragma (NFD) de ratón ( <i>Mus musculus</i> ) ....	32
5.8.2. Preparación de nervio tibial – músculo <i>gastrocnemio</i> (NTG) de lagartija ( <i>Sceloporus undulatus</i> ).....	34
6. Resultados y discusión .....	37
6.1. Proteómica del veneno de <i>M. b. browni</i> .....	37
6.2 Transcriptómica de las glándulas de veneno de <i>M. b. browni</i> .....	39
6.3. Correlación entre proteoma y transcriptoma. ....	41
6.4. Evaluación de letalidad y neurotoxicidad.....	44
6.4.1. Modelo murino ( <i>Mus musculus</i> ).....	44
6.4.2. Modelo reptil .....	48
6.5. Caracterización bioquímica del veneno de <i>M. b. browni</i> .....	56
6.5.1. Inhibición de actividad PLA <sub>2</sub> con <i>pBPB</i> .....	56
6.5.2. Fraccionamiento en condiciones no desnaturalizantes.....	59
6.5.3. Caracterización de fracciones de intercambio catiónico .....	60
6.6. Análisis de fracciones selectas. ....	63
6.6.1. Fracción X .....	63
6.6.2. Fracción XI.....	67
6.6.3. Fracción XVII.....	68
6.6.4. Fracción XVIII .....	68
7. Conclusiones.....	72
8. Perspectivas .....	73
9. Bibliografía.....	75
Anexos .....	84
Anexo I. Análisis proteómico de fracciones de veneno de <i>M. b. browni</i> purificadas mediante RP-HPLC .....	84

Anexo II. Análisis de PM determinados vs. teóricos de transcritos .....	90
Anexo III. RP-HPLC de fracciones de Intercambio catiónico .....	92
Anexo IV. Protocolos .....	101
IV.I. Cuantificación de proteínas por método del ácido bicinconínico (BCA) .....	101
IV.II. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).....	102
IV.III. Extracción de RNA total con Trizol.....	104
IV.IV. Determinación de actividad fosfolipasa A <sub>2</sub> .....	105
IV.V. Inhibición de actividad PLA <sub>2</sub> con <i>p</i> BPB .....	107
Anexo V. Artículo publicado.....	108



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Actividad enzimática de PLA <sub>2</sub> .	8
Figura 2.2. Efecto de neurotoxinas presinápticas y postsinápticas en la unión neuromuscular.	9
Figura 2.3. Ejemplos de 3FTx descritas en veneno de elápidos.	10
Figura 2.4. Distribución de la especie <i>M. browni</i> (rojo) según el SNIB, CONABIO.	13
Figura 3.1. Proporción de 3FTx y PLA <sub>2</sub> en proteomas de veneno de coralillos.	16
Figura 3.2. Composición proteica de dos venenos de coralillos mexicanos.	19
Figura 3.3. Efecto del veneno de <i>M. laticollaris</i> sobre preparaciones neuromusculares.	19
Figura 5.1. Diagrama de flujo mostrando la estrategia metodológica utilizada en el presente trabajo.	26
Figura 5.2. Hidrólisis de sustrato 4NOBA por PLA <sub>2</sub> generando una molécula de 4HNB y una de ácido octanoico.	30
Figura 5.3. A. Reactivo pBPB. B. Grupo pBromo fenacilo unido la Histidina 48 de PLA <sub>2</sub> (Zhao <i>et al.</i> , 1998).	31
Figura 5.4. Esquematación de la preparación de nervio frénico - hemidiafragma de ratón.	33
Figura 6.1. Fraccionamiento del veneno de <i>M. b. browni</i> .	37
Figura 6.2. Abundancia relativa de las familias proteicas presentes en el veneno de <i>M. b. browni</i> .	38
Figura 6.3. Análisis transcriptómico de las glándulas de veneno de <i>M. b. browni</i> .	40
Figura 6.4. Transcritos pertenecientes a la familia de las 3FTx.	42
Figura 6.5. Transcritos pertenecientes a la familia de las PLA <sub>2</sub> . pI/PM.	44
Figura 6.6. Efecto de $\delta$ -Tc 7.5 $\mu$ M sobre la contracción generada por estimulación indirecta en la preparación de NFD de ratón.	46
Figura 6.7. Efecto del veneno completo de <i>M. browni</i> [5 $\mu$ g/mL] sobre la contracción en preparación de NFD de ratón.	47
Figura 6.8. Efecto del veneno completo de <i>M. b. browni</i> sobre la contracción generada por estimulación indirecta en preparación de NFD de ratón.	47
Figura 6.9. Efecto de $\delta$ -Tubocurarina ( $\delta$ -Tc) 5 $\mu$ M sobre la contracción generada por estimulación indirecta en preparación de NTG de <i>S. undulatus</i> .	49
Figura 6.10. Comparación del efecto de $\delta$ -Tc 5 $\mu$ M sobre la contracción generada por estimulación indirecta en ambas preparaciones neuromusculares analizadas.	50
Figura 6.11. Comparación del efecto de concolortoxina 5 $\mu$ g/mL (0.2 $\mu$ M) sobre la contracción generada por estimulación indirecta en ambas preparaciones neuromusculares.	51
Figura 6.12. Comparación del efecto de Irditoxina 40 $\mu$ g/mL (2.3 $\mu$ M) sobre la contracción generada por estimulación indirecta en ambas preparaciones neuromusculares.	52
Figura 6.13. Comparación del efecto de Miotoxina a 2.5 $\mu$ g/mL (0.6 $\mu$ M) sobre la contracción generada por estimulación directa en ambas preparaciones neuromusculares.	53
Figura 6.14. Comparación del efecto de Miotoxina a 2.5 $\mu$ g/mL (0.6 $\mu$ M) sobre la tensión basal de ambas preparaciones neuromusculares.	53
Figura 6.15. Efecto del veneno completo de <i>M. b. browni</i> [5 $\mu$ g/mL] sobre la contracción en preparación de NTG de lagartija.	54

Figura 6.16. Comparación del efecto del veneno de <i>M. browni</i> 5 µg/mL sobre la contracción generada por <i>estimulación indirecta</i> en ambas preparaciones neuromusculares analizadas.....	55
Figura 6.17. Actividad PLA <sub>2</sub> sobre sustrato 4NOBA del veneno de <i>M. fulvius</i> y el veneno tratado con diferentes proporciones molares de <i>pBPB</i> .....	56
Figura 6.18. Inhibición de actividad PLA <sub>2</sub> del veneno de <i>M. b. browni</i> . ....	57
Figura 6.19. RP-HPLC en columna C <sub>18</sub> analítica.....	59
Figura 5.20. Intercambio catiónico fuerte (FPLC). ....	60
Figura 6.21. SDS-PAGE 15% de fracciones de intercambio catiónico. ....	60
Figura 6.21. Efecto de FX [7 µg/mL] sobre preparación neuromuscular NFD de ratón. ....	64
Figura 6.22. Caracterización de la αNTx denominada D.H. ....	66
Figura 6.23. Identificación de toxina MitTx en el veneno de <i>M. b. browni</i> . ....	67
Figura 6.24. Caracterización de Brownitoxina-1.....	69

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla III.I.</b> Letalidad de algunos venenos de coralillos del género <i>Micrurus</i> .....	16
<b>Tabla V.I.</b> Gradiente de acetonitrilo.....	26
<b>Tabla V.II.</b> Condiciones de estimulación.....	34
<b>Tabla VI.I.</b> Identificación por similitud de transcritos presentes en el veneno.....	43
<b>Tabla VI.II.</b> Caracterización de fracciones de intercambio catiónico.....	61
<b>Tabla VI.III.</b> Letalidad de FXVIII y sus subfracciones por vía <i>i.v.</i> en ratones.....	69

## RESUMEN

El presente trabajo representa una caracterización funcional, proteómica y transcriptómica del veneno de la serpiente de coral conocida como coralillo de Brown (*Micrurus browni browni*), una especie de amplia distribución en el territorio mexicano. Su estudio es de gran importancia debido a que contribuye al mejoramiento de los tratamientos actualmente disponibles en caso de envenenamientos y aporta información relevante para entender la evolución de los venenos de coralillo mexicanos.

La caracterización proteómica se llevó a cabo utilizando una separación por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) y posterior identificación de fragmentos proteicos obtenidos mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Este análisis mostró la presencia de aproximadamente 41 componentes, pertenecientes a 9 familias proteicas. Las más abundantes de éstas fueron fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y toxinas de tres dedos (3FTx). En el análisis transcriptómico de las glándulas de veneno de un individuo adulto, realizado mediante la generación y secuenciación de bibliotecas RNAseq, se identificaron 39 transcritos, pertenecientes a 10 familias proteicas; también se observó que los transcritos de PLA<sub>2</sub> y 3FTx eran más abundantes que el resto.

La presencia de una toxina multimérica, designada aquí Brownitoxina-1, fue determinada mediante la caracterización del veneno y sus fracciones. Esta toxina consta de al menos una PLA<sub>2</sub> y una 3FTx, las cuales tienen muy poca o nula letalidad por sí mismas, pero son extremadamente letales al ser combinadas (DL<sub>50</sub> *i.v.* de 0.01 µg/g). También se identificaron y caracterizaron parcialmente otros dos componentes letales para ratones: Una segunda PLA<sub>2</sub> neurotóxica (la cual es monomérica, a diferencia de Brownitoxina-1) y una 3FTx con actividad de  $\alpha$ -neurotoxina ( $\alpha$ NTx). Además, identificamos componentes no letales relevantes, como una toxina nociceptiva denominada MitTx, así como PLA<sub>2</sub> no neurotóxicas con alta actividad enzimática. Utilizando un ensayo de inhibición de la actividad PLA<sub>2</sub> del veneno con bromuro de *p*Bromo-fenacilo (*p*BPB) concluimos que alrededor del 90% de la toxicidad en ratones es dependiente de esta actividad enzimática.

Se estandarizaron dos preparaciones neuromusculares, una murina y una de reptil, con el fin de caracterizar la neurotoxicidad del veneno de *M. b. browni*, así como su posible especificidad hacia reptiles. En las preparaciones de nervio frénico-hemidiafragma de ratón se observó que el veneno ocasiona una disminución progresiva de la fuerza de contracción ejercida por estimulación indirecta, la cual es irreversible después de los lavados. También se observó un período de latencia previo al inicio de la disminución de fuerza, lo cual sugiere que el veneno ejerce un efecto mayoritariamente presináptico. Al comparar la preparación neuromuscular murina con la de nervio tibial – gastrocnemio de lagartija, no se observó evidencia de actividad específica hacia reptiles. Tampoco pudo observarse especificidad por los reptiles en los modelos *in vivo* de letalidad analizados. Contrariamente, se notó que la  $\alpha$ NTx letal para ratones previamente mencionada, no genera ningún efecto en serpientes.

Este proyecto contribuye significativamente al conocimiento actual de los venenos de coralillos norteamericanos, los cuales han sido muy poco estudiados. Además, resalta la importancia de los complejos proteicos en estos venenos, por lo que podría servir de base para la descripción de otras proteínas multiméricas.

## **ABSTRACT**

The present work consists of a functional, proteomic, and transcriptomic characterization of the venom from the Brown's coral snake (*Micrurus browni browni*), a species with wide distribution in Mexico. Its study is relevant for the development of better treatments and antivenom improvement and it provides information to understand the evolution of venoms in coral snakes. First, proteomic characterization showed approximately 41 components that belong to 9 proteic families. The most abundant ones are phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) and Three finger toxins (3FTx). During transcriptomic analysis of the venom glands of a single adult individual, performed through sequencing of RNAseq libraries, we identified 39 annotated transcripts, belonging to 10 protein families; the most abundant of these were also the ones coding for PLA<sub>2</sub>'s and 3FTx's.

The presence of a multimeric toxin, designated Brownitoxin-1, was determined through venom and fraction characterization. This toxin, first of its kind to be described in coral snake venom, consists of at least one PLA<sub>2</sub> and one 3FTx. These subunits have no or extremely low lethality when tested individually but are extremely lethal when combined (*i.v.* LD<sub>50</sub> of 0.01 µg/g). We also identified and characterized two more components that were lethal to mice: A second neurotoxic PLA<sub>2</sub>, which is monomeric, unlike Brownitoxin-1, and a 3FTx with α-neurotoxin activity. Additionally, we found relevant non-lethal components such as MitTx, a dimeric nociceptive toxin, as well as various non-neurotoxic PLA<sub>2</sub>'s. By inhibiting PLA<sub>2</sub> enzymatic activity with *p*Bromophenacyl bromide (*p*BPB) we concluded that 90% of venom lethality to mice is dependent of the mentioned activity.

Two neuromuscular preparations, one murine and one reptile, were standardized to perform a characterization of *M. b. browni* venom neurotoxicity, as well as its possible specificity for reptile tissue. In murine phrenic nerve – hemidiaphragm preparations we observed that the venom caused a progressive and irreversible decrease in indirectly evoked twitch force. A latency period before the initial decrease of twitch tension was also noted, suggesting that the venom has a primarily presynaptic mechanism. When comparing these findings with those of the lizard tibial nerve – gastrocnemius preparations, there was no evidence of specificity for either tissue. The *in vivo* lethality models showed no evidence of venom specificity for reptiles. On the contrary, the previously mentioned α-neurotoxin, extremely lethal to mice, caused no evident effect on the snake model analyzed.

This project contributes significantly to the actual knowledge of coral snake venoms, extremely unstudied to this date. Also, it stresses the relevance of protein complexes in the venoms and therefore could serve as a starting point for the description of other multimeric toxins.

# INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

Secciones 1 y 2



# 1. INTRODUCCIÓN

El estudio de los venenos de serpientes, así como los efectos que éstos causan en humanos, ha sido tema de intensa investigación y debate. La familia Elapidae es uno de los principales grupos de serpientes que causan envenenamientos a nivel mundial (Gutiérrez, 2010) y los venenos de algunas de ellas están entre los más extensamente estudiados (Tasoulis y Isbister, 2017). Estos venenos poseen neurotoxinas y citotoxinas con alta potencia letal y mecanismos de acción extremadamente variados.

En América, esta familia está representada por una especie de serpiente marina (*Hydrophis platura*) y dos géneros de coralillos (*Micrurus* y *Micruroides*). Estos últimos son serpientes de tamaño mediano y hábitos semifosoriales que ocasionan pocos envenenamientos, en comparación con los integrantes del otro grupo de serpientes venenosas del continente (familia Viperidae) (Chippaux, 2017). Los envenenamientos por coralillos, aunque poco comunes, se caracterizan por generar un cuadro clínico neurotóxico que, en casos severos y sin el tratamiento adecuado, puede ser letal (Bucarechi *et al.*, 2016).

Debido a esta baja incidencia de envenenamientos, sus venenos han sido relativamente poco estudiados. En México, por ejemplo, sólo se ha analizado la composición proteica de los venenos de dos especies (Bénard-Valle *et al.*, 2014; Carbajal-Saucedo *et al.*, 2013). La complejidad de su mantenimiento en cautiverio, así como sus hábitos evasivos y semifosoriales (Roze, 1996), han contribuido también a la escasez de estudios referentes a estas serpientes. El estudio del veneno de estos organismos contribuye, entre otras cosas, a la identificación de moléculas con potencial farmacológico como analgésicos y relajantes musculares, entre otros.

Actualmente, la disponibilidad de nuevas herramientas de análisis como la proteómica y transcriptómica, han permitido un avance significativo en el conocimiento de los venenos animales en general (Calvete *et al.*, 2007). No obstante, el uso de técnicas bioquímicas y su integración con las nuevas herramientas es de vital importancia para comprender la función de las proteínas dentro de los venenos y los efectos de éstos en los organismos (Calvete, 2017). El análisis de los venenos de serpientes mexicanas nos permite conocer a mayor detalle la gran biodiversidad de nuestro país y es de vital importancia para la predicción de cuadros clínicos en caso de envenenamientos.

En particular, *Micrurus browni* es una especie de amplia distribución en el territorio nacional de cuyo veneno no existe a la fecha ninguna caracterización. En el presente estudio, se caracterizó el veneno de la subespecie *M. b. browni*, analizando su función y la de las fracciones más relevantes dentro de él. Además, se utilizó un modelo de presa natural con el fin de identificar posibles diferencias con los efectos observados en los modelos mamíferos normalmente utilizados. Se analizó su composición utilizando técnicas proteómicas y transcriptómicas. También se estudiaron sus efectos y los de sus componentes utilizando análisis bioquímicos y experimentos *in vivo* y *ex vivo*, en un modelo murino y uno de reptil. Esto permitió establecer técnicas de análisis previamente no disponibles en nuestro país,

además de proporcionar una comprensión integral de la composición y función de este veneno.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Epidemiología y cuadro clínico de los envenenamientos por coralillo

El accidente ofídico representa un problema de salud importante a nivel mundial, pues ocurren entre 421,000 y 1,841,000 envenenamientos por mordedura de serpiente cada año, ocasionando entre 20,000 y 94,000 muertes ([Kasturiratne et al., 2008](#)). En América se ha estimado que ocurren en promedio 57,500 accidentes ofídicos anuales (6.2 por cada 100,000 habitantes) y aproximadamente 370 muertes (0.04 por cada 100,000 habitantes). Aproximadamente 95% de los accidentes del continente son ocasionados por víboras (Familia Viperidae) y alrededor de 1% por coralillos (Familia Elapidae) ([Chippaux, 2017](#)).

En México, ocurren en promedio 3,850 de estos envenenamientos anualmente, cerca de 40 con desenlaces fatales ([Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2017](#); [Secretaría de Salud \(Mexico\), 2017](#)). La especie de la serpiente que muerde generalmente no es registrada, sin embargo, basado en la experiencia acumulada de médicos colaboradores del grupo del Dr. Alejandro Alagón, en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, se estimó que alrededor de 98% son ocasionadas por vipéridos, y menos del 2% por coralillos.

El cuadro clínico generado en humanos por el veneno de coralillos es marcadamente neurotóxico y se caracteriza por el desarrollo de parálisis flácida progresiva. En un estudio retrospectivo de mordeduras en humanos por *M. fulvius fulvius* (Coralillo de Florida) se reportaron 387 pacientes entre 1998 y 2010, 56% de los cuales no presentaron signos de envenenamiento sistémico. Los signos y síntomas más comunes reportados fueron: dolor en el sitio de la mordedura (41% de los casos), parestesias locales (28%), náuseas (12%) vómito (11%) y debilidad (7%). En menos del 4% de los casos, se presentó también ptosis palpebral, depresión respiratoria, visión borrosa, disfagia, disnea, parálisis y/o diplopía. Todos los casos de envenenamiento sistémico fueron tratados con antiveneno y no se presentaron muertes ([Wood et al., 2013](#)).

Una revisión bibliográfica de casos de envenenamiento por *Micrurus* reportados en Brasil entre 1867 y 2014, mostró el desarrollo de cuadros clínicos similares a los mencionados. En ésta, se observó que la mayor parte de los envenenamientos fueron ocasionados por *M. corallinus* o *M. frontalis*, aunque se identificaron accidentes por otras ocho especies. La mayor parte de los pacientes (74%) desarrollaron signos locales como

parestesias, dolor y edema leve, mientras que el 59% mostró envenenamiento sistémico; 14% fueron asintomáticos. Los signos y síntomas sistémicos más comunes fueron ptosis palpebral (33% de los casos), mareos (27%), visión borrosa (21%), debilidad (20%), disfagia (15%), disnea o respiración superficial (11%) e inhabilidad para caminar (11%). En menos del 10% de los casos, se observó también mialgia, diplopía, salivación, somnolencia, dolor de cabeza, abdominal y/o torácico, oftalmoplejía y/o fasciculaciones; en 3% de los casos, los pacientes requirieron ventilación mecánica. El estudio menciona dos casos fatales y cuatro muertes posiblemente ocasionadas por coralillo en el mismo periodo pero sin datos clínicos disponibles (Bucarechi *et al.*, 2016).

Es importante hacer notar que se ha reportado la existencia de una ventana de tiempo asintomática entre la mordedura y los primeros signos de envenenamiento. La duración de ésta es extremadamente variable, pudiendo ser menor a 30 min o, en algunos casos, superior a 12 h (Bucarechi *et al.*, 2016; Manock *et al.*, 2008; Wood *et al.*, 2013). Debido a esta variabilidad, la observación de los pacientes aparentemente asintomáticos por períodos largos es de vital importancia.

Envenenamientos experimentales en modelo murino han mostrado además miotoxicidad y nefrotoxicidad ocasionada por los venenos de *M. nigrocinctus* y *M. fulvius* (De Roodt *et al.*, 2012; Gutiérrez *et al.*, 1986), aunque no se ha reportado que esto tenga relevancia clínica en envenenamientos humanos.

## 2.2. Aparato venenoso y Taxonomía del género *Micrurus*

Como todos los integrantes de la familia Elapidae, los coralillos poseen una dentición solenoglifa, lo cual significa que los dientes inoculadores de veneno se encuentran fijos en el hueso maxilar, en la parte anterior de la boca. El aparato venenoso consiste en dos glándulas serosas productoras de veneno, posicionadas a los lados de la cabeza, por debajo y hacia atrás de los ojos. Cada una de éstas se conecta con los dientes inoculadores mediante un conducto recubierto en parte por una glándula mucosa que se denomina accesoria (Roze, 1996); la función de esta última es aún motivo de debate. Un solo músculo, conocido como *M. levator anguli oris*, está directamente asociado a cada glándula productora de veneno; éste se encarga de promover la expulsión de veneno durante la mordida (Roze, 1996).

Los coralillos constituyen el grupo más diversificado de la familia Elapidae en el continente americano. Éste comprende dos géneros: *Micruroides*, con una sola especie, y *Micrurus*, el cual actualmente cuenta con cerca de 78 especies distribuidas desde el Sur de los Estados Unidos hasta Argentina (Uetz y Hallermann, s/f).

En México se distribuyen aproximadamente 16 especies de Elápidos, las cuales incluyen a la serpiente marina *Hydrophis platurus* y a la única especie del género



*Micruroides*: *M. euryxanthus*. La taxonomía y filogenia del género *Micrurus* es aún motivo de debate en México, así como en el resto de su distribución. Existen pocos trabajos que aborden estos temas o aquellos referentes a su historia de vida y biología. Debido en parte a esta falta de información, el número de especies del género que se distribuyen en nuestro país varía dependiendo del autor. Campbell y Lamar (2004) citaron 14 especies mexicanas de *Micrurus*, mientras que el Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad (SNIB), perteneciente a la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), considera actualmente 12 especies de este género, excluyendo a *M. nebularis* y *M. bogerti* (<http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>).

Utilizando marcadores moleculares, Reyes y colaboradores (2020) realizaron una revisión de las especies del complejo *M. diastema*, el cual está conformado por 13 de las especies mexicanas, con un total de 24 subespecies reconocidas. En este trabajo, proponen una modificación significativa de la taxonomía, reconociendo ahora diez especies en total, sin designación de subespecies (Reyes-velasco *et al.*, 2020). Además, muestran que es necesario realizar más estudios para establecer claramente las relaciones filogenéticas presentes en este grupo.

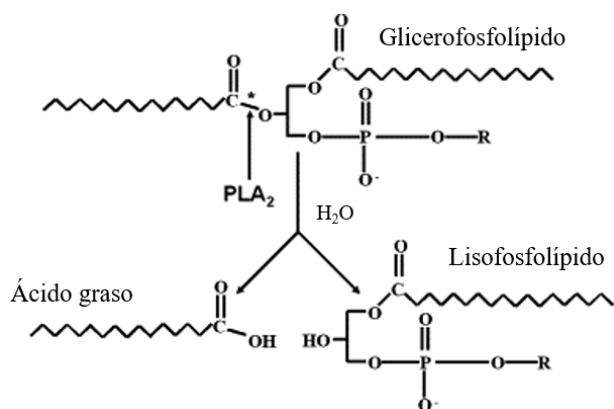
## 2.3. Composición y mecanismo de acción de los venenos de coralillo

Los venenos de coralillos generalmente poseen alta potencia letal, con dosis letales medias (DL<sub>50</sub>) entre 0.2 y 2 µg/ratón. Están compuestos principalmente por dos grupos de proteínas: Las fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y las toxinas de tres dedos (3FTx). Las primeras son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace *sn*<sub>2</sub> de fosfolípidos (Figura 2.1) (Fisher y Jain, 2001). Poseen una amplia gama de actividades farmacológicas, sin embargo, las más relevantes en venenos de coralillos son aquellas que actúan como neurotoxinas presinápticas. Las 3FTx, por otro lado, poseen también una gran diversidad de efectos farmacológicos al ser capaces de unirse a diversos receptores celulares con actividades extremadamente distintas. En coralillos, las de mayor relevancia clínica se denominan α-neurotoxinas (αNTx) y son potentes antagonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR).

### 2.3.1. PLA<sub>2</sub> con actividad neurotóxica

En particular, las PLA<sub>2</sub> de secreción (sPLA<sub>2</sub>) son proteínas pequeñas (alrededor de 15 kDa) que requieren Ca<sup>2+</sup> como cofactor. Con base en su secuencia primaria y estructura, han sido divididas en cuatro clases (I, II, III y IV) entre las que destacan las del grupo I y II por estar presentes en venenos de serpientes. Las de clase II han sido aisladas de venenos de la familia Viperidae, así como algunas fuentes endógenas de mamíferos como mucosa

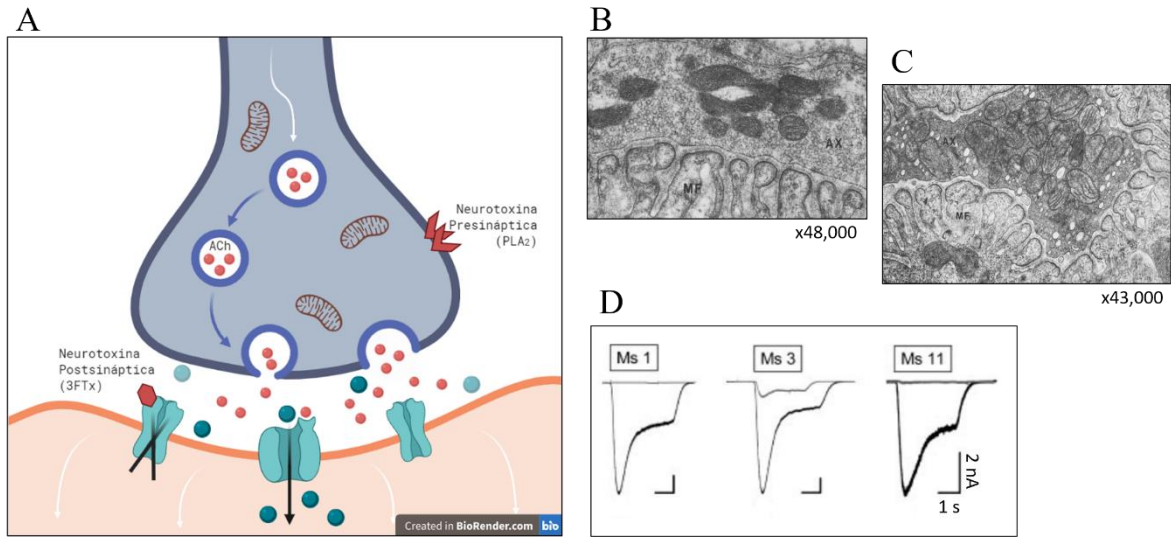
gástrica, plaquetas y neutrófilos. La clase I, que compete al presente trabajo, ha sido aislada de venenos de la familia Elapidae, sin embargo, también están presentes en páncreas de mamíferos y espermatozoides humanos (Kini, 1997).



**Figura 2.1. Actividad enzimática de PLA<sub>2</sub>.**

Hidrólisis del enlace *sn2* de fosfolípidos que genera un liso-derivado y un ácido graso. Imagen modificada de (Cummins, 2007).

Se han descrito una gran diversidad de efectos farmacológicos tanto en las PLA<sub>2</sub> de clase I, como en las de clase II, incluidos la miotoxicidad y la neurotoxicidad (Mackessy, 2010). En venenos de coralillos, las más relevantes para la letalidad son neurotoxinas presinápticas, también llamadas  $\beta$ -neurotoxinas ( $\beta$ NTx), las cuales han sido descritas y ampliamente estudiadas en venenos de otros elápidos como *Bungarus multicinctus* y *Pseudonaja textilis*, entre otros (Pearson *et al.*, 1993; Rowan, 2001). Éstas actúan evitando la liberación del neurotransmisor ACh del botón presináptico en la unión neuromuscular y eventualmente generando una lisis de este último (Figura 2.2A-C).



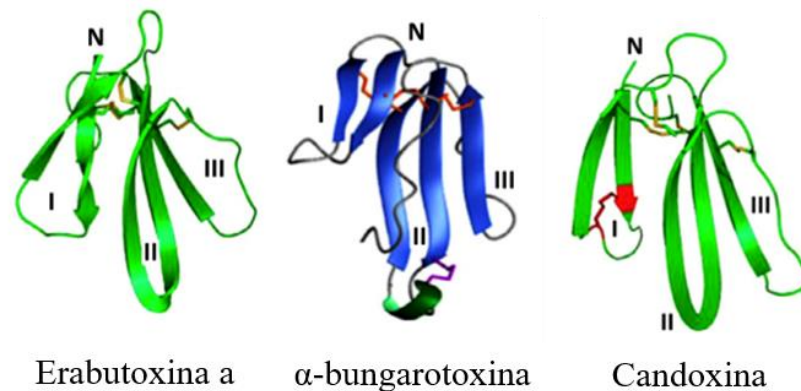
**Figura 2.2. Efecto de neurotoxinas presinápticas y postsinápticas en la unión neuromuscular.** Esquema de unión neuromuscular mostrando la liberación del neurotransmisor ACh mediante vesículas sinápticas y su posterior unión a receptores nicotínicos de ACh en el músculo; esta unión ocasiona la entrada de iones que a su vez generan la contracción muscular. En rojo se muestran los sitios de acción de neurotoxinas presinápticas (flechas) y postsinápticas (hexágono). B y C. Micrografías electrónicas de la unión neuromuscular de diafragma murino normal (B) y en una etapa avanzada de envenenamiento por la neurotoxina presináptica Taipoxina (C) (Cull-Candy *et al.*, 1976). Los números en las esquinas inferiores representan magnificación. AX. Botón presináptico. MF. Fibra muscular. D. Registros electrofisiológicos mostrando el bloqueo de receptores nicotínicos de ACh musculares ocasionado por toxinas postsinápticas de cadena corta aisladas de veneno de *Micrurus surinamensis* (Ms1, Ms3 y Ms11 [1  $\mu$ M]) (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008).

Actualmente, no está muy claro qué les confiere a las  $\beta$ NTx su alta especificidad hacia la membrana de la neurona motora en la unión neuromuscular y se ha hipotetizado sobre su unión a uno o diversos receptores celulares. Sin embargo, a la fecha no se ha comprobado la existencia de estos receptores, excepto para el caso de  $\beta$ -bungarotoxina, la cual se une a canales de  $K^+$  en la membrana presináptica de nervios periféricos (Rowan, 2001). Una vez unidas a la membrana, ocasionan un aumento significativo de la exocitosis de ACh contenida en las vesículas sinápticas de la terminal nerviosa (Figura 2.2B vs. 2.2C) (Cull-Candy *et al.*, 1976; Montecucco *et al.*, 2008). Esto es muy posiblemente consecuencia de la alteración de la membrana celular causada por la actividad enzimática de las  $\beta$ NTx sobre fosfolípidos de membrana y la consecuente generación de ácidos grasos y lisofosfolípidos. Esta misma alteración de la membrana, ocasiona un aumento de la permeabilidad a iones y por tanto de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ . Este aumento desencadena una serie de eventos degenerativos entre los que destaca el daño a mitocondrias (Figura 2.2B vs. C) y que eventualmente culminan en la destrucción del botón presináptico (Montecucco *et al.*, 2008). Este daño no llega al cuerpo celular de la motoneurona, por lo que, una vez inactivada la

$\beta$ NTx, es posible la reinervación y regeneración del músculo dañado (Harris, 2003; Montecucco *et al.*, 2008).

### 2.3.2. 3FTx presentes en venenos de elápidos

Las proteínas pertenecientes a la familia de 3FTx son polipéptidos no enzimáticos de entre 64 y 72 aminoácidos. Estructuralmente, constan de un núcleo hidrofóbico estabilizado por cuatro puentes disulfuro, los cuales están conservados en todos los integrantes de la familia. De este núcleo, se extienden 3 asas conformadas por láminas beta que pueden o no contener un puente disulfuro adicional (Figura 2.3) (Kini y Doley, 2010).



**Figura 2.3. Ejemplos de 3FTx descritas en veneno de elápidos.**

3FTx de cadena corta (Erabutoxina a), de cadena larga ( $\alpha$ -bungarotoxina) y no convencional (Candoxina). Se señaló el N-terminal con una N y las asas están numeradas (I a III). Nótese el puente disulfuro extra en el asa II de la  $\alpha$ -bungarotoxina (morado) y en el asa I de la Candoxina (rojo). Imagen tomada de (Tsetlin, 2015).

Este grupo de toxinas es muy abundante en venenos de las familias Colubridae y Elapidae. Aunque el patrón de cisteínas y el arreglo de puentes disulfuro es relativamente constante en todos los integrantes de la familia, la secuencia primaria es extremadamente variable. Las 3FTx son capaces de ejercer una amplia gama de actividades farmacológicas, entre las que podemos encontrar antagonistas de una gran diversidad de receptores, inhibidores de agregación plaquetaria, inhibidores de acetilcolinesterasa, entre muchos otros (Fry *et al.*, 2003).

Las 3FTx que actúan como antagonistas de receptores nicotínicos de ACh (nAChR) son denominadas  $\alpha$ NTx y son uno de los grupos más relevantes, en términos de letalidad, presentes en venenos de elápidos. En la Figura 2.2D se presenta un ejemplo del efecto bloqueador de nAChRs musculares, ocasionado por  $\alpha$ NTx purificadas del veneno de *M.*

*surinamensis* utilizando la técnica *Patch Clamp* sobre células de Rabdomiosarcoma. En estos experimentos, se observa la inhibición de las corrientes generadas por el neurotransmisor ACh después de la incubación de células con toxinas a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008).

Las  $\alpha\text{NTx}$  a su vez se dividen en tres subclases: Las  $\alpha\text{NTx}$  Tipo I, o de cadena corta; las  $\alpha\text{NTx}$  Tipo II o de cadena larga; y las  $\alpha\text{NTx}$  Tipo III o no convencionales (Figura 2.3) (Tsetlin, 2015). La mayoría de las 3FTx estudiadas hasta el momento en venenos de coralillos pertenecen al primer grupo (Alape-Girón *et al.*, 1996; Carbajal-Saucedo *et al.*, 2013; Guerrero-Garzón *et al.*, 2018). Las  $\alpha\text{NTx}$  de Tipo III, por otro lado, han sido denominadas también neurotoxinas débiles debido a su baja afinidad por los nAChR musculares, en los que fueron estudiadas. Sin embargo, recientemente se describió una toxina perteneciente a este grupo, aislada del veneno de *Boiga irregularis*, una serpiente de la familia Colubridae que se alimenta principalmente de aves y huevos de aves. Esta toxina es un dímero de 3FTx que no es letal en ratones, pero es extremadamente tóxica para aves y lagartijas. Su actividad bloqueadora de la contracción muscular es también mucho más potente al probarla en una preparación neuromuscular de ave (*biventer cervicis* de pollo) que en una de mamífero (nervio frénico - hemidiafragma de rata) (Pawlak *et al.*, 2009). Debido en parte a este descubrimiento, se ha especulado que otros integrantes del grupo de las  $\alpha\text{NTx}$  Tipo III podrían tener actividades específicas para las presas naturales de las serpientes de donde provienen (Fry, 2015).

Es interesante apuntar que tanto en éste como en los grupos de 3FTx previamente mencionados es común la formación de dímeros debido a interacciones tanto covalentes como de otra naturaleza. El papel de estas interacciones en las actividades biológicas de estas proteínas aún no está bien comprendido.

## 2.4. El papel biológico de los venenos de coralillo

Todos los coralillos utilizan el veneno para someter a sus presas, aunque también es probable que éste tenga una función defensiva y de predigestión (Van der Laat *et al.*, 2013). La mayoría de ellos se alimentan de pequeñas serpientes, lagartijas y anfisbénidos; con algunas excepciones como *Micrurus surinamensis*, cuya dieta consta casi exclusivamente de peces (Campbell y Lamar, 2004; Roze, 1996).

La investigación relativa al papel biológico de los venenos de coralillos, así como de su efecto sobre posibles presas naturales es escasa. Actualmente existen muy pocos estudios que relacionen la dieta de estos animales con la composición de sus venenos. En 2001 da Silva Jr. y Aird realizaron un extenso trabajo en el que determinaron  $\text{DL}_{50\text{s}}$  de 12 especies de coralillos, en su mayoría sudamericanas, sobre un modelo murino y varios modelos de presa natural (da Silva Jr. y Aird, 2001). En éste, encontraron una marcada especificidad de los

venenos, siendo mucho más letales para los modelos cercanos a las presas naturales de la especie que para ratones. Por ejemplo, el veneno de *M. surinamensis*, una especie que se alimenta principalmente de peces, tiene una DL<sub>50</sub> más de 30 veces menor al ser probada en el pez *Gymnotus carapo*, que en ratones. Diversas especies ofiófagas, como *M. ibiboboca*, *M. altirostris* y *M. frontalis*, mostraron DL<sub>50</sub>s entre 2 y 8.3 veces mayores en ratones que en el colúbrido *Liophis typhlus*.

De manera contrastante, se ha descrito resistencia de algunas especies de colúbridos por el veneno del coralillo *M. nigrocinctus*. En este trabajo, se observó que el veneno era al menos 25 veces menos letal para dos especies del género *Ninia* y entre 3 y 10 veces menos letal para dos especies del género *Geophis* que para ratones (Urdaneta *et al.*, 2004).

Respecto a toxinas aisladas, algunos componentes del veneno de *M. surinamensis*, denominados MS4 y MS5, son letales para peces e inofensivas para ratones (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008). En trabajos anteriores realizados en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón, se identificó también una toxina, inofensiva para ratones, que causa parálisis flácida en serpientes pequeñas del género *Conopsis* (Bénard-Valle *et al.*, 2014).

## 2.5. *Micrurus browni* o coralillo de Brown: Descripción y distribución

*Micrurus browni*, o coralillo de Brown es una especie de amplia distribución en el territorio mexicano. Podemos encontrarla desde el Estado de México hacia el Suroeste por la vertiente del Pacífico desde Guerrero hasta Oaxaca y Chiapas, entrando finalmente a las montañas de Guatemala (Figura 2.4). Es de tamaño mediano, ya que los adultos generalmente miden entre 450 y 700 mm de largo total. Actualmente se reconocen tres subespecies: *M. b. browni*, que ocupa prácticamente toda la distribución descrita; *M. b. taylori*, de la región de Acapulco, Guerrero y *M. b. importunus*, de la región de Dueñas, en Guatemala (Roze, 1996).



# ANTECEDENTES

## Sección 3



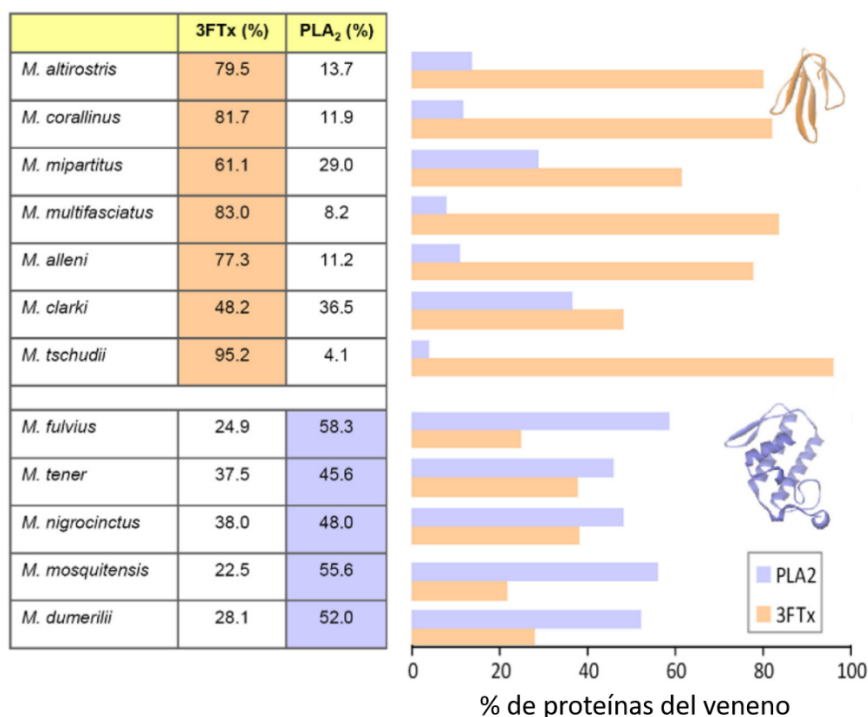


### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Composición de los venenos de coralillos

La investigación de los venenos de coralillos se ha llevado a cabo mediante gran variedad de estrategias distintas desde hace más de 40 años (Gutiérrez, 2002). La mayor parte de estos estudios han estado enfocados en sus efectos tóxicos en mamíferos, así como la producción y mejoramiento de antivenenos. Comparativamente, los estudios de toxicidad sobre presas naturales y aquellos que analizan el papel biológico de los venenos, son escasos.

Actualmente, se ha realizado la caracterización proteómica de los venenos de 24 especies de coralillos (Aird *et al.*, 2017; Lomonte *et al.*, 2016a) con distribución en Sudamérica (Aird *et al.*, 2017; Ciscotto *et al.*, 2011; Corrêa-Netto *et al.*, 2011; Olamendi-Portugal *et al.*, 2008; Rey-Suárez *et al.*, 2016, 2011; Sanz *et al.*, 2016), Centroamérica (Fernández *et al.*, 2015, 2011; Lomonte *et al.*, 2016b; Rey-Suárez *et al.*, 2011) y Norteamérica (Bénard-Valle *et al.*, 2014; Carbajal-Saucedo *et al.*, 2013; Vergara *et al.*, 2014). Estos análisis han mostrado, como se mencionó anteriormente, una predominancia de proteínas pertenecientes a las familias de las 3FTx y PLA<sub>2</sub> (Figura 3.1), aunque se han identificado un total de 22 familias proteicas, incluyendo metaloproteasas (SVMP), péptidos inhibidores de proteasa tipo Kunitz (KUN), L-aminoácido oxidasas (LAAO) y lectinas tipo C (CTL).



### Figura 3.1. Proporción de 3FTx y PLA<sub>2</sub> en proteomas de veneno de coralillos.

Los porcentajes de la tabla representan abundancia relativa en los venenos de componentes pertenecientes a 3FTx o PLA<sub>2</sub>. Los porcentajes resaltados en naranja pertenecen a venenos con predominancia de 3FTx y los porcentajes en morado pertenecen a venenos con predominancia de PLA<sub>2</sub> (Lomonte *et al.*, 2016a).

En este sentido, se ha sugerido un patrón en donde las especies Sudamericanas poseen predominancia de 3FTx, mientras que en Norteamérica los venenos están predominantemente compuestos por PLA<sub>2</sub> (Fernández *et al.*, 2015; Lomonte *et al.*, 2016a). Este patrón, sin embargo, no está completamente probado, pues aún existe una gran cantidad de especies sin estudiar y ya se han descrito algunos venenos que no lo cumplen (Sanz *et al.*, 2019).

Adicionalmente, se han llevado a cabo análisis transcriptómicos en poco más de 10 especies (Aird *et al.*, 2017; Fernández *et al.*, 2011; Leão *et al.*, 2009; Margres *et al.*, 2013; Rokyta *et al.*, 2015). Como se anticipaba, los transcritos que mostraron mayor abundancia fueron 3FTx y PLA<sub>2</sub>, representando en conjunto más del 85% del total de transcritos. En el resto de los transcritos se identificaron más de 20 familias proteicas, entre las que podemos destacar KUN, CTLs, péptidos natriuréticos (NP) y factores de crecimiento nervioso (NGF).

Las caracterizaciones anteriormente mencionadas han identificado una gran diversidad de moléculas cuya actividad tóxica no ha sido comprobada, al menos al ser estudiada en los modelos animales convencionales como ratones. Es posible que algunas de estas toxinas tengan actividad específicamente sobre los tejidos de sus presas naturales. Otra posibilidad es que existan interacciones o sinergismos entre las proteínas de los venenos, las cuales se pierden al utilizar métodos de fraccionamiento como el RP-HPLC.

## 3.2. Neurotoxicidad y efectos *in vivo*

La toxicidad de los venenos de coral, así como de muchas otras especies de serpientes ha sido normalmente analizada en modelos murinos. De esta manera, se ha observado que poseen DL<sub>50</sub>s bajas es decir, alta potencia letal (Tabla III.I), al igual que otros elápidos (da Silva Jr. y Aird, 2001; De Roodt *et al.*, 2012; Sanz *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017).

**Tabla III.I.** Letalidad de algunos venenos de coralillos del género *Micrurus*

Especie	DL <sub>50</sub> (µg/g)	Vía de inoculación	Metodología	Cita
<i>M. fulvius</i>	0.3	<i>i.v.</i>	RNL	(Vergara <i>et al.</i> , 2014)
<i>M. tener</i>	1.2	<i>i.v.</i>	RNL	(Bénard-Valle <i>et al.</i> , 2014)
<i>M. laticollaris</i>	0.6	<i>i.v.</i>	RNL	(Carbajal, 2014)
<i>M. alleni</i>	0.4	<i>i.v.</i>	Probit	(Fernández <i>et al.</i> , 2015)

<i>M. mosquitensis</i>	0.4	<i>i.v.</i>	Probit	(Fernández <i>et al.</i> , 2015)
<i>M. pyrrhocryptus</i>	1.1	<i>i.p.</i>	M-T	(Dokmetjian <i>et al.</i> , 2009)
<i>M. dumerilii</i>	1.2	<i>i.p.</i>	S-K	(Rey-Suárez <i>et al.</i> , 2016)
<i>M. mipartitus</i>	1.8	<i>i.v.</i>	Probit	(Bolanos <i>et al.</i> , 1975)
<i>M. clarki</i>	0.7	<i>i.v.</i>	Probit	(Lomonte <i>et al.</i> , 2016b)
<i>M. tschudii</i>	0.4 a 0.8	<i>i.p.</i>	Probit	(Sanz <i>et al.</i> , 2016)

RNL. Método de regresión no lineal (Casasola *et al.*, 2009).

M-T. Método de Meier y Theakston (Meier y Theakston, 1986).

S-K. Método de Spearman y Karber.

Con el fin de caracterizar su neurotoxicidad, diversos venenos de coralillo han sido probados sobre preparaciones neuromusculares murinas y/o de pollo. Muchas de las especies estudiadas han mostrado efectos marcadamente postsinápticos, evidenciados por respuestas favorables a agentes competidores de ACh como neostigmina, así como por la inhibición de contracciones generadas por este neurotransmisor en las preparaciones de pollo. Podemos encontrar ejemplos de esto en los venenos de *M. dumerilii carnicauda* (Serafim *et al.*, 2002) *M. mipartitus* (Renjifo *et al.*, 2012), *M. pyrrhocryptus* (Camargo *et al.*, 2011) y *M. altirrostris* (De Abreu *et al.*, 2008). También se han descrito especies en donde se combinan efectos presinápticos y postsinápticos como es el caso de *M. spixii* (Terra *et al.*, 2015), *M. lemniscatus lemniscatus* (Floriano *et al.*, 2019) y la única especie mexicana estudiada hasta el momento, *M. laticollaris* (Carbajal-Saucedo *et al.*, 2014).

Como se mencionó anteriormente, se ha descrito también actividad miotóxica en los venenos de algunas especies, tanto utilizando preparaciones neuromusculares (*M. dissoleucus*) (Renjifo *et al.*, 2012), como en modelos *in vivo* (De Roodt *et al.*, 2012; Gutiérrez *et al.*, 1986).

### 3.3. Toxinas aisladas de venenos de coralillos

La mayor parte de las toxinas descritas en venenos de coralillos pertenecen a la familia de las 3FTx. Entre ellas, encontramos diversas  $\alpha$ NTx con alta potencia letal como Mipartoxina, de *M. mipartitus* (DL<sub>50</sub> *i.p.* de 0.06  $\mu$ g/g) (Rey-Suárez *et al.*, 2012), MS1 de *M. surinamensis* (DL<sub>50</sub> *i.v.* < 1  $\mu$ g/g) (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008) y Frontoxinas I, II y III de *M. frontalis* (Moreira *et al.*, 2010). Algunas de ellas han sido analizadas mediante técnicas electrofisiológicas, comprobando sus efectos bloqueadores del nAChR muscular (Bénard-Valle *et al.*, 2014; Olamendi-Portugal *et al.*, 2008).

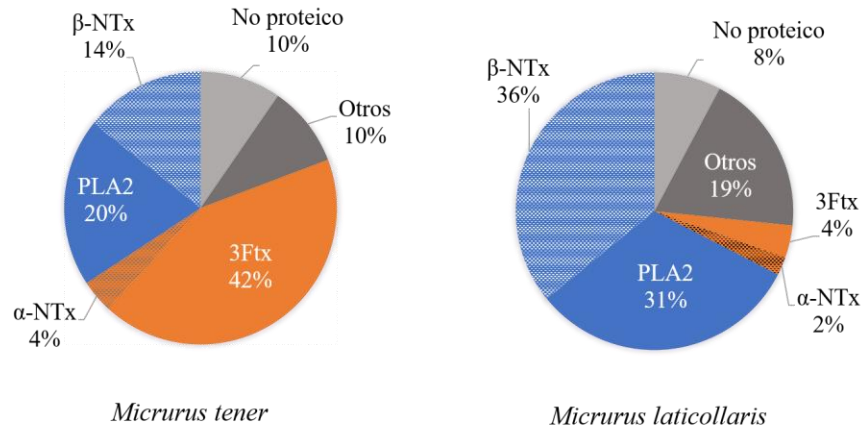
Pertenecientes a esta misma familia, podemos encontrar algunas toxinas con efectos previamente no descritos, como es el caso de MmTx1 y MmTx2, también del veneno de *M. mipartitus*. Aunque no son letales al ser inyectadas por vía intravenosa, estas 3FTxs poseen una DL<sub>50</sub> por vía intracraneal (*i.c.*) de 0.002 µg/g y tienen un efecto modulador de canales neuronales tipo GABA<sub>A</sub> (Rosso *et al.*, 2015). Su efecto durante el envenenamiento de las presas o en casos clínicos no ha sido estudiado, sin embargo, toxinas de este tipo, o similares, tienen un gran potencial para desarrollo de fármacos como antiepilépticos, antidepresivos, moduladores de la función cardíaca, entre otros.

En el caso de la familia de las PLA<sub>2</sub>, se han aislado algunos representantes con efectos miotóxicos, como la Lemnitoxina de *M. lemniscatus* (Casais-E-Silva *et al.*, 2016) y las Nigroxinas de *M. nigrocinctus* (Alape-Girón *et al.*, 1996). También han sido descritas βNTxs con alta potencia letal (DL<sub>50</sub> < 1 µg/g) como las presentes en *M. fulvius* (Vergara *et al.*, 2014) y *M. dumerilii* (Dal Belo *et al.*, 2005). Es importante mencionar que diversas neurotoxinas descritas en venenos de elápidos poseen también actividad miotóxica (Rowan, 2001).

También es muy destacable el aislamiento a partir del veneno de *M. tener* de MitTx, una molécula cuyo efecto principal es la generación de dolor (Bohlen *et al.*, 2011). Ésta es un dímero no covalente formado por una PLA<sub>2</sub> sin actividad enzimática denominada MitTxB y un péptido tipo Kunitz denominado MitTxA. En ese trabajo, se describió que MitTx genera su efecto a través de la activación de canales iónicos sensores de voltaje llamados ASIC1.

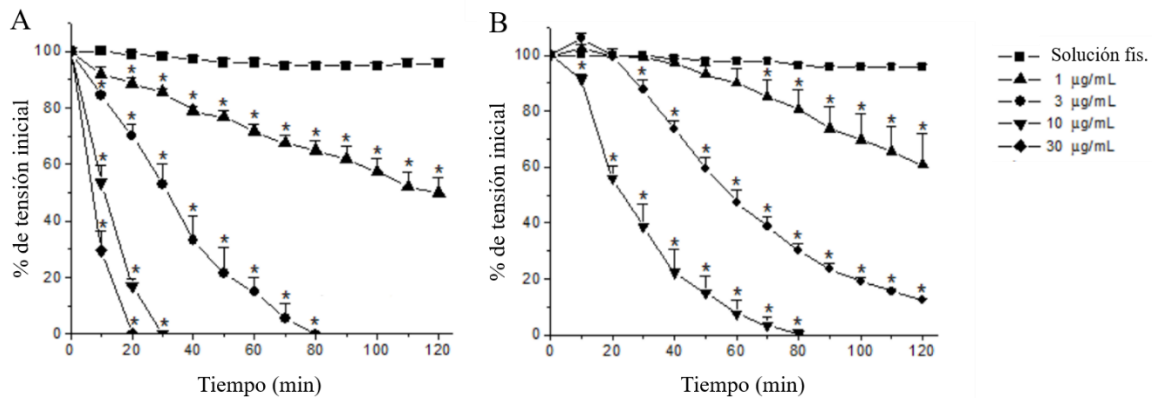
### 3.4. Conocimiento actual de los venenos de coralillos mexicanos

A la fecha, sólo existen caracterizaciones proteómicas de dos especies de coralillos mexicanos (*M. tener* y *M. laticollaris*; Figura 3.2). Otras especies de coralillos mexicanos han sido estudiadas de manera menos detallada, mostrando en su mayoría predominancia de PLA<sub>2</sub>, aunque aparentemente existen venenos con predominancia de 3FTx como el del coralillo de Los Tuxtlas (*M. limbatus*) y *M. elegans* (Bénard-Valle, 2009; Lomonte *et al.*, 2016a).



**Figura 3.2. Composición proteica de dos venenos de coralillos mexicanos.**  
Adaptado de (Bénard-Valle *et al.*, 2014; Carbajal-Saucedo *et al.*, 2013).

El análisis de la composición proteica del veneno de *M. laticollaris* (Coralillo del Balsas) mostró que tiene una marcada predominancia de PLA<sub>2</sub>s, Estas son responsables de la mayor parte de la letalidad de este veneno, aunque también se describió un componente α-neurotóxico (MlatA1) importante para la letalidad. MlatA1, que es una 3FTx con una DL<sub>50</sub> en ratón de 0.067 μg/g y pertenece al subgrupo de cadena corta de las αNTx, fue posteriormente aislada y expresada en bacterias en forma soluble y activa (Carbajal-Saucedo *et al.*, 2013). La letalidad de este mismo veneno fue posteriormente caracterizada utilizando preparaciones neuromusculares de ratón y pollo (Figura 3.3) y se describió que posee toxinas que actúan en ambas preparaciones tanto de manera presináptica como postsináptica (Carbajal-Saucedo *et al.*, 2014).



**Figura 3.3. Efecto del veneno de *M. laticollaris* sobre preparaciones neuromusculares.**  
A. *Biventer cervicis* de pollo. B. Nervio frénico - diafragma de ratón. Tomado de (Carbajal-Saucedo *et al.*, 2014).

El veneno de *Micrurus tener fitzingeri*, también conocido como coralillo del Noreste fue estudiado utilizando técnicas proteómicas y de función (Bénard-Valle *et al.*, 2014). En este trabajo, se observó que posee una ligera predominancia de PLA<sub>2</sub> sobre 3FTx, aunque la mayor parte de los componentes letales para ratones pertenecían a la familia de las PLA<sub>2</sub>. Al igual que en el veneno de *M. laticollaris*, se reportó la presencia de al menos una  $\alpha$ NTx con alta potencia letal. El efecto del veneno de *M. t. fitzingeri* fue posteriormente estudiado en serpientes del género *Conopsis* como modelo de presa natural. De manera interesante, no se reportó una mayor toxicidad del veneno sobre el modelo de reptil, que era lo esperado dado lo previamente reportado para especies Sudamericanas (da Silva Jr. y Aird, 2001). Aun así, se describió una  $\alpha$ NTx no tóxica para ratones, que genera parálisis flácida en *Conopsis sp.*, representando la única neurotoxina con especificidad hacia reptiles descrita en el veneno de un elárido.

Actualmente no se ha reportado ningún transcriptoma completo de una especie mexicana, sin embargo, se han reportado secuencias de 3FTx obtenidas a partir de las glándulas de veneno de cuatro especies de coralillos del país (*M. laticollaris*, *M. browni*, *M. tener* and *M. diastema*) (Guerrero-Garzón *et al.*, 2018). En este trabajo, se obtuvieron 30 transcritos, cuatro de los cuales fueron identificados, por su secuencia primaria, como  $\alpha$ NTx de cadena corta. Una de ellas, denominada D.H. fue encontrada en el veneno de *M. diastema* y también expresada en bacterias de manera soluble y activa.

El coralillo de Brown o *M. b. browni* tiene una amplia distribución en el territorio mexicano y su veneno sólo ha sido estudiado marginalmente. Este trabajo tuvo como objetivo obtener una comprensión de su veneno desde el punto de vista de composición y función biológica. Además, se pretendió aportar información que contribuya al entendimiento de los mecanismos que guían la selectividad de algunos venenos por los tejidos de su presa natural.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## Sección 4



## 4.1. HIPÓTESIS

Durante el envenenamiento ocasionado en ratones por la serpiente de coral *Micrurus browni*, los componentes más relevantes son  $\alpha$  y  $\beta$ -neurotoxinas; algunos de éstos tienen actividad específica hacia reptiles.

## 4.2. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el veneno en su conjunto, así como sus componentes más relevantes, de la serpiente de coral *Micrurus b. browni*, analizando su posible especificidad hacia presas naturales.

## 4.3. OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar la composición del veneno mediante caracterizaciones proteómica y transcriptómica.
- Realizar fraccionamiento del veneno en condiciones que no afecten su actividad biológica.
- Analizar la actividad biológica del veneno de *M. browni* y sus fracciones *in vivo*, utilizando un modelo murino (ratones cepa CD1) y uno reptil (*Conopsis sp.*).
- Caracterizar posibles sinergias entre los componentes del veneno.
- Caracterizar la actividad neurotóxica *ex vivo* del veneno sobre preparaciones neuromusculares de un mamífero y un reptil.
- En caso de haberlas, caracterizar toxinas con actividad específica para reptiles.



# METODOLOGÍA

## Sección 5



## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Obtención y procesamiento de venenos

Se realizaron extracciones mensuales de veneno de seis individuos de la subespecie *Micrurus browni browni*, provenientes de la localidad de Villa Flores, Chiapas, durante un año y medio. Las extracciones se realizaron de manera manual, sosteniendo al ejemplar por la cabeza y permitiéndole morder una cuchara de plástico cubierta de Parafilm. Posteriormente, la cuchara fue lavada con acetato de amonio 20 mM (pH 4.7) para recuperar el veneno. Los venenos obtenidos de esta manera fueron centrifugados a 17,600 g durante 3 minutos para remover detritos celulares y otros materiales insolubles. Posteriormente, la fracción soluble fue separada y congelada a -70 °C en tubos de 2 mL, previamente pesados, para su posterior liofilización. Una vez liofilizados, se obtuvo el peso seco de veneno por extracción (utilizando una balanza granataria; Adventurer™, OHAUS) y se almacenaron individualmente. En total, se obtuvieron 411.2 mg de veneno liofilizado. Es importante notar que el uso de amortiguadores con bajo pH como el acetato de amonio, puede causar pérdida de actividad enzimática de algunos componentes de venenos como las SVMs. En este caso se utilizó debido a su alta volatilidad y se mantuvo una baja molaridad para evitar el efecto mencionado.

Aproximadamente 1 mg de veneno de cada extracción fue resuspendido en acetato de amonio 20 mM y analizado mediante RP-HPLC en una columna C<sub>18</sub> con el fin de evaluar si existía variación entre los venenos de individuos o extracciones (datos no mostrados). Una vez determinado que no había variación significativa entre los individuos, sus venenos se juntaron en una mezcla de trabajo, la cual contenía veneno de los seis individuos en partes iguales. Esta mezcla fue nuevamente resuspendida en acetato de amonio 20 mM (pH 4.7) para asegurar su homogeneización y posteriormente fue liofilizada y almacenada a -20 °C hasta su uso. Para cada experimento realizado, una fracción de esta mezcla fue pesada, resuspendida y su concentración proteica fue determinada utilizando el método del ácido bicinónico (BCA) y absorbancia a 280 nm ( $A_{280}$ ).

### 5.2. Cuantificación de proteínas

#### 5.2.1. Absorbancia a 280 nm

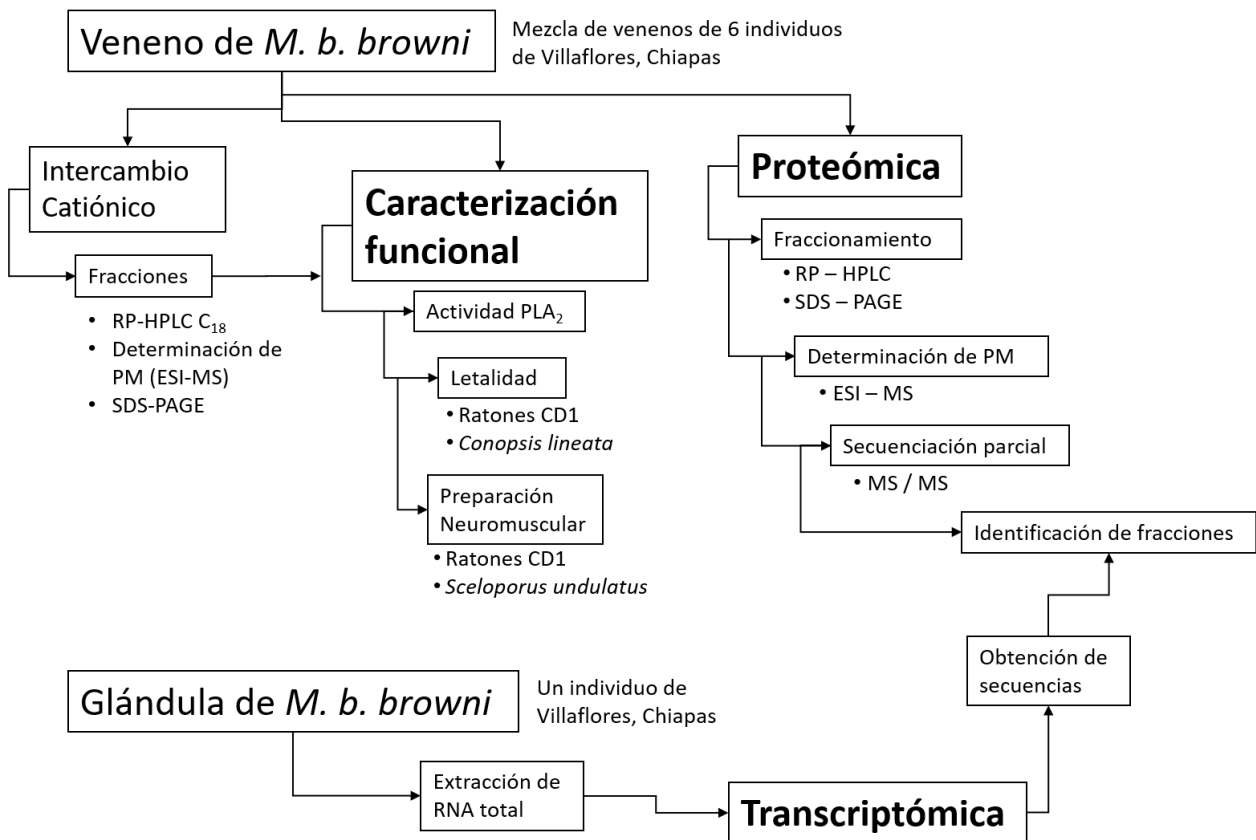
La cuantificación proteica se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro (Thermo scientific) y una celda de cuarzo con longitud ( $l$ ) de 1 cm. La concentración ( $[C] = A_{280}/\epsilon l$ ) se obtuvo asumiendo un coeficiente de extinción ( $\epsilon$ ) igual a uno, por lo que una unidad de Absorbancia a 280 nm ( $A_{280}$ ) es equivalente a una concentración de proteína de 1 mg/mL.

### 5.2.2. Método del ácido bicinónico

La cuantificación proteica se llevó a cabo utilizando un paquete comercial para reacciones de BCA de la marca Pierce™ (Ver protocolo en Anexo IV.I).

### 5.3. Estrategia metodológica

El proyecto fue dividido en dos etapas: La primera consistió en la caracterización proteómica del veneno bajo estudio. La segunda etapa consistió en el análisis de la actividad biológica del veneno completo, así como de sus fracciones, en un modelo murino y uno de reptil. Durante esta última se realizaron ensayos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* con el fin de analizar la función del veneno y las diferentes fracciones dentro de éste (Figura 5.1). Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis transcriptómico de las glándulas de veneno de un individuo de la especie *M. b. browni*. Este último permitió, entre otras cosas, obtener secuencias completas de componentes encontrados durante las caracterizaciones.



**Figura 5.1. Diagrama de flujo mostrando la estrategia metodológica utilizada en el presente trabajo.**

Se muestran las metodologías llevadas a cabo durante cada una de las fases del proyecto: Análisis proteómico y Caracterización funcional, las cuales se realizaron a partir del veneno de 6 individuos de la especie *M. b. browni* y Análisis transcriptómico, que se llevó a cabo utilizando las glándulas de veneno de un individuo de la misma especie y localidad.

## 5.4. Caracterización proteómica

### 5.4.1. RP - HPLC

El veneno fue fraccionado por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC) utilizando una columna C<sub>18</sub> analítica (GraceVydac 250 x 4.6 mm. Tamaño de partícula 5 µm), estabilizada con H<sub>2</sub>O + 0.1% ácido trifluoroacético (TFA). La elución se realizó con un flujo de 1 mL/min, utilizando un gradiente de acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) + 0.1% TFA detallado en la [Tabla V.I.](#)

**Tabla V.I.** Gradiente de acetonitrilo

Tiempo (min)	% CH <sub>3</sub> CN + TFA
0	0
5	0
15	15
70	45
87	70
97	100
107	100

Se fraccionaron 1.4 mg de la mezcla de venenos individuales de *M. browni*. Las fracciones obtenidas fueron colectadas manualmente y secadas por centrifugación al vacío. Posteriormente fueron resuspendidas en 20, 50 ó 100 µL de H<sub>2</sub>O destilada (dependiendo de la abundancia relativa de cada pico en el cromatograma obtenido a 280nm) para analizar en geles de poliacrilamida-SDS en condiciones reductoras.

### 5.4.2. SDS – PAGE

Una matriz de acrilamida-bisacrilamida al 15% fue utilizada como gel separador y al 4% como concentrador. Se agregaron 16 µL de cada pico por carril, en condiciones reductoras (2-mercaptoetanol). La estimación de peso molecular se realizó incluyendo en cada gel 10 µl de marcadores de peso molecular preteñidos de amplio rango para proteínas (2 a 250 kDa) (BioRad). La electroforesis se llevó a cabo un voltaje constante de 70 V durante

15 min. y posteriormente a 120 V durante aproximadamente 90 min. Finalmente, los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie R-250 (Ver protocolo en Anexo IV.II).

Para los siguientes experimentos, se cortaron 2 o 3 fragmentos circulares de aproximadamente 2 mm de diámetro por cada banda y fueron almacenados a 4°C, en 20 µL de H<sub>2</sub>O destilada hasta su utilización.

### 5.4.3. Espectrometría de masas en tándem (MALDI-TOF-TOF)

Los experimentos detallados en esta sección se llevaron a cabo por el Dr. Bruno Lomonte, en el Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica. Los fragmentos tomados de los geles de SDS-PAGE fueron equilibrados con bicarbonato de amonio (50 mM) y sometidos a un proceso de reducción con ditioneitol (10 mM) por 30 min a 56°C, alquilación con iodacetamida (50 mM) por 20 min a temperatura ambiente en la oscuridad y digestión con tripsina (grado secuenciación) a 37°C durante la noche. Posteriormente, los péptidos resultantes de la hidrólisis fueron extraídos con una solución de ácido trifluoroacético al 1% en acetonitrilo al 50% y concentrados por centrifugación al vacío (VacuFuge, Eppendorf).

El análisis de los péptidos eluidos se realizó mediante MALDI-TOF-TOF en un espectrómetro de masas Proteomics Analyzer 4800 Plus (Applied Biosystems). Los péptidos fueron mezclados con un volumen igual de una solución saturada de ácido alfa-hidroxicinámico en acetonitrilo al 50% con 0,1% de ácido trifluoroacético y 1 µL de esta mezcla se colocó sobre la superficie de una placa OptiTOF384. Luego de la evaporación a temperatura ambiente, la placa fue introducida en el espectrómetro y analizada en modo reflector positivo, en el ámbito de 900-4000 m/z, utilizando 1500 disparos a una intensidad de láser de 3000. Los diez iones precursores más intensos se seleccionaron en modo automático para su fragmentación mediante disociación inducida por colisión (CID) a 2 kV, utilizando 500 disparos a intensidad de láser 3800.

Los espectros de fragmentación MS/MS se analizaron frente a las bases de datos de proteínas del NCBI (Uniprot/SwissProt, Serpentes), utilizando el algoritmo Paragon del software ProteinPilot v.4 (ABSciex) con una confianza > 95% y *score* > 5 o, alternativamente, fueron interpretados de forma manual. Los parámetros de búsqueda fueron digestión con tripsina, 2 *missed cleavages*, carbamidametilación de cisteínas como modificación constante y oxidación de metioninas como modificación variable. Las secuencias obtenidas permitieron la asignación a familias proteicas basadas en similitud. La abundancia relativa de los componentes del veneno se basó en la integración del cromatograma de RP-HPLC a 214 nm y posterior densitometría de las bandas de SDS-PAGE utilizando el software ImageJ.

#### 5.4.4. Determinación de Masa Molecular por espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS)

Estos experimentos fueron realizados por el Dr. Fernando Zamudio en el laboratorio del Dr. Lourival Possani. Las fracciones obtenidas del RP-HPLC se analizaron en un espectrómetro de masas LCQ-Fleet (Thermo-Fischer) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). Cada muestra fue inyectada por infusión directa utilizando como fase móvil acetonitrilo 60% con 0.1% de ácido acético, con un flujo de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . El voltaje del aerosol fue de 2.1 kV y la detección iónica realizada en modo positivo. Los datos espectrométricos fueron adquiridos manualmente mediante el programa Tune Plus y la deconvolución se realizó utilizando el programa Xtract. Las masas moleculares se determinaron como masas medianas contemplando la contribución de los isótopos pesados y no como masas monoisotópicas.

#### 5.4.5. Determinación de secuencias N-terminales por degradación de Edman

La secuencia N-terminal de algunos componentes obtenidos por RP-HPLC fue obtenida mediante degradación de Edman. Esto se llevó a cabo en un secuenciador PPSQ-31A (Shimadzu Scientific Instruments, Inc.). Aproximadamente 250 pmol de muestra fueron adsorbidos en un disco de fibra de vidrio tratado con TFA (Shimadzu) y analizados según especificaciones del fabricante.

### 5.5. Análisis Transcriptómico

Ambas glándulas de veneno fueron extraídas de un ejemplar adulto de la especie *M. b. browni* que murió por causas naturales y se mantuvo a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 días. El veneno de este ejemplar es uno de los que se utilizaron para hacer la mezcla con la que se llevó a cabo todo el presente trabajo. La extracción de RNA total se realizó 3 días *post mortem* utilizando Trizol, con metodologías previamente descritas (Guerrero-Garzón *et al.*, 2018) (Ver protocolo en Anexo IV.III).

La generación y secuenciación de las bibliotecas RNAseq fueron realizadas en la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática del IBt, UNAM (UUSMB, IBt-UNAM). La preparación de las bibliotecas se llevó a cabo utilizando el TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit, con el protocolo sugerido por el fabricante. Para la secuenciación de las bibliotecas se utilizó la plataforma Nextseq 500 Illumina, generando lecturas pareadas de 75 pares de bases (pb). Finalmente, la calidad de las lecturas fue analizada utilizando FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

El análisis transcriptómico fue realizado con la ayuda del Dr. Jason Strickland, investigador posdoctoral del departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Clemson, con base en métodos previamente publicados (Strickland *et al.*, 2018). Una vez

obtenidas las lecturas (datos crudos), éstas fueron filtradas y se cortaron los adaptadores utilizando el software TrimGalore! V. 0.5.0. Posteriormente, las lecturas pareadas fueron fusionadas utilizando PEAR v 0.9.6 y para el ensamblado *de novo* se utilizaron tanto Trinity v 2.6.6 como Extender (Rokyta *et al.*, 2012). La anotación se llevó a cabo con bases de datos locales, así como UniProt/SwissProt utilizando BlastX con un *e-value* mínimo de  $10^{-4}$ . Los transcritos positivos fueron anotados según su mejor resultado y aquellos sin resultado fueron manualmente analizados utilizando BlastN. Posteriormente, los transcritos duplicados fueron removidos y analizados para identificar transcritos quiméricos utilizando el software BWA y ChimeraKiller (<https://github.com/masonaj157/ChimeraKiller>). Finalmente, la cuantificación de transcritos se realizó con RSEM y Bowtie2 (Langmead y Salzberg, 2013) mediante un alineamiento de las lecturas filtradas con el transcriptoma final.

## 5.6. Caracterización bioquímica

### 5.6.1. Fraccionamiento por cromatografía de Intercambio catiónico.

Como primer paso de purificación se utilizó un intercambio catiónico fuerte en un sistema FPLC (GE Healthcare LifeSciences) con una columna HiPrep<sup>TM</sup> SP HP de 16 x 100 mm y volumen total de 20 mL, cuyo intercambiador iónico es el grupo sulfopropyl ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^-$ ). Ésta fue equilibrada en acetato de amonio 20 mM pH 4.7 y la elución de los componentes se realizó incrementando linealmente la concentración de NaCl de 0 a 1M durante 80 minutos con una velocidad de flujo de 5 mL/min.

### 5.6.2. Procesamiento de fracciones

Las fracciones obtenidas de la cromatografía de intercambio catiónico fueron dializadas contra amortiguador acetato de amonio 20 mM, pH 4.7, previo a su corrimiento en geles de SDS-PAGE y PAGE. Se realizaron cuatro cambios de amortiguador, el primero toda la noche y los siguientes de al menos media hora cada uno. La membrana de diálisis utilizada tenía un tamaño de corte de 3.5 kDa, un diámetro de 34 mm y volumen interno de 9.3 mL/cm (SpectrumLabs). Posteriormente, las fracciones dializadas fueron liofilizadas y resuspendidas en acetato de amonio 20 mM pH 4.7 para obtener una concentración final de 1 mg/mL. La determinación de concentración proteica se realizó utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA) y por absorbancia a 280 nm.

### 5.6.3. Actividad enzimática de PLA<sub>2</sub>

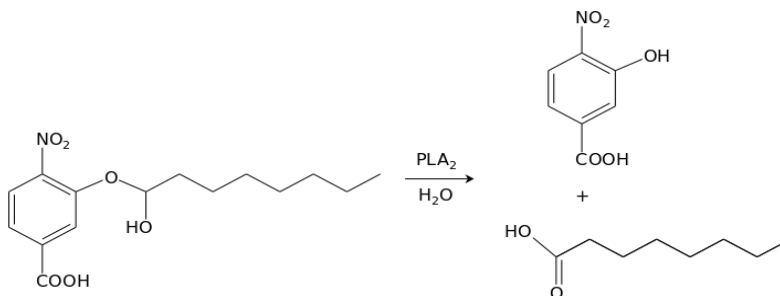
#### 5.6.3.1. Ensayo titulométrico

El ensayo titulométrico de actividad PLA<sub>2</sub> (Shiloah *et al.*, 1973) se llevó a cabo utilizando como sustrato yema de huevo al 10% en solución estándar (100 mM NaCl, 10 mM

CaCl<sub>2</sub>, 0.5% Triton X-100). Brevemente, 0.5 mL. de solución fueron llevados a un pH entre 8.0 y 8.1 con NaOH 50 mM y mantenidos bajo agitación constante y ligero burbujeo de N<sub>2</sub>. Posteriormente, se agregaron entre 1 y 10 µg de muestra y se registró el volumen de NaOH necesario para mantener un pH sobre 8.0, así como el tiempo que éste tardaba en volver a disminuir. Dado que la cantidad de NaOH consumida es equivalente a los ácidos grasos producidos por la hidrólisis del enlace *sn2* de los fosfolípidos presentes en el sustrato, las unidades de actividad enzimática específica (U/mg) fueron definidas como µmoles de NaOH consumidas por minuto por miligramo de muestra (Ver protocolo en Anexo IV.IVA).

### 5.6.3.2. Ensayo colorimétrico

El ensayo colorimétrico de actividad PLA<sub>2</sub> se llevó a cabo a 37 °C sobre el sustrato comercial 4-Nitro 3-(octanoiloxy)-benzoico (4NOBA; Sigma) utilizando una modificación del protocolo descrito por (Holzer y Mackessy, 1996). La hidrólisis del enlace éster presente en este sustrato, da como resultado un ácido graso de 8 carbonos y ácido 3-hidroxy-4-Nitrobenzoico (4HNB) (Figura 5.2). La concentración molar [M] de este último compuesto puede medirse utilizando su absorbancia a 425 nm, sabiendo que posee un coeficiente de extinción molar (ε) de 5 039 y que la distancia del paso de la luz a través de la muestra (l) es de 0.82 cm. ([M]=A<sub>425</sub>/(ε\*l)). A partir de esta información, la unidad de actividad enzimática (U) fue definida como las µmolas de 4NB liberadas por minuto y los datos se expresaron como unidades específicas (U/mg de enzima). Los datos fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism 6.0 (Ver protocolo en Anexo IV.IVB).



**Figura 5.2. Hidrólisis de sustrato 4NOBA por PLA<sub>2</sub> generando una molécula de 4HNB y una de ácido octanoico.**

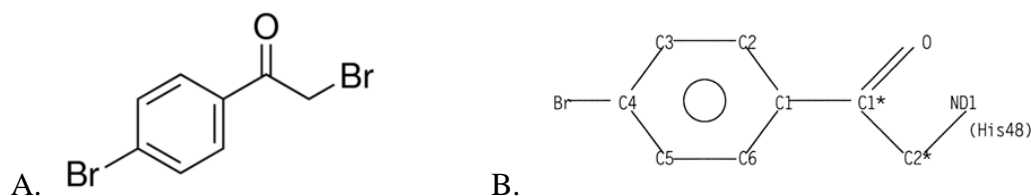
### 5.6.3.3. Inhibición de actividad PLA<sub>2</sub> con *p*BPB

Dado que todas las βNTxs descritas hasta el momento en venenos de elápidos son PLA<sub>2</sub> con actividad enzimática, se decidió realizar un ensayo de inhibición de esta actividad con el fin de analizar la contribución de αNTxs y βNTxs dentro del veneno total y sus fracciones.

Se utilizó un inhibidor comercial denominado Bromuro de *para* pBromo-fenacilo (*p*BPB). El *p*BPB, realiza una alquilación de las Histidinas presentes en las PLA<sub>2</sub>. En



particular, la modificación de la Histidina localizada en el dominio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  evita la unión de este cofactor, indispensable para la hidrólisis del enlace *sn2* de fosfolípidos (Zhao *et al.*, 1998). En la Figura 4.3 se ilustra la modificación generada por el *p*BPB en la His48 de una PLA<sub>2</sub> de veneno de *Agkistrodon halys*, la cual se encuentra en el sitio de unión al cofactor  $\text{Ca}^{2+}$  y es indispensable para la actividad enzimática.



**Figura 5.3. A. Reactivo *p*BPB. B. Grupo *p*Bromo-fenacilo unido la Histidina 48 de PLA<sub>2</sub> (Zhao *et al.*, 1998).**

El veneno de *Micrurus fulvius* se utilizó como control debido a que se ha descrito que su toxicidad está dada exclusivamente por PLA<sub>2</sub> con actividad neurotóxica (Vergara *et al.*, 2014). El ensayo se realizó en solución de inhibición (0.1 M Tris/HCl, 2 mM EDTA, pH 8.0), preincubando el veneno en esta solución durante 10 min a 25 °C previo a la adición de *p*BPB en relación molar 1:1, 1:5 y 1:10, tomando en cuenta un peso molecular promedio del veneno de 14 kDa. El veneno con inhibidor fue incubado a 25 °C durante tres horas y posteriormente se agregó  $\text{CaCl}_2$  a una concentración final 4 mM (Ver protocolo en Anexo IV.V).

Finalmente, los venenos tratados fueron incubados 10 minutos a 37 °C y se les realizó una determinación de actividad PLA<sub>2</sub> utilizando el método colorimétrico previamente descrito.

## 5.7. Análisis de especificidad *In vivo*

El análisis de la letalidad y efectos *in vivo* del veneno de *Micrurus b. browni*, conforma la tesis de licenciatura de Manuel Francisco Yañez Mendoza, quien realizó este trabajo bajo mi tutoría en el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano (Yañez Mendoza, 2019). Todos los métodos aquí descritos fueron previamente aprobados por el comité de bioética del Instituto de Biotecnología, bajo el proyecto número # 385 “Caracterización funcional y análisis de especificidad de venenos de corallillos norteamericanos”.

### 5.7.1. Modelo murino

La Dosis Letal Media (DL<sub>50</sub>) del veneno y las fracciones de intercambio catiónico fueron determinadas en ratones de la cepa CD1 entre 18 y 20 gramos de peso corporal. Grupos de tres ratones fueron inoculados con distintas dosis de veneno o fracciones utilizando la vía intravenosa (*i.v.*) o intraperitoneal (*i.p.*). El porcentaje de mortalidad fue determinado 48 horas posteriores a la inoculación y los datos fueron analizados utilizando un método de regresión no lineal, graficando el porcentaje de mortalidad contra el logaritmo de

la dosis inoculada (Casasola *et al.*, 2009) en el software GraphPad Prism v6.0. Se registraron los tiempos de parálisis y muerte y se realizaron observaciones de signos de envenenamiento.

#### 5.7.1.1. Neutralización de actividad letal con antiveneno

Se analizó la capacidad del antiveneno comercial Coralmyn® (Lote # B-5H-16, Caducidad: Enero, 2018) para neutralizar la letalidad del veneno de *M. b. browni* y una de sus fracciones. La Dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>) se define como la dosis de antiveneno capaz de salvar a la mitad de una población envenenada experimentalmente. Se utilizaron grupos de 3 ratones de la cepa CD1 entre 18 y 20 g de peso corporal. El equivalente a 3 ó 6 DL<sub>50</sub>s murinas fueron preincubadas con diferentes dosis de antiveneno en un volumen total de 500 µL de PBS 1X y se inocularon por vía *i.v.* El porcentaje de supervivencia fue determinado 48 horas después de la inoculación. Los datos obtenidos se analizaron en el software GraphPad Prism v6.0 con un método de regresión no lineal, graficando el porcentaje de supervivencia contra el logaritmo de la dosis de antiveneno inoculada (Casasola *et al.*, 2009).

#### 5.7.2. Modelo reptil

Como modelo de reptil se utilizaron serpientes terrestres de tamaños variables pertenecientes a la especie *Conopsis sp.* Grupos de tres serpientes fueron inoculadas por vía *i.p.* en el tercer tercio del cuerpo con cantidades variables de veneno o sus fracciones. Previo a la inoculación, cada serpiente fue pesada con el fin de administrar la dosis requerida por serpiente en µg/g de peso corporal.

Se registraron los tiempos de parálisis y muerte y se realizaron observaciones de signos de envenenamiento. Posteriormente, se realizaron necropsias de las serpientes que murieron debido al veneno con el fin de realizar observaciones generales de daño a nivel macroscópico en órganos y tejidos.

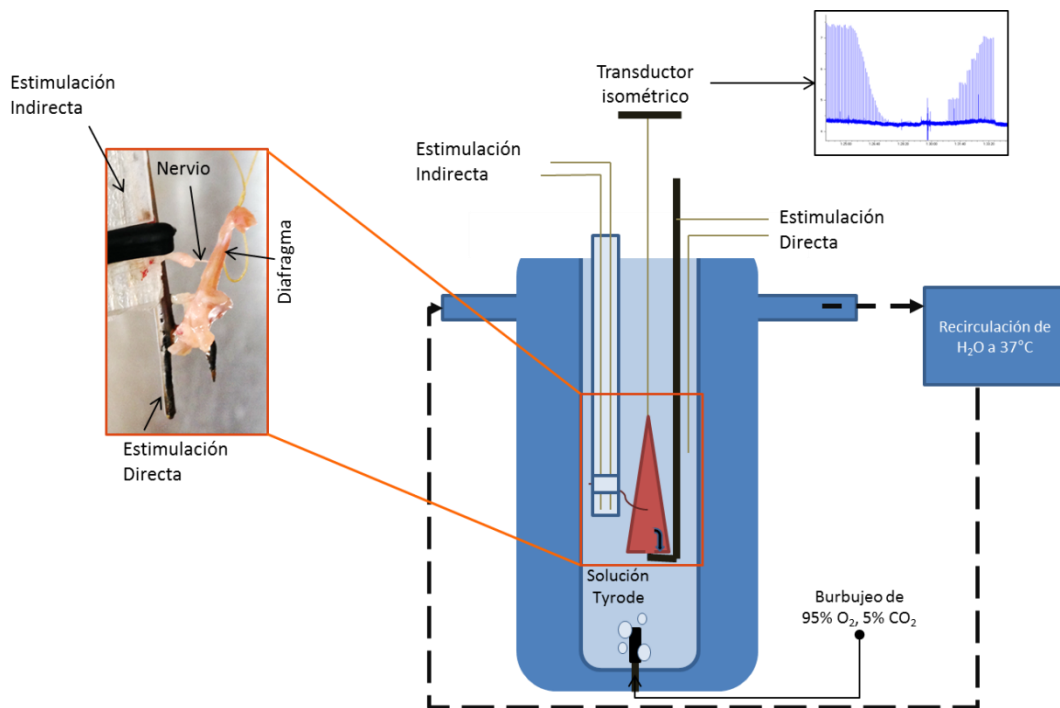
### 5.8. Análisis de especificidad *Ex vivo*

#### 5.8.1. Preparación de nervio frénico – diafragma (NFD) de ratón (*Mus musculus*)

Los experimentos reportados en esta sección fueron realizados en parte en los laboratorios y con la colaboración del Dr. Enrique Jiménez Ferrer y la Dra. Maribel Herrera del Centro de Investigación Biomédica del Sur del IMSS. Otra parte de los experimentos fue realizada durante una estancia en el laboratorio del Dr. Stephen P. Mackessy de la Universidad del Norte de Colorado en Greeley, CO., E.E.U.U.

La preparación de nervio frénico – hemidiafragma de ratón se llevó a cabo utilizando una variación del método originalmente descrito por (Bülbring, 1946). Brevemente, un ratón de la cepa CD1, entre 25 y 35 g de peso corporal fue sacrificado e inmediatamente se realizó la disección del nervio frénico con una porción de diafragma. El tejido se montó en un baño

para tejidos aislados de 10 mL. en solución Tyrode (0.4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2.7 mM  $\text{KCl}$ , 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 137 mM  $\text{NaCl}$  y 11.9 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) con glucosa 11 mM a una temperatura fija de 37 °C, de la siguiente manera: El extremo costal del diafragma se fijó utilizando dos ganchos de platino al fondo de la preparación mientras que el centro tendinoso del diafragma fue amarrado con un hilo de nylon a un transductor isotónico el cual mantiene al tejido en reposo con una tensión basal de 5 g y realiza las mediciones de contracción muscular (Figura 5.4). La preparación se mantuvo bajo un burbujeo de solución gaseosa de 95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$  con el fin de proveer al tejido la oxigenación necesaria.



**Figura 5.4. Esquematación de la preparación de nervio frénico - hemidiafragma de ratón.**

La estimulación del nervio o indirecta (E. I.) se realizó utilizando dos electrodos de platino aislados de la solución Tyrode y directamente en contacto con el nervio frénico. La estimulación del músculo completo o directa (E. D.) se realizó utilizando también dos electrodos de platino, uno directamente en contacto con el músculo y otro sumergido en la solución. Las condiciones de estimulación utilizadas se detallan en la [Tabla V.II](#).

**Tabla V.II.** Condiciones de estimulación.

	<b>E. Directa (Músculo)</b>	<b>E. Indirecta (Nervio)</b>
Voltaje	Supra máximo (>70 V)	Supra máximo (>70 V)
Duración	1 ms	0.1 ms
Frecuencia	0.2 pps	0.2 pps

Una vez montado el tejido, se dejó estabilizar la preparación bajo estimulación indirecta durante al menos 20 minutos. Posteriormente, con el fin de asegurar la independencia de los estímulos directos e indirectos, se agregó hidrocloreto de  $\delta$ -tubocurarina a una concentración final de 5  $\mu\text{M}$ , se permitió actuar durante 5 minutos y se realizaron al menos 3 lavados en los que se hizo un intercambio total de la solución Tyrode. Finalmente, se permitió estabilizar la preparación hasta que se recuperó el 100% de la intensidad de contracción original y se obtuvo una línea base estable.

El veneno completo de *M. b. browni* fue agregado directamente al baño de tejido, utilizando una concentración final de 5  $\mu\text{g/mL}$  (aprox. 0.5  $\mu\text{M}$ , considerando una masa molecular promedio del veneno completo de 10 000 Da).

### 5.8.2. Preparación de nervio tibial – músculo *gastrocnemio* (NTG) de lagartija (*Sceloporus undulatus*)

Estos experimentos fueron realizados durante una estancia en el laboratorio del Dr. Stephen Mackessy de la Universidad del Norte de Colorado en Greeley, CO. E.E.U.U. La preparación se llevó a cabo utilizando la rama tibial del nervio ciático junto con el músculo *gastrocnemio*, que ésta inerva en la pata trasera de lagartijas de la especie *Sceloporus undulatus*.

La disección del nervio con su músculo asociado se llevó a cabo inmediatamente después del sacrificio del animal por decapitación. Todo el proceso se realizó sumergido en solución Tyrode, manteniendo una temperatura aproximada de 25 °C. El músculo *gastrocnemio* completo fue extraído junto con ambos extremos tendinosos, uno de los cuales se sujetó a la base del baño con un gancho de platino y el otro fue amarrado al transductor isotónico (Figura 5.4). La tensión inicial se fijó en 1 g y se utilizó un baño para tejidos aislados de 10 mL con solución Tyrode. Se realizó un burbujeo constante con solución gaseosa 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> y la temperatura se fijó a 29 °C.

La estimulación directa e indirecta se realizó utilizando los mismos electrodos y con el mismo acomodo que en la preparación murina. Las condiciones de estimulación utilizadas se detallan en la [Tabla V.II](#).

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

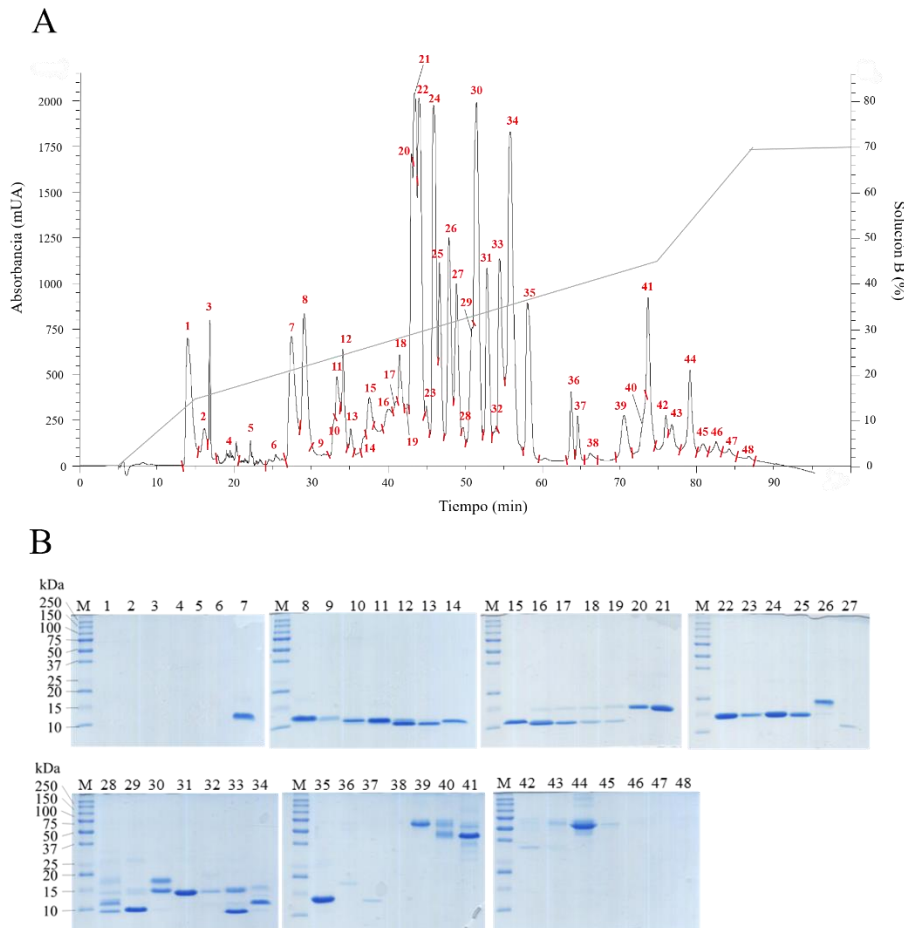
## Sección 6



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Proteómica del veneno de *M. b. browni*

La caracterización proteómica se llevó a cabo con el fin de analizar la composición del veneno, identificar las familias proteicas a las que pertenecen sus componentes y obtener un panorama general de su abundancia. En el RP-HPLC se obtuvieron 48 fracciones, cada una de las cuales se divide en 1 a 4 bandas en los geles de SDS-PAGE. Esto muestra que el veneno de *M. b. browni* es uno de los venenos de coralillo más complejos estudiados hasta el momento (Figura 6.1) (Lomonte *et al.*, 2016a). Es interesante observar que no existe una separación clara entre 3FTx y PLA<sub>2</sub>, ya que ambos grupos eluyeron en un rango amplio de tiempos de retención. Con el fin de obtener muestras suficientes para los análisis proteómicos se realizaron dos corridas con aproximadamente 1 mg de veneno, en la Figura 6.1 se muestra una corrida cuyos resultados son representativos de ambas.

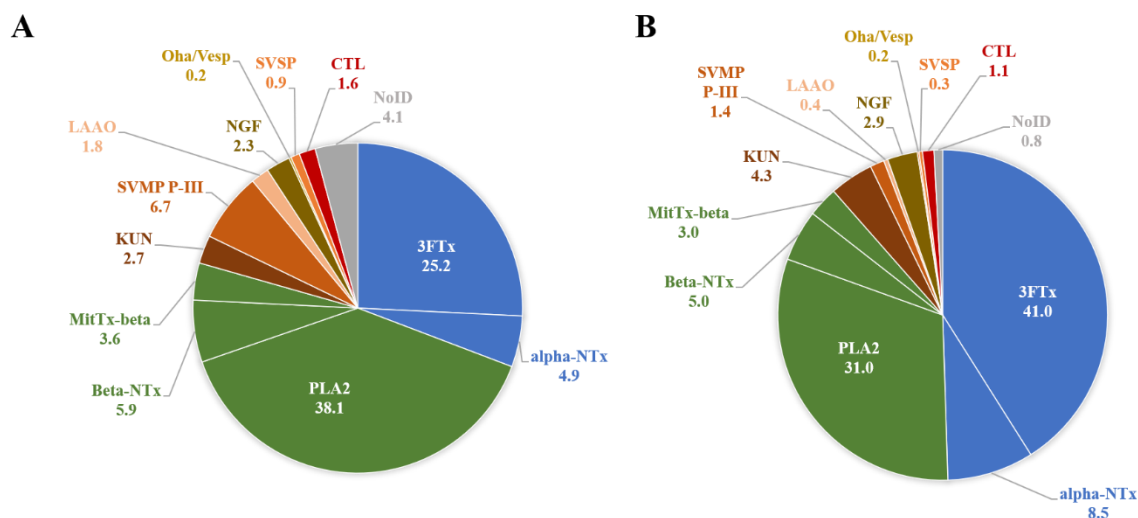


**Figura 6.1. Fraccionamiento del veneno de *M. b. browni*.**

**A.** RP – HPLC. Columna C<sub>18</sub> analítica (250 x 4.6 mm, 5 μm). 1.2 mg de veneno de *M. b. browni* (Pool de 6 individuos). *mAU*. mili Unidades de absorbancia. **B.** SDS-PAGE 15% de fracciones en

condiciones reductoras (2-mercaptoetanol). 16  $\mu$ L de fracción cargados por carril. *kDa*. kilo Dáltones. *M*. Marcadores de peso molecular.

En el Anexo I se muestran los resultados del análisis proteómico. El porcentaje total representado por cada fracción fue obtenido a partir de la integración del cromatograma obtenido durante el RP-HPLC. Posteriormente, los SDS-PAGE de las fracciones fueron procesados utilizando el software ImajeJ para obtener el porcentaje representado por cada banda. Estos porcentajes por fracción fueron sumados para cada familia proteica para obtener la abundancia relativa de cada familia en el veneno total de *M. browni* (Figura 6.2A). Finalmente, estos porcentajes fueron corregidos tomando en cuenta el peso molecular promedio de cada familia proteica con el fin de obtener una gráfica de abundancia relativa que considerara el número de moléculas aproximado por familia proteica (Figura 6.2B).



**Figura 6.2. Abundancia relativa de las familias proteicas presentes en el veneno de *M. b. browni*.**

**A.** Porcentajes obtenidos a partir de RP-HPLC y SDS-PAGE. **B.** Porcentajes corregidos por número aproximado de moléculas por familia proteica. *3FTx*. Toxinas de tres dedos. *PLA<sub>2</sub>*. Fosfolipasas A<sub>2</sub>. *Beta-NTx*. *PLA<sub>2</sub>* con actividad de  $\beta$ NTx (identificada por efecto *in vivo*). *KUN*. Péptidos tipo Kunitz. *SVMP P-III*. Metaloproteasas tipo P-III. *LAAO*. L-aminoácido oxidasas. *NGF*. Factor de crecimiento nervioso. *Oha/Vesp*. Ohanina/Vesprina. *SVSP*. Serinoproteasas. *CTL*. Lectinas tipo C. *No ID*. No identificadas.

Los péptidos obtenidos fueron asignados a 35 proteínas distintas pertenecientes a la base de datos UniProt/SwissProt, lo cual permitió su asignación a 9 familias proteicas. Al igual que en otros venenos de coralillos estudiados hasta el momento (Aird *et al.*, 2017; Lomonte *et al.*, 2016a), las familias de mayor abundancia, con base en la integración del

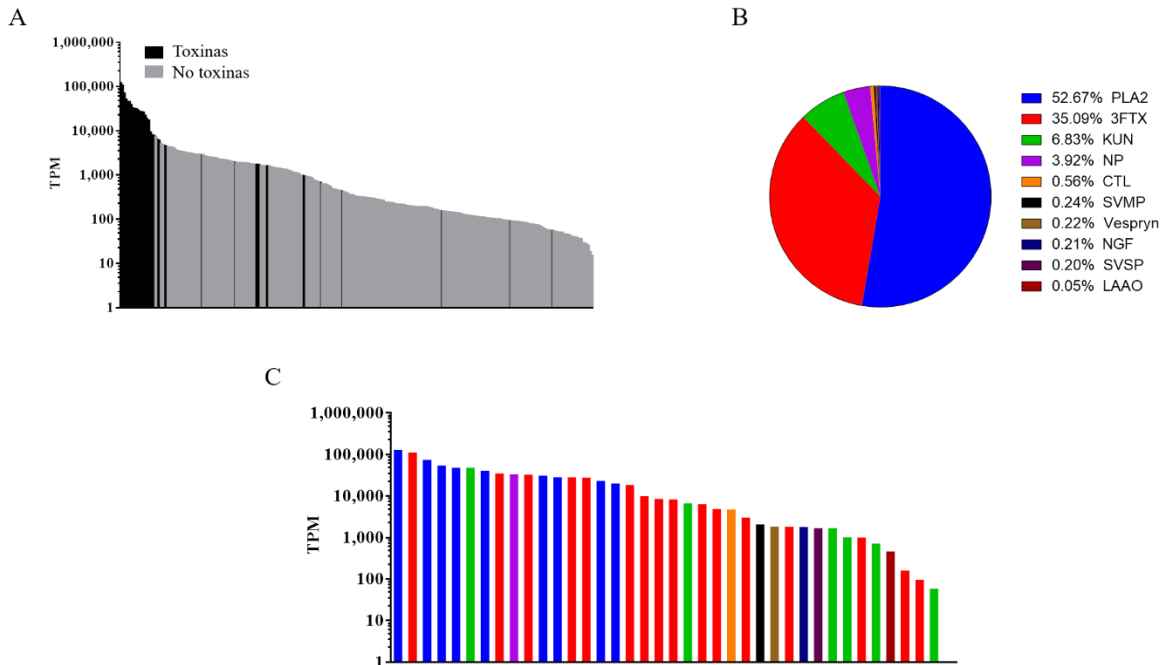


cromatograma de RP-HPLC a 214 nm, son las PLA<sub>2</sub> (46.6%) seguidas de las 3FTx (30.1%). De manera interesante, cuando se toma en cuenta el número de moléculas aproximado que está presente de cada familia proteica en el veneno total, las 3FTx (49.5%) resultan ser ligeramente más abundantes que las PLA<sub>2</sub> (47.6%). Este análisis proteómico permitió identificar también familias proteicas menos abundantes entre las que encontramos Metaloproteasas tipo PIII, Lectinas Tipo C, L-aminoácido oxidasas, péptidos inhibidores de proteasa tipo Kunitz y algunas proteínas poco abundantes que presentaron similitud con toxinas de familias proteicas menos estudiadas como la Taicobrina de *Naja kouthia* (Figura 6.2 y Anexo I).

Este reporte constituye un aumento significativo en el conocimiento de los venenos de coralillos mexicanos. En términos de composición, el veneno de *M. b. browni* es similar al reportado para *M. tener*, pues tiene abundancia de PLA<sub>2</sub>, seguidas de 3FTx. Los dos venenos pueden considerarse predominantes en PLA<sub>2</sub>, lo cual concuerda con el patrón dicotómico sugerido previamente (Fernández *et al.*, 2011). Sin embargo, es importante recalcar en ambos la presencia de muchas 3FTx, algunas de las cuales poseen alta letalidad en mamíferos o generan parálisis flácida en serpientes (Bénard-Valle *et al.*, 2014).

## 6.2 Transcriptómica de las glándulas de veneno de *M. b. browni*

El transcriptoma se realizó con el fin de obtener información sobre los transcritos presentes en las glándulas de veneno de *M. b. browni* y las familias proteicas a los que estos pertenecen. Además, permitió la obtención de secuencias completas de muchas de las proteínas identificadas en el veneno. A partir de las glándulas de veneno de un ejemplar adulto de la especie *M. b. browni* se obtuvieron un total de 28,572,384 lecturas. El ensamblaje *de novo* de estas secuencias generó 272 transcritos únicos que fueron anotados mediante BLAST utilizando bases de datos locales, así como las de SwissProt/UniProt. De estos transcritos, 39 fueron identificados como toxinas siendo las más abundantes, en términos de transcritos por millón de lecturas (TPMs), los pertenecientes a la familia de las PLA<sub>2</sub> (52.7%) y las 3FTx (35.1%) (Figura 6.3B). Se identificaron, además, transcritos de ocho familias proteicas de menor abundancia entre las que destacan péptidos inhibidores de proteasa tipo Kunitz (KUN), péptidos natriuréticos (NP) y lectinas tipo C (CTL). En términos de diversidad, también son predominantes los transcritos de las PLA<sub>2</sub> y las 3FTx (9 y 16 respectivamente; Figura 6.3C). Es importante notar que la expresión de los transcritos en la glándula de veneno está dominada por transcritos de toxinas (79.4%; Figura 6.3A), lo cual era de esperarse y se ha observado en otros transcriptomas de glándulas de *Micrurus* (Corrêa-Netto *et al.*, 2011; Leão *et al.*, 2009).



**Figura 6.3. Análisis transcriptómico de las glándulas de veneno de *M. b. browni*.**

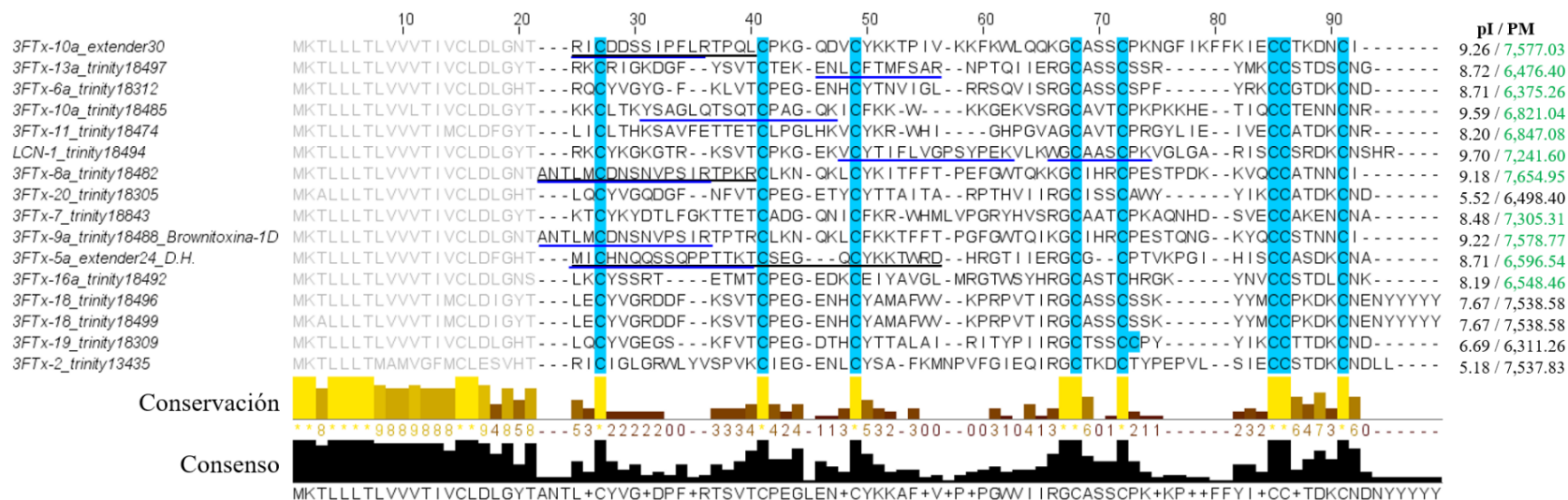
**A.** Abundancia de transcritos en la glándula de *M. b. browni*. TPM. Transcritos por millón de lecturas. **B.** Abundancia relativa de transcritos por familia proteica **C.** Abundancia de transcritos identificados como toxinas por familia proteica. PLA<sub>2</sub>. Fosfolipasas A<sub>2</sub>. 3FTx. Toxinas de tres dedos. NP. Péptidos natriuréticos. KUN. Péptidos tipo Kunitz. CTL. Lectinas tipo C. SVMP. Metaloproteasas. NGF. Factor de crecimiento nervioso SVSP. Serinoproteasas. LAAO. L-aminoácido oxidasas.

En términos de las familias proteicas identificadas, el transcriptoma obtenido es similar al que se ha descrito para las glándulas venenosas de coralillos Norteamericanos como *M. fulvius* (Margres *et al.*, 2013) y sudamericanos como *M. altirrostris* y *M. corallinus* (Aird *et al.*, 2017; Corrêa-Netto *et al.*, 2011). Sin embargo, en los coralillos sudamericanos predominan los transcritos que codifican para 3FTx sobre los de PLA<sub>2</sub>. En estas especies se encontraron también, con menor abundancia, transcritos que codificaban para KUN, LAAO, SVMP, CTL y NGF, entre otros. Es importante mencionar que el presente transcriptoma se realizó utilizando las glándulas de un solo individuo, por lo que es muy probable que no contenga todas las variantes posibles de las toxinas presentes en el veneno de esta especie. Además, no es posible hacer inferencias sobre variación intraespecífica, que podría existir en este veneno.

### 6.3. Correlación entre proteoma y transcriptoma.

Al comparar la información transcriptómica con la proteómica, encontramos que todas excepto una de las familias proteicas identificadas como transcritos, fueron también encontradas en el veneno como proteínas.

La información obtenida en el proteoma y transcriptoma, así como algunas secuencias de N-terminal realizadas por degradación de Edman, se utilizaron para identificar las secuencias completas de los componentes más abundantes en los venenos. El análisis comparativo de PMs teóricos y determinados puede consultarse en el Anexo II. En la [Figura 6.4](#) podemos observar las secuencias traducidas de los transcritos obtenidos para la familia de las 3FTx ordenados de mayor a menor abundancia (TPM), junto con sus puntos isoeléctricos y PM teóricos. De las 16 secuencias, 11 fueron identificadas en el veneno por tener un PM idéntico al teórico (mostradas en verde) y siete fueron identificadas además por identidad de secuencia con los péptidos del veneno.



**Figura 6.4. Transcritos pertenecientes a la familia de las 3FTx.**

pI/PM. Punto isoeléctrico y peso molecular teóricos, obtenidos a partir de la secuencia ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)). Los pesos moleculares identificados en el proteoma se muestran en verde (Anexo II). Se muestran subrayados los péptidos obtenidos mediante degradación de Edman (negro) o MS/MS (azul). El alineamiento se llevó a cabo utilizando el software Jalview v2.10.4.

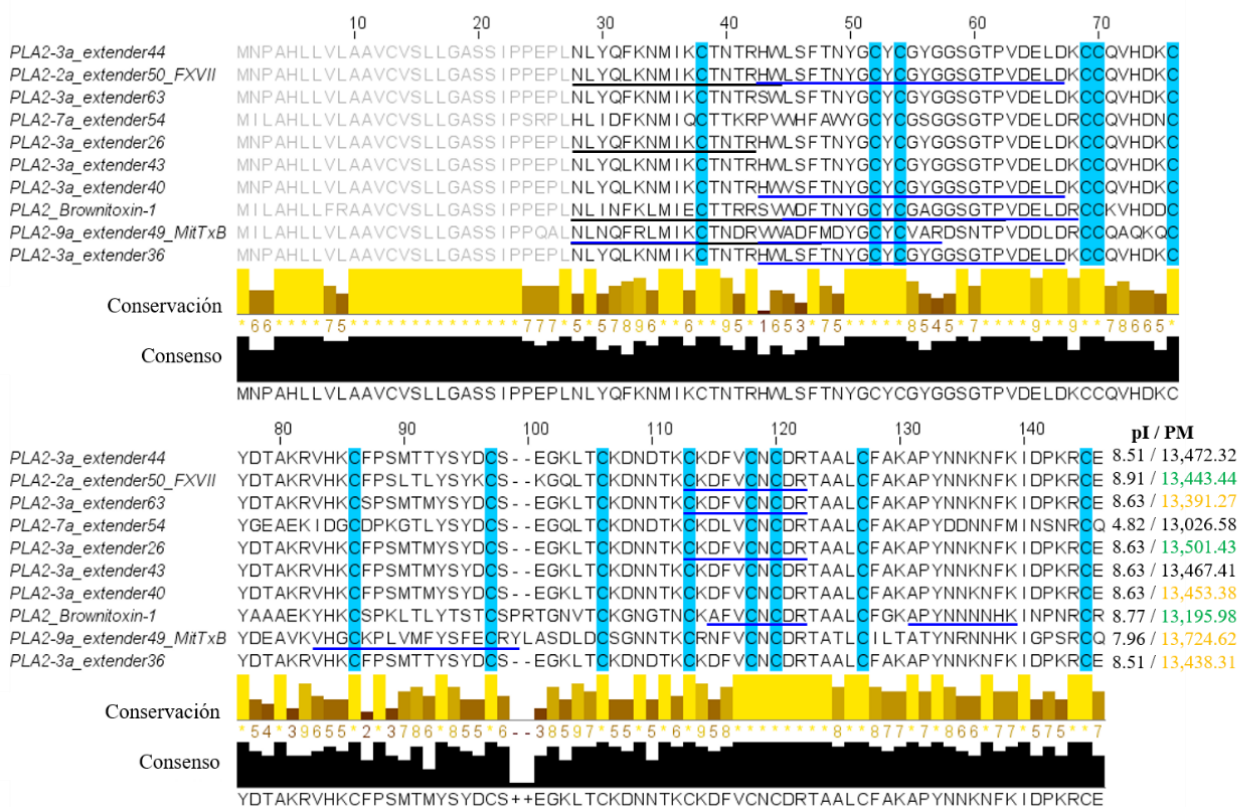
Con el fin de predecir la posible función de las 3FTx, se realizó un BLAST de las secuencias de transcritos que se cuya secuencia o peso molecular teórico fue identificado en el veneno (Tabla VI.I). De esta manera, se observó que existe una gran diversidad en esta familia, pues se encontraron transcritos pertenecientes a 6 subfamilias de 3FTx. Entre ellas, destacan las  $\alpha$ NTx de tipo I y II, cuyos representantes poseen actividad bloqueadora de nAChR y por lo tanto podrían participar en la letalidad del veneno de *M. b. browni*. Es importante mencionar que estas identificaciones son solamente teóricas y es necesario realizar experimentos para corroborar la actividad de cada una de estas secuencias, especialmente al observar que los porcentajes de identidad con las toxinas cuya función ha sido descrita, son relativamente bajos (Tabla VI.I).

**Tabla VI.I.** Identificación por similitud de transcritos presentes en el veneno

Transcrito	Proteína con mayor identidad (%ID)		Proteína con mayor identidad y función reportada			
	Toxina; especie; #acc (%ID)	Identificado en veneno	BLAST	%ID	Subfamilia	Notas
10a_extender30	B.G; <i>M. browni</i> ; AKO63245.1 (100%)	Secuencia y peso molecular	Clarkitoxin-I; <i>M. clarki</i> ; C0HK04.1	98%	Cadena corta	No tóxica para ratones
13a_Trynity181397	B.F; <i>M. browni</i> ; AKO63244.1 (99%)	Secuencia y peso molecular	Citotoxin 2; <i>N. annulifera</i> ; P01462.1	54%	Citotoxinas grupo 1A	Incrementa ritmo cardíaco, lisis de diversas células
6a_trinity18312	D.M; <i>M. diastema</i> ; AKN63200.1 (88%)	peso molecular	Long neurotoxin OH17; <i>O. hannah</i> ; Q53B54.1	41%	$\alpha$ NTxs de tipo II	Unión a nAChRs neuronales y musculares
10a_trinity18485	B.C; <i>M. browni</i> ; AKN63206.1 (100%)	Secuencia y peso molecular	Mipartoxin-IV; <i>M. mipartitus</i> ; A0A2P1BSS8.1	74%	$\alpha$ NTxs de tipo I	Bloqueo de nAChR musculares
11_trinity18474	B.A; <i>M. browni</i> ; AKN63204.1 (100%)	peso molecular	Muscarinic toxin Mtx6; <i>O. hannah</i> ; Q2VBN1.1	54%	Toxina aminérgica	Unión a receptor muscarínico de ACh (deducida)
LCN1_trinity_18494	D.J; <i>M. diastema</i> ; AKN63197.1 (100%)	Secuencia y peso molecular	a-Elapitoxin LS2A; <i>L. semifasciata</i> ; P01379.2	43%	$\alpha$ NTxs de tipo II	Unión a nAChRs neuronales y musculares
8a_trinity18482	T.D; <i>M. tener</i> ; AKO63251.1 (98%)	Secuencia y peso molecular	Clarkitoxin-I; <i>M. clarki</i> ; C0HK04.1	46%	$\alpha$ NTxs de tipo I	No tóxica para ratones
7_trinity18843	3FTx precursor; <i>M. altirrostris</i> ; AED89572.1 (77%)	peso molecular	MTLP2; <i>N. kouthia</i> ; P82463.1	65%	Muscarínicas tipo C	NO se une a receptores muscarínicos de ACh
9a_Brownitoxina-1D	D.N; <i>M. diastema</i> ; AKN63201.1 (90%)	Secuencia y peso molecular	dumertoxin-1; <i>M. dumerilii</i> ; C0HLK5.1	43%	Cadena corta	No tóxica para ratones
5a_extender24_D.H.	D.H; <i>M. diastema</i> ; AKM28630.1 (100%)	Secuencia y peso molecular	D.H; <i>M. diastema</i> ; AKM28630.1	100%	$\alpha$ NTxs de tipo I	Unión a nAChR muscular
16a_trinity18492	3FTx 3b; <i>M. fulvius</i> ; 4RUD_A; 78%	peso molecular	Mipartoxin 1A; <i>M. mipartitus</i> ; A0A2P1BST7.1	67%	Cadena corta	Bloqueo de nAChR

BLAST. Protein BLAST, taxId: Elapidae. %ID: Porcentaje de identidad. # acc. Número de identificación UniProt.

Posteriormente, en la **Figura 6.5** se presentan las secuencias traducidas de los transcritos obtenidos para la familia de las PLA<sub>2</sub>, también ordenadas según su abundancia en el transcriptoma. De los diez transcritos encontrados, sólo tres pudieron ser identificados con seguridad en el veneno. Éstos corresponden a las dos PLA<sub>2</sub> letales (Brownitoxina1B y FXVII) y a la subunidad β del complejo MitTx (MitTxβ). La falta de certeza en la identificación del resto de las PLA<sub>2</sub> se debe a la baja cobertura obtenida para los fragmentos de secuencia del análisis proteómico, aunada a altos porcentajes de identidad entre los transcritos (**Figura 6.5**).



**Figura 6.5. Transcritos pertenecientes a la familia de las PLA<sub>2</sub>. pI/PM.**

*pI/PM*. Punto isoeléctrico y peso molecular teóricos, obtenidos a partir de la secuencia ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)). Los pesos moleculares identificados en el proteoma se muestran en verde o amarillo (Anexo II). Se muestran subrayados los péptidos obtenidos mediante degradación de Edman (negro) o MS/MS (azul). El alineamiento se llevó a cabo utilizando el software Jalview v2.10.4.

## 6.4. Evaluación de letalidad y neurotoxicidad

### 6.4.1. Modelo murino (*Mus musculus*)

El análisis de la neurotoxicidad y letalidad del veneno es la primera parte del análisis funcional. Éste proporcionó información básica sobre la severidad del

envenenamiento en ratones, así como una base para estudiar los mecanismos de acción de las toxinas que conforman el veneno. La  $DL_{50}$ , determinada en ratones de la cepa CD1 entre 18 y 20 gramos de peso corporal por vía *i.v.* fue de 3.2  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  ( $IC_{95} = 3.1$  a 3.3), lo cual equivale a 0.17  $\mu\text{g}/\text{g}$ . Al inocular el veneno por vía *i.p.*, se obtuvo una  $DL_{50}$  de 8.8  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  ( $IC_{95} = 8.6$  a 8.9), que equivalen a 0.46  $\mu\text{g}/\text{g}$ . Lo anterior muestra que es un veneno con alta potencia letal para mamíferos, incluso comparado con el de otros coralillos norteamericanos (Tabla III.I).

El principal signo observado durante estos experimentos fue parálisis flácida y la causa de muerte fue una evidente insuficiencia respiratoria, lo cual indica que algunas de las PLA<sub>2</sub> y/o 3FTx identificadas en el veneno actúan como neurotoxinas presinápticas y/o postsinápticas respectivamente.

Al realizar la necropsia de los ratones envenenados con dosis letales de veneno completo, se observó que éstos presentaron pocos daños macroscópicos evidentes en órganos y tejidos. En todos los casos fue posible observar hemorragias en los pulmones, las cuales pueden ser atribuidas a daño generado por el esfuerzo durante la insuficiencia respiratoria. Por otro lado, se observó una coloración roja y en algunos casos petequias en los riñones. Esto último concuerda con lo observado por (De Roodt *et al.*, 2012), quienes reportaron daño renal generado por miotoxicidad en ratas envenenadas con *M. fulvius* y *M. nigrocinctus*. Recientemente, se analizó el veneno de *M. b. browni* sobre un modelo de riñón aislado, mostrando también un posible efecto nefrotóxico directo (Braga *et al.*, 2020).

#### 6.4.1.1. Neutralización de la actividad letal del veneno de *M. b. browni*

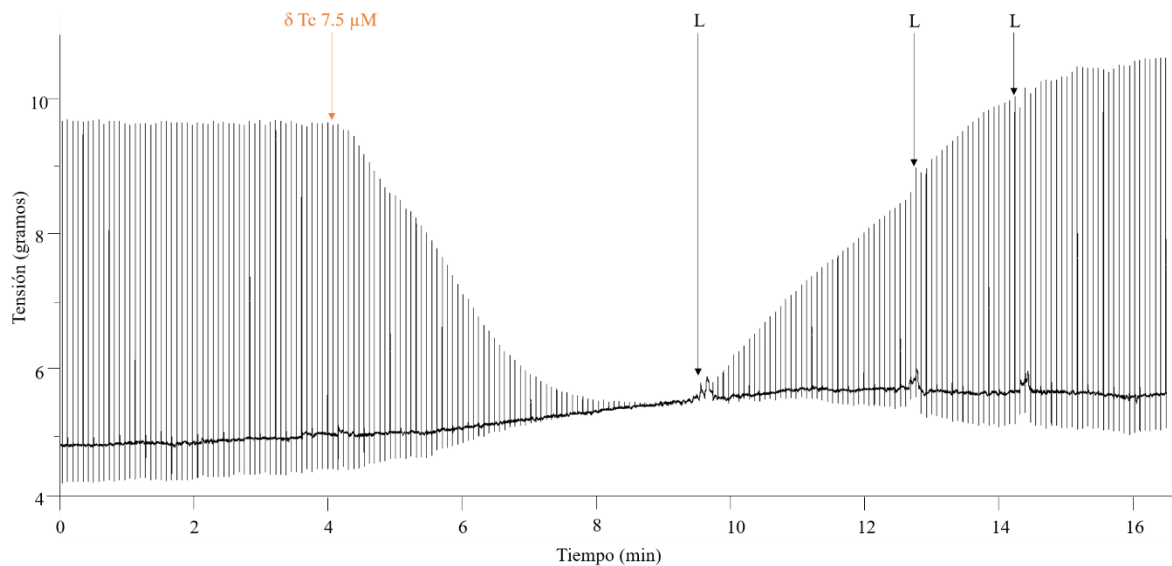
El antiveneno comercial Coralmyn<sup>®</sup> (# Lote: B-5H-16), generado mediante la hiperinmunización de caballos con los venenos de *M. nigrocinctus*, *M. laticollaris* y *M. tener*, fue muy eficaz para neutralizar la actividad letal del veneno completo de *M. b. browni*. Se obtuvo una  $DE_{50}$  de 4.2  $\mu\text{L}$  de antiveneno al preincubar con 3  $DL_{50}$  de veneno ( $IC_{95} = 4.1$  a 4.4) y menos de 10  $\mu\text{L}$  al preincubar con 6  $DL_{50}$ s de veneno. Si consideramos una concentración de antiveneno determinada por absorbancia a 280 nm ( $E=1.4$ ) de 7.8 mg/mL, estos datos pueden expresarse como 3.4 mgAV/mgV (miligramos de antiveneno por miligramo de veneno) al preincubar con 3  $DL_{50}$ s y menos de 4.1 mgAV/mgV al preincubar con 6  $DL_{50}$ s.

Posteriormente, se observó que este mismo antiveneno es incapaz de neutralizar la actividad letal de la  $\alpha\text{NTx}$  D.H. identificada en el veneno de *M. b. browni* (Véase sección 6.6.1), incluso al preincubar con la máxima cantidad posible de antiveneno (450  $\mu\text{L}$ , equivalente a 417 mg de AV por miligramo de D.H.). Esta observación sugiere que, aunque D.H. posee alta potencia letal, su relevancia en el envenenamiento es baja.

#### 6.4.1.2. Preparación de nervio frénico – diafragma (NFD) de ratón

La estandarización de la preparación de nervio frénico hemidiafragma de ratón fue llevado a cabo con éxito. La verificación de la independencia entre la estimulación

indirecta (E.I; nervio) y la estimulación directa (E.D; músculo) se realizó agregando el bloqueador reversible de la unión neuromuscular, hidrocloreuro de  $\delta$ -tubocurarina ( $\delta$ Tc; 7.5  $\mu$ M) y observando que la respuesta a la E.I. sea completamente inhibida. Esta inhibición confirmó la ausencia de una estimulación del músculo a través de los electrodos unidos al tejido nervioso. Posteriormente, se realizaron lavados con solución Tyrode hasta recuperar la respuesta de contracción original (Figura 6.6). Finalmente, se permitió un segundo período de estabilización de aproximadamente 10 minutos antes de aplicar el veneno a probar.

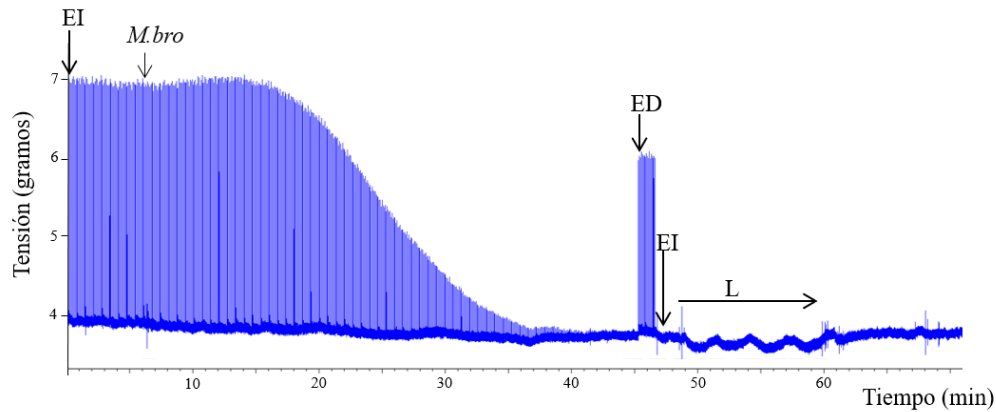


**Figura 6.6. Efecto de  $\delta$ -Tc 7.5  $\mu$ M sobre la contracción generada por estimulación indirecta en la preparación de NFD de ratón.**

L. Lavado.

En la Figura 6.7 se muestra la respuesta de la preparación neuromuscular al veneno de *M. b. browni* en una concentración final de 5  $\mu$ g/mL (0.5  $\mu$ M si se considera un peso molecular promedio de 10,000 Da). Es importante notar que existe un periodo de latencia de aproximadamente 13 minutos posterior a la aplicación del veneno y que la respuesta a la estimulación indirecta no se recupera al realizar múltiples lavados. Ambas observaciones sugieren un efecto mayormente presináptico. Nótese también que la respuesta a la estimulación directa se vio muy poco afectada, sugiriendo que no hay un efecto miotóxico relevante a tiempos cortos.

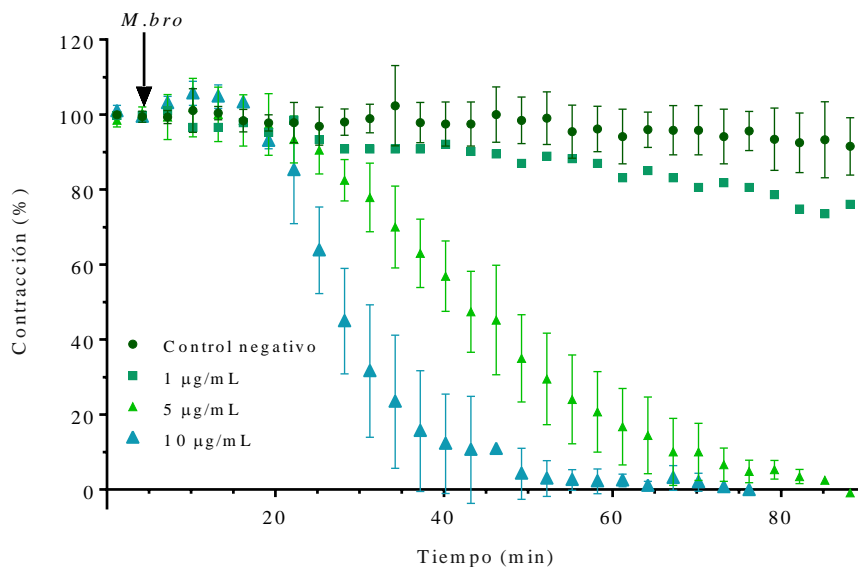




**Figura 6.7. Efecto del veneno completo de *M. browni* [5 µg/mL] sobre la contracción en preparación de NFD de ratón.**

*Mbro.* Veneno de *M. b. browni*. *EI.* Estimulación Indirecta. *ED.* Estimulación directa. *L.* Lavado

La normalización de los datos se llevó a cabo utilizando como 100% la fuerza de contracción promedio de 5 minutos previos a la adición de veneno. A partir de esos datos se obtuvo un valor de  $T_{90}$ , el cual se define como el tiempo que pasa desde la adición de una cantidad determinada de veneno y la inhibición del 90% de la fuerza de contracción (Figura 6.8). Los valores obtenidos fueron de 67.4 y 38.8 min utilizando concentraciones de 5 y 10 µg/mL, respectivamente. El tiempo de latencia con ambas dosis fue cercano a los 10 min.



**Figura 6.8. Efecto del veneno completo de *M. b. browni* sobre la contracción generada por estimulación indirecta en preparación de NFD de ratón.**

Datos normalizados. *M.bro.* Momento de adición del veneno. Las barras de error representan desviación estándar de tres experimentos. *Control negativo.* 200 µL de solución Tyrode.

### 6.4.2. Modelo reptil

El estudio de los efectos del veneno sobre presas naturales se realizó con el fin de observar las diferencias, de haberlas, con los modelos de mamífero normalmente estudiados. Lo anterior permite hacer inferencias sobre el papel biológico de los venenos de coralillos. Aunque no fue posible determinar una  $DL_{50}$  precisa del veneno de *M. b. browni* en las serpientes *Conopsis sp.*, se observó que ésta se encuentra entre 5 y 6  $\mu\text{g/g}$  por vía intraperitoneal, lo cual representa alrededor de 10 veces menor potencia letal que en ratones. Sin embargo, también se observó que el veneno ocasiona a las serpientes debilidad en la zona de la inyección con dosis a partir de 1  $\mu\text{g/g}$ . La descripción detallada de los signos de envenenamiento en ambos modelos animales fue materia de la tesis de licenciatura del estudiante Manuel Yañez Mendoza (Yañez Mendoza, 2019). Brevemente, los signos de envenenamiento observados consistieron en una debilidad muscular progresiva, desarrollándose en parálisis flácida con dosis altas. Se asume que la muerte ocurre debido a insuficiencia respiratoria. El veneno del coralillo Sudamericano *M. ibiboboca*, el cual ha sido reportado ser cinco veces más letal para el colúbrido *Lyophis typhlus* que para ratones (da Silva Jr. y Aird, 2001), fue probado en este modelo con el fin de comparar los resultados obtenidos. De manera interesante, este veneno no generó ningún efecto observable al ser inyectado por vía intraperitoneal a un grupo de 3 *Conopsis sp.* (Dosis máxima 8  $\mu\text{g/g}$ ). Este resultado sugiere que existen diferencias en susceptibilidad entre colúbridos de diferentes géneros y especies. En coralillos, este efecto ha sido reportado para el veneno de *M. nigrocinctus*, el cual tiene mayor potencia letal en colúbridos del género *Geophis* que en aquellos del género *Ninia*, los cuales parecen ser extremadamente resistentes (Urdaneta et al., 2004). En ese trabajo, se reportó que el modelo murino era el más susceptible al veneno de *M. nigrocinctus*, similar a lo que se observó para *M. b. browni* y previamente para *M. tener* (Bénard-Valle et al., 2014).

Estos resultados descartan la hipótesis original en la que se proponía una mayor letalidad del veneno completo de *M. b. browni* para serpientes del género *Conopsis*. Sin embargo, también muestran una clara diferencia en el efecto del veneno en ambos modelos de estudio, la cual fue observada también en el veneno de *M. tener* (Bénard-Valle et al., 2014). El veneno de este último también posee una  $DL_{50}$  más alta en ratones que en *Conopsis sp.* pero genera parálisis flácida en ambos modelos a dosis similares. Es posible, por tanto, que estas diferencias se deban a la baja tasa metabólica de las serpientes (Nagy, 2005), quienes, contrario a los ratones, son capaces de sobrevivir durante períodos largos de tiempo con muy poca oxigenación. Por otro lado, es posible que las serpientes de la especie *Conopsis sp.* posean una resistencia de carácter más específico hacia el veneno de *M. browni*. Por todo lo anterior, es relevante realizar este análisis con otras especies de colúbridos, así como generar más información sobre las especies que conforman la dieta de *M. b. browni*.

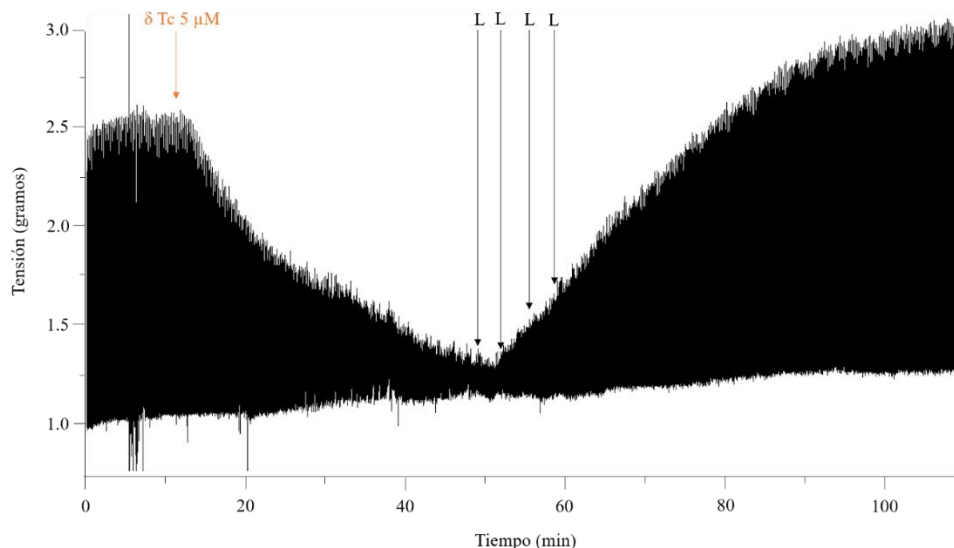
#### 6.4.2.1. Preparación de nervio tibial – gastrocnemio (NTG) de lagartija (*Sceloporus undulatus*)

Con el fin de estudiar una posible especificidad del veneno de *M. browni* y sus neurotoxinas por el tejido neuromuscular de sus presas naturales, se decidió montar una preparación neuromuscular utilizando el nervio tibial y el músculo *gastrocnemio* de lagartijas de la especie *S. undulatus*. Debido a que las lagartijas son animales ectotermos, y basados en preparaciones de tejidos aislados de otros reptiles (Liu y Xu (Ke Hsu), 1990), se decidió montar el tejido a 29 °C utilizando una tensión inicial de 1 g. Estos experimentos fueron realizados sólo una vez cada uno, dada la baja disponibilidad de lagartijas de la especie *S. undulatus*.

##### 6.4.2.1.1. Estandarización y análisis de toxinas de referencia

Dado que este tipo de preparaciones neuromusculares, no se habían hecho previamente, fue necesario analizar toxinas con mecanismos de acción y especificidad conocidas para estandarizar las técnicas a usar y evaluar las diferencias y similitudes con la preparación murina. Debido a la baja disponibilidad de individuos de *Sceloporus undulatus*, no fue posible realizar repeticiones de las toxinas de referencia, excepto para el caso de  $\delta$ -tubocurarina. Esta última, al ser rápidamente reversible, puede ser probada en un tejido y posteriormente reutilizarlo para posteriores experimentos.

La verificación de la independencia de la E.I. (nervio) de la E.D. (músculo) se llevó a cabo de la misma manera que la preparación NFD, utilizando hidrocloreuro de  $\delta$ -tubocurarina a una concentración final de 5  $\mu$ M (Figura 6.9).

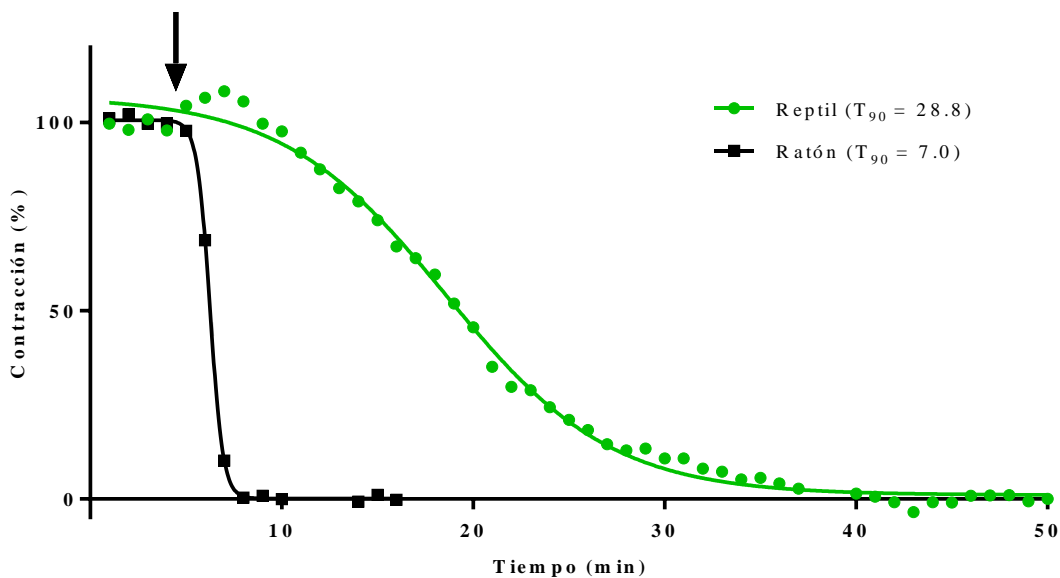


**Figura 6.9.** Efecto de  $\delta$ -Tubocurarina ( $\delta$ -Tc) 5  $\mu$ M sobre la contracción generada por estimulación indirecta en preparación de NTG de *S. undulatus*.

L. Lavado.

A continuación, se detallan las toxinas utilizadas como referencia y sus efectos sobre la preparación murina y de reptil:

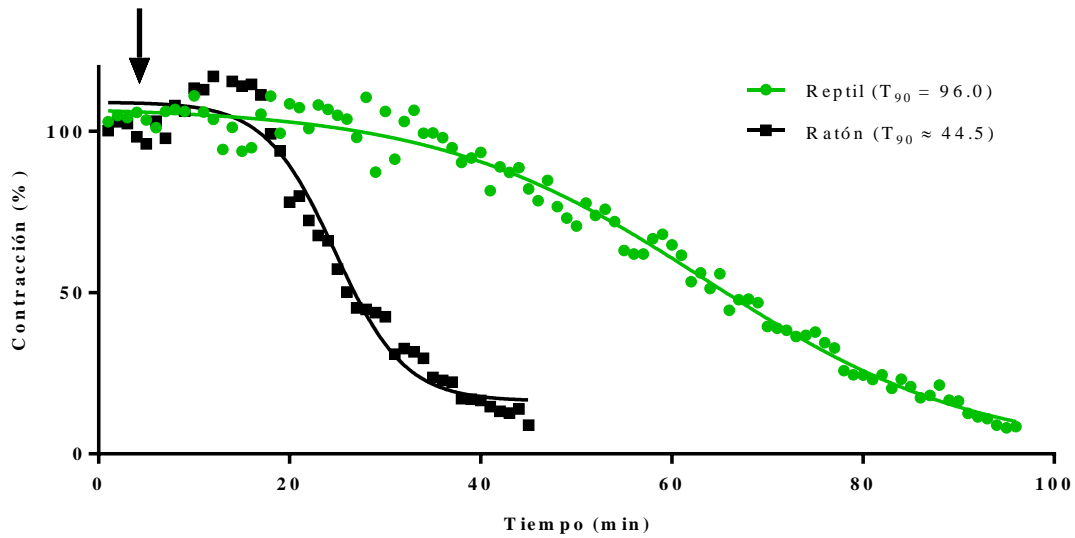
**A. Control de bloqueo reversible:  $\delta$ -tubocurarina 5  $\mu\text{M}$ .** Es un antagonista reversible del nAChR muscular. No se ha descrito que posea una especificidad por algún grupo taxonómico, sin embargo, todas las descripciones realizadas de su mecanismo de acción están basadas en mamíferos. El efecto de  $\delta$ -Tc sobre ambas preparaciones es marcadamente distinto, a saber, el tejido de ratón muestra el efecto bloqueador mucho más rápido. Esto se observa claramente al comparar los valores de  $T_{90}$  (Figura 6.10).



**Figura 6.10. Comparación del efecto de  $\delta$ -Tc 5  $\mu\text{M}$  sobre la contracción generada por estimulación indirecta en ambas preparaciones neuromusculares analizadas.**

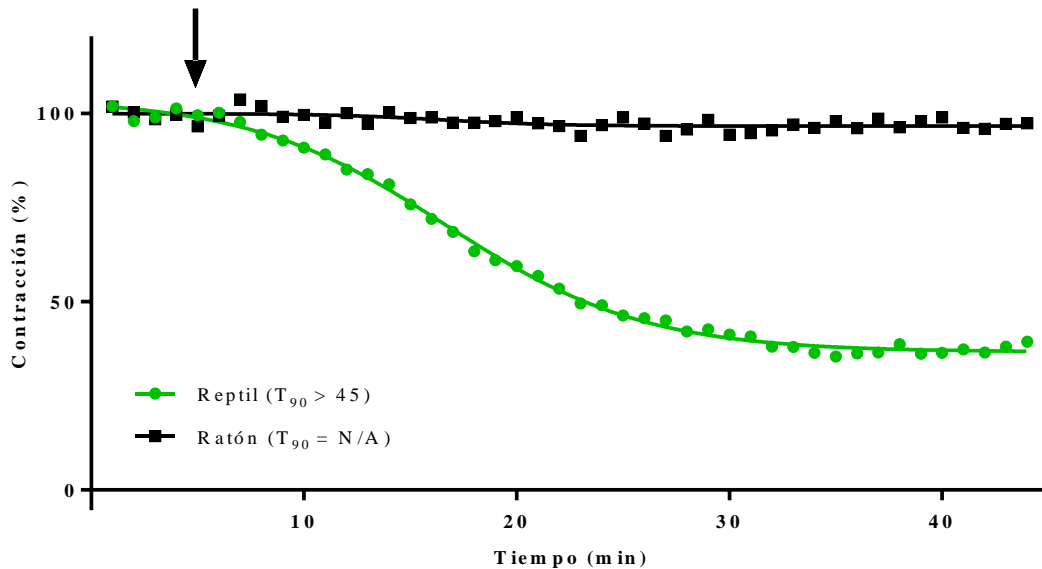
Datos normalizados. La flecha negra muestra el momento de la adición de la toxina. Valores de  $T_{90}$  expresados en minutos.

**B. Toxina no específica: Concolortoxina 5  $\mu\text{g/mL}$  (0.2  $\mu\text{M}$ ).** Es una  $\beta\text{NTx}$  tipo crotolina proveniente del veneno de *Crotalus oreganus concolor*. No posee especificidad por taxón en modelos *in vivo*, pues se ha descrito que su letalidad es muy similar en reptiles y ratones. En ambos modelos fue posible observar el período de latencia característico de una actividad  $\beta$ -neurotóxica (Figura 5.11). Dado que esta toxina no posee especificidad por tejido, el cambio observado en la  $T_{90}$  en ambas preparaciones puede ser atribuido a dos factores: 1.) La diferencia de temperatura a la que se llevan a cabo las preparaciones y 2.) Las diferencias metabólicas entre el tejido de reptil y el de mamífero. Estas diferencias serían por lo tanto esperadas al analizar cualquier componente que actúe en la unión neuromuscular, independientemente de su especificidad.



**Figura 6.11. Comparación del efecto de concolortoxina 5 µg/mL (0.2 µM) sobre la contracción generada por estimulación indirecta en ambas preparaciones neuromusculares.** Datos normalizados. La flecha negra muestra el momento de la adición de la toxina. Valores de  $T_{90}$  expresados en minutos.

**C. Toxina específica hacia aves/reptiles: Irditoxina 40 µg/mL (2.3 µM).** Es una  $\alpha$ NTx dimérica proveniente del veneno de *Boiga irregularis*. Ha sido descrita como una toxina específica para aves y reptiles tanto *in vivo* como *ex vivo* (Pawlak *et al.*, 2009). Al comparar su efecto en ambas preparaciones, es evidente la especificidad de esta toxina por el tejido de *Sceloporus undulatus*, sin embargo, es necesario utilizar una concentración mayor para poder determinar una  $T_{90}$  confiable, pues con la concentración utilizada no se llegó al 90% de inhibición de la respuesta contráctil (Figura 6.12).

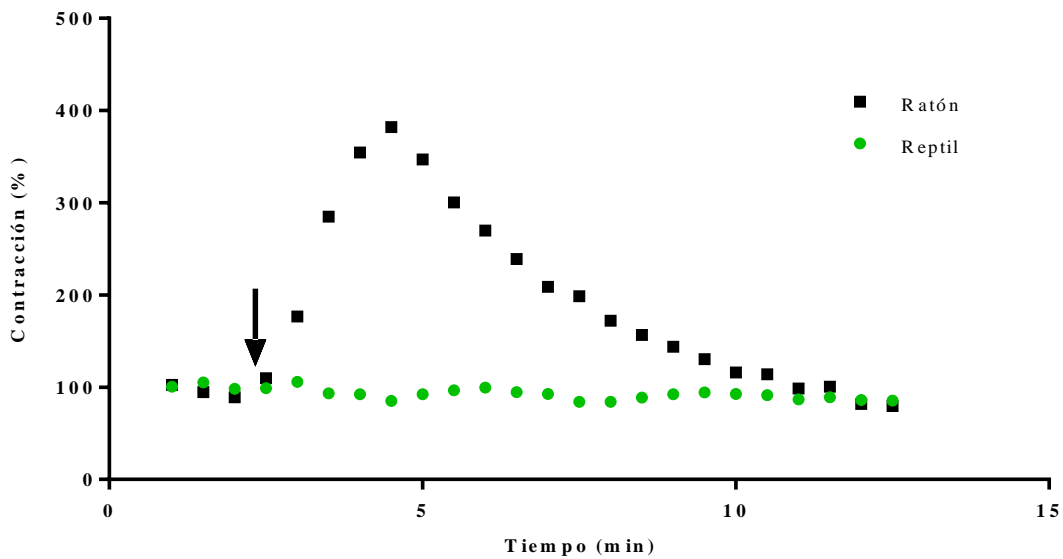


**Figura 6.12. Comparación del efecto de Irditoxina 40  $\mu\text{g/mL}$  (2.3  $\mu\text{M}$ ) sobre la contracción generada por estimulación indirecta en ambas preparaciones neuromusculares.**

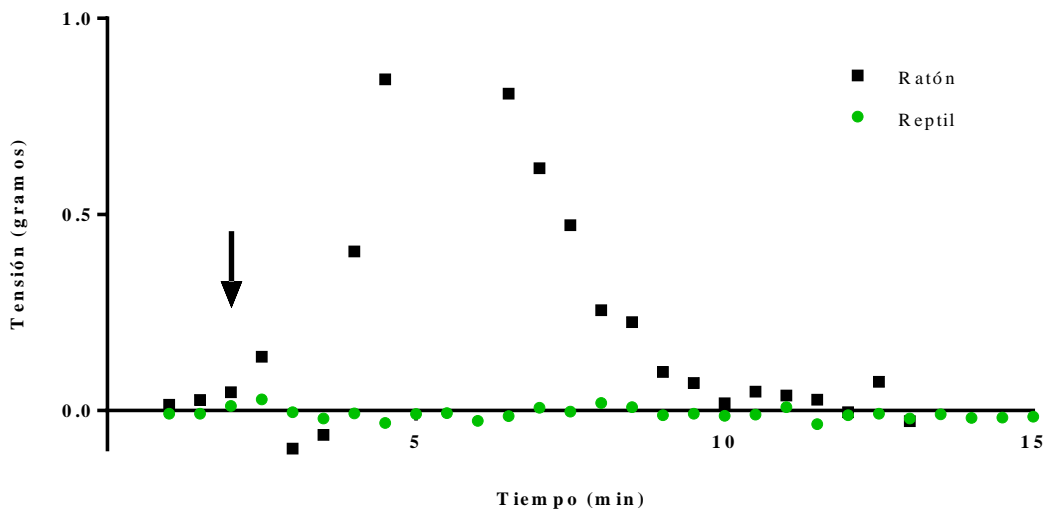
Datos normalizados. La flecha negra muestra el momento de la adición de la toxina. Valores de  $T_{90}$  expresados en minutos.

**D. Toxina específica hacia mamíferos: Miotoxina a 2.5  $\mu\text{g/mL}$  (0.6  $\mu\text{M}$ ).** A diferencia de las toxinas previamente mencionadas y de los venenos de coralillo, la Miotoxina a no es un bloqueador de la comunicación neuromuscular. En cambio, se piensa que actúa como antagonista de los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de Voltaje que se encuentran en la placa muscular. De esta manera, genera un aumento en la fuerza de contracción (Peigneur *et al.*, 2012).

En estudios *in vivo* se ha reportado que la Miotoxina a es específica para mamíferos, lo cual puede observarse también en el presente trabajo. La adición de Miotoxina a genera un incremento inmediato de la fuerza de contracción en la preparación NFD de ratón, mientras que no genera efecto alguno en la preparación NTG de lagartija (Figura 6.13). Además, fue posible observar un aumento en la tensión basal del músculo de ratón, el cual también está ausente en la preparación de reptil (Figura 6.14). Es importante notar que, en este caso siempre se estimuló el músculo de manera directa, sin embargo, dado el mecanismo de acción de esta toxina, el efecto debería poder observarse independientemente del tipo de estimulación.



**Figura 6.13.** Comparación del efecto de Miotoxina a 2.5 µg/mL (0.6 µM) sobre la contracción generada por *estimulación directa* en ambas preparaciones neuromusculares. Datos normalizados. La flecha negra muestra el momento de la adición de la toxina.



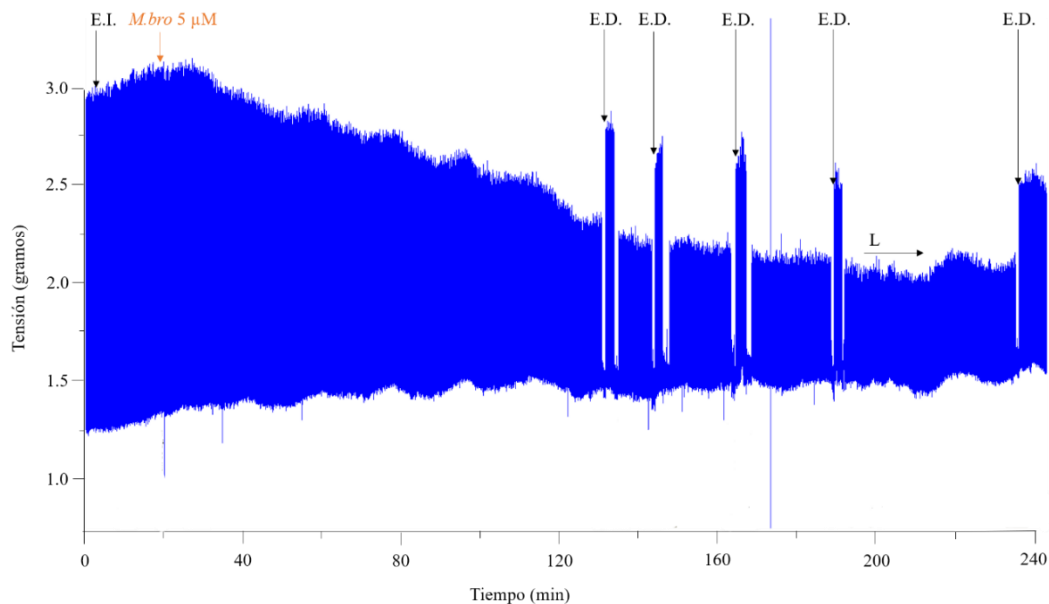
**Figura 6.14.** Comparación del efecto de Miotoxina a 2.5 µg/mL (0.6 µM) sobre la *tensión basal* de ambas preparaciones neuromusculares. Datos normalizados. La flecha negra muestra el momento de la adición de la toxina.

El análisis de los efectos de las toxinas anteriores sobre ambas preparaciones sugiere que la preparación de NTG de lagartija es un buen modelo para observar especificidad de toxinas que actúan sobre la comunicación neuromuscular, pues los

resultados coinciden con los reportes de toxicidad *in vivo*. Sin embargo, es importante notar que existe una gran cantidad de fuentes de variación que podrían afectar las conclusiones obtenidas. Entre los más importantes se encuentra la especie de lagartija utilizada, así como las diferencias entre las fibras musculares del músculo *gastrocnemio* y el diafragma.

#### 6.4.2.1.2. Veneno completo de *M. b. browni* (5 µg/mL)

El veneno completo de *M. browni* no genera una inhibición del 100% de la contracción muscular al ser probado en la preparación de NTG con la misma concentración que en la preparación de ratón (5 µg/mL; aprox. 0.5 µM) (Figuras 6.15 y 6.16). Esto puede deberse a la ausencia de efecto de la αNTx D.H., la cual contribuye al bloqueo neuromuscular en ratones, pero no parece tener ningún efecto en serpientes del género *Conopsis* (Tabla V.II).

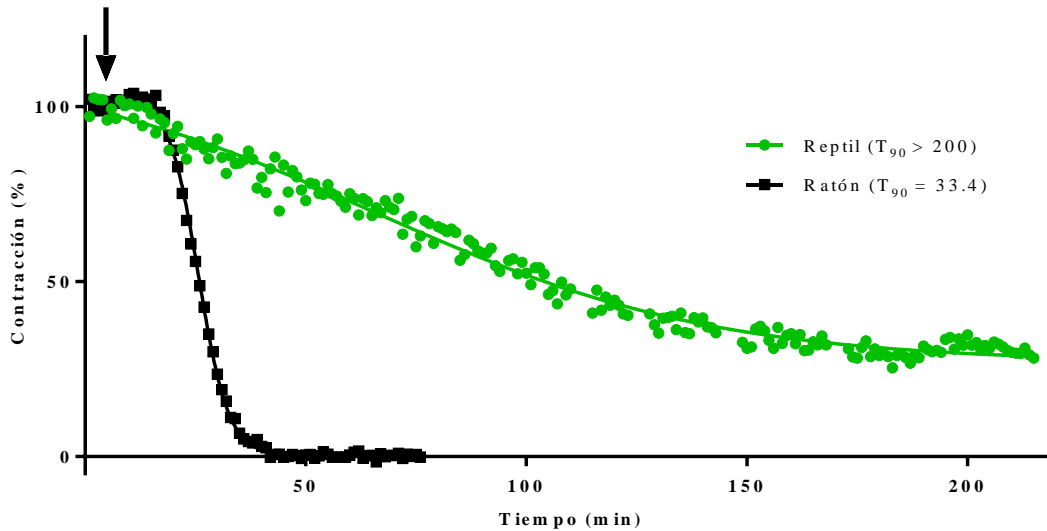


**Figura 6.15. Efecto del veneno completo de *M. b. browni* [5 µg/mL] sobre la contracción en preparación de NTG de lagartija.**

*Mbro.* Veneno de *M. b. browni*. *EI.* Estimulación Indirecta. *ED.* Estimulación directa. *L.* Lavado.

Esta observación coincide con lo que se vio *in vivo*, ya que al probar este mismo veneno en *Conopsis sp.*, éstas requieren de concentraciones altas (en comparación con los ratones) para mostrar un cuadro de parálisis flácida en todo el cuerpo (Tabla V.I). Una vez instaurada la parálisis, ésta no se revierte al realizar lavados. La estimulación directa es menos afectada que la indirecta, pero sí existe una disminución por lo que podría existir un efecto miotóxico sobre tejido de *S. undulatus*. Para comprobar este efecto sería necesario realizar el mismo experimento sobre el tejido curarizado.





**Figura 6.16. Comparación del efecto del veneno de *M. browni* 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sobre la contracción generada por estimulación indirecta en ambas preparaciones neuromusculares analizadas. Datos normalizados. La flecha negra muestra el momento de la adición de la toxina.**

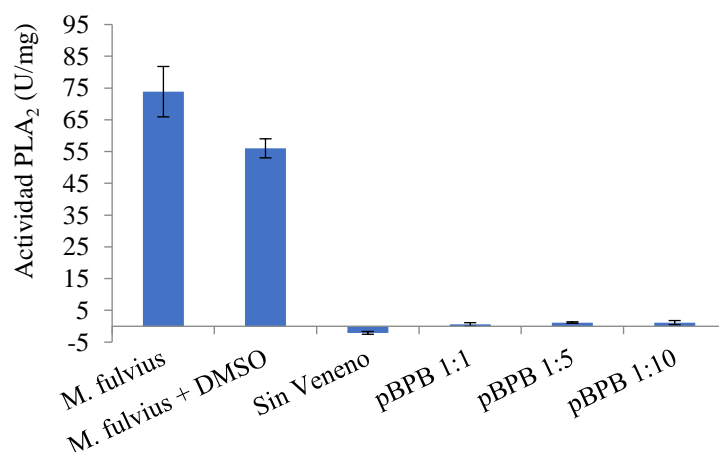
La preparación neuromuscular aquí utilizada permite identificar y caracterizar el efecto de diversos compuestos sobre la unión neuromuscular y el músculo esquelético de una lagartija. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que existen diferencias fisiológicas muy marcadas entre el tejido de mamífero y reptil. Además, la diferencia en temperatura entre ambas preparaciones puede tener un efecto en la actividad de las toxinas y venenos probados. Es necesario realizar triplicados de las toxinas aquí utilizadas, además de llevar a cabo una estandarización más detallada de la preparación de reptil para poder hacer observaciones cuantificables en esta preparación.

## 6.5. Caracterización bioquímica del veneno de *M. b. browni*

### 6.5.1. Inhibición de actividad PLA<sub>2</sub> con *p*BPB

Los ensayos previamente mostrados, en particular, la observación de un periodo de latencia antes del inicio de la parálisis muscular, sugieren una actividad principalmente presináptica del veneno de *M. b browni*. Sin embargo, estas preparaciones no permiten una distinción clara entre un bloqueo presináptico y uno postsináptico. Con este fin y dado que se ha descrito que la actividad PLA<sub>2</sub> es indispensable, aunque no suficiente, para la  $\beta$ -neurotoxicidad (Soares y Giglio, 2003), se decidió realizar un ensayo de inhibición de actividad PLA<sub>2</sub> con Bromuro de *para*Bromofenacil (*p*BPB). Éste permitió analizar la contribución de las  $\beta$ NTxs a la toxicidad del veneno total, sin necesidad de realizar fraccionamientos que pudieran modificar el funcionamiento del veneno como un todo.

Antes de realizar el ensayo utilizando el veneno de *M. browni*, se utilizó el veneno completo de *M. fulvius* ya que éste es el mejor ejemplo de  $\beta$ -neurotoxicidad en venenos de coralillos norteamericanos y no hay contribución de  $\alpha$ NTxs a su letalidad (Vergara *et al.*, 2014). En la Figura 6.17 se observa que fue posible inhibir completamente la actividad enzimática de este veneno utilizando una proporción molar de 1:1 de *p*BPB con respecto al veneno completo de *M. fulvius*, considerando un P.M. promedio de 14 000 Da. Como controles positivos, se utilizó el veneno completo de *M. fulvius* sin tratamiento (Figura 6.17; *M. fulvius*) y el veneno completo tratado con las mismas incubaciones y soluciones, pero en ausencia del inhibidor (Figura 6.17; *M. fulvius* + DMSO). La actividad PLA<sub>2</sub> no se recuperó aun cuando en todos los casos se añadió CaCl<sub>2</sub> a una concentración final de 4 mM, lo cual comprueba que la inhibición realizada no es debida a la falta del cofactor. La actividad PLA<sub>2</sub> fue medida utilizando el sustrato 4-NOBA.

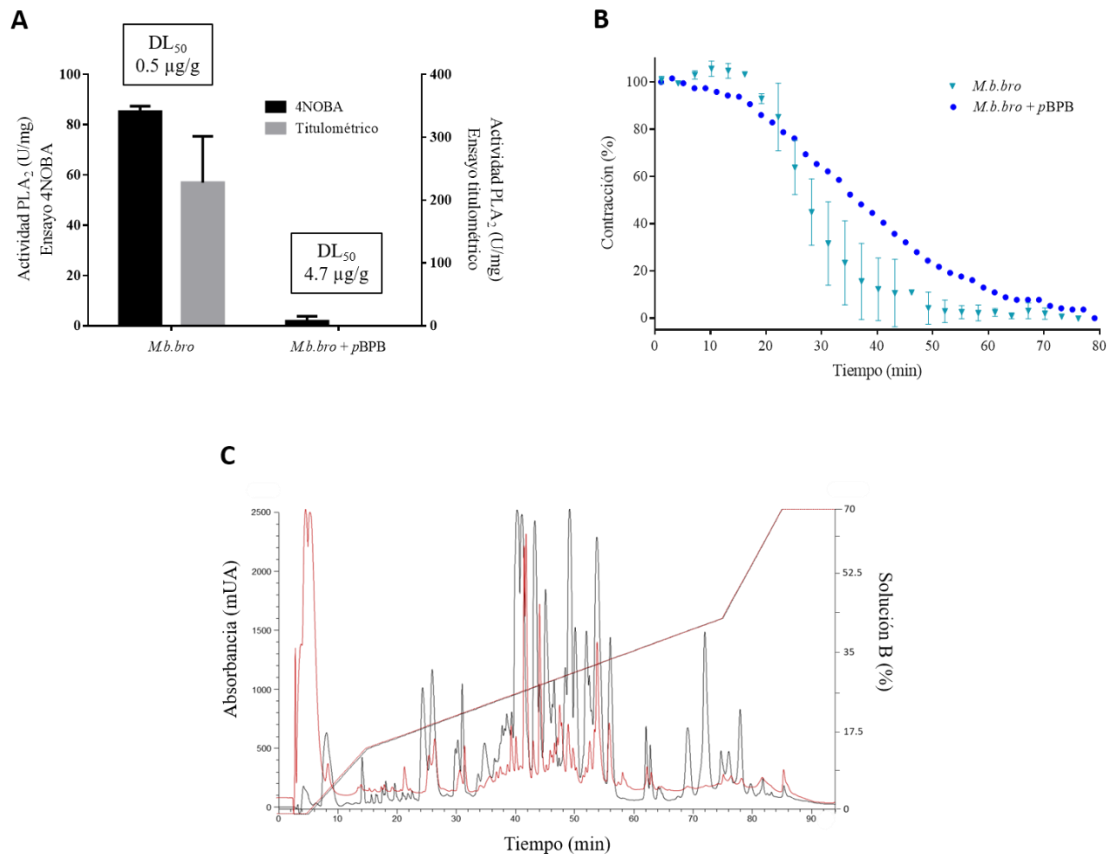


**Figura 6.17. Actividad PLA<sub>2</sub> sobre sustrato 4NOBA del veneno de *M. fulvius* y el veneno tratado con diferentes proporciones molares de *p*BPB.**

U= nano moles de producto liberado / minuto.

Finalmente, el veneno *M. fulvius* tratado con *p*BPB fue inyectado en ratones por vía *IV* y se observó que no ocasionaba ningún signo de envenenamiento con una dosis máxima de 5.3  $\mu\text{g/g}$ . Esto implica una disminución en su letalidad de al menos 16 veces, pues la  $\text{DL}_{50}$  *i.v.* del veneno no tratado es de 0.3  $\mu\text{g/g}$  comprobando que el efecto de este veneno es exclusivamente presináptico. Además, este experimento mostró que se requiere la actividad enzimática de  $\text{PLA}_2$  para que ejerzan su efecto letal.

Para el veneno de *M. b. browni*, se utilizó una proporción molar aproximada de 1:2 (veneno:*p*BPB), considerando que el veneno tiene un P.M. promedio de 10 kDa. En la **Figura 6.18A** se observa la determinación de actividad  $\text{PLA}_2$ , en donde se comprobó que ésta fue completamente inhibida. Posteriormente, se realizó un RP-HPLC (Columna  $\text{C}_{18}$ ) del veneno sometido y sin someter a tratamiento con *p*BPB (**Figura 6.18C**). De esta manera, se observó que el tiempo de retención de los componentes de tipo 3FTx (entre 20 y 40 min), cambian muy poco. Por otro lado, la mayor parte de las modificaciones de tiempos de retención se encuentran entre los 40 y 55 min, que es en donde encontramos a la mayor parte de las  $\text{PLA}_2$ , sin embargo, estas modificaciones no son muy drásticas.



**Figura 6.18. Inhibición de actividad  $\text{PLA}_2$  del veneno de *M. b. browni*.**

**A.** Determinación de actividad  $\text{PLA}_2$  con método colorimétrico (4NOBA) y titulométrico. Insertos. Dosis letales medias determinadas por vía *IP*. **B.** Comparación del efecto neuromuscular del veneno

tratado y sin tratar sobre preparación de NFD de ratón. C. RP-HPLC en columna C<sub>18</sub> del veneno de *Micrurus b. browni* tratado con pBPB (0.5 mg; rojo) y sin tratar (1 mg; negro). La línea roja con negro representa el gradiente de CH<sub>3</sub>CN + 0.1% TFA utilizado. *M.b.bro.* Veneno sin tratar. *M.b.bro* + pBPB. Veneno tratado con pBPB. *mUA*. Miliunidades de Absorbancia.

Se determinó la DL<sub>50</sub> del veneno tratado con pBPB y se obtuvo de 89.1 µg/ratón (IC<sub>95</sub> = 81.8 a 97.0) equivalente a 4.7 µg/g. Al compararla con la obtenida para el veneno completo se observó que tenía alrededor de 10 veces menos potencia letal (Figura 6.18A), lo cual implica que la contribución de las PLA<sub>2</sub> a la letalidad de este veneno es de aproximadamente un 90%. Además, esto nos dice que existe por lo menos un componente que no es una PLA<sub>2</sub> activa y que tiene un efecto en la letalidad total.

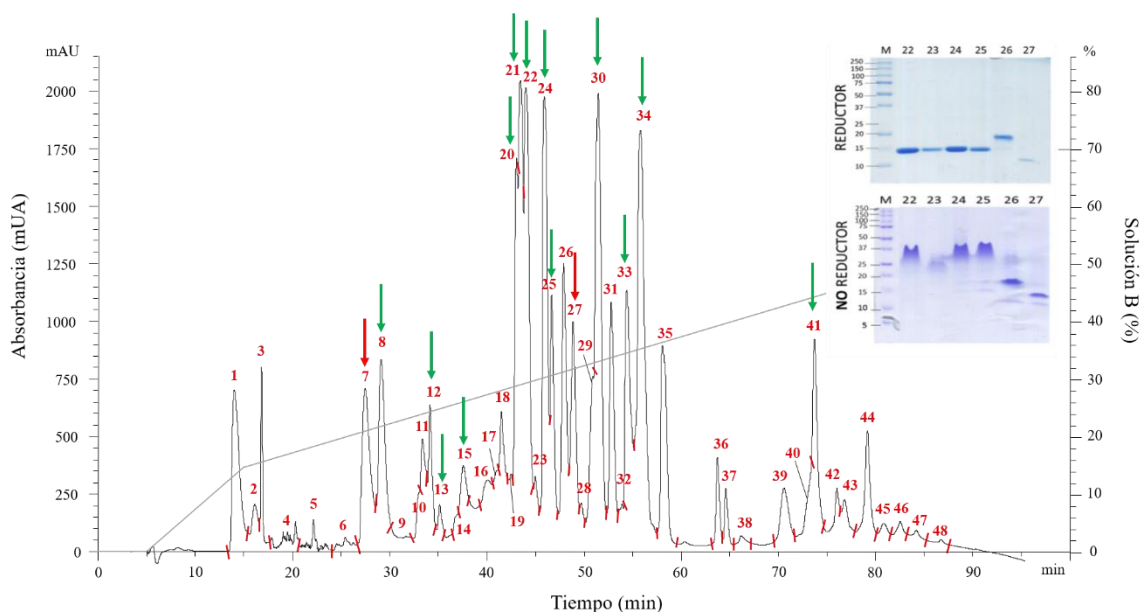
Con el fin de comprobar si este componente con menor participación era la alfa neurotoxina de cadena corta previamente observada en el proteoma, se procedió a analizar el peso molecular y letalidad de esta toxina (Figura 6.1, F7), tanto en el veneno tratado con pBPB como en el veneno sin tratar. Dado que el peso molecular de F7 en ambos casos es el mismo (6587.0 y 6588.3 Da respectivamente), puede concluirse que no fue modificado por el inhibidor. Además, se inyectaron 10 µg de la F7 presente en el veneno tratado en un ratón y éste murió en menos de 5 min, por lo que es seguro concluir que la neurotoxina mantiene una letalidad similar a la presente en el veneno no tratado. Esta neurotoxina representa alrededor de 5% del veneno completo, por lo que al inyectar una DL<sub>50</sub> del veneno tratado con pBPB, se están inyectando alrededor de 4.5 µg de ésta; una dosis muy cercana a su DL<sub>50</sub> (< 3 µg/ratón). Todo lo anterior es evidencia de que F7 es el principal componente letal no enzimático (PLA<sub>2</sub>) en el veneno de *M. b. browni*, aunque no necesariamente el único.

Es importante mencionar también que las fracciones de RP-HPLC que eluyen entre 70 y 80 min en el veneno de *M. b. browni*, no se observan en el RP-HPLC del veneno tratado con pBPB (Figura 6.18C). La desaparición de estas fracciones, que fueron identificadas como SVMP, puede deberse a una modificación de su estructura ocasionada por el pBPB o algún otro paso del proceso de inhibición de PLA<sub>2</sub>. Aunque éstas se encontraron en baja proporción en el veneno total, no es posible descartar que tengan alguna participación en la letalidad total del veneno.

Este tipo de ensayos se han realizado previamente con venenos de otros *Micrurus*. En 2015, Fernández y colaboradores sometieron los venenos de dos coralillos a un tratamiento con el mismo agente inhibidor utilizado en el presente trabajo. Ellos encontraron que el veneno de *M. alleni*, que es predominante en 3FTx, mostraba una disminución muy pequeña en la letalidad, mientras que el de *M. mosquitensis* disminuía su potencia letal aproximadamente 15 veces (Fernández *et al.*, 2015).

## 6.5.2. Fraccionamiento en condiciones no desnaturizantes

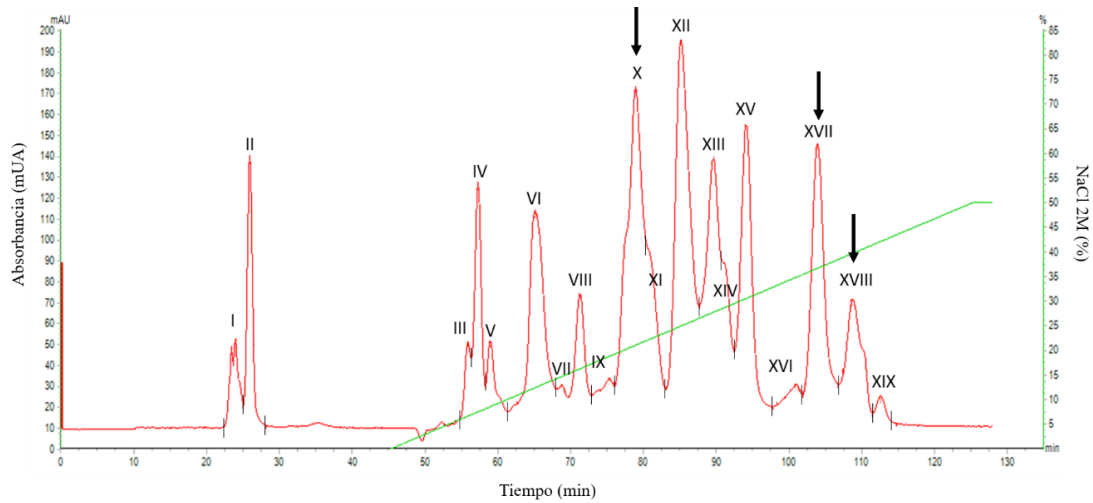
Durante el fraccionamiento y análisis de los componentes del veneno por RP-HPLC, se hicieron dos observaciones importantes desde el punto de vista funcional: Primero, al inyectar en ratones una dosis de 1  $\mu\text{g/g}$  de las fracciones obtenidas, sólo dos de ellas resultaron ser letales y, dada su poca abundancia dentro del veneno total, es muy poco probable que sean éstas por sí mismas las responsables de la alta letalidad del veneno de *M. b. browni*. Posteriormente, al realizar geles de SDS-PAGE de las fracciones en condiciones reductoras y no reductoras se observó evidencia de interacciones entre sus componentes (Figura 6.19). Debido a estas observaciones, las cuales sugieren la presencia de asociaciones o complejos entre las proteínas del veneno, se decidió realizar un fraccionamiento por cromatografía de intercambio catiónico. Éste se llevó a cabo en condiciones no desnaturizantes para mantener la mayor parte de las interacciones existentes.



**Figura 6.19. RP-HPLC en columna  $C_{18}$  analítica.**

Se señalan con flechas aquellas fracciones inyectadas en ratones (0.5  $\mu\text{g/g}$  por vía *i.v.*), en rojo las que resultaron letales y en verde las que no fueron letales. *mUA*. Miliunidades de Absorbancia. En el inserto se muestran geles de SDS-PAGE al 15% en donde se observa la posible presencia de interacciones covalentes entre los componentes del veneno.

Al fraccionar el veneno utilizando un intercambio catiónico fuerte, se generaron un total de 19 fracciones (Figura 6.20). Las fracciones III a XIX fueron dializadas con una membrana con tamaño de corte de 3 500 Da con el fin de remover las sales.

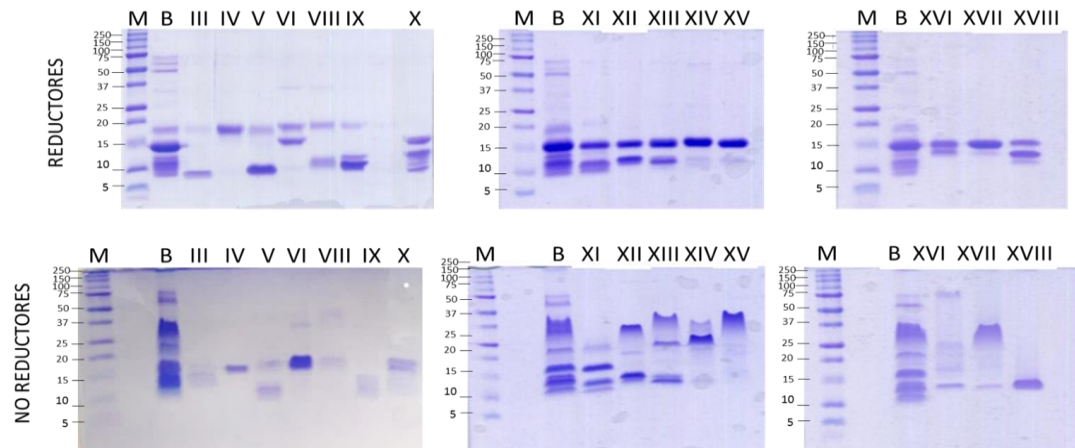


**Figura 5.20. Intercambio catiónico fuerte (FPLC).**

Columna equilibrada en amortiguador acetato de amonio 20 mM, pH 4.7. La elución se realizó con un gradiente de 0 a 1 M de NaCl en 80 minutos. Se utilizó una velocidad de flujo de 5 mL/min. 10.5 mg de veneno de *M. browni*. Las fracciones letales en ratones de la cepa (CD1 1 µg/g por vía *i.p.*) son señaladas con flechas. *mUA*. Miliunidades de Absorbancia.

### 6.5.3. Caracterización de fracciones de intercambio catiónico

Las fracciones obtenidas durante el intercambio catiónico fueron separadas en geles de SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (Figura 6.21). Esto sirvió como una identificación parcial de los componentes de cada fracción y proporcionó evidencia de las posibles interacciones entre ellos.



**Figura 6.21. SDS-PAGE 15% de fracciones de intercambio catiónico.**

*Reductores*. Muestras en presencia de 2-mercaptoetanol, hervidas 5 min. *No reductores*. Muestras sin 2-mercaptoetanol, hervidas 5 min. M. Marcadores de peso molecular. Números a la izquierda representan peso molecular de marcadores en kDa. B. veneno completo de *M. browni*. Se cargaron 5 µg de fracción por carril y 15 µg del veneno completo.

La separación electroforética de las fracciones mostró que, a partir de la fracción XI, existen muchas proteínas que migran con pesos moleculares aparentes mucho mayores en condiciones no reductoras que en condiciones reductoras. Esto sugiere la presencia de interacciones entre las moléculas de veneno cuya naturaleza es aparentemente covalente. Sin embargo, se han reportado migraciones anómalas en SDS-PAGE dadas por la estructura terciaria de la proteína. Ésta puede generar variaciones en términos de la interacción con el detergente SDS, modificando significativamente su migración en la matriz de poliacrilamida (Rath *et al.*, 2009). Al obtener los PM de las fracciones mediante ESI-MS, no se observó evidencia de ningún dímero o polímero covalente (Tabla VI.II). Algunas de las fracciones, fueron analizadas con más detalle (Véase sección 5.6).

**Tabla VI.II.** Caracterización de fracciones de intercambio catiónico

	% en el veneno	PLA <sub>2</sub> <sup>a</sup> U/mg ± DE	PM (ESI-MS) <sup>b</sup> Da	Efecto en <i>Conopsis sp.</i> (Dosis <i>i.p.</i> )	Letalidad en ratones CD1		
					DL <sub>50</sub> <i>i.p.</i> µg/g <sup>c</sup> (IC <sub>95</sub> )	Toxicity score <sup>d</sup>	% Cont <sup>e</sup>
<i>M. b. browni</i>	100	284.6 ± 28.2	-	DL <sub>50</sub> = 5 a 6 µg/g Parálisis flácida (desde 1 µg/g)	0.46 (0.46 a 0.47)	217.4	100
III	1.3	87.5 ± 2.4	6,490.7	<i>N.E.</i> (1.8 µg/g)	<i>N.L.</i>		
IV	4.2	1,974.0 ± 102.3	7,097.7	<i>N.E.</i> (1.8 µg/g)	<i>N.L.</i>		
V	2	244.5 ± 19.6	N.D.	N.D.	<i>N.L.</i>		
VI	8.4	272.6 ± 15.3	N.I.	<i>N.E.</i> (1.8 µg/g)	<i>N.L.</i>		
VII	0.9	0	6,595.3	N.D.	<i>N.L.</i>		
VIII	3.5	0	6,501.6	N.D.	<i>N.L.</i>		
IX	1.9	ND	6,423.8	<i>N.E.</i> (1.8 µg/g)	<i>N.L.</i>		
X	12	273.6 ± 7.1	6,605.8	<i>N.E.</i> (1.8 µg/g)	0.31 (0.29 a 0.31)	38.7	17.8
XI	6	0	6,574.7; 7,135.8	<i>N.E.</i> (1.8 µg/g)	<i>N.L.</i>		
XII	14.7	11.5 ± 0.4	7,571.4; 7,439.6	<i>N.E.</i> (1.8 µg/g)	<i>N.L.</i>		
XIII	8.3	11.2 ± 2.8	7,119.7; 6,562.8	<i>N.E.</i> (1.8 µg/g)	<i>N.L.</i>		
XIV	4.2	14.7 ± 0.4	7,120.4; 13,383.5	N.D.	<i>N.L.</i>		
XV	9.3	35.1 ± 4.4	13,503.1	N.D.	<i>N.L.</i>		
XVI	1.8	0	7,648.7; 7,760.0	N.D.	N.D.		
XVII	9.6	12.4 ± 0.9	13,432.4; 6,827.8	Parálisis flácida (1.4 µg/g)	0.36 (0.29 a 0.37)	26.7	12.3
XVIII	5.4	0	6,815.0; 13,178.2	Parálisis flácida (0.4 µg/g)	0.095 (0.09 a 0.1)	56.8	26.1
XIX	0.9	0	7,235.5	<i>N.E.</i> (1.8 µg/g)	<i>N.L.</i>		

a. Actividad fosfolipasa A<sub>2</sub>. U/mg ± DE. Unidades por miligramo ± Desviación estándar. N = 3.

b. Se muestran solamente las masas de mayor abundancia relativa.

c. Dosis letal media expresada en microgramos por gramo

d. DL<sub>50</sub> / % en el veneno (Laustsen *et al.*, 2015).

e. Contribución de cada fracción a la letalidad, considerando el *toxicity score* del veneno completo como 100%.

*N.E.*: No hubo ningún efecto observable

*N.L.*: No letal con una dosis máxima de 1 µg/g

N.D.: No determinado

N.I.: No identificada.

IC<sub>95</sub>: Intervalo de confianza a 95%

### 5.5.3.1. Letalidad y actividad PLA<sub>2</sub>

Como parte de su caracterización funcional y para completar la identificación de las fracciones de intercambio catiónico, cada una de ellas fue inyectada por vía intraperitoneal a 3 ratones de la cepa CD1, utilizando una dosis de 1 µg/g. Posteriormente, se determinó la *toxicity score* (Laustsen *et al.*, 2015), la cual se obtiene considerando la DL<sub>50</sub> de cada fracción y su abundancia relativa en el veneno total. A partir de ésta se analizó la contribución de cada una de ellas a la letalidad total del veneno (Tabla VI.II). Es importante hacer notar que, aquellas fracciones que no fueron letales con dosis de 1 µg/g podrían tener cierta toxicidad, pero tendrían una contribución relativamente pequeña a la letalidad total.

Se inyectaron 1.8 µg/g de las fracciones no letales para ratones o el equivalente a 4 DL<sub>50</sub>s murinas de las fracciones letales, en grupos de 2 serpientes del género *Conopsis*. Ninguna de las fracciones no letales en ratones tuvo efecto en este modelo, mientras que la fracción X resultó ser tóxica solamente en el modelo murino (Tabla VI.II). Las otras dos fracciones que mostraron ser letales en ratones fueron también letales en serpientes y generaron parálisis flácida, lo cual sugiere un mecanismo de acción similar en ambos modelos. Este análisis mostró que con esta separación es posible recuperar el 56.2% de la actividad letal del veneno (Tabla VI.II; % Cont.) en sus fracciones individuales lo cual puede deberse a tres factores: 1.) Existen interacciones proteicas que se pierden durante la cromatografía de intercambio catiónico, 2.) Algunos componentes pierden su actividad letal debido a las condiciones del fraccionamiento y 3.) Existen diversos componentes de baja letalidad que contribuyen poco y no fueron detectados con las dosis probadas.

Algunas de las fracciones no letales observadas están presentes en muy alta proporción, lo cual sugiere que poseen un papel relevante en el veneno. Se ha sugerido que éste podría ser principalmente digestivo (Van der Laet *et al.*, 2013), en particular aquellas identificadas como fosfolipasas A<sub>2</sub>. También existe una variación muy grande en la actividad PLA<sub>2</sub> determinada para cada fracción (Tabla VI.II). Lo anterior puede deberse a la proporción de estas enzimas presente en cada una de las fracciones, así como a diferencias en la actividad enzimática de cada proteína. En el Anexo III se muestra la purificación por RP-HPLC de cada una de las fracciones obtenidas. Estudios previos han mostrado que la actividad enzimática de las PLA<sub>2</sub> presinápticas no está directamente relacionada con su toxicidad, aunque parece ser necesaria para ésta (Montecucco *et al.*, 2008). En el presente estudio, las fracciones con actividad neurotóxica mostraron menor actividad enzimática que las fracciones tipo PLA<sub>2</sub> que no presentaron toxicidad (Por ejemplo, fracciones IV y VII vs. XVII; Tabla VI.II).

Al analizar los PM obtenidos por ESI-MS, se vio que algunas de las fracciones identificadas como PLA<sub>2</sub> por su migración en SDS-PAGE y por su actividad enzimática, no mostraban PMs congruentes con estas proteínas (Véanse fracciones III a VI en Tabla VI.II). Lo anterior puede deberse a que tienen un punto isoeléctrico bajo, lo cual es evidenciado por su elución al inicio del cromatograma de intercambio catiónico (Figura



6.20). La ausencia de suficientes cargas positivas complica su ionización mediante electrospray (Bruins, 1998). Acorde con esta teoría, las PLA<sub>2</sub> con carga neta básica, que eluyen al final del cromatograma, muestran PM por ESI-MS congruentes con PLA<sub>2</sub>.

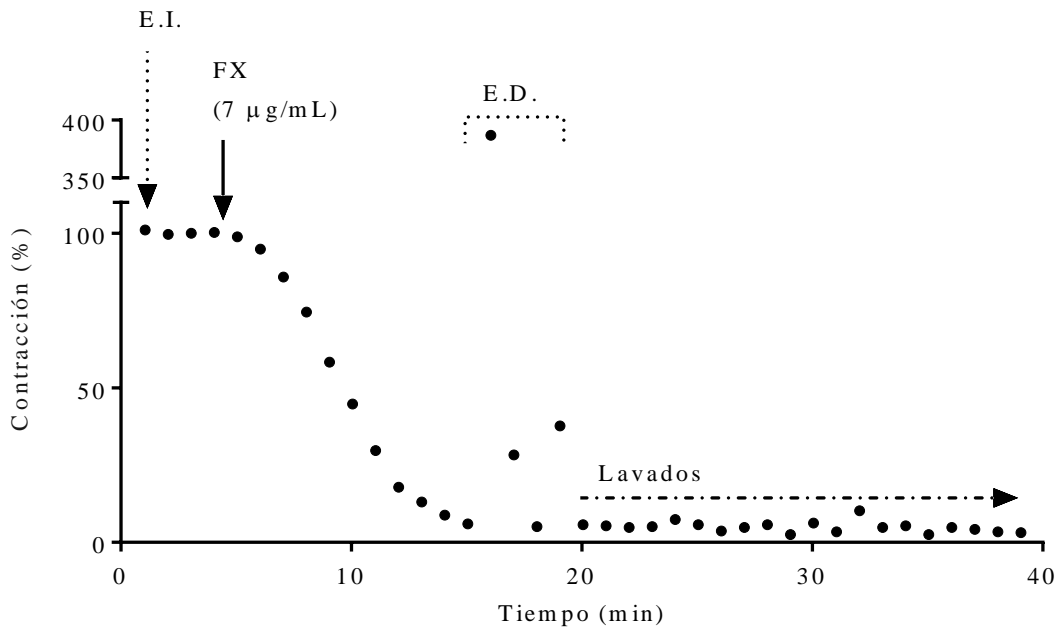
Debido principalmente a la cantidad de veneno y de individuos de *Conopsis sp.* disponibles, no fue posible probar en este modelo todas las fracciones obtenidas. Sin embargo, con las fracciones probadas observamos que sólo dos de las tres fracciones letales para ratones son también letales para estas serpientes (Tabla VI.II). La fracción X, no ocasionó ningún efecto tóxico evidente en *Conopsis* (Tabla VI.II) mientras que las fracciones XVII y XVIII generaron parálisis flácida en ambos modelos (Véase sección 5.6 para una discusión referente a estas fracciones).

## 6.6. Análisis de fracciones selectas.

### 6.6.1. Fracción X

La fracción X es interesante debido a su alta letalidad en ratones (0.3 µg/g *i.p.*), en los cuales ocasiona parálisis flácida, y a su gran abundancia dentro del veneno (12%; Tabla VI.II). Entre los componentes que la conforman, se identificó una toxina de tres dedos, denominada D.H., cuya secuencia había sido previamente observada como transcrito en las glándulas de veneno de *M. diastema* (Guerrero-Garzón *et al.*, 2018). Esta toxina, presenta la secuencia característica de las αNTxs de cadena corta (Figura 6.4), las cuales son potentes bloqueadores de los nAChRs musculares y podría ser responsable por sí misma de la letalidad de esta fracción. Además de D.H., se identificaron en esta fracción, por su PM, dos 3FTx y dos PLA<sub>2</sub> independientes, las cuales podrían también jugar un papel en la alta letalidad de esta fracción.

Su efecto sobre la preparación neuromuscular de NFD murino se observa en la Figura 6.21. En este caso, puede advertirse que no presenta latencia, lo cual sugiere una actividad postsináptica. Además, existe una ausencia total de recuperación al realizar múltiples lavados, lo cual sugiere que esta toxina posee una muy alta afinidad por los nAChR presentes en la placa neuromuscular murina. Sin embargo, la existencia de una contaminación de PLA<sub>2</sub> (Figura 6.21 y 6.22A) en esta fracción no permite descartar un efecto presináptico.



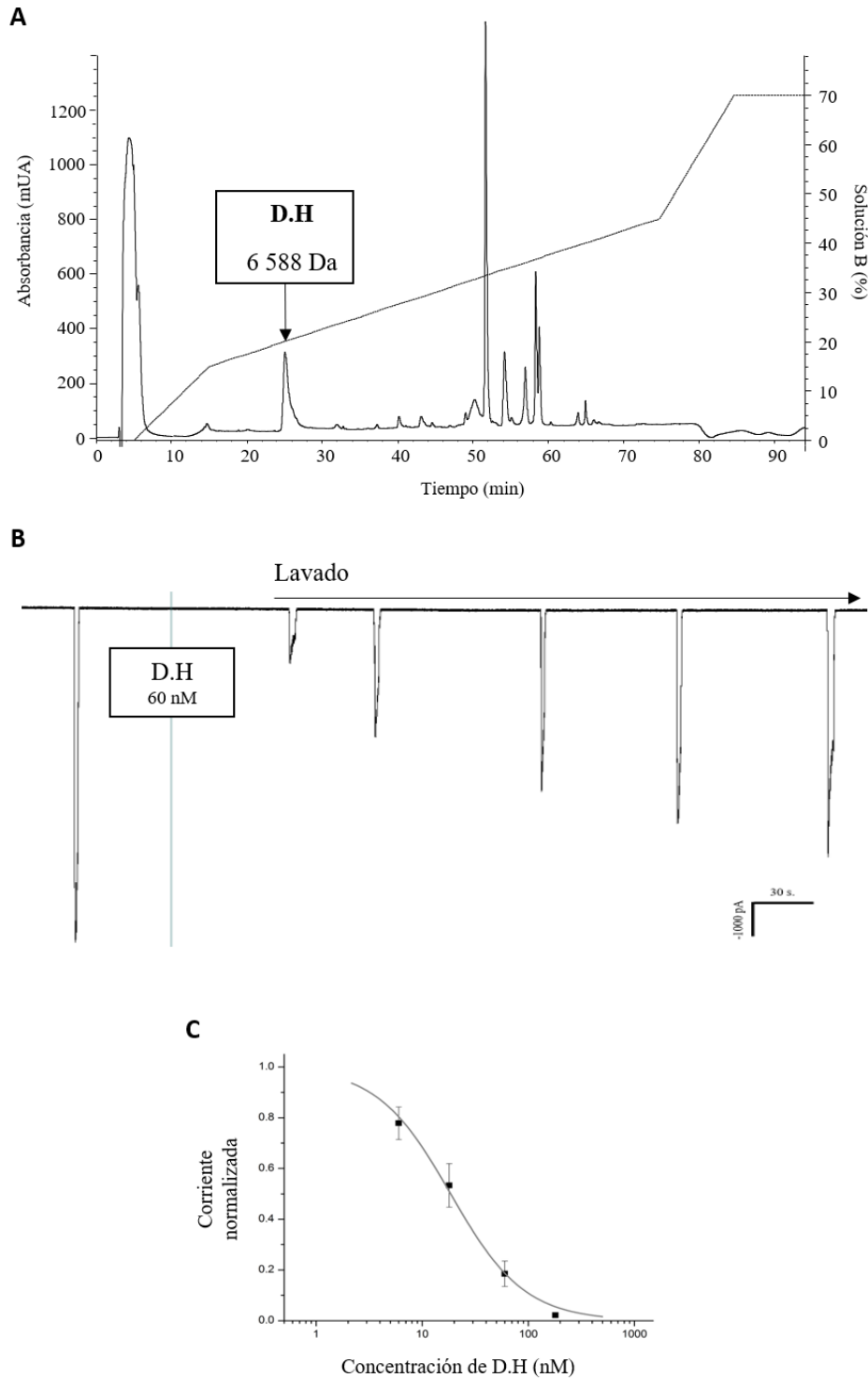
**Figura 6.21. Efecto de FX [7 µg/mL] sobre preparación neuromuscular NFD de ratón. Datos normalizados. E.I. Estimulación indirecta. E.D. Estimulación directa.**

La toxina D.H. (identificada en el RP-HPLC del veneno completo como F7), genera parálisis flácida en ratones por vía *i.v.* Como se esperaba, es un potente bloqueador del nAChR muscular, con una  $IC_{50}$  de  $18.5 \pm 1.5$  nM (pendiente  $1.2 \pm 0.1$ ; [Figura 6.22B y C](#)). Esta afinidad es similar a la reportada para otros componentes de la familia de las  $\alpha$ NTxs de cadena corta purificados a partir de coralillos como *M. laticollaris* ([Carbajal-Saucedo et al., 2013](#)), *M. surinamensis* ([Olamendi-Portugal et al., 2008](#)). Esta toxina es, sin duda, el bloqueador postsináptico de mayor relevancia para la toxicidad en mamíferos del veneno de *M. b. browni*. Sin embargo, se identificaron otros componentes cuya secuencia primaria sugiere que tienen actividad neurotóxica postsináptica ([Tabla VI.I](#)), por lo que podrían también tener cierta toxicidad.

Es muy interesante que D.H. no mostró ningún efecto al ser inyectada en serpientes del género *Conopsis*, ni pura ni con los otros componentes de la fracción X. Con el fin de descartar una posible resistencia de *Conopsis sp.* a esta  $\alpha$ NTx, se decidió inyectarla en dos individuos de colúbridos pequeños que estaban disponibles: Un adulto de la especie *Ninia sebae* y uno de la especie *Chersodromus liebmanni*. No se observó ningún efecto de envenenamiento con una dosis de 1 µg/g por vía *i.p.*, lo cual sugiere una baja toxicidad de esta toxina en colúbridos y no una resistencia específica de *Conopsis sp.* Debido a la baja disponibilidad de estos modelos animales, no fue posible realizar repeticiones de los experimentos, las cuales serían de gran relevancia para comprobar la hipótesis sugerida.

A pesar de que las  $\alpha$ NTx de cadena corta tienen una muy alta potencia letal en ratones, existen pocos trabajos en los que haya sido probada su letalidad en presas naturales. En éstos, se ha reportado una muy baja potencia letal de  $\alpha$ -cobrotoxina (66% ID de secuencia con D.H) y  $\alpha$ -bungarotoxina (una  $\alpha$ NTx de cadena larga) en diversas serpientes venenosas y no venenosas (Burden *et al.*, 1975; Liu y Xu (Ke Hsu), 1990). Por otro lado, se ha observado mayor toxicidad en reptiles que en ratones, al probar algunas  $\alpha$ NTx no convencionales, pertenecientes a venenos de la familia *Colubridae* (Heyborne y Mackessy, 2013; Pawlak *et al.*, 2009, 2006).

Con la información disponible, no es posible hacer más que especular sobre la relevancia biológica de esta toxina en venenos de serpientes cuya dieta no incluye mamíferos. Sin embargo, componentes idénticos han sido descritos en los venenos de *M. tener* y *M. diastema* (Bénard-Valle *et al.*, 2014; Guerrero-Garzón *et al.*, 2018) y algunos con porcentaje de identidad superior a 90% se han encontrado en los venenos de *M. laticollaris*, *M. nigrocinctus* y *M. surinamensis* (Carbajal-Saucedo *et al.*, 2013; Olamendi-Portugal *et al.*, 2008; Rosso *et al.*, 1996), lo cual sugiere que poseen una función dentro de los venenos. Es posible que algunas de estas toxinas tengan baja letalidad en su presa natural, contribuyendo a la letalidad total del veneno.



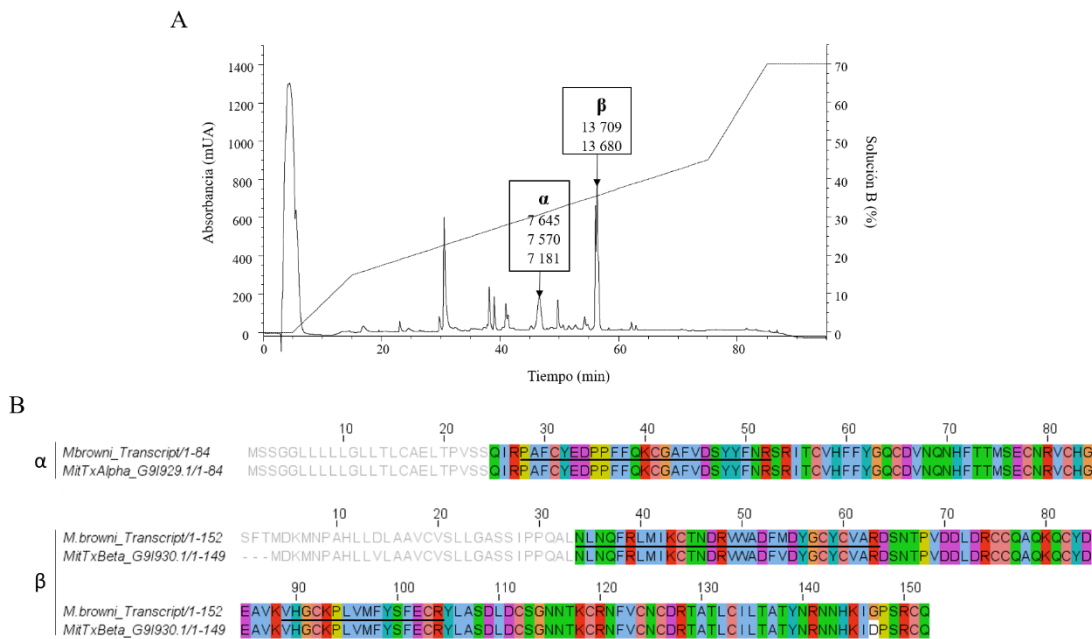
**Figura 6.22. Caracterización de la  $\alpha$ NTx denominada D.H.**

**A.** Purificación de fracción X de intercambio catiónico por RP-HPLC y determinación de PM por ESI-MS (inserto). *mUA*. Miliunidades de Absorbancia. **B.** Efecto de D.H. 60 nM en corrientes generadas por ACh en células de Rbdomiosarcoma TE621. *pA*. picoAmperios. **C.** Curva dosis-respuesta de datos normalizados.

## 6.6.2. Fracción XI

En esta fracción se identificó un complejo proteico denominado MitTx, el cual fue previamente descrito en el veneno del coralillo estadounidense *Micrurus tener tener*. Éste está conformado por un homólogo de PLA<sub>2</sub> denominado MitTx $\beta$ , el cual se une mediante interacciones no covalentes a un péptido tipo Kunitz, denominado MitTx $\alpha$ . El conjunto MitTx es un activador de canales sensores de pH denominados *Acid Sensing Ion Channels* (ASIC) los cuales juegan un papel en la generación de dolor (Bohlen *et al.*, 2011).

En el presente trabajo, se observó que las proteínas que conforman este complejo se mantienen unidas después del fraccionamiento por intercambio catiónico, pero se separan al pasar por RP-HPLC (Figura 6.20 y 6.23A). A partir de las secuencias obtenidas del transcriptoma, la masa molecular y los péptidos de MS/MS se concluyó que la proteína tipo Kunitz presente en el veneno de *M. b. browni* es idéntica a MitTx $\alpha$ , mientras que el homólogo de PLA<sub>2</sub> tiene un aminoácido diferente en el carboxilo terminal con respecto a MitTx $\beta$  (Figura 6.23B).



**Figura 6.23. Identificación de toxina MitTx en el veneno de *M. b. browni*.**

**A.** purificación por RP-HPLC a partir de fracción XI de intercambio catiónico. *Inserto.* PM obtenido por ESI-MS. *mUA.* Miliunidades de Absorbancia. **B.** Alineamiento de transcritos obtenidos de la glándula de *M. b. browni* con las secuencias de MitTx. Se muestran subrayados los péptidos obtenidos en el proteoma del presente trabajo.

Posteriormente, con el fin de corroborar que el complejo presente en *M. b. browni* posea la misma actividad generadora de dolor que el complejo MitTx, se inyectaron 4  $\mu$ g de FXI por vía *s.c.* (20  $\mu$ L totales en PBS) en la pata trasera derecha de tres ratones. Los

ratones pasaron un mínimo de 150 s. lamiendo la pata inyectada, mientras que el control negativo, al cual se le inyectaron solamente 20 µL de PBS, no lamió su pata en ningún momento. Esto comprobó que el complejo es activo.

Además del complejo anterior, se identificó una 3FTx denominada B.I, la cual posee un porcentaje de identidad del 59.6% con la secuencia consenso de αNTxs del tipo II (Fry *et al.*, 2003). Sin embargo, no posee el puente disulfuro extra en la segunda asa, característico de este grupo de αNTxs, por lo que no es posible inferir con certeza la actividad de esta toxina.

### 6.6.3. Fracción XVII

La fracción XVII tiene una alta potencia letal en ratones, generando parálisis flácida al ser inyectada por vía intraperitoneal ( $DL_{50} = 0.36 \mu\text{g/g}$ ; Tabla VI.II). Fue identificada como una PLA<sub>2</sub> por su peso molecular, así como mediante su actividad enzimática y secuencia utilizando BLAST. Posee 92% de identidad con una PLA<sub>2</sub> básica de *M. corallinus* (Q8AXW7.1) y una de *M. laticollaris* (ATA63216.1). Sin embargo, no hay información disponible sobre la letalidad o neurotoxicidad de estas últimas. También genera parálisis flácida al ser inyectada *i.p.* en *Conopsis sp.* siendo uno de los principales componentes responsables de la toxicidad del veneno en este modelo.

### 6.6.4. Fracción XVIII

XVIII es el componente de mayor letalidad en ratones entre las fracciones de intercambio catiónico, con una  $DL_{50}$  *i.p.* de  $0.095 \mu\text{g/g}$  y  $DL_{50}$  *i.v.* de  $0.01 \mu\text{g/g}$ . Al igual que el veneno completo de *M. b. browni* causa parálisis flácida, la cual eventualmente genera la muerte por insuficiencia respiratoria. El cálculo de *toxicity scores* (Laustsen *et al.*, 2015), así como de la contribución de las fracciones a la letalidad total del veneno (Tabla VI.I) sugieren que es, de hecho, la fracción que tiene mayor contribución en la toxicidad. Este componente también genera parálisis flácida en *Conopsis sp.* con una dosis de  $0.4 \mu\text{g/g}$ .

Al purificarla por RP-HPLC se obtuvieron cinco fracciones, ninguna de las cuales fue letal al ser inyectada en ratones (Figura 6.24 A y B; Tabla VI.III). De manera interesante, cuando se juntaron todas estas fracciones, excluyendo la subfracción C (que es una contaminación de la fracción XVII), la letalidad se recuperó. Lo anterior es evidencia de que existe algún sinergismo o interacción entre los componentes que es relevante para la letalidad de la fracción XVIII. Con el fin de analizar esta hipótesis, se realizaron combinaciones de las subfracciones y fueron inyectadas por vía *i.v.* en ratones, observando que la letalidad se recuperaba solamente cuando se juntaban las subfracciones D y E (Tabla V.III). Esta toxina fue por lo tanto designada Brownitoxina-1.

**Tabla VI.III.** Letalidad de FXVIII y sus subfracciones por vía *i.v.* en ratones.

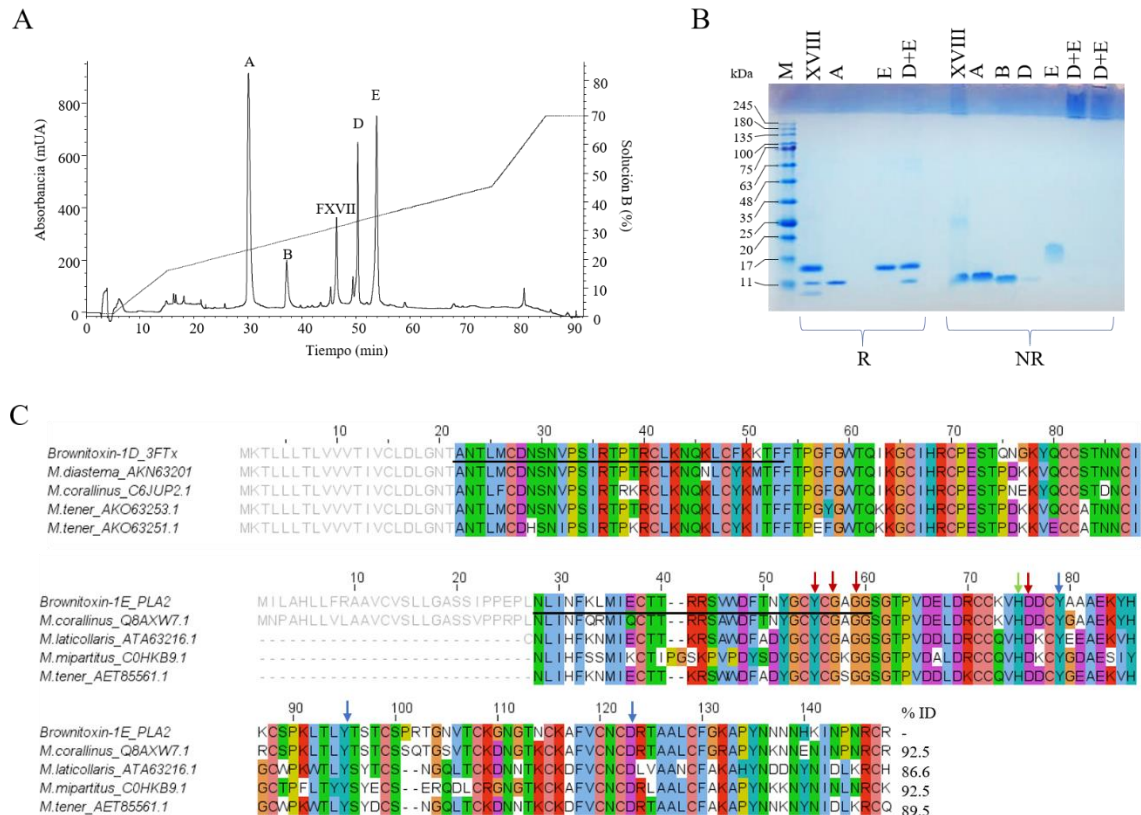
Fracción <sup>a</sup>	PM <sup>c</sup> (Da)	Dosis (µg/ratón)	Letalidad <sup>c</sup> (tiempo de muerte)
<b>FXVIII<sup>b</sup></b>	-	-	DL <sub>50</sub> : 0.2 µg/ratón, 0.01 µg/g
<b>A</b>	6,812; 6 923	2	0/1
<b>B</b>	7,076; 7,188	2	0/1
<b>D</b>	7,570	0.1, 5	0/3, 0/3
<b>E</b>	13,181; 7,561	0.1, 5	0/3, 0/3
<b>D(33%) + E(77%)</b>		0.2	3/3 (2.5 h)
<b>A(42%) + B(6%) + D(17%) + E(25%)</b>		0.4	3/3 (2.5 h)

<sup>a</sup> Para combinar las subfracciones se utilizaron aproximadamente las proporciones observadas por RP-HPLC a 280 nm; se muestran entre paréntesis.

<sup>b</sup> Fracción completa de intercambio catiónico.

<sup>c</sup> Peso molecular (ESI-MS).

<sup>d</sup> Número de muertes / total de ratones inyectados. DL<sub>50</sub>. Dosis letal media.



**Figura 6.24. Caracterización de Brownitoxina-1.**

**A.** RP-HPLC de fracción XVIII de intercambio catiónico. *mUA*. Miliunidades de Absorbancia. **B.** SDS-PAGE 15% 1 µg/carril R. Condiciones reductoras. NR. Condiciones no reductoras. kDa. kilo

Dáltones. M. Marcadores de peso molecular. C. Alineamiento de las subunidades de Brownitoxina con las secuencias de mayor similitud identificadas por BLAST. Las secuencias obtenidas por secuenciación directa de proteína se señalan subrayadas en negro y los péptidos señal se marcaron con letras grises. Para la secuencia de PLA<sub>2</sub> (Brownitoxina1E\_PLA<sub>2</sub>), fueron marcados con flechas los aminoácidos que participan en el sitio de unión a Ca<sup>2+</sup> (rojo), el sitio catalítico (verde) y soporte estructural de éste (azul) (Kini, 1997; Scott *et al.*, 1990).

Con el fin de obtener las secuencias completas de ambas, se obtuvieron las secuencias N-terminales y se alinearon con dos transcritos obtenidos de las glándulas de veneno. En el caso de la subfracción E, el PM teórico del transcrito identificado por N-terminal (Brownitoxin-1E; 13,181.98 Da), coincide con el determinado por ESI-MS (Tabla VI.III). Por otro lado, el transcrito identificado por N-terminal para la subfracción D (Brownitoxina-1D) tiene un PM teórico de 7,646.95 Da, el cual tiene una diferencia significativa con el PM determinado para esta subfracción. Es necesario realizar una secuenciación directa de ésta con el fin de confirmar su secuencia. En la Figura 6.24C se presenta un alineamiento de ambas secuencias con las cuatro proteínas más similares en las bases de datos UniProt/SwissProt, utilizando BLAST. Estos datos permitieron identificar a la Brownitoxina-1D como una toxina de tres dedos y la Brownitoxina-1E como una fosfolipasa A<sub>2</sub>.

Finalmente, para caracterizar la interacción entre estas fracciones, se estudió su perfil de SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (Figura 6.24B). Al correrse juntas en el gel reductor, se observan dos bandas claras, sin embargo, en el gel en condiciones no reductoras éstas no están presentes y sólo existe una banda que no entra en el gel separador. Esto podría indicar la formación de un complejo proteico de muy alto peso molecular o carga neta muy básica. De esta manera se comprobó que existe una interacción entre ambas fracciones, aunque es necesario realizar más experimentos para conocer su naturaleza exacta. Este es el primer reporte de una neurotoxina polimérica en el veneno de un coralillo, aunque éstas se han descrito en venenos de otros elápidos. De hecho, la  $\beta$ NTx con mayor potencia letal aislada del veneno de una serpiente, conocida como Textilotoxina (DL<sub>50</sub> *i.v.* de 1  $\mu$ g/kg), es un complejo formado por cinco subunidades tipo PLA<sub>2</sub> (Pearson *et al.*, 1993). Se han descrito, además, varias otras PLA<sub>2</sub> poliméricas con actividad  $\beta$ -neurotóxica y alta potencia letal como la Taipoxina de *Oxyuranus scutellatus*, y la  $\beta$ -bungarotoxina de *Bungarus multicinctus* (Doley y Kini, 2009).



# CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Secciones 7 y 8



## 7. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se realizó una caracterización detallada de la composición proteica y la función del veneno de *M. b. browni*, lo cual contribuye de manera muy significativa al conocimiento actual sobre venenos de serpientes mexicanas. Se vio que el veneno posee alrededor de 40 componentes distintos, pertenecientes a nueve familias proteicas, entre las que destacan por abundancia las PLA<sub>2</sub>, seguidas de las 3FTx. El análisis de las glándulas venenosas de un individuo mostró también abundantes transcritos que codifican para PLA<sub>2</sub> y 3FTx, con un total de diez familias proteicas identificadas. Estos datos nos permiten clasificar al veneno como predominante en PLA<sub>2</sub>, al igual que otros venenos de coralillos norteamericanos.

El mecanismo de acción del veneno de *M. b. browni* es principalmente presináptico, lo cual se evidenció análisis sobre tejidos aislados. La identificación de dos PLA<sub>2</sub> con alta toxicidad y abundancia relativa en el veneno, apoyan esta teoría. Aun así, se describió la presencia de una neurotoxina postsináptica también relevante para el envenenamiento en mamíferos.

Los componentes tóxicos para mamíferos identificados pertenecen en su mayoría a las dos familias mencionadas. De manera interesante, no se encontró ningún componente con mayor toxicidad en el modelo de presa natural. Sin embargo, se identificó uno letal en ratones, pero sin toxicidad en este último modelo. No se observó tampoco evidencia de mayor letalidad para presas naturales al utilizar el veneno completo, observación interesante para una especie estrictamente ofiófaga.

Finalmente, se describió por primera vez una neurotoxina multimérica letal en un veneno de coralillo. Este resultado resalta la necesidad de utilizar técnicas de bioquímica clásica en combinación con los análisis proteómicos y transcriptómicos para poder entender la función del veneno en su conjunto e identificar interacciones proteicas relevantes para ésta.

## 8. PERSPECTIVAS

- Realizar una caracterización detallada de la Brownitoxina-1, su toxicidad, mecanismo de acción y las interacciones entre sus componentes.
- Analizar la actividad de las 3FTx identificadas sobre otros receptores celulares (Nav, mAChR, GABA).
- Continuar los estudios *ex vivo* del veneno.
  - Caracterizar la reversibilidad de la neurotoxicidad del veneno al aplicar antiveneno.
  - Corroborar que el efecto observado es mayoritariamente presináptico.
- Terminar la estandarización de la preparación neuromuscular de nervio tibial – gastrocnemio de lagartija.
- Analizar el efecto in vivo del veneno en otros modelos de presa natural.
- Utilizar las estrategias desarrolladas en el trabajo para el análisis de otros venenos de coralillos mexicanos (*M. diastema*, *M. distans*).



# BIBLIOGRAFÍA

Sección 9



## 9. Bibliografía

- Aird, S.D., da Silva, N., Qiu, L., Villar-Briones, A., Saddi, V., Pires de Campos Telles, M., Grau, M., Mikheyev, A., 2017. Coralsnake Venomics: Analyses of Venom Gland Transcriptomes and Proteomes of Six Brazilian Taxa. *Toxins (Basel)*. 9, 187. <https://doi.org/10.3390/toxins9060187>
- Alape-Girón, A., Stiles, B., Schmidt, J., Girón-Cortes, M., Thelestam, M., Jörnvall, H., Bergman, T., 1996. Characterization of multiple nicotinic acetylcholine receptor-binding proteins and phospholipases A 2 from the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus* [WWW Document]. *FEBS Lett.* [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01543-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01543-4)
- Bénard-Valle, M., 2009. Similitud bioquímica e inmunoquímica entre venenos de coralillos Norteamericanos. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Mexico.
- Bénard-Valle, M., Carbajal-Saucedo, A., De Roodt, A., López-Vera, E., Alagón, A., 2014. Biochemical characterization of the venom of the coral snake *Micrurus tener* and comparative biological activities in the mouse and a reptile model. *Toxicon* 77, 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.10.005>
- Bohlen, C.J., Chesler, A.T., Sharif-Naeini, R., Medzihradzsky, K.F., Zhou, S., King, D., Sánchez, E.E., Burlingame, A.L., Basbaum, A.I., Julius, D., 2011. A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain. *Nature* 479, 410–4. <https://doi.org/10.1038/nature10607>
- Bolanos, R., Cerdas, L., Taylor, R., 1975. the Production and Characteristics of a Coral Snake *Micrurus mipartitus hertwigi* Anti Venin. *Toxicon* 13, 139–142.
- Braga, J.R.M., Jorge, A.R.C., Marinho, A.D., Silveira, J.A. de M., Nogueira-Junior, F.A., Valle, M.B., Alagón, A., de Menezes, R.R.P.P.B., Martins, A.M.C., Feijão, L.X., Monteiro, H.S.A., Jorge, R.J.B., 2020. Renal effects of venoms of Mexican coral snakes *Micrurus browni* and *Micrurus laticollaris*. *Toxicon* 181, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.04.095>
- Bruins, A.P., 1998. Mechanistic aspects of electrospray ionization. *J. Chromatogr. A* 794, 345–357. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01110-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01110-2)
- Bucarechi, F., Mello de Capitani, E., Ronan, J.V., Rodrigues, C.K., Zannin, M., da Silva Jr., N.J., Casais-E-Silva, L.L., Hyslop, S., 2016. Coral snake bites (*Micrurus spp.*) in Brazil: a review of literature reports. *Clin. Toxicol.* 54, 222–234. <https://doi.org/10.3109/15563650.2015.1135337>
- Bülbring, E., 1946. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 1, 38–61.
- Burden, S.J., Hartzell, H.C., Yoshikami, D., 1975. Acetylcholine receptors at neuromuscular synapses: Phylogenetic differences detected by snake a-neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3245–3249.
- Calvete, J.J., 2017. Venomics: integrative venom proteomics and beyond. *Biochem. J.* 474, 611–634. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160577>
- Calvete, J.J., Jú Arez, P., Sanz, L., 2007. Snake venomics. Strategy and applications. *J. MASS Spectrom. J. Mass Spectrom* 42, 1405–1414. <https://doi.org/10.1002/jms.1242>
- Camargo, T.M., de Roodt, A.R., da Cruz-Höfling, M.A., Rodrigues-Simioni, L., 2011. The neuromuscular activity of *Micrurus pyrrhocryptus* venom and its neutralization by commercial and specific coral snake antivenoms. *J. Venom Res.* 2, 24–31.

- Campbell, J.A., Lamar, W.W., 2004. The venomous reptiles of the western hemisphere Vol. I.
- Carbajal-Saucedo, A., Floriano, R.S., Dal Belo, C.A., Olvera-Rodríguez, A., Alagón, A., Rodrigues-Simioni, L., 2014. Neuromuscular activity of *Micrurus laticollaris* (Squamata: Elapidae) venom in Vitro. *Toxins (Basel)*. 6, 359–370. <https://doi.org/10.3390/toxins6010359>
- Carbajal-Saucedo, A., López-Vera, E., Bénard-Valle, M., Smith, E.N., Zamudio, F., de Roodt, A.R., Olvera-Rodríguez, A., 2013. Isolation, characterization, cloning and expression of an alpha-neurotoxin from the venom of the Mexican coral snake *Micrurus laticollaris* (Squamata: Elapidae). *Toxicon* 66, 64–74. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2013.02.006>
- Carbajal, A., 2014. Caracterización biológica, bioquímica e inmunoquímica del veneno de *Micrurus laticollaris*: bases para el desarrollo del antiveneno de amplio espectro contra coralillos. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Casais-E-Silva, L.L., Teixeira, C.F.P., Lebrun, I., Lomonte, B., Alape-Girón, A., María Gutiérrez, J., 2016. Lemnitoxin, the major component of *Micrurus lemniscatus* coral snake venom, is a myotoxic and pro-inflammatory phospholipase A 2. *Toxicol. Lett.* 257, 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.005>
- Casasola, A., Ramos-Cerrillo, B., de Roodt, A.R., Saucedo, A.C., Chippaux, J.P., Alagón, A., Stock, R.P., 2009. Paraspecific neutralization of the venom of African species of cobra by an equine antiserum against *Naja melanoleuca*: A comparative study. *Toxicon* 53, 602–608. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.011>
- Chippaux, J.-P., 2017. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005662. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005662>
- Ciscotto, P.H.C., Rates, B., Silva, D. a F., Richardson, M., Silva, L.P., Andrade, H., Donato, M.F., Cotta, G.A., Maria, W.S., Rodrigues, R.J., Sanchez, E., De Lima, M.E., Pimenta, A.M.C., 2011. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. *J. Proteomics* 74, 1810–25. <https://doi.org/10.1016/j.jpro.2011.07.011>
- Corrêa-Netto, C., Junqueira-de-Azevedo, I. de L.M., Silva, D.A., Ho, P.L., Leitão-de-Araújo, M., Alves, M.L.M., Sanz, L., Foguel, D., Zingali, R.B., Calvete, J.J., 2011. Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. *J. Proteomics* 74, 1795–1809. <https://doi.org/10.1016/j.jpro.2011.04.003>
- Cull-Candy, S.G., Fohlman, J., Gustavsson, D., Lüllmann-Rauch, R., Thesleff, S., 1976. The effects of taipoxin and notexin on the function and fine structure of murine neuromuscular junction. *Neuroscience* 1, 175–180. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(76\)90074-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(76)90074-9)
- Cummings, B.S., 2007. Phospholipase A2 as targets for anti-cancer drugs. *Biochem. Pharmacol.* 74, 949–959. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.04.021>
- da Silva Jr., N.J., Aird, S.D., 2001. Prey specificity , comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 128, 425–456.
- Dal Belo, C.A., Leite, G.B., Toyama, M.H., Marangoni, S., Corrado, A.P., Fontana, M.D., Southan, A., Rowan, E.G., Hyslop, S., Rodrigues-Simioni, L., 2005. Pharmacological and structural characterization of a novel phospholipase A2 from

- Micrurus dumerilii carinicauda* venom. *Toxicon* 46, 736–750.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.07.016>
- De Abreu, V.A., Leite, G.B., Oliveira, C.B., Hyslop, S., Furtado, M.D.F.D., Simioni, L.R., 2008. Neurotoxicity of *Micrurus altirostris* (Uruguayan coral snake) venom and its neutralization by commercial coral snake antivenom and specific antiserum raised in rabbits. *Clin. Toxicol.* 46, 519–527.  
<https://doi.org/10.1080/15563650701647405>
- De Roodt, A.R., Lago, N.R., Stock, R.P., 2012. Myotoxicity and nephrotoxicity by *Micrurus* venoms in experimental envenomation. *Toxicon* 59, 356–364.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.11.009>
- Dokmetjian, J.C., Del Canto, S., Vinzón, S., de Jiménez Bonino, M.B., 2009. Biochemical characterization of the *Micrurus pyrrhocryptus* venom. *Toxicon* 53, 375–82. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.015>
- Doley, R., Kini, R.M., 2009. Protein complexes in snake venom. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 2851–71. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0050-2>
- Fernández, J., Alape-Girón, A., Angulo, Y., Sanz, L., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., Lomonte, B., 2011. Venomic and antivenomic analyses of the Central American coral snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae). *J. Proteome Res.* 10, 1816–1827.  
<https://doi.org/10.1021/pr101091a>
- Fernández, J., Vargas-Vargas, N., Pla, D., Sasa, M., Rey-Suárez, P., Sanz, L., Gutiérrez, J.M., 2015. Snake venomomics of *Micrurus alleni* and *Micrurus mosquitensis* from the Caribbean region of Costa Rica reveals two divergent compositional patterns in New World elapids. *Toxicon* 107, 217–233. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.08.016>
- Fisher, A.B., Jain, M., 2001. Phospholipases : Degradation of Membrane Phospholipids. *Encycl. Life Sci.*
- Floriano, R.S., Schezaro-Ramos, R., Silva, N.J., Bucarechi, F., Rowan, E.G., Hyslop, S., 2019. Neurotoxicity of *Micrurus lemniscatus lemniscatus* (South American coralsnake) venom in vertebrate neuromuscular preparations in vitro and neutralization by antivenom. *Arch. Toxicol.* 93, 2065–2086.  
<https://doi.org/10.1007/s00204-019-02476-9>
- Fry, B.G., 2015. *Venomous Reptiles and their Toxins*, 1st ed. Oxford University Press.  
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Fry, B.G., Wüster, W., Kini, R.M., Brusica, V., Khan, A., Venkataraman, D., Rooney, A.P., 2003. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. *J. Mol. Evol.* 57, 110–29. <https://doi.org/10.1007/s00239-003-2461-2>
- Guerrero-Garzón, J.F., Bénard-Valle, M., Restano-Cassulini, R., Zamudio, F., Corzo, G., Alagón, A., Olvera-Rodríguez, A., 2018. Cloning and sequencing of three-finger toxins from the venom glands of four *Micrurus* species from Mexico and heterologous expression of an alpha-neurotoxin from *Micrurus diastema*. *Biochimie* 147, 114–121. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2018.01.006>
- Gutiérrez, J.M., 2010. Snakebite Envenoming: A Public Health Perspective.  
<https://doi.org/10.5772/36076>
- Gutiérrez, J.M., 2002. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en America Latina. *Rev. Biol. Trop.* 50, 377–394.
- Gutiérrez, J.M., Arroyo, O., Chaves, F., Lomonte, B., Cerdas, L., 1986. Pathogenesis of myonecrosis induced by coral snake (*Micrurus nigrocinctus*) venom in mice. *Br. J.*

- Exp. Pathol. 67, 1–12.
- Harris, J.B., 2003. Myotoxic phospholipases A2 and the regeneration of skeletal muscles. *Toxicon* 42, 933–945. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.011>
- 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, 1923–1932. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.025>
- Holzer, M., Mackessy, S.P., 1996. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. *Toxicon* 34, 1149–1155. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00057-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00057-8)
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2017. Mortalidad General INEGI [WWW Document]. URL <https://www.inegi.org.mx/programas/mortalidad/default.html#Tabulados> (consultado 2.9.19).
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A.R., Silva, N. De, Gunawardena, N.K., 2008. The Global Burden of Snakebite : A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. *PLoS Med.* 5, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050218>
- Kini, R.M., 1997. Venom phospholipase A2 enzymes. Structure, function and evolution. John Wiley & Sons, Chichester, England.
- Kini, R.M., Doley, R., 2010. Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. *Toxicon* 56, 855–67. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.07.010>
- Langmead, B., Salzberg, S., 2013. Bowtie2. *Nat. Methods* 9, 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Laustsen, A.H., Lohse, B., Lomonte, B., Engmark, M., Gutiérrez, J.M., 2015. Selecting key toxins for focused development of elapid snake antivenoms and inhibitors guided by a Toxicity Score. *Toxicon* 104, 43–45. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.07.334>
- Leão, L.I., Ho, P.L., Junqueira-de-Azevedo, I.D.L.M., 2009. Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. *BMC Genomics* 10, 112. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-112>
- Liu, Y.-B., Xu (Ke Hsu), K., 1990. Lack of the blocking effect of cobrotoxin from *Naja naja* atra venom on neuromuscular transmission in isolated nerve muscle preparations from poisonous and non-poisonous snakes. *Toxicon* 28, 1071–1076. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90145-W](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90145-W)
- Lomonte, B., Rey-Suárez, P., Fernández, J., Sasa, M., Pla, D., Vargas, N., Bénard-Valle, M., Sanz, L., Corrêa-Netto, C., Núñez, V., Alape-Girón, A., Alagón, A., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., 2016a. Venoms of *Micrurus* coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. *Toxicon* 122, 7–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.09.008>
- Lomonte, B., Sasa, M., Rey-Suárez, P., Bryan, W., Gutiérrez, J.M., 2016b. Venom of the coral snake *Micrurus clarki*: Proteomic profile, toxicity, immunological cross-neutralization, and characterization of a three-finger Toxin. *Toxins (Basel)*. 8. <https://doi.org/10.3390/toxins8050138>
- Mackessy, S.P., 2010. Handbook of venoms and toxins of reptiles. CRC Press. Taylor &



- Francis Group, New York.
- Manock, S.R., Suarez, G., Graham, D., Avila-Aguero, M.L., Warrell, D.A., 2008. Neurotoxic envenoming by South American coral snake (*Micrurus lemniscatus helleri*): case report from eastern Ecuador and review. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 1127–1132. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.03.026>
- Margres, M.J., Aronow, K., Loyacano, J., Rokyta, D.R., 2013. The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. *BMC Genomics* 14, 531. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-531>
- Meier, J., Theakston, R.D.G., 1986. Approximate LD50 determinations of snake venoms using eight to ten experimental animals. *Toxicon* 24, 395–401. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(86\)90199-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(86)90199-6)
- Montecucco, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2008. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: Common aspects of their mechanisms of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2897–2912. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8113-3>
- Moreira, K.G., Prates, M. V., Andrade, F.A.C., Silva, L.P., Beirão, P.S.L., Kushmerick, C., Naves, L.A., Bloch, C., 2010. Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurus frontalis* venom, decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction. *Toxicon* 56, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.02.030>
- Nagy, K.A., 2005. Field metabolic rate and body size. *J. Exp. Biol.* 208, 1621–1625. <https://doi.org/10.1242/jeb.01553>
- Olamendi-Portugal, T., Batista, C.V.F., Restano-Cassulini, R., Pando, V., Villa-Hernandez, O., Zavaleta-Martínez-Vargas, A., Salas-Arruz, M.C., Rodríguez de la Vega, R.C., Becerril, B., Possani, L.D., 2008. Proteomic analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics* 8, 1919–32. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700668>
- Pawlak, J., Mackessy, S.P., Fry, B.G., Bhatia, M., Mourier, G., Fruchart-Gaillard, C., Servent, D., Ménez, R., Stura, E., Ménez, A., Kini, R.M., 2006. Denmotoxin, a three-finger toxin from the colubrid snake *Boiga dendrophila* (mangrove catsnake) with bird-specific activity. *J. Biol. Chem.* 281, 29030–29041. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605850200>
- Pawlak, J., Mackessy, S.P., Sixberry, N.M., Stura, E.A., He, M., Du, L., Foo, C.S., 2009. Irditoxin, a novel covalently linked heterodimeric three-finger toxin with high taxon-specific neurotoxicity. *FASEB J.* 23, 534–545. <https://doi.org/10.1096/fj.08-113555>
- Pearson, J.A., Tyler, M.I., Retson, K. V., Howden, M.E.H., 1993. Studies on the subunit structure of textilotoxin, a potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian common brown snake (*Pseudonaja textilis*). 3. The complete amino-acid sequences of all the subunits. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* 1161, 223–229. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(93\)90217-F](https://doi.org/10.1016/0167-4838(93)90217-F)
- Peigneur, S., Orts, D.J.B., Prieto da Silva, A.R., Oguiura, N., Boni-Mitake, M., de Oliveira, E.B., Zaharenko, A.J., de Freitas, J.C., Tytgat, J., 2012. Crotamine Pharmacology Revisited: Novel Insights Based on the Inhibition of KV Channels. *Mol. Pharmacol.* 82, 90–96. <https://doi.org/10.1124/mol.112.078188>

- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V.G., Chen, G., Deber, C.M., 2009. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1760–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813167106>
- Renjifo, C., Smith, E.N., Hodgson, W.C., Renjifo, J.M., Sanchez, A., Acosta, R., Maldonado, J.H., Riveros, A., 2012. Neuromuscular activity of the venoms of the Colombian coral snakes *Micrurus dissoleucus* and *Micrurus mipartitus*: An evolutionary perspective. *Toxicon* 59, 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.10.017>
- Rey-Suárez, P., Floriano, R.S., Rostelato-Ferreira, S., Saldarriaga-Córdoba, M., Núñez, V., Rodrigues-Simioni, L., Lomonte, B., 2012. Mipartoxin-I, a novel three-finger toxin, is the major neurotoxic component in the venom of the redbellied coral snake *Micrurus mipartitus* (Elapidae). *Toxicon* 60, 851–863. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.05.023>
- Rey-Suárez, P., Núñez, V., Fernández, J., Lomonte, B., 2016. Integrative characterization of the venom of the coral snake *Micrurus dumerilii* (Elapidae) from Colombia: Proteome, toxicity, and cross-neutralization by antivenom. *J. Proteomics* 136, 262–273. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.02.006>
- Rey-Suárez, P., Núñez, V., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2011. Proteomic and biological characterization of the venom of the redbellied coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. *J. Proteomics* 75, 655–667. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.09.003>
- Reyes-velasco, J., Adams, R.H., Boissinot, S., Parkinson, L., Campbell, J.A., Castoe, T.A., Smith, E.N., 2020. Genome-wide SNPs clarify lineage diversity confused by coloration in coralsnakes of the *Micrurus diastema* species complex (Serpentes: Elapidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 106770. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106770>
- Rokyta, D.R., Lemmon, A.R., Margres, M.J., Aronow, K., 2012. The venom-gland transcriptome of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*), *BMC Genomics*.
- Rokyta, D.R., Margres, M.J., Calvin, K., 2015. Post-transcriptional Mechanisms Contribute Little to Phenotypic Variation in Snake Venoms. *Genes|Genomes|Genetics* 5, 2375–2382. <https://doi.org/10.1534/g3.115.020578>
- Rosso, J.-P., Bougis, P.E., Kneussel, M., Gutiérrez, J.M., Céard, B., Diaz-Bustamante, M., Schwarz, J.R., Pongs, O., Bosmans, F., 2015. MmTX1 and MmTX2 from coral snake venom potently modulate GABA A receptor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E891–E900. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415488112>
- Rosso, J.-P., Vargas-Rosso, O., Gutiérrez, J.M., Rochat, H., Bougis, P.E., 1996. Characterization of a-neurotoxin and phospholipase A, activities from *Micrurus* venoms Determination of the amino acid sequence and receptor-binding ability of the major or-neurotoxin from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. *Eur. J. Biochem.* 238, 231–239.
- Rowan, E.G., 2001. What does  $\beta$ -bungarotoxin do at the neuromuscular junction? *Toxicon* 39, 107–118. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00159-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00159-8)
- Roze, J.A., 1996. *Coral Snakes of the Americas Biology Identification and Venoms*. Krieger Publishing Company, Malabar, USA.
- Sanz, L., Pla, D., Pérez, A., Rodríguez, Y., Zavaleta, A., Salas, M., Lomonte, B., Calvete,

- J.J., 2016. Venomic analysis of the poorly studied desert coral snake, *Micrurus tschudii tschudii*, supports the 3FTx/PLA2 dichotomy across *Micrurus* venoms. *Toxins (Basel)*. 8, 9–12. <https://doi.org/10.3390/toxins8060178>
- Sanz, L., Quesada-Bernat, S., Ramos, T., Casais-e-Silva, L.L., Corrêa-Netto, C., Silva-Haad, J.J., Sasa, M., Lomonte, B., Calvete, J.J., 2019. New insights into the phylogeographic distribution of the 3FTx/PLA 2 venom dichotomy across genus *Micrurus* in South America. *J. Proteomics* 200, 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.03.014>
- Scott, D.L., White, S.P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M.H., Sigler, P.B., 1990. Interfacial catalysis: The mechanism of phospholipase A2. *Science* 80. 250, 1541–1546. <https://doi.org/10.1126/science.2274785>
- Secretaría de Salud (Mexico), 2017. Boletín Epidemiológico. Vigilancia Epidemiológica Semana 52. 2003 - 2017, Boletín Epidemiológico SINAVE. Ciudad de México.
- Serafim, F.G., Reali, M., Cruz-Höfling, M.A., Fontana, M.D., 2002. Action of *Micrurus dumerilii carinicauda* coral snake venom on the mammalian neuromuscular junction. *Toxicon* 40, 167–174.
- Shiloah, J., Klibansky, C., de Vries, A., Berger, A., 1973. Phospholipase B activity of a purified phospholipase A from *Vipera pahstinae* venom. *J. Lipid Res.* 14, 267–278.
- Soares, A.M., Giglio, J.R., 2003. Chemical modifications of phospholipases A2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. *Toxicon* 42, 855–868. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2003.11.004>
- Strickland, J.L., Mason, A.J., Rokyta, D.R., Parkinson, C.L., 2018. Phenotypic variation in Mojave Rattlesnake (*Crotalus scutulatus*) venom is driven by four toxin families. *Toxins (Basel)*. 1–23. <https://doi.org/10.3390/toxins10040135>
- Tasoulis, T., Isbister, G.K., 2017. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. *Toxins (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>
- Terra, A.L.C., Moreira-Dill, L.S., Simões-Silva, R., Monteiro, J.R.N., Cavalcante, W.L.G., Gallacci, M., Barros, N.B., Nicolete, R., Teles, C.B.G., Medeiros, P.S.M., Zanchi, F.B., Zuliani, J.P., Calderon, L.A., Stábeli, R.G., Soares, A.M., 2015. Biological characterization of the Amazon coral *Micrurus spixii* snake venom: Isolation of a new neurotoxic phospholipase A2. *Toxicon* 103, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2015.06.011>
- Tsetlin, V.I., 2015. Three-finger snake neurotoxins and Ly6 proteins targeting nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological tools and endogenous modulators. *Trends Pharmacol. Sci.* 36, 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.11.003>
- Uetz, P., Hallermann, J., s/f. Reptile Database [WWW Document]. Reptil. Database. URL [http://reptile-database.reptarium.cz/advanced\\_search?taxon=Elapidae&submit=Search](http://reptile-database.reptarium.cz/advanced_search?taxon=Elapidae&submit=Search) (consultado 1.1.17).
- Urdaneta, A.H., Bolaños, F., Gutiérrez, J.M., 2004. Feeding behavior and venom toxicity of coral snake *Micrurus nigrocinctus* (Serpentes: Elapidae) on its natural prey in captivity. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 138, 485–492. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.08.018>
- Van der Laat, M., Fernández, J., Durban, J., Villalobos, E., Camacho, E., Calvete, J.J., Lomonte, B., 2013. Amino acid sequence and biological characterization of BlatPLA2, a non-toxic acidic phospholipase A2 from the venom of the arboreal

- snake *Bothriechis lateralis* from Costa Rica. *Toxicon* 73, 71–80.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.07.008>
- Vergara, I., Pedraza-Escalona, M., Paniagua, D., Restano-Cassulini, R., Zamudio, F., Batista, C.V.F., Possani, L.D., Alagón, A., 2014. Eastern coral snake *Micrurus fulvius* venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipases A2. *J. Proteomics* 105, 295–306. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.027>
- Wood, A., Schauben, J., Thundiyil, J., Kunisaki, T., Sollee, D., Lewis-Younger, C., Bernstein, J., Weisman, R., 2013. Review of Eastern coral snake (*Micrurus fulvius fulvius*) exposures managed by the Florida Poison Information Center Network: 1998–2010. *Clin. Toxicol.* 51, 783–788.  
<https://doi.org/10.3109/15563650.2013.828841>
- Yañez Mendoza, M.F., 2019. Efecto del veneno de la serpiente de coral *Micrurus browni* en modelo de mamífero y reptil. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Yang, D.C., Dobson, J., Cochran, C., Dashevsky, D., Arbuckle, K., Benard, M., Boyer, L., Alagón, A., Hendrikx, I., Hodgson, W.C., Fry, B.G., 2017. The Bold and the Beautiful: a Neurotoxicity Comparison of New World Coral Snakes in the *Micruroides* and *Micrurus* Genera and Relative Neutralization by Antivenom. *Neurotox. Res.* 32, 487–495. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9771-4>
- Zhao, H., Tang, L., Wang, X., Zhou, Y., Lin, Z., 1998. Structure of a snake venom phospholipase A2 modified by p-bromo-phenacyl-bromide. *Toxicon* 36, 875–86.  
[https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00169-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00169-4)

# ANEXOS



# ANEXOS

## Anexo I. Análisis proteómico de fracciones de veneno de *M. b. browni* purificadas mediante RP-HPLC

Fracción	T.R. (min)	% total	Peso Molecular (Da)		Ion		Secuencia (MS/MS)	Conf (%)	Sco (%)	Cob (%)	Proteína relacionada; código; especie	Familia Proteica
			ESI-MS	SDS-PAGE*	m/z	z						
<b>1 - 6</b>			ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	péptido/no-proteico
<b>7</b>	27.47	3.89	6,588.00	11,000	1756.8	1	MICHNQSSQPPTTK	99	10	24.6	scNTx 1; P68419; <i>Naja nivea</i>	3FTx
<b>8a</b>	29.11	0.12	6,813.00	20,000	-	-	-	-	-	-	-	No ID
<b>8b</b>		3.52		11,000	1696.7	1	YSAGLQTSQTCPAGQK	99	9	57.1	3FTx-B.C; AKN63206; <i>Micrurus browni</i>	3FTx
<b>9</b>	30.04	1.01	6,588.20	11,000	1772.8	1	MICHNQSSQPPTTK	99	8	24.6	short neurotoxin 1; P68419; <i>Naja nivea</i>	3FTx
<b>10a</b>	33.01	0.45	7,132.01; 6,425.30	10,500	-	-	-	-	-	-	-	No ID
<b>10b</b>					1725.9	1	VCYTTFLVGPSQPEK	99	11	27.6	lcNTx-1c; tr[U3FYQ1]; <i>Micrurus fulvius</i>	3FTx
<b>11</b>	33.35	1.69	6,541.4; 7,132.87	10,500	1725.8	1	VCYTTFLVGPSQPEK	99	14	27.6	lcNTx-1c; U3FYQ1; <i>Micrurus fulvius</i>	3FTx
					1036.3	1	WGCAASCPK	74.9	9			
<b>12a</b>	34.11	1.74	6,468.34; 6,541.2	10,500	975.4	1	KFWSHDR	-	-	man	scNTx-B.D; A0A0H4J512; <i>Micrurus browni</i>	3FTx
<b>12b</b>					1375.6	1	ENLCFTMF SAR	99	12	13.9	3FTx-B.F; AKO63244; <i>Micrurus browni</i>	3FTx
<b>13</b>	35.13	0.64	6,438.04	10,500	940.5	1	NPAQIER	99	12	10.1	3FTx-13a; A0A194ARE8; <i>Micrurus tener</i>	3FTx
<b>14</b>	37.17	0.54	7,077.59; 7,176.2	10,500	1772.8	1	VCYTIFLVGPSYPEK	99	14	17.9	lcNTx-6; U3FYQ0; <i>Micrurus fulvius</i>	3FTx
<b>15</b>	37.57	1.73	7,233; 6,560.01	11,000	1772.8	1	VCYTIFLVGPSYPEK	99	16	28.6	lcNTx-6; U3FYQ0; <i>Micrurus fulvius</i>	3FTx
					1050.4	1	WGCAASCP <sup>PyK</sup>	89.6	11			
					989.4	1	SFQFH PAR	97.5	9	26.5	3FTx-B.B; A0A0H4BJD8; <i>Micrurus browni</i>	
<b>16a</b>	40.09	0.13	7,436.9; 7,564.75	14,000	989.4	1	SFQFH PAR	99	9	8.2	3FTx-B.B; A0A0H4BJD8; <i>Micrurus browni</i>	3FTx
<b>16b</b>		1.69		10,500	2071.1	1	GENLCFTIFSQFH PAR	99	13	29.6	3FTx-D.L; A0A0H4BLZ2; <i>Micrurus diastema</i>	3FTx
				989.4	1	SFQFH PAR	99	11				
<b>17a</b>	41.23	0.13	7,437.76;	14,000	1179.6	1	YEEPS <sup>cmPox</sup> TAGR	99	11	4.8	tropomiosina; ETE73056; <i>Ophiophagus hannah</i>	no veneno
<b>17b</b>		1.01	7,565.1	10,500	1324.6	1	AIEFGCAASmeCPK	99	15	48	3FTx-B.B; A0A0H4BJD8; <i>Micrurus browni</i>	3FTx

					2070.9	1	GENLCFTIFSQFHPAR	99	14				
					2045.9	1	VGLGPHVTCCSADNCNSR	99	15				
					989.4	1	SFQFHPAR	99	13				
<b>17c</b>					1277.6	1	BRCYVGYFK	-	-	man	3FTx; AKN63200; <i>Micrurus diastema</i>		3FTx
					1790.9	1	SYELPDGQVITIGNER	99	8	12.7			
<b>18a</b>	0.48		14,000		1515.7	1	IWHHTFYNELR	99	9		actina; V8NV61; <i>Ophiophagus hannah</i>		no veneno
					1130.5	1	GYSFVTTAER	98.8	7				
	41.47		6,366.81		1179.6	1	YEEPS <sup>cmPox</sup> TAGR	99	11	man	tropomiosina; ETE73056; <i>Ophiophagus hannah</i>		
					2070.9	1	GENLCFTIFSQFHPAR	99	10				
<b>18b</b>	1.66		10,500		2045.9	1	VGLGPHVTCCSADNCNSR	99	14				
					989.4	1	SFQFHPAR	99	13	48	3FTx-B.B; A0A0H4BJD8; <i>Micrurus browni</i>		3FTx
					1338.6	1	AIEFGCAASCPK <sup>fo</sup>	74.7	10				
<b>19a</b>	42.47	0.38	6,370.37; 7,665.3	14,000	974.4	1	CCRVHDK	95.3	8	4.9	phospholipase A <sub>2</sub> -24; U3FYP5; <i>Micrurus fulvius</i>		PLA2
<b>19b</b>		0.55	7,437.00	10,500	1277.6	1	BRCYVGYFK	-	-	man	3FTx; AKN63200; <i>Micrurus diastema</i>		3FTx
<b>20a</b>		2.37		11,000	1548.8	1	APYNNKNFKIDPK	99	7	9	PLA2-4b; U3EPD8; <i>Micrurus fulvius</i>		PLA2
<b>20b</b>	43.05	0.44	6,454.50	10,500	995.5	1	WHMLVPGR	99	9	15.1	3FTx-12; U3EPM9; <i>Micrurus fulvius</i>		3FTx
<b>20d</b>		0.32		9,500	-	-	-	-	-	-	-		No ID
					1387.5	1	CKEFVCNCDR	98.6	10	7.1	PLA2; F5CPF0; <i>Micrurus altirostris</i>		
<b>21</b>	43.43	5.43	7,297.6; 13,408.14	14,000	2961.2	1	HWVSFTNYGCYCGYGGSGTPVDELDK	98.7	9	man	nigroxin B; P81167; <i>Micrurus nigrocinctus</i>		PLA2
<b>22a</b>					1179.6	1	YEEPS <sup>cmPox</sup> TAGR	99	11	man	tropomiosina; ETE73056; <i>Ophiophagus hannah</i>		no veneno
					1373.5	1	CKDFVCNCDR	99	12	7	phospholipase A <sub>2</sub> -24; U3FYP5; <i>Micrurus fulvius</i>		
<b>22b</b>	44.00	6.88	13,485.3; 7,296	14,000	1085.4	1	DFVCNCDR	95.9	9				PLA2
					1387.5	1	CKEFVCNCDR	99	14	7.1	PLA2; F5CPF0; <i>Micrurus altirostris</i>		
					1071.5	1	APYNNNNHK	99	12	6.2	PLA2-3b; U3FYP1; <i>Micrurus fulvius</i>		
<b>23</b>	44.98	0.97	6,073.02; 7,777.4; 7,645.97	15,000	3112.3	1	SWTHYVSYGCY <sup>io</sup> CGYGGSGTPVDELDR	99	10	18.1	PLA2-BF-42; B2KNL6; <i>Bungarus fasciatus</i>		PLA2
<b>24a</b>	45.90		13,431.00		1179.6	1	YEEPS <sup>cmPox</sup> TAGR	99	11	man	tropomiosina; ETE73056; <i>Ophiophagus hannah</i>		no veneno

					1373.5	1	CKDFVCNCDR	99	11	25	PLA2-24; U3FYP5; <i>Micrurus fulvius</i>	
<b>24b</b>	5.95		14,000		3011.3	1	HWLSFTN <sup>dm</sup> YGCYCGYGGSGTPVDELDR	94	8			PLA2
					1085.4	1	DFVCNCDR	89.1	8			
					974.4	1	CCRVHDK	33.7	7			
					1387.5	1	CKEFVCNCDR	99	13	7.1	PLA2; F5CPF0; <i>Micrurus altirostris</i>	
<b>25a</b>					1179.6	1	YEEPS <sup>cmPox</sup> TAGR	99	13	man	tropomiosina; ETE73056; <i>Ophiophagus hannah</i>	no veneno
<b>25b</b>	46.66	2.92	13,400.60	14,000	1387.5	1	CKEFVCNCDR	99	9	7.1	PLA2; F5CPF0; <i>Micrurus altirostris</i>	PLA2
					1373.5	1	CKDFVCNCDR	99	7	7	phospholipase A <sub>2</sub> -24; U3FYP5; <i>Micrurus fulvius</i>	
<b>26a</b>	47.90	3.81	7,645.60	19,000	1546.6	1	APYDDNNFMMNSK	99	8		PLA2-21; U3EPF6; <i>Micrurus fulvius</i>	PLA2
					1702.8	1	APYDDNNFMMNSKR	99	19			
<b>26b</b>					1179.6	1	YEEPS <sup>cmPox</sup> TAGR	98.3	9	man	tropomiosina; ETE73056; <i>Ophiophagus hannah</i>	no veneno
<b>27a</b>		1.35		11,000	1691.8	1	ANTLMCDNSNVPSIR	99	8	14.8	three-finger toxin-9a; A0A194APE1; <i>Micrurus tener</i>	3FTx
	48.89		7,570; 7,645;		1529.8	1	TFFTPGFGWTQIK	99	11	17.1	3FTx-11; U3FAF0; <i>Micrurus fulvius</i>	
<b>27b</b>		1.13	7,181.4	10,000	1707.8	1	ANTLM <sup>ox</sup> CDNSNVPSLR	-	-	man	three-finger toxin-9a; A0A194APE1; <i>Micrurus tener</i>	3FTx
<b>27c</b>		0.99		9,000	1498.7	1	CGAFVDSYYFNR	99	10	14.3	KUN MitTx-a; G9I929; <i>Micrurus tener</i>	KUN
<b>28a</b>		0.01		26,000	1373.5	1	CKDFVCNCDR	99	7	7	phospholipase A <sub>2</sub> -24; U3FYP5; <i>Micrurus fulvius</i>	PLA2
<b>28b</b>		0.02		18,000	-	-	-	-	-	-	-	No ID
					1373.5	1	CKDFVCNCDR	99	12	7	phospholipase A <sub>2</sub> -24; U3FYP5; <i>Micrurus fulvius</i>	
<b>28c</b>		0.10		14,000	1085.4	1	DFVCNCDR	99	9			PLA2
	49.73		7,103; 13,248; 7,569.2; 7,133.6; 7,642.0		1071.4	1	APYNNNNHK	99	10	11.6	PLA2-3b; U3FYP1; <i>Micrurus fulvius</i>	
					1041.4	1	AFVCNCDR	57.5	6			
<b>28d</b>		0.04		11,000	1691.7	1	ANTLMCDNSNVPSIR	99	10		3FTx-9a; A0A194APE1; <i>Micrurus tener</i>	3FTx
					1529.7	1	TFFTPGFGWTQIK	99	17	31.8		
<b>28e</b>		0.23		10,500	1691.7	1	ANTLMCDNSNVPSIR	99	10		3FTx-9a; A0A194APE1; <i>Micrurus tener</i>	3FTx
					1529.7	1	TFFTPGFGWTQIK	99	14	31.8		
<b>28f</b>		0.13		9,000	1498.6	1	CGAFVDSYYFNR	99	11	14.3	KUN MitTx-a; G9I929; <i>Micrurus tener</i>	KUN
<b>29a</b>	50.94	0.10		26,000	1702.7	1	APYDDNNFMMNSKR	99	16	9.7	PLA2-21; U3EPF6; <i>Micrurus fulvius</i>	PLA2



<b>29b</b>	0.26		14,000	1702.7	1	APYDDNNFMMNSKR	99	15	9.7	PLA2-21; U3EPF6; <i>Micrurus fulvius</i>	PLA2
		6,447.43;		1498.6	1	CGAFVDSYYFNR	96.3	8	14.3	KUN MitTx-a; G9I929; <i>Micrurus tener</i>	KUN
<b>29c</b>	1.58	7,103.65;	9,000	1498.6	1	CGAFVDSYYFNR	99	16			
		13,179.21		1659.6	1	PAFCYE <sup>me</sup> DPPFFQK	99	15	29.8	KUN MitTx-a; G9I929; <i>Micrurus tener</i>	KUN
<b>30a</b>	3.66		18,000	1670.6	1	APYDDNNFM <sup>dtM<sup>ox</sup></sup> NSKR	99	16	15.3	PLA2-21; U3EPF6; <i>Micrurus fulvius</i>	
				1051.4	1	DLVCNCDR	75.7	8			PLA2
				1107.5	1	NMIQCANTR	99	11	6.6	PLA2-D6; POCAT1; <i>Micrurus pyrrhocryptus</i>	
<b>30b</b>	51.46	7,103.31;		1085.4	1	DFVCNCDR	99	9	16.9	phospholipase A <sub>2</sub> -24; U3FYP5; <i>Micrurus fulvius</i>	
		6,448.3; 6,838.5;		1373.5	1	CKDFVCNCDR	99	13			
		13,469.7	15,000	1702.7	1	APYDDNNFMMNSKR	99	16	9.7	PLA2-21; U3EPF6; <i>Micrurus fulvius</i>	PLA2
	4.13			1387.5	1	CKEFVCNCDR	99	10	7.1	PLA2; F5CPF0; <i>Micrurus altirostris</i>	
<b>31a</b>	52.81	0.00	14,000	1071.4	1	APYNNNNHK	99	11	6.2	PLA2-3b; U3FYP1; <i>Micrurus fulvius</i>	PLA2
				1071.4	1	APYNNNNHK	99	14	17.1	PLA2-3b; U3FYP1; <i>Micrurus fulvius</i>	
<b>31b</b>	3.47	13,182.97	14,000	1041.4	1	AFVCNCDR	99	12			PLA2
				2883.1	1	S <sup>fo</sup> AWDFTNYGCYCGAGGSGTPVDELDR	99	17	23.3	PLA2; Q8AXW7; <i>Micrurus corallinus</i>	
<b>32a</b>	0.05		19,000	1071.4	1	APYNNNNHK	99	10			
			14,000	1298.6	1	LTLYTSTCSPR	99	7	13.7	phospholipase A <sub>2</sub> -3b; U3FYP1; <i>Micrurus fulvius</i>	PLA2
<b>32b</b>	53.93	0.44		1071.4	1	APYNNNNHK	99	11	6.2	PLA2-3b; U3FYP1; <i>Micrurus fulvius</i>	
		7,585.89;		1298.6	1	LTLYTSTCSPR	99	9			PLA2
		7,453.8; 7,569.6;		1621.7	1	APYNTKNFM <sup>oxM<sup>di</sup></sup> NDK	99	11	8.7	PLA2-6; A6MFM5; <i>Demansia vestigiata</i>	
<b>32c</b>	0.00	12,070	12,000	-	-	-	-	-	-	-	No ID
<b>33a</b>	1.43		15,000	1621.7	1	APYNTKNFM <sup>oxM<sup>di</sup></sup> NDK	99	14	8.7	PLA2-6; A6MFM5; <i>Demansia vestigiata</i>	PLA2
<b>33b</b>	54.41	0.23	12,000	1306.6	1	ICDVSSIPFLR	99	8	12.6	3FTx-15b; A0A194ATD1; <i>Micrurus tener</i>	3FTx
<b>33c</b>	2.33	6,838.61;	9,000	1492.7	1	RSLSDDSM <sup>oxN<sup>am</sup></sup> SLIR	99	13	man	neurotrophin-3; ACB42333; <i>Micrurus fulvius</i>	NGF
		7,568.4									
<b>34a</b>	55.82	1.72	15,000	2799.1	1	GALDYADYGCYCGKGGSGTPVDELDR	99	10	17.1	PLA2-2; R4G2S8; <i>Denisonia devisi</i>	PLA2
<b>34b</b>	0.20	7,567.80	13,500	1810.9	1	TVENVGVSQVAPDNPER	99	10	14.7	vespryn; A0A194AR88; <i>Micrurus tener</i>	Vespryn/Ohanin

<b>34c</b>	6.69		12,000	1322.8	1	ICDDSSIPFLR	99	9	21.8	3FTx-6; U3EPK7; <i>Micrurus fulvius</i>	3FTx	
				1478.9	1	RICDDSSIPFLR	99	12				
<b>34d</b>	0.36		9,000	-	-	-	-	-	-	-	No ID	
<b>35a</b>	0.00		14,000	1276.8	1	NLNQFRLMIK	99	10	6.7	MitTx-b; G9I930; <i>Micrurus tener</i>	PLA2	
<b>35b</b>	58.06	3.56	13,696.57	2030	1	VHGCKPLVMFYSECR	99	12	20.8	MitTx-b; G9I930; <i>Micrurus tener</i>	PLA2	
				1880.9	1	VWADFVDYGCYCVAR	99	7				
<b>35c</b>				-	-	-	-	-	-	-	No ID	
<b>36a</b>				-	-	-	-	-	-	-	No ID	
<b>36b</b>	63.73		ND	-	-	-	-	-	-	-	No ID	
<b>36c</b>	0.93			18,000	1005.5	IWEWTDR	95.1	8	10.8	CTL-1a; U3EPK2; <i>Micrurus fulvius</i>	CTL	
<b>37</b>	64.57	0.64	15,969.24	1183.7	1	NVWIGLNDPR	99	8	10.8	CTL-1a; U3EPK2; <i>Micrurus fulvius</i>	CTL	
				1005.5	1	IWEWTDR	95.1	8				
<b>38</b>	66.18	0.37	ND								No ID	
				2309.9	1	ISDEPLYEFSSCSVQQHQR	99	10				
<b>39</b>	70.55	1.50	ND	2324	1	ISDEP <sup>py</sup> LYEFSSCSVQQHQR	99	10	6.2	SVMP-4; U3FWL3; <i>Micrurus fulvius</i>	SVMP	
				1416.6	1	YIEFYVVVDNR	99	14				
				1054.4	1	TYWHYER	97.3	8				
<b>40a</b>	0.57			1054.6	1	TYWHYER	99	11	5.5	SVMP-4; U3FWL3; <i>Micrurus fulvius</i>	SVMP	
				1546	1	P <sup>oxT<sup>dh</sup></sup> ASVAVIQDYNNR	97.2	9				
<b>40b</b>	73.31	0.65	21,308.00	2310.2	1	ISDEPLYEFSSCSVQQHQR	99	12	6.4	SVMP-4; U3FWL3; <i>Micrurus fulvius</i>	SVMP	
				1054.6	1	TYWHYER	99	11				
<b>40c</b>	0.00			1054.6	1	TYWHYER	99	11	5.5	SVMP-4; U3FWL3; <i>Micrurus fulvius</i>	SVMP	
				1137.7	1	SVAVIQDYSR	95.2	5	3.4	SVMP-2; A0A194AR91; <i>Micrurus tener</i>	SVMP	
				1297.7	1	SAECTPDSFQR	89.4	6				
<b>41a</b>	0.07			100,000	1416.8	1	YIEFYVVVDNR	95.6	5	1.8	SVMP-4; U3FWL3; <i>Micrurus fulvius</i>	SVMP
					1416.8	1	YIEFYVVVDNR	99	7			
<b>41b</b>	73.67	0.50	5,565.41; 7,651.38; 22,680	2324	1	ISDEPLYEFSSCSVQQHQR	98.8	8	1.8	SVMP-4; U3FWL3; <i>Micrurus fulvius</i>	SVMP	
				1054.4	1	TYWHYER	95.2	8				

				1893.1	1	HLNFHIALTGLEIWTK	99	14				
<b>41c</b>	1.99		45,000	1416.8	1	YIEFYVVVDNR	99	15	9.1	SVMP-4; U3EPC7; <i>Micrurus fulvius</i>	SVMP	
				2053.1	1	TKPAYQFSSCSVQEHQR	97.2	6				
<b>41d</b>	0.23		37,000	1416.7	1	YIEFYVVVDNR	99	6	1.8	SVMP-4; U3FWL3; <i>Micrurus fulvius</i>	SVMP	
<b>41e</b>	0.03		37,000	1416.8	1	YIEFYVVVDNR	99	7	1.8	SVMP-4; U3FWL3; <i>Micrurus fulvius</i>	SVMP	
<b>41f</b>	0.03		37,000	1416.7	1	YIEFYVVVDNR	99	8	1.8	SVMP-4; U3FWL3; <i>Micrurus fulvius</i>	SVMP	
<b>42a</b>			60,000	-	-	-	-	-	-	-	No ID	
<b>42b</b>	75.97	0.37	29,039.61	30,000	1152.7	1	LPHYADWIK	99	9	2.5	prostaticin-like protein; U3FBP8; <i>Micrurus fulvius</i>	SVSP
<b>43a</b>		1.09		60,000	1416.7	1	YIEFYVVVDNR	99	10	1.8	SVMP-4; U3FWL3; <i>Micrurus fulvius</i>	SVMP
<b>43b</b>	76.77		ND	-	-	-	-	-	-	-	No ID	
<b>43c</b>				-	-	-	-	-	-	-	No ID	
<b>44a</b>		0.00		150,000	1484.8	1	EADYEEFLEIAR	99	9	5	LAAO-1a; U3FYQ2; <i>Micrurus fulvius</i>	LAAO
<b>44b</b>		0.18		150,000	-	-	-	-	-	-	No ID	
<b>44c</b>		0.07		150,000	-	-	-	-	-	-	No ID	
<b>44d</b>	79.13	1.53	19,676.00	55,000	1620.9	1	RFDEIVGGFDQLPK	98.7	7	2.7	LAAO-1a; U3FYQ2; <i>Micrurus fulvius</i>	LAAO
<b>44e</b>		0.12		50,000	1620.9	1	RFDEIVGGFDQLPK	95.1	6	2.7	LAAO-1a; U3FYQ2; <i>Micrurus fulvius</i>	LAAO
<b>44f</b>		0.10		48,000	1620.9	1	RFDEIVGGFDQLPK	99	8	2.7	LAAO-1a; U3FYQ2; <i>Micrurus fulvius</i>	LAAO
<b>44g</b>		0.00		45,000	1620.9	1	RFDEIVGGFDQLPK	99	7	2.7	LAAO-1a; U3FYQ2; <i>Micrurus fulvius</i>	LAAO
<b>45-48</b>	80.85-86.70	<b>2.2650</b>	ND	55,000	-	-	-	-	-	-	No ID	

T.R. Tiempo de Retención

Cob. Cobertura.

Valores de Confianza (Conf) y Score (Sco) calculados con el algoritmo Paragon® de ProteinPilot®.

Secuencias obtenidas mediante interpretación manual de espectros de MS/MS y posterior comparación con proteínas conocidas se indican con "man". X: Leu/Ile; B: Lys/Gln

Modificaciones de aminoácidos posibles, aunque no confirmadas están indicadas: <sup>ox</sup> oxidado; <sup>py</sup> pyroglutamico; <sup>cm</sup> carbamidometil; <sup>me</sup> metil; <sup>fo</sup> formil; <sup>io</sup> yodo; <sup>dm</sup> dimetil; <sup>di</sup> dioxidado; <sup>dh</sup> deshidratado; <sup>dt</sup> detiometil.

\* Estimaciones de masa molecular a partir de SDS-PAGE en condiciones reductoras.

Las cisteínas están carbamidometiladas.

## Anexo II. Análisis de PM determinados vs. teóricos de transcritos

PLA2				# de péptido (MS/MS)									
Transcritos	pIteórico	PMteórico	PM-14/PMdet*	21	22	24	25	28	29	31	32	35	
				<b>13,408.1</b>	<b>13,485.3</b>	<b>13,431.0</b>	<b>13,400.0</b>	<b>13,248.0</b>	<b>13,179.2</b>	<b>13,183.0</b>	<b>12,070.0</b>	<b>13,696.6</b>	
Brownitoxina 1B	8.8	13,196.0	<b>13,182.0</b>	226.2	303.3	249.0	218.0	66.0	-2.8	1.0	-1,112.0	514.6	
PLA2-9a_extender49	8.0	13,724.6	<b>13,710.6</b>	-302.5	-225.3	-279.6	-310.6	-462.6	-531.4	-527.7	-1,640.6	-14.1	
PLA2-7a_extender54	4.8	13,026.6	<b>13,012.6</b>	395.6	472.7	418.4	387.4	235.4	166.6	170.4	-942.6	684.0	
PLA33a_extender44	8.5	13,472.3	<b>13,458.3</b>	-50.2	27.0	-27.3	-58.3	-210.3	-279.1	-275.4	-1,388.3	238.3	
PLA33a_extender36	8.5	13,438.3	<b>13,424.3</b>	-16.2	61.0	6.7	-24.3	-176.3	-245.1	-241.3	-1,354.3	272.3	
PLA2_2a_extender50	8.9	13,443.4	<b>13,429.4</b>	-21.3	55.9	1.6	-29.4	-181.4	-250.2	-246.5	-1,359.4	267.1	
PLA3a_extender63	8.6	13,391.3	<b>13,377.3</b>	30.9	108.0	53.7	22.7	-129.3	-198.1	-194.3	-1,307.3	319.3	
PLA3a_extender43	8.6	13,467.4	<b>13,453.4</b>	-45.3	31.9	-22.4	-53.4	-205.4	-274.2	-270.4	-1,383.4	243.2	
PLA3a_extender40	8.6	13,453.4	<b>13,439.4</b>	-31.2	45.9	-8.4	-39.4	-191.4	-260.2	-256.4	-1,369.4	257.2	
PLA3a_extender26	8.6	13,501.4	<b>13,487.4</b>	-79.3	-2.1	-56.4	-87.4	-239.4	-308.2	-304.5	-1,417.4	209.1	

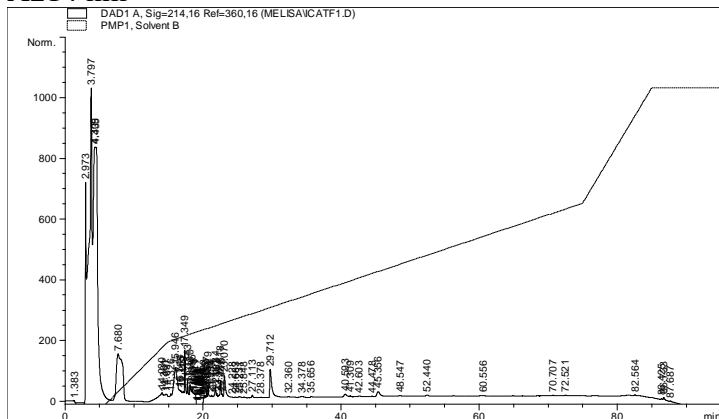
3FTx				# de péptido (MS/MS)											
Transcritos	pIteórico	PMteórico	PM-14/PMdet*	7y9	8	10,11	10	11,12	12,13	14	14	15	15	16,17,19	16,17
				<b>6588.0</b>	<b>6813.0</b>	<b>7132.0</b>	<b>6425.3</b>	<b>6541.0</b>	<b>6468.3</b>	<b>7077.6</b>	<b>7176.2</b>	<b>7233.0</b>	<b>6560.0</b>	<b>7436.9</b>	<b>7564.8</b>
3FTx-5a_extender24	8.7	6596.5	<b>6588.5</b>	-0.5	224.5	543.5	-163.2	-47.5	-120.2	489.1	587.7	644.5	-28.5	848.4	976.2
3FTx-9a_trinity18488	9.2	7578.8	<b>7570.8</b>	-982.8	-757.8	-438.8	-1145.5	-1029.8	-1102.4	-493.2	-394.6	-337.8	-1010.8	-133.9	-6.0
3FTx-8a_trinity18482	9.2	7655.0	<b>7647.0</b>	-1059.0	-834.0	-515.0	-1221.7	-1106.0	-1178.6	-569.4	-470.8	-414.0	-1087.0	-210.1	-82.2
3FTx-10a_extender30	9.3	7577.0	<b>7569.0</b>	-981.0	-756.0	-437.0	-1143.7	-1028.0	-1100.7	-491.4	-392.8	-336.0	-1009.0	-132.1	-4.3
3FTx-16a_trinity18492	8.2	6548.5	<b>6540.5</b>	47.5	272.5	591.5	-115.2	0.5	-72.1	537.1	635.7	692.5	19.5	896.4	1024.3
3FTx-20_trinity18305	5.5	6498.4	<b>6490.4</b>	97.6	322.6	641.6	-65.1	50.6	-22.1	587.2	685.8	742.6	69.6	946.5	1074.4
3FTx-18_trinity18499	7.7	7538.6	<b>7530.6</b>	-942.6	-717.6	-398.6	-1105.3	-989.6	-1062.2	-453.0	-354.4	-297.6	-970.6	-93.7	34.2
3FTx-18_trinity18496	7.7	7538.6	<b>7530.6</b>	-942.6	-717.6	-398.6	-1105.3	-989.6	-1062.2	-453.0	-354.4	-297.6	-970.6	-93.7	34.2
3FTx-19_trinity18309	6.7	6311.3	<b>6303.3</b>	284.7	509.7	828.7	122.0	237.7	165.1	774.3	872.9	929.7	256.7	1133.6	1261.5
3FTx-6a_trinity18312	8.7	6375.3	<b>6367.3</b>	220.7	445.7	764.7	58.0	173.7	101.1	710.3	808.9	865.7	192.7	1069.6	1197.5
LCN-1_trinity18494	9.7	7241.6	<b>7233.6</b>	-645.6	-420.6	-101.6	-808.3	-692.6	-765.3	-156.0	-57.4	-0.6	-673.6	203.3	331.2
3FTx-2_trinity13435	5.2	7537.8	<b>7529.8</b>	-941.8	-716.8	-397.8	-1104.5	-988.8	-1061.5	-452.2	-353.6	-296.8	-969.8	-92.9	34.9
3FTx-13a_trinity18497	8.7	6476.4	<b>6468.4</b>	119.6	344.6	663.6	-43.1	72.6	-0.1	609.2	707.8	764.6	91.6	968.5	1096.4
3FTx-11_trinity18474	8.2	6847.1	<b>6839.1</b>	-251.1	-26.1	292.9	-413.8	-298.1	-370.7	238.5	337.1	393.9	-279.1	597.8	725.7
3FTx-10a_trinity18485	9.6	6821.0	<b>6813.0</b>	-225.0	0.0	319.0	-387.7	-272.0	-344.7	264.6	363.2	420.0	-253.0	623.9	751.7
3FTx-7_trinit18843	8.5	7305.3	<b>7297.3</b>	-709.3	-484.3	-165.3	-872.0	-756.3	-829.0	-219.7	-121.1	-64.3	-737.3	139.6	267.4

3FTx				# de péptido (MS/MS)											
				18	19	19	20	21	22,26,27	27	29,30	30,33	32	32	32,33,34
Transcritos	plteórico	PMteórico	PM-14/PMdet*	6,366.8	6,370.4	7,665.3	6,454.5	7,297.6	7,646.0	7,570.7	6,447.4	6,838.5	7,585.9	7,453.8	7,569.6
3FTx-5a_extender24	8.7	6,596.5	6,588.5	-221.7	-218.2	1,076.8	-134.0	709.1	1,057.4	982.2	-141.1	250.0	997.4	865.3	981.1
3FTx-9a_trinity18488	9.2	7,578.8	7,570.8	-1,204.0	-1,200.4	94.5	-1,116.3	-273.2	75.2	-0.1	-1,123.4	-732.3	15.1	-117.0	-1.2
3FTx-8a_trinity18482	9.2	7,655.0	7,647.0	-1,280.2	-1,276.6	18.4	-1,192.5	-349.3	-1.0	-76.3	-1,199.6	-808.5	-61.1	-193.2	-77.3
3FTx-10a_extender30	9.3	7,577.0	7,569.0	-1,202.2	-1,198.7	96.3	-1,114.5	-271.4	76.9	1.7	-1,121.6	-730.5	16.9	-115.2	0.6
3FTx-16a_trinity18492	8.2	6,548.5	6,540.5	-173.7	-170.1	1,124.8	-86.0	757.1	1,105.5	1,030.2	-93.1	298.0	1,045.4	913.3	1,029.1
3FTx-20_trinity18305	5.5	6,498.4	6,490.4	-123.6	-120.0	1,174.9	-35.9	807.2	1,155.6	1,080.3	-43.0	348.1	1,095.5	963.4	1,079.2
3FTx-18_trinity18499	7.7	7,538.6	7,530.6	-1,163.8	-1,160.2	134.7	-1,076.1	-233.0	115.4	40.1	-1,083.2	-692.1	55.3	-76.8	39.0
3FTx-18_trinity18496	7.7	7,538.6	7,530.6	-1,163.8	-1,160.2	134.7	-1,076.1	-233.0	115.4	40.1	-1,083.2	-692.1	55.3	-76.8	39.0
3FTx-19_trinity18309	6.7	6,311.3	6,303.3	63.5	67.1	1,362.0	151.2	994.3	1,342.7	1,267.4	144.1	535.2	1,282.6	1,150.5	1,266.3
3FTx-6a_trinity18312	8.7	6,375.3	6,367.3	-0.5	3.1	1,298.0	87.2	930.3	1,278.7	1,203.4	80.1	471.2	1,218.6	1,086.5	1,202.3
LCN-1_trinity18494	9.7	7,241.6	7,233.6	-866.8	-863.2	431.7	-779.1	64.0	412.4	337.1	-786.2	-395.1	352.3	220.2	336.0
3FTx-2_trinity13435	5.2	7,537.8	7,529.8	-1,163.0	-1,159.5	135.5	-1,075.3	-232.2	116.1	40.9	-1,082.4	-691.3	56.1	-76.0	39.8
3FTx-13a_trinity18497	8.7	6,476.4	6,468.4	-101.6	-98.0	1,196.9	-13.9	829.2	1,177.6	1,102.3	-21.0	370.1	1,117.5	985.4	1,101.2
3FTx-11_trinity18474	8.2	6,847.1	6,839.1	-472.3	-468.7	826.2	-384.6	458.5	806.9	731.6	-391.7	-0.6	746.8	614.7	730.5
3FTx-10a_trinity18485	9.6	6,821.0	6,813.0	-446.2	-442.7	852.3	-358.5	484.6	832.9	757.7	-365.6	25.5	772.9	640.8	756.6
3FTx-7_trinit18843	8.5	7,305.3	7,297.3	-930.5	-926.9	368.0	-842.8	0.3	348.7	273.4	-849.9	-458.8	288.6	156.5	272.3

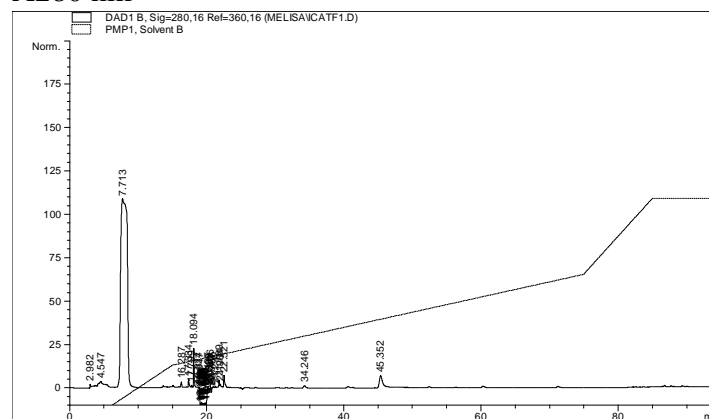
## Anexo III. RP-HPLC de fracciones de Intercambio catiónico

Fracción I (140 µg)

A214 nm

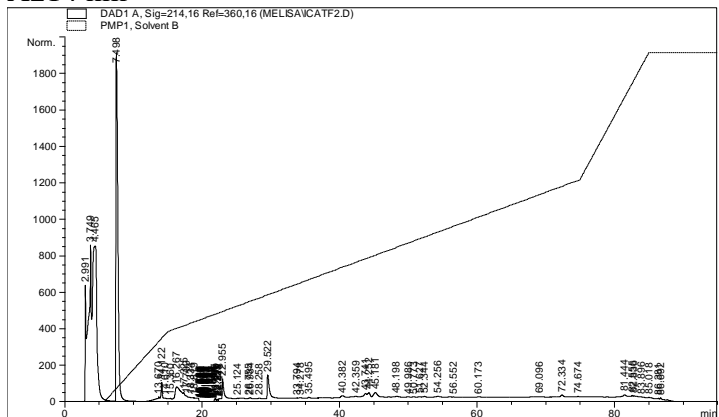


A280 nm

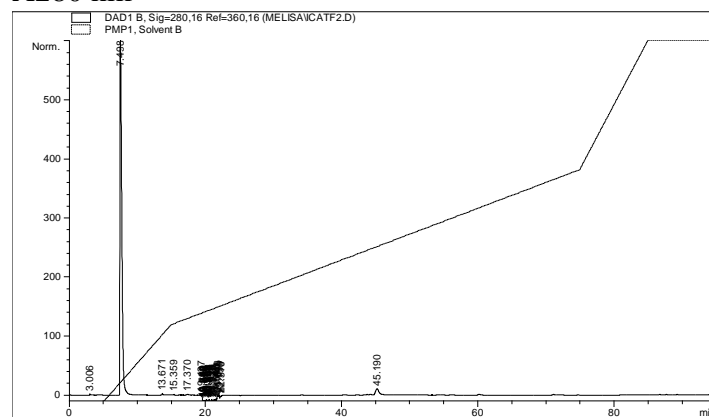


Fracción II (125 µg)

A214 nm

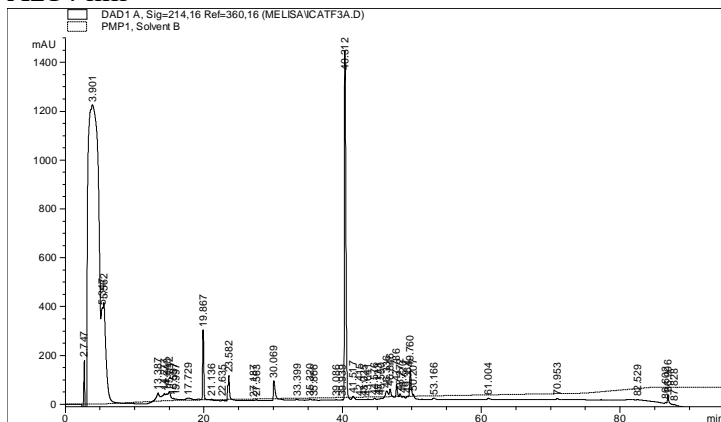


A280 nm

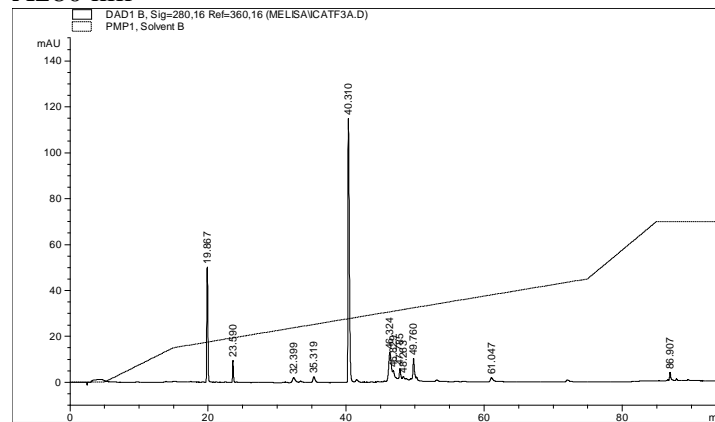


Fracción III (76 µg)

### A214 nm

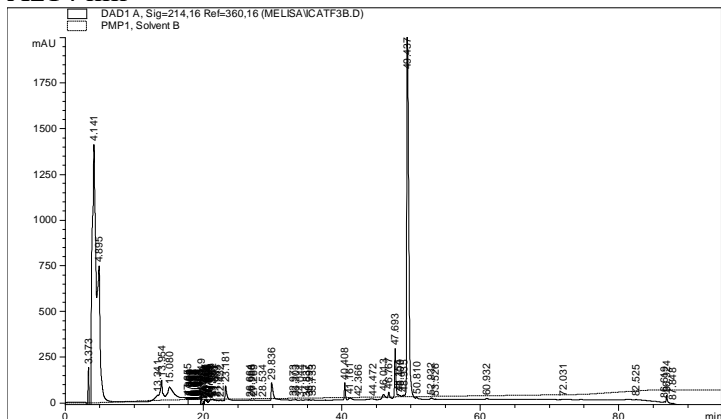


### A280 nm

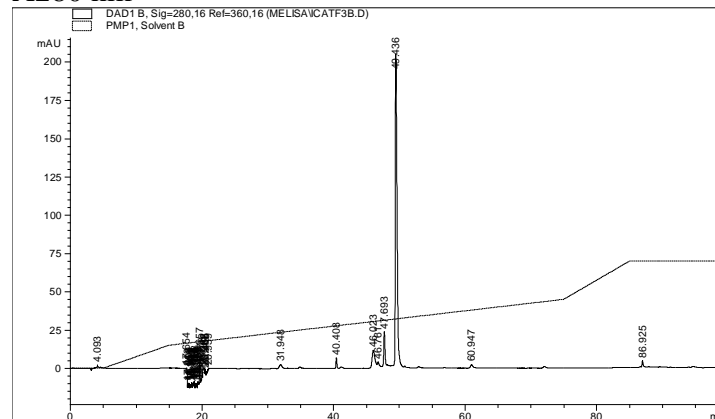


### Fracción IV (94 µg)

#### A214 nm

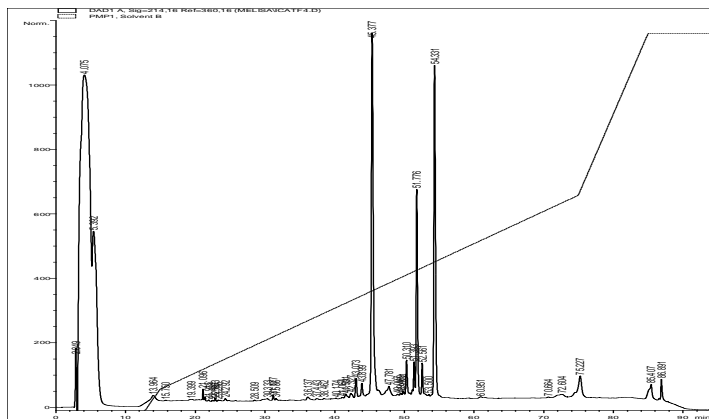


#### A280 nm

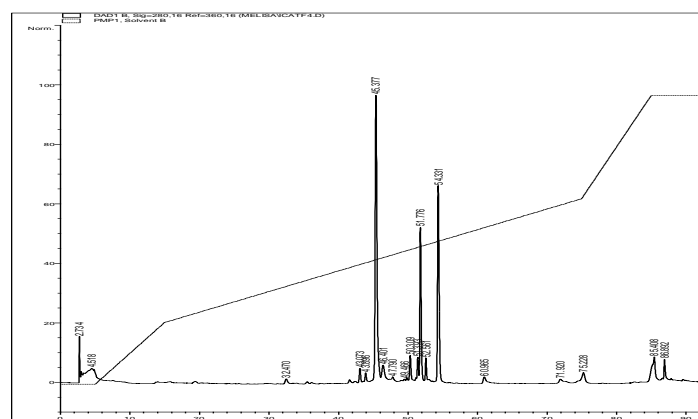


### Fracción VI (100 µg)

### A214 nm

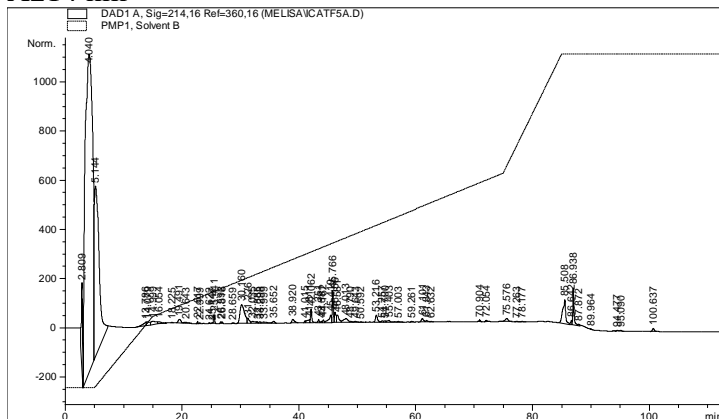


### A280 nm

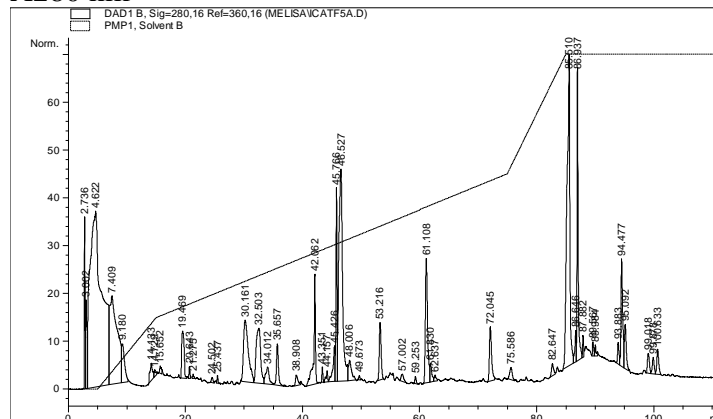


### Fracción VII (60 µg)

#### A214 nm



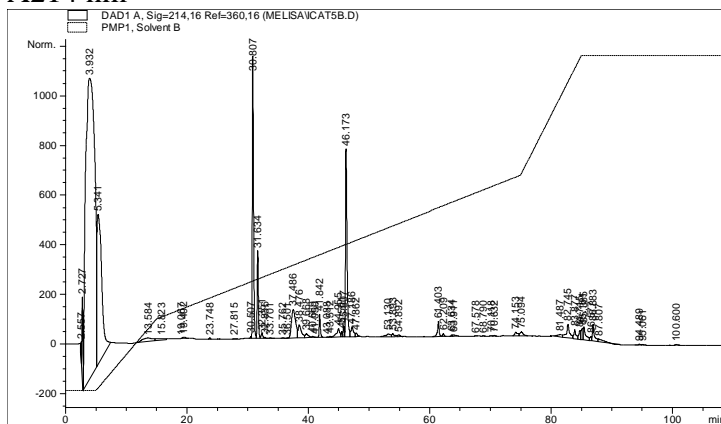
#### A280 nm



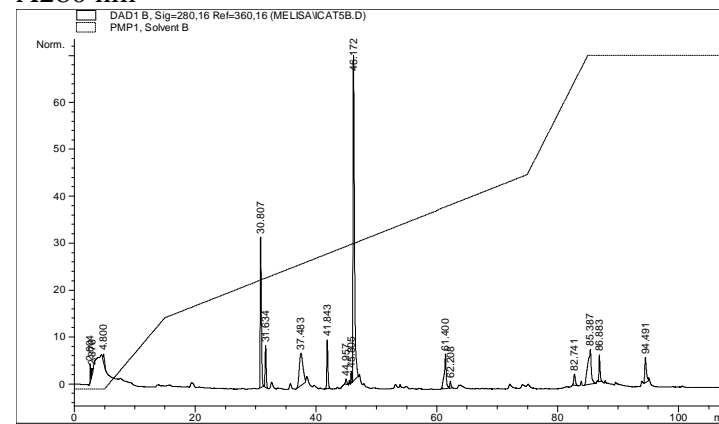


### Fracción VIII (70 µg)

A214 nm

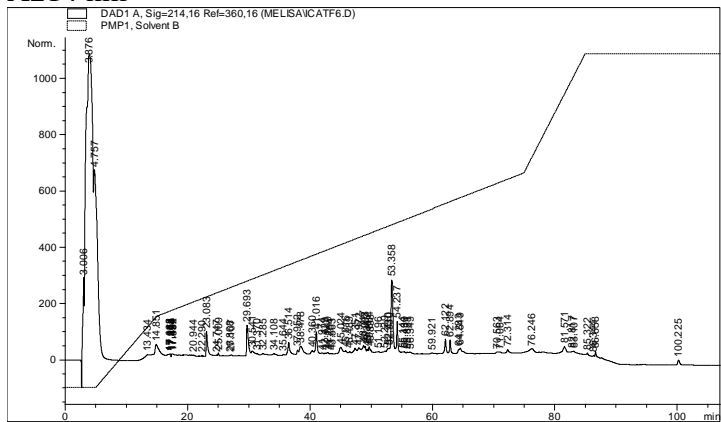


A280 nm

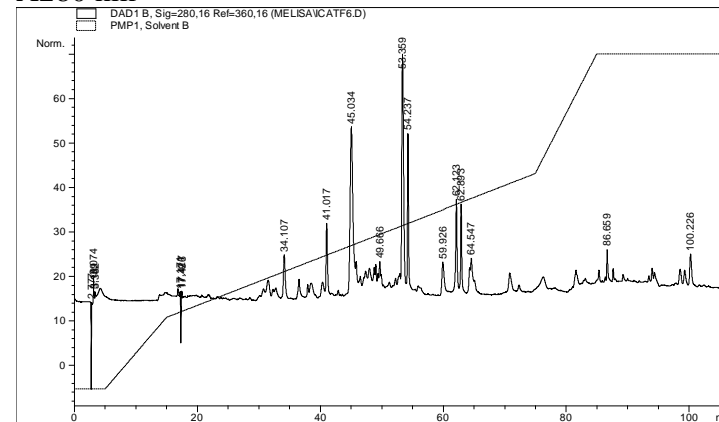


### Fracción IX (40 µg)

A214 nm

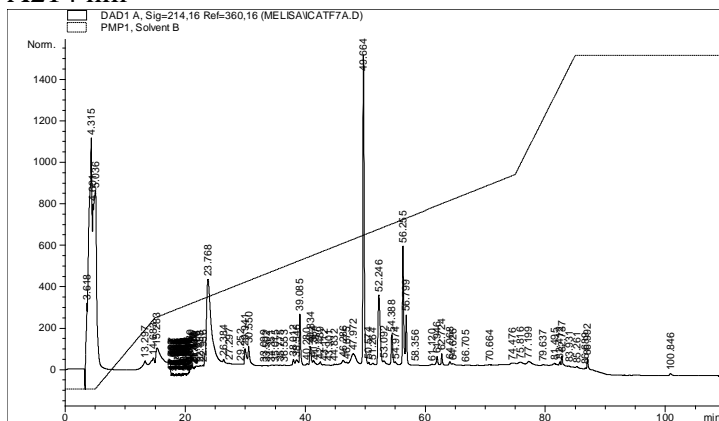


A280 nm

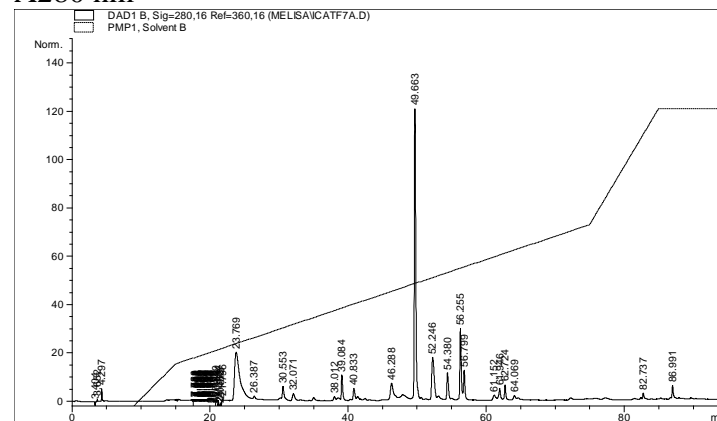


### Fracción X (120 µg)

A214 nm

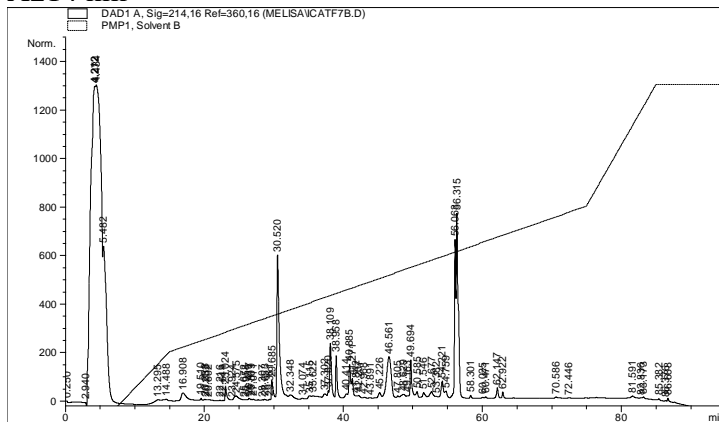


A280 nm

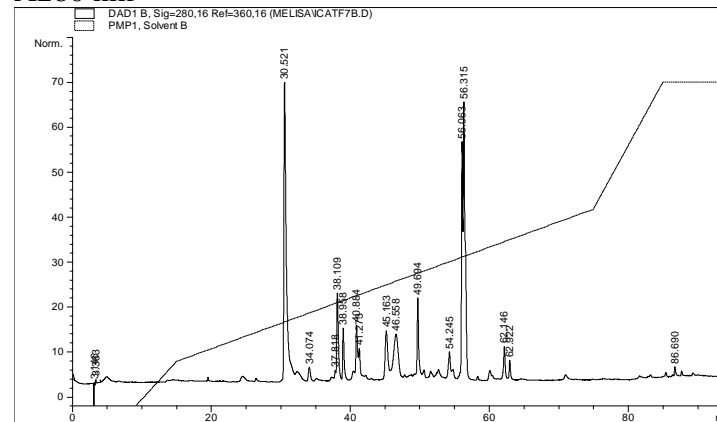


### Fracción XI (95 µg)

A214 nm

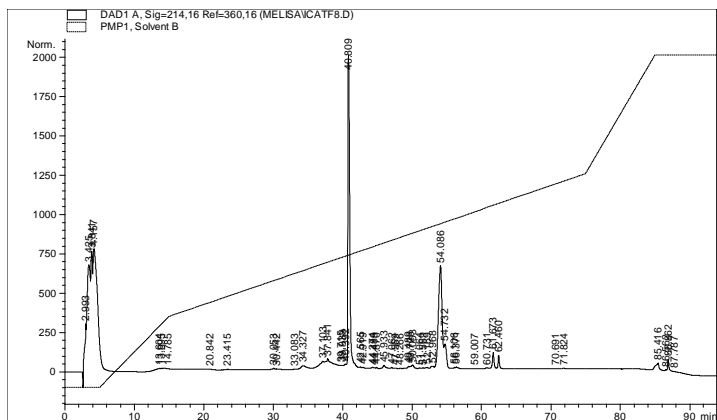


A280 nm

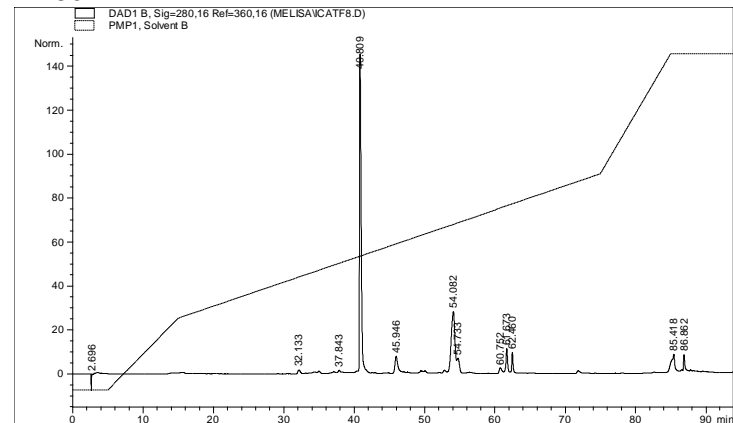


### Fracción XII (93 µg)

A214 nm

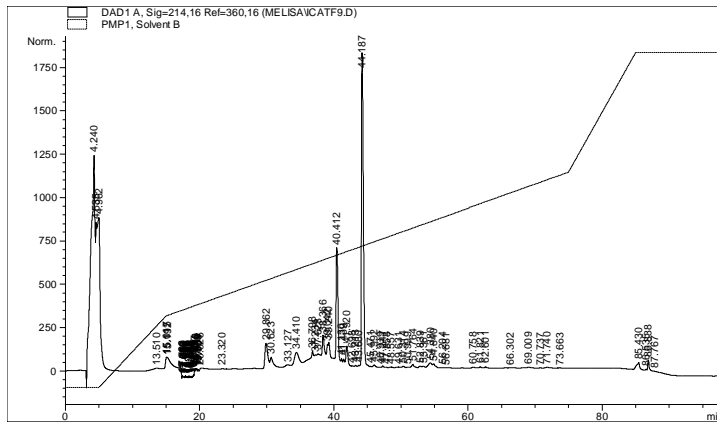


A280 nm

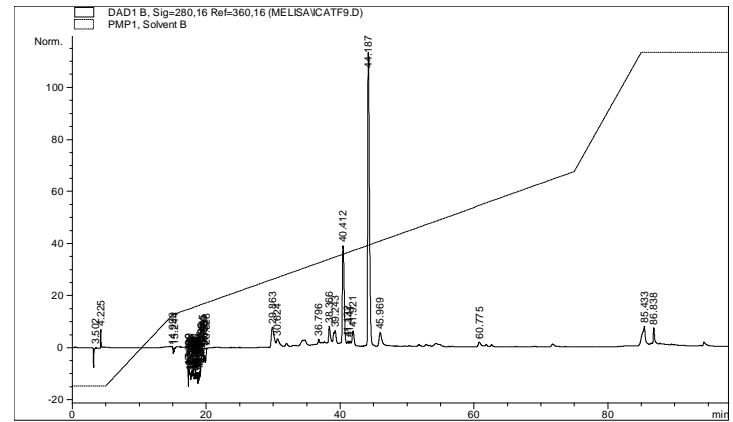


### Fracción XIII (90 µg)

A214 nm

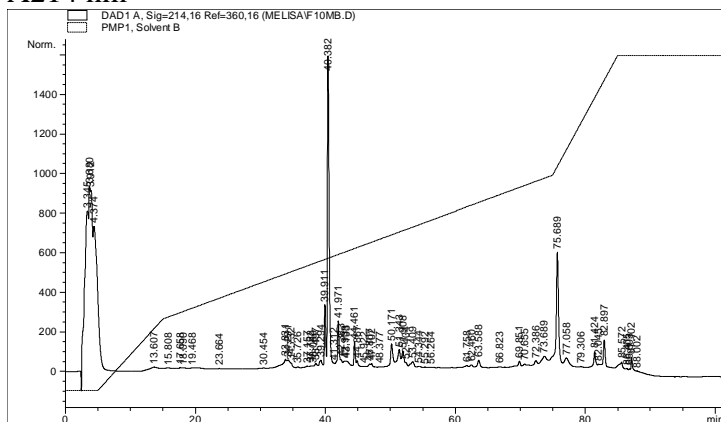


A280 nm

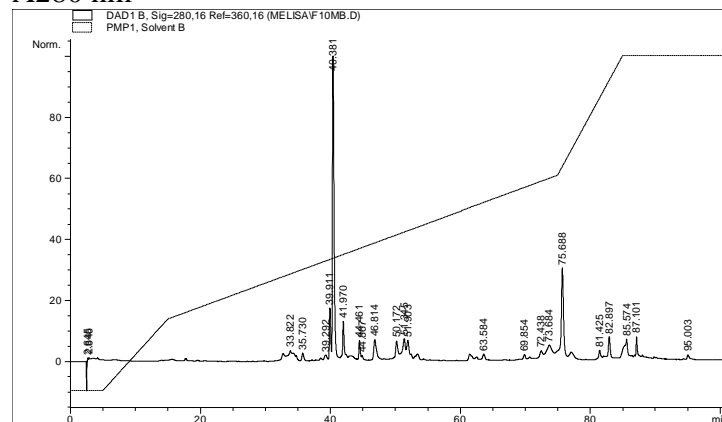


### Fracción XIV (66 µg)

A214 nm

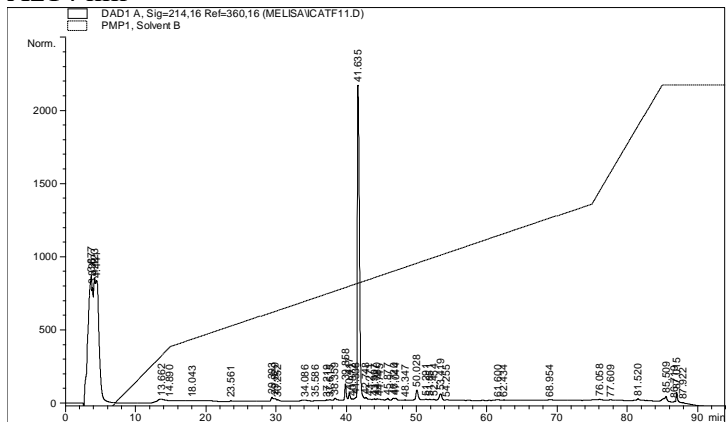


A280 nm

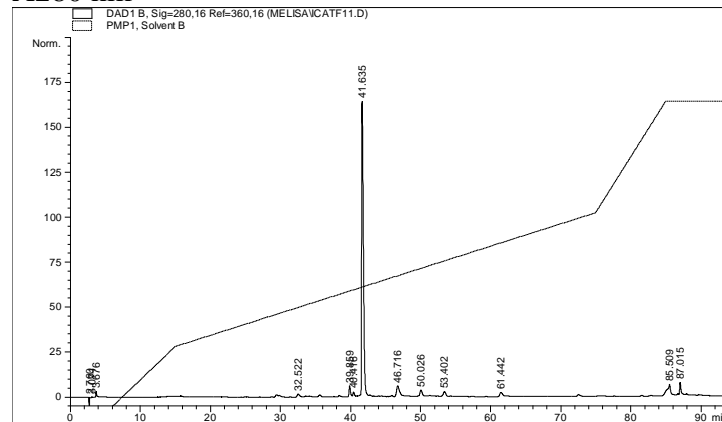


### Fracción XV (80 µg)

A214 nm

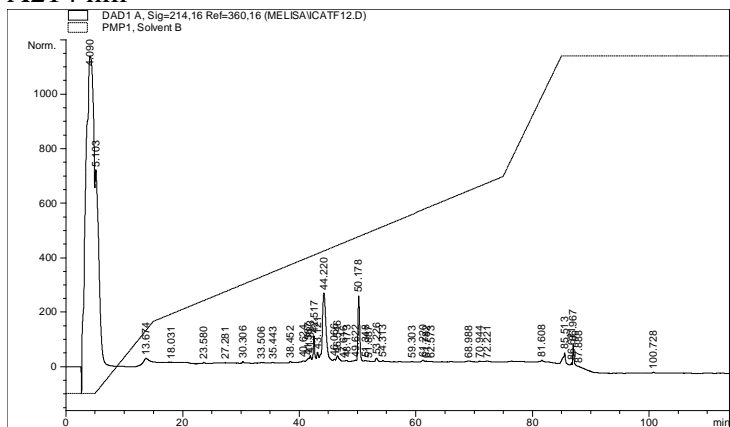


A280 nm

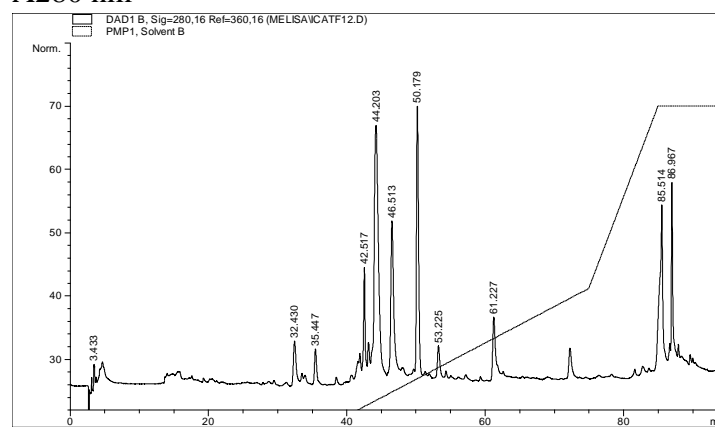


### Fracción XVI (48 µg)

A214 nm

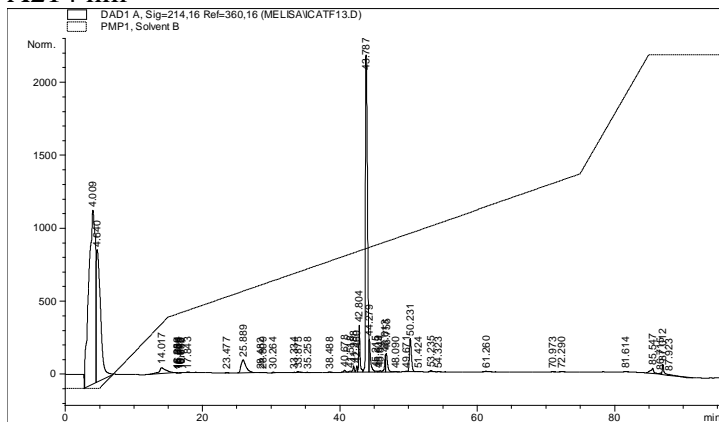


A280 nm

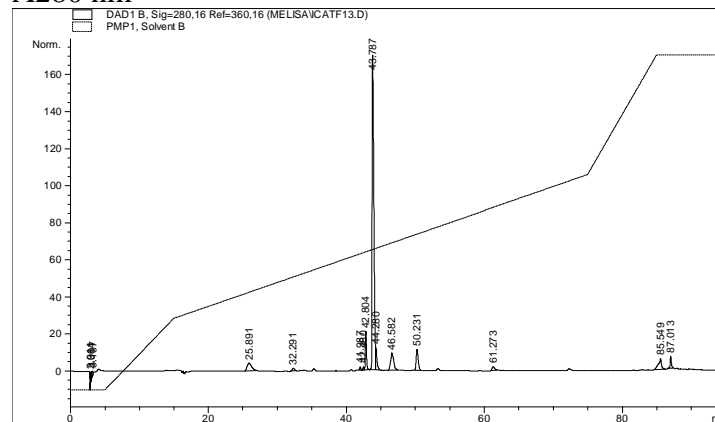


### Fracción XVII (87 µg)

A214 nm

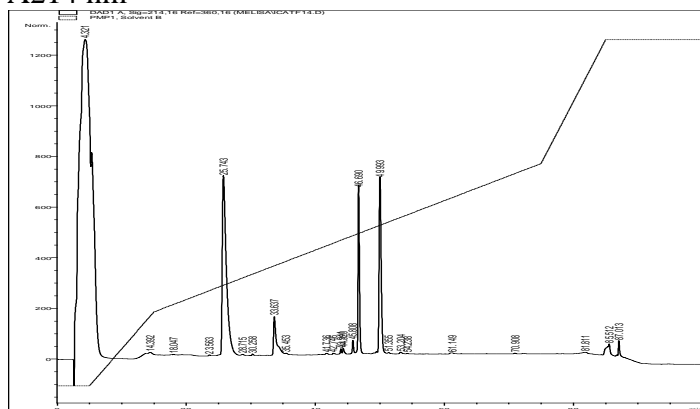


A280 nm

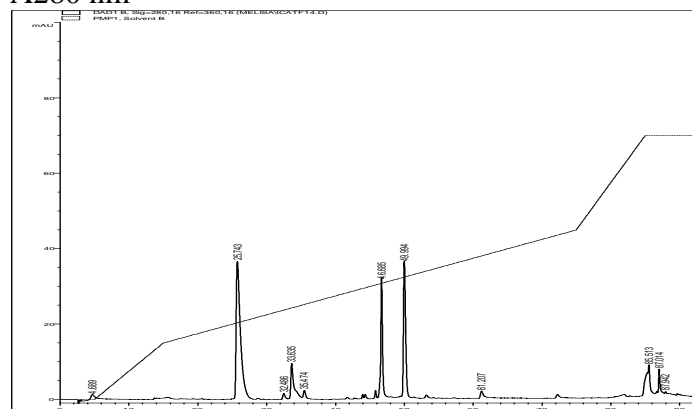


### Fracción XVIII (80 µg)

A214 nm

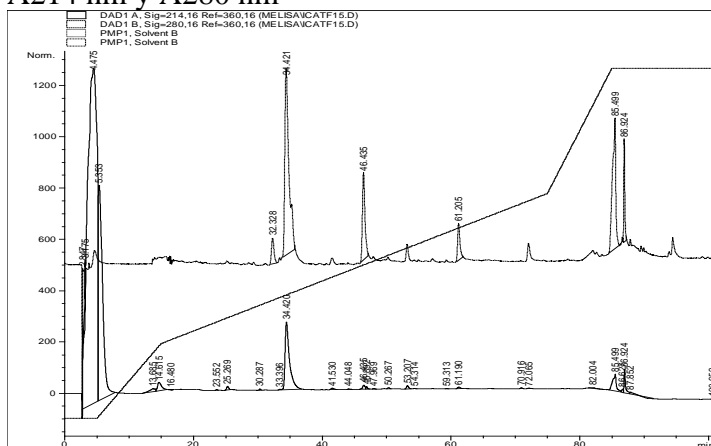


A280 nm



### Fracción IX (76 µg)

A214 nm y A280 nm



## Anexo IV. Protocolos

### IV.I. Cuantificación de proteínas por método del ácido bicinonínico (BCA)

Se utilizó el paquete comercial “BCA Protein Assay Kit” de la marca Pierce™

#### Materiales

- Reactivo A: Carbonato de sodio, Bicarbonato de sodio, Ácido bicinonínico y Tartrato de sodio en 0.01M de Hidróxido de sodio.
- Reactivo B: 40% de sulfato cúprico.
- Albúmina sérica bovina (BSA): Solución stock a 2 mg/mL en 0.9% NaCl y 0.05% azida de sodio.
- Lector de E.L.I.S.A. con filtro de 570 nm (Marca: Magellan).
- Microplacas para E.L.I.S.A. de 96 pozos marca Falcon (no tratadas para unir proteínas).

#### Procedimiento

1. Preparar las siguientes concentraciones de BSA en PBS a partir del stock 2 mg/mL para realizar la curva estándar:

- 1) 320 µg/mL
- 2) 160 µg/mL
- 3) 80 µg/mL
- 4) 40 µg/mL
- 5) 20 µg/mL

2. Preparar mezcla de reacción (MR) añadiendo 50 partes del reactivo A con un parte del reactivo B.

3. Añadir 200 µl de MR por pozo y mezclar. en las microplacas de E.L.I.S.A

4. Agregar 25 µl de cada ST y MP. Incluir dos pozos con el amortiguador en que se encuentran diluidas las muestras y los estándares.

3. Cubrir la placa con una tapa e incubar a 37 °C durante dos horas.

4. Leer absorbancia en el lector de E.L.I.S.A con un filtro de 570 nm utilizando.

NOTA: La concentración de la muestra debe estar dentro del rango de la curva estándar, no es confiable realizar extrapolaciones.

## IV.II. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)

### Preparación de soluciones:

#### **Solución de acrilamida** (30% de acrilamida + 0.8% bis--acrilamida):

Disolver 49.5 g de acrilamida y 1.32 de bis-acrilamida en un volumen final de 165 mL de agua desionizada.

#### **Amortiguador inferior** (1.5 M de Tris + 0.4% de SDS):

Disolver 18.7 g de tris en 50 mL de agua desionizada y adicionar 2 mL de SDS al 20%. Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 mL.

#### **Amortiguador superior** (0.5 M de Tris + 0.4% SDS):

Disolver 6.06 g de tris en 50 mL de agua desionizada y adicionar 2 mL de SDS 20%. Ajustar pH a 6.8 con HCl concentrado. Aforar a 100 mL.

#### **Amortiguador de cámara 10X** (0.24 M Tris + 0.19 M glicina + 0.1% SDS):

Disolver 15.2 g de tris y 72.1 g de glicina en 300 mL de agua desionizada y adicionar 25 mL de SDS al 20%. Ajustar pH a 8.6 con NaOH 10 M. Aforar a 500 mL.

**Amortiguador de cámara 1X:** Diluir 100 mL de amortiguador de cámara 10X en 900 mL de agua desionizada.

#### **Amortiguador de corrida desnaturizante 5X** (10% glicerol + 2.5% SDS + 50 mM Tris-HCl pH 6.8 + 5% $\beta$ -mercaptoetanol + 0.002% azul de bromofenol):

en un tubo Falcon de 15 mL mezclar 2.5 mL de glicerol, 3.125 mL de SDS 20%, 1.25 mL de Tris-HCl 1 M pH 6.8, 1.25 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.5 mL de 1% azul de bromofenol. Aforar a 10 mL con agua desionizada.

**Persulfato a amonio 10%:** Disolver 0.1 g de persulfato de amonio en 1 mL de agua desionizada.

#### **Solución de tinción** (50% metanol + 10% ácido acético + 0.2% azul de Coomassie G250):

Disolver 1 g de azul de Coomassie G250 en 250 mL de metanol, 50 mL de ácido acético y aforar a 500 mL con agua desionizada.

#### **Solución de destinción** (10% metanol + 10% ácido acético):

Mezclar 400 mL de agua desionizada, 50 mL de metanol y 50 mL de ácido acético.

### Preparación de geles:

	GEL	GELES		
	CONCENTRADOR	12.5%	15%	17%
<b>Amortiguador inferior (mL)</b>	4%	1.50	1.50	2.25
<b>Amortiguador superior (mL)</b>	-	-	-	-
<b>Acrilamida (mL)</b>	0.63	-	-	-
<b>Acrilamida (mL)</b>	0.33	2.50	3.00	5.10
<b>H<sub>2</sub>O desionizada (mL)</b>	1.54	2.00	1.50	1.65
<b>TEMED (<math>\mu</math>l)</b>	15	15	15	15
<b>PSA 10% (<math>\mu</math>l)</b>	45	45	45	45



**Procedimiento:**

- 1) Incluir el volumen necesario de muestra ( $\mu\text{g}$  deseados) y aforar con  $\text{dH}_2\text{O}$  a  $16 \mu\text{l} + 4 \mu\text{l}$  de amortiguador de corrida 5X. Hervir las muestras durante 5 minutos y centrifugar a  $17,600 \text{ g}$  durante 2 minutos.
- 2) Cargar los pozos del gel en la cámara electroforética con las muestras ( $20 \mu\text{l}/\text{pozo}$ ) y los marcadores de peso molecular ( $5 \mu\text{l}$ ).
- 3) Migrar a 90 Volts hasta que el colorante de referencia haya atravesado el gel concentrador. Luego incrementar a 120 V y mantener hasta que el colorante de referencia se encuentre a 0.5 cm del final del gel.
- 4) Teñir el gel con solución de tinción y desteñir con solución de destinción.

NOTA: Para las muestras *no desnaturalizantes*, omitir el  $\beta$ -mercaptoetanol y no hervir.

### IV.III. Extracción de RNA total con Trizol

1. Lavar el homogeneizador con NaOH 1 M durante 1 h.
2. Agregar el Trizol para RNA al homogeneizador y dejar reposar al menos 20 min.
3. Extraer el tejido y ponerlo en Trizol (1 mL por cada 100 mg de tejido) dentro del homogeneizador, manteniéndolo en hielo mientras se homogeniza (Trabajar con guantes nuevos cerca del mechero, con tubos y puntas estériles).
4. Pasar a tubos eppendorf. Centrifugar a 4 °C y 17,600 g por 5 min. para quitar la basura. Pasar sobrenadante a tubos limpios.
5. Agregar 200 µL de Trizol por mL. y dejar a temperatura ambiente 10 min. para formar interfase.
6. Centrifugar 10 min. a 4 °C y 17,600 g.
7. Pasar el sobrenadante a tubos limpios usando pipetas *Pasteur* de vidrio estériles con la punta adelgazada en mechero. Es muy importante no llevarse nada de la interfase.
8. Precipitar sobrenadante con un volumen igual de isopropanol. Dejar 10 min. en hielo.
9. Centrifugar 10 min. a 4 °C y 17,600 g.
10. Decantar el sobrenadante y lavar el pellet con 500 µL de etanol frío al 75%. *Vortex* durante 10 segundos y centrifugar 10 min a 4 °C y 17,600 g.
11. Repetir paso 10.
12. Decantar el etanol y secar pellet 10 min. a 37 °C (tubos abiertos boca abajo sobre papel limpio).
13. Disolver en ~ 100 µL de agua DEPC.
14. Revisar integridad en gel de agarosa al 1.5%.
15. Cuantificar en NanoDrop.

## IV.IV. Determinación de actividad fosfolipasa A<sub>2</sub>

### A. Ensayo titulométrico de actividad PLA<sub>2</sub>

1. Preparación de la solución de yema de huevo 10%
  - a.) solución estándar (150 mL).

	[ ] STOCK	[ ] TRABAJO	VOL. PARA AÑADIR
<b>NaCl</b>	5 M	0.1 M	3 mL
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0.1 M	0.01 M	15 mL
<b>Triton X 100</b>	20%	0.5%	3.75 mL

- b.) Pesar yema de huevo (sin membrana) y aforar con solución estándar hasta 10% p/v (ej. 14g – 140 mL)
  - c.) Agitar durante 10 min.
  - d.) Centrifugar a 380 g durante 5 min. y recuperar el sobrenadante.
2. En 500 µL 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 1µL de veneno [1mg/mL]\*
  5. Cuando el pH llegue a 7.99 agregar un vol. de NaOH 50 mM (entre 1 y 5 µL) 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 (µmol) de NaOH en función del tiempo (min).
  10. La pendiente ( $m = \Delta y / \Delta x$ ) representa la cantidad de NaOH consumida por minuto. La actividad del veneno se reporta en unidades que se definen como µmol 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.

## B. Ensayo colorimétrico de actividad PLA<sub>2</sub>

1. Preparar solución estándar
  - Tris-HCl 0.01 M
  - NaCl 0.1 M
  - CaCl<sub>2</sub> 0.01 M
  - pH 8.0
2. Preparar sustrato, al momento del ensayo.
  - Ácido 4Nitro-3-octanoiloxy- benzoico (4NOBA)
  - PM = 309.31 g/mol
  - Disolver en acetonitrilo o cloroformo a 1 mg/mL (0.32 mM)
3. Mezclar en una placa de ELISA 200 µL de solución estándar y 25 µL de sustrato por pozo.
4. Incubar 10 minutos a 37°C
5. Agregar 25 µL de muestra por pozo, incubar a 37°C.
6. Leer Absorbancia a 425 nm a los 3, 6, 9, 12, 15 y 30 min.
  - Los tiempos pueden modificarse dependiendo de la actividad de la muestra.
7. Análisis de datos:
  - Graficar las absorbancias obtenidas en función del tiempo y obtener la pendiente (m) de la zona lineal al inicio de la curva obtenida ( $m = A_{425}/\text{min}$ ).
  - Transformar el valor de absorbancia obtenido a concentración Molar de sustrato obtenido utilizando la fórmula:  
$$[M] = \frac{A_{405}}{\epsilon l}$$
 considerando un coeficiente de extinción molar a 425 nm ( $\epsilon_{425}$ ) de 5,039 y una longitud de paso de la luz (l) de 0.82 cm. Esta última puede variar dependiendo del tipo de placa de ELISA utilizada y el volumen final por pozo.
  - Las unidades de actividad enzimática (U) se definen como µmoles de producto (NOB) por minuto.
8. La actividad se expresa en unidades por mg de muestra (U/mg).

NOTA: Los ensayos se analizaron a 405 nm, dado que no había filtro disponible para leer a 425 nm.

NOTA 2: Es importante comprobar la linealidad de la curva obtenida, de no haberla, modificar cantidad de muestra o tiempos de lectura.

## IV.V. Inhibición de actividad PLA<sub>2</sub> con *p*BPB

Veneno de *M. b. browni*, relación molar 1:2.6 (veneno:*p*BPB)

### A.) *p*BPB

- PM = 278 g/mol
- Preparar stock 10 mg/mL (36 mM)
- Concentración final = 143.9  $\mu$ M

### B.) Veneno

- PM  $\approx$  10,000 g/mol
- Stock = 14.2 mg/mL (BCA); 14.8 mg/mL (A<sub>280</sub>)
- Concentración final = 56  $\mu$ M

### C.) Soluciones

- *p*BPB: stock resuspendido en DMSO
- Veneno resuspendido en NH<sub>4</sub>Ac 20 mM pH 4.7
- Solución de inhibición: 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA

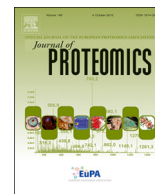
### D.) Muestras

	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>M1</b>
<b>Descripción</b>	Veneno sin <i>p</i> BPB	<i>p</i> BPB sin veneno	Veneno con <i>p</i> BPB
<b>Veneno</b>	7 $\mu$ L (100 $\mu$ g)	-	420 $\mu$ l (5.96 mg)
<b>Solución de inhibición</b>	1,736.8 $\mu$ L	1,055.8 $\mu$ L	10,137.6 $\mu$ L
<b><i>p</i>BPB</b>	-	4.2 $\mu$ L	42.4 $\mu$ L
<b>DMSO</b>	7.2 $\mu$ L	-	-
<b>Vol. Final</b>	1.8 mL	1.06 mL	10.6 mL
<b>CaCl<sub>2</sub> (20 mM)</b>	450 $\mu$ L	265 $\mu$ L	2,650 $\mu$ L

### E.) Procedimiento

- 1.- Incubar C1, C2 y M1, sin DMSO/*p*BPB ni CaCl<sub>2</sub>, a 25 °C durante 10 min
- 2.- Agregar *p*BPB/DMSO e incubar 3 hrs a 25 °C
- 3.- Agregar CaCl<sub>2</sub> (4 mM final)
- 4.- Tomar muestra para medición de actividad PLA<sub>2</sub>
- 5.- Dializar contra amortiguador NH<sub>4</sub>Ac 20 mM, pH 4.7, membrana con corte de 500 a 1000 Da

## Anexo V. Artículo publicado



## Original Article

# Functional, proteomic and transcriptomic characterization of the venom from *Micrurus browni browni*: Identification of the first lethal multimeric neurotoxin in coral snake venom



Melisa Bénard-Valle<sup>a,\*</sup>, Edgar Neri-Castro<sup>a</sup>, Manuel F. Yañez-Mendoza<sup>a,b</sup>, Bruno Lomonte<sup>c</sup>, Alejandro Olvera<sup>a</sup>, Fernando Zamudio<sup>a</sup>, Rita Restano-Cassulini<sup>a</sup>, Lourival D. Possani<sup>a</sup>, Enrique Jiménez-Ferrer<sup>d</sup>, Alejandro Alagón<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad # 2001, Colonia Chamilpa, CP: 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Mexico

<sup>c</sup> Facultad de Microbiología, Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, Costa Rica

<sup>d</sup> Centro de Investigaciones Biomédicas del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico

## ARTICLE INFO

## Keywords:

*Micrurus browni*  
Proteome  
Multimeric neurotoxin  
Prey specificity  
Phospholipases A<sub>2</sub>  
Three-finger toxins  
Neuromuscular blockers

## ABSTRACT

Proteomic characterization of *Micrurus browni browni* venom showed approximately 41 components belonging to 9 protein families, mainly phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s) and three-finger toxins (3FTxs). Venom gland transcriptome yielded 39 venom transcripts belonging to 10 protein families. Functional characterization identified a multimeric toxin, here designated Brownitoxin-1, which comprises at least one PLA<sub>2</sub> and one 3FTx. Its components have no or very low lethality individually but become extremely lethal when combined; both were partially characterized. Other two lethal components were identified: A neurotoxic PLA<sub>2</sub>, and a postsynaptic  $\alpha$ -neurotoxin. LD<sub>50</sub>s as well as PLA<sub>2</sub> and nAChR-blocking activities were determined for whole venom and isolated components. Application of venom to murine neuromuscular preparations caused a progressive decrease of twitch force that was irreversible after washing. Inhibition of PLA<sub>2</sub> activity with *p*-bromophenacyl bromide (pBPB) showed that approximately 90% of toxicity is dependent on this activity. Non-lethal components include diverse 3FTxs, at least three enzymatically active PLA<sub>2</sub>s and the nociceptive toxin MitTx. No evidence of specificity towards prey was observed. This work is one of the most complete characterizations of a coral snake venom so far and its findings highlight the relevance of protein complexes in venom function.

**Significance:** This study represents a profound analysis of the venom of the coral snake *Micrurus browni browni*, including a venom proteome, venom gland transcriptomic data and functional studies of whole venom and isolated toxins. It significantly contributes to the understanding of North American coral snake venoms, which are currently largely unknown. It includes characterization of relevant venom components, one of which represents the first description of a lethal multimeric neurotoxin in coral snake venom. This work highlights the importance of protein complexes in coral snake venom and could serve as a basis for the finding of several other multimeric toxins. Finally, we report the absence of taxon specificity, which has been previously reported in the venoms of other snakes of the same genus.

## 1. Introduction

Included in the family Elapidae, together with several other medically relevant snakes, *Micrurus* is the most diverse genus of coral snakes. The 80 species recognized within this group [1] are distributed from southern United States, throughout the whole American continent, to southern Argentina [2]. Incidence of envenomation by these snakes in America is low when compared to snakes of the family Viperidae.

Nonetheless, high lethal potency of their venoms [3–5], as well as the markedly neurotoxic clinical syndromes they cause [2,4,6], add up to generate a relevant medical issue to address in most American countries.

Research on their venoms, using various strategies and from different points of view, has been going on for more than 40 years [7]. While some work has been done analyzing the biological significance of their venom and their toxicity to non-mammal models [8,9], most

\* Corresponding author.

E-mail address: [mel@ibt.unam.mx](mailto:mel@ibt.unam.mx) (M. Bénard-Valle).

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103863>

Received 4 April 2020; Received in revised form 18 May 2020; Accepted 4 June 2020

Available online 11 June 2020

1874-3919/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

characterizations have been focused on toxicity to mammals, medically relevant toxins and neutralization using antivenom [5,10–13]. The neurotoxicity of some North American [13–16] and South American [11,17–20] venoms has been characterized using isolated tissue preparations of murine, avian and amphibian neuromuscular junctions. Among the components found in the venoms, presynaptic and postsynaptic blockers have been reported [3,19,21–25].

Two protein families: phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s) and three finger toxins (3FTxs), have been described to be the most abundant and relevant for toxicity to mammals in all *Micrurus* venoms studied so far [26]. The first are a group of low molecular weight enzymes (around 14,000 Da) [27], which catalyze the hydrolysis of the sn2 ester bond of phospholipids [28]; those present in elapid venoms are classified as Group I PLA<sub>2</sub>s, on a structural basis [27]. Among the very diverse pharmacological effects that these proteins can produce during envenomation are those induced by β-neurotoxins. These components are able to specifically target the presynaptic button at the neuromuscular junction of skeletal muscle, inhibiting the release of acetylcholine (ACh) and eventually causing severe structural damage of the button [29]. The second, 3FTxs, are a group of non-enzymatic peptides (~7000 Da) that possess the ability to bind several cellular receptors, generating an amazing array of pharmacological effects [30]. By far, the most studied of these proteins in coral snake venoms are α-neurotoxins, strong antagonists of the nicotinic ACh receptor (nAChR) of skeletal muscle [31]. Different electrophysiology and binding competition assays techniques have been used to study some of these isolated α-neurotoxins [19,23,32,33]. Both β and α-neurotoxins can therefore cause severe flaccid paralysis of skeletal muscle.

Using proteomic approaches, the composition of the venoms from 21 species of *Micrurus*, most of them from South and Central America [26,34], has been described. In them, 22 protein families have been identified. These works have allowed the suggestion of a dichotomy in the composition of North and South American venoms, where 3FTx predominant venoms are abundant in South American species of *Micrurus*, whereas in Central and North American countries their venoms are richer in PLA<sub>2</sub> [26,35].

For several reasons, research on Mexican coral snake venoms is relatively scarce and recent. Today, it is probably one of the less studied group of venomous snakes in the continent [26]. *Micrurus browni*, or Brown's coral snake is one of the 16 species of coral snakes in Mexico [1]. It can be found from the Pacific coastal region of Guatemala and Chiapas to the State of Mexico and likely Michoacán [2,36]. Three subspecies are currently recognized: *M. b. importunus*, only known from the region of *Dueñas* in Guatemala, *M. b. taylori*, which is distributed only in low altitudes between sea level and 400 m in the region around Acapulco, Guerrero, and *M. b. browni*. This last subspecies can be found in altitudes from 500 to over 2000 m in sub-humid to dry montane formations of the Mexican Plateau. Its distribution includes Mexico City, *Estado de México* and central Guerrero and continues on the Pacific side of Sierra Madre del Sur to Oaxaca, Chiapas and Western Guatemala [2]. More recent reports place this subspecies as far North as the Pacific coast of Colima and Michoacan [36].

The only available information on *M. browni* venom are 3FTx sequences obtained from venom gland [33] while no characterization of the venom has been done so far. The present study aimed to perform a functional characterization of the venom of the coral snake *Micrurus b. browni*, combining the transcriptomic and proteomic analyses with *ex vivo* and *in vivo* toxicity assays. Then, a natural prey model was used to study venom toxicity from the point of view of its biological role and to screen for possible reptile specific toxins.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Ethics statement

All methods performed in the present study were approved by the

bioethics committee of the Institute of Biotechnology, Universidad Nacional Autónoma de México (IBt, UNAM) with project # 385 “*Caracterización funcional y análisis de especificidad de venenos de corallillos Norteamericanos*”.

### 2.2. Venoms and experimental animals

All venoms were obtained by manual extraction of adult specimens of *Micrurus b. browni* species collected in the locality Villa Flores in the state of Chiapas, México (Collection license # SGPS/DGVS/03459/15, SEMARNAT, Mexico). The obtained venoms were recovered using 20 mM ammonium acetate buffer (pH 4.7), centrifuged 2 min at 17,600 ×g and the soluble venom was lyophilized. All the work was performed using a pool of 6 individuals, as follows: Dry venom from each individual was weighed and combined in equal proportions. Then, the pool was resuspended in ammonium acetate buffer (pH 4.7), aliquoted and lyophilized again until use. Lyophilized venom of *Micrurus ibiboboca* (Brazil) was kindly donated by Dr. Andreimar Soares to Dr. Bruno Lomonte. Approximately 150 mg of *M. b. browni* venom and 0.5 mg of *M. ibiboboca* venom were used in total.

ICR mice between 18 and 20 g of body weight, for LD<sub>50</sub> and Median effective dose (ED<sub>50</sub>) determinations, and between 30 and 35 g of body weight, for neuromuscular preparations, were obtained from the animal facility at IBt-UNAM. In order to minimize the number of animals used in the study, groups of three mice per dose were used in all experiments [37]. All animals were kept under 12-h light and dark cycles and with food and water *ad libitum*. Colubrids of the genus *Conopsis* between 5 and 7 g of body weight (collected under license # SGPA/DGVS/13262/19) were used for determination of lethality and observations of signs generated by *M. b. browni* venom and its fractions.

### 2.3. Protein quantification

Before use, the required amounts of lyophilized venom were dissolved in water (milli-Q®, Millipore). Protein concentration was determined employing Absorbance at 280 nm and bicinchoninic acid method (BCA).

Protein absorbance was determined using a spectrophotometer (Thermo Scientific), with a light path length of 1 cm and assuming an extinction coefficient (*E*) of 1. Therefore, absorbance at 280 nm was equivalent to protein concentration in mg/ml.

BCA (Pierce) was performed following manufacturer's instructions and using bovine serum albumin as a standard. Unless otherwise stated, this method was used for quantification during the experiments of the present study in order to decrease variation caused by amino acid composition of venom fractions.

### 2.4. Proteomic analysis

#### 2.4.1. RP-HPLC

*Micrurus b. browni* venom pool was fractionated using RP- HPLC on a C<sub>18</sub> analytical column (GraceVydac 250 × 4.6 mm. 5 μm particle size) and an Agilent 1100 Series HPLC system. Column was equilibrated with solution A (0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in ultrapure water (milli-Q®, Millipore)) and elution was performed using a gradient to solution B (acetonitrile with 0.1% TFA) with a constant flow of 1 ml/min.

1.2 mg of venom (quantified using absorbance at 280 nm) were loaded to the RP-HPLC and eluted fractions were manually collected and dried using a SpeedVac system (Thermo Scientific). Each fraction was later dissolved in 20, 50 or 100 μl of ultrapure H<sub>2</sub>O, depending on their relative abundance on the RP-HPLC chromatogram read at 214 nm. One to five μl were used for molecular mass determination (ESI-MS) and 16 μl were loaded to SDS-PAGE under reducing conditions for further determination of partial amino acid sequence through in-gel digestion of protein bands with trypsin, followed by tandem mass spectrometry (MALDI-TOF-TOF) as described in 2.4.4.



#### 2.4.2. SDS-PAGE

Electrophoretic separation was performed on 15% acrylamide/bisacrylamide gels, using the discontinuous system described by Laemmli [38] under reducing (2-mercaptoethanol) and non-reducing conditions. For molecular weight estimation, 5  $\mu$ l of Broad Range Protein Markers (10–250 kDa) from New England Bio-Labs were included. The gels were stained in solution A (0.2% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio Rad), 10% acetic acid, 50% methanol) and de-stained in solution B (10% acetic acid, 10% methanol).

#### 2.4.3. Molecular mass determination by ESI-MS

The fractions obtained through RP-HPLC were loaded in an LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo-Fisher) with electrospray ionization system (ESI). They were injected by direct infusion using 50% acetonitrile 0.1% acetic acid as mobile phase, flow speed of 500 nl/min. The spray voltage was 1.9 kV and the ion detection was made on positive mode. Spectrometric data were acquired manually using the Tune Plus software and the software Xtract was used for data deconvolution. The molecular masses were determined as isotope averaged masses ( $M_{av}$ ).

#### 2.4.4. Partial sequence determination by tandem Mass Spectrometry (MALDI-TOF-TOF) and Edman degradation

Gel plugs taken from each SDS-PAGE protein band were equilibrated with 50 mM ammonium bicarbonate and submitted to reduction with 10 mM dithiothreitol (DTT) for 30 min at 56 °C. Samples were then treated with 50 mM iodoacetamide in darkness for 20 min at room temperature and digested overnight with sequencing grade Trypsin at 37 °C. Later, resulting peptides were extracted using 50% acetonitrile with 1% TFA and concentrated using vacuum centrifugation (VacuFuge, Eppendorf).

Peptide analysis was performed using MALDI-TOF-TOF in a Proteomics Analyzer 4800 Plus mass spectrometer (Applied Biosystems). Samples were mixed with an equal volume of a saturated  $\alpha$ -cyano-hydroxy-cinnamic acid in 50% acetonitrile with 0.1% TFA and 1  $\mu$ l of this mixture was applied onto an OptiTOF-384 plate. After room temperature evaporation, peptide samples were analyzed in positive reflective mode, using a range of 900–4000  $m/z$  and 1500 shots with laser intensity of 3000. Ten most intense ions were automatically selected for fragmentation by collision induced dissociation (CID) at 2 kV, using 500 shots with a laser intensity of 3800. External calibration of the MALDI-TOF-TOF instrument was performed using CalMix-5 (Sciex) which contains the following standards: des-Arg-bradykinin (904.46 Da), angiotensin I (1,296.68 Da), Glu-fibrinopeptide B (1,570.67 Da), ACTH clip 1–17 (2093.08 Da), ACTH clip 18–39 (2465.19 Da), and ACTH clip 7–38 (3657.92 Da).

MS/MS fragmentation spectra were analyzed against the Serpentes protein database (UniProt/SwissProt) using the Paragon algorithm of ProteinPilot v.4 Software (ABSciex) with confidence > 95% and Score > 5, or alternatively, they were manually interpreted. Search parameters were trypsin digestion, maximum 2 missed cleavages, cysteine carbamidomethylation as a fixed modification and methionine oxidation as a variable modification. The obtained sequences allowed protein identification or at least assignment to a protein family based on similarity with known protein entries using BLAST ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)).

Relative abundance of protein families was obtained based on the integration of the 214 nm RP-HPLC chromatogram, combined with densitometry of SDS-PAGE protein bands using the software Image J. Furthermore, we performed a correction to obtain the number of molecules considering the average mass (determined using ESI-MS) of the proteins identified for each family.

In some cases, RP-HPLC fractions were submitted to N-terminal amino acid sequencing using Edman degradation. This was performed in a PPSQ-31A Protein Sequencer from Shimadzu Scientific Instruments, Inc. (Columbia, Maryland, USA). Each fraction

(approximately 250 pmol) was adsorbed on TFA treated Glass Fiber Disk, (Shimadzu) and analyzed according to manufacturer's instructions.

#### 2.5. Transcriptomic analysis

Venom glands were dissected from one adult male *M. b. browni*, that died of natural causes and was kept at  $-70$  °C for approximately 3 days. The venom of this snake was among the ones used as part of the pool for proteomic analysis. Total RNA extraction was performed as previously described [33].

The generation and sequencing of RNAseq libraries was performed by the University Unit of Massive Sequencing and Bioinformatics at the Institute of Biotechnology of the National Autonomous University of Mexico (UUSMB, IBt-UNAM). Library preparation was performed using the TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit, according to the manufacturer's protocol. Sequencing of RNAseq libraries was performed using the Nextseq 500 Illumina platform, generating paired-end reads of 75 bp. Quality of reads obtained from the high-throughput sequencing was analyzed using FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

Transcriptome analysis was performed following the methods in Strickland and collaborators [39]. The raw reads were filtered and trimmed using TrimGalore! v. 0.5.0. Paired end reads were then merged using PEAR v.0.9.6 and *de novo* transcriptome assembly was carried out using both Trinity v.2.6.6 and Extender [40]. Annotation was performed against UniProt/SwissProt database using BlastX with a minimum e-value of  $10^{-4}$ . Transcripts with a blast match were annotated based on their top match and unannotated transcripts were manually checked for toxin matches through NCBI blastn. Duplicate transcripts were removed and then annotated transcripts that were chimeric were identified and removed by aligning the trimmed reads back to the sequence using BWA and checking for regions of zero coverage and/or 10-fold differences across the coverage distribution (<https://github.com/masonaj157/ChimeraKiller>). Finally, transcript quantification was performed with RSEM using Bowtie2 [41] as the aligner by aligning the quality trimmed reads to the final transcriptome.

#### 2.6. Venom fractionation by cation exchange chromatography

In order to achieve a venom separation where proteins are closer to native conditions, a strong ion exchange was performed on a Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) system (Äkta pure, GE Lifesciences). We used a HiPrep<sup>™</sup> SP HP column (16  $\times$  1000 mm, total volume 20 ml, particle size 34  $\mu$ m) where the ionic exchanger is a sulfopropyl group ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^-$ ). Column was equilibrated with 20 mM ammonium acetate buffer pH 4.7 and components were eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 1 M in 80 min. The flow rate was set to 5 ml/min.

The obtained fractions were dialyzed using the same 20 mM ammonium acetate buffer at pH 4.7 using a regenerated cellulose (RC) membrane with MWCO of 3500 Da (SpectrumLabs). Finally, fractions were lyophilized and stored at 4 °C. Before their use, each fraction was dissolved in 20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7 and protein concentration was determined using BCA and 280 nm absorbance.

#### 2.7. Phospholipase A<sub>2</sub> activity

PLA<sub>2</sub> activity of whole venom and cation exchange fractions was determined using a titrimetric assay, with 10% w/v egg yolk in standard solution (100 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5% Triton X-100) as a substrate [42]. Briefly, 0.5 ml of egg yolk solution were set to a pH between 8.0 and 8.1 with 50 mM NaOH under constant stirring and N<sub>2</sub> bubbling. Between 1 and 10  $\mu$ g of each sample were added to the solution and the amount of NaOH consumed over time to keep pH at 8.0 was recorded (sample amount was varied in order to obtain a linear behavior on the

NaOH vs time graph). Given that the consumed NaOH is equivalent to the acidification caused by fatty acids produced after hydrolysis of the sn2 ester bond of phospholipids by PLAs, specific enzymatic activity units (U/mg) were defined as the  $\mu$ moles of NaOH consumed per minute per milligram of venom or fraction.

## 2.8. Inhibition of PLA<sub>2</sub> activity by pBPB

The PLA<sub>2</sub> inhibitor pBPB was used in order to analyze the contribution of active PLA<sub>2</sub>s to venom toxicity [43]. We used the method in Shiloah and collaborators [44] with some modifications. *M. b. browni* venom pool was preincubated at 25 °C in inhibition buffer (0.1 M Tris/HCl, 2 mM EDTA, pH 8.0) for 10 min. Later, the inhibitor was added to a molar ratio of 1:2 (venom:pBPB), assuming an average MW of 14,000 Da for the whole venom, and incubated 3 h at 25 °C. Finally, CaCl<sub>2</sub> was added to a final concentration of 4 mM and the solution was further incubated for 10 min at 25 °C. Samples were dialyzed against 20 mM ammonium acetate using an RC membrane with 3500 Da MWCO. The previously described titrimetric PLA<sub>2</sub> activity assay was then performed to verify there was complete inhibition of PLA<sub>2</sub> activity.

## 2.9. Neurotoxicity

### 2.9.1. Murine phrenic nerve-hemidiaphragm (PND) neuromuscular preparation

A variation of the method originally described by Büllbring [45] was used to mount a murine phrenic nerve – hemidiaphragm neuromuscular preparation. An ICR mouse of 30–35 g body weight was euthanized using CO<sub>2</sub> inhalation and the left phrenic nerve with its attached half of the diaphragm muscle was mounted as previously described [46] inside a 25 ml organ bath in Tyrode solution (0.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 137 mM NaCl and 11.9 mM NaHCO<sub>3</sub>) with 11 mM glucose, at 37 °C, under constant carbon (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) bubbling.

Both indirect (nerve) and direct (muscle) stimulations consisted of supramaximal voltage pulses, with duration of 0.1 ms and frequency of 0.2 pulses/s. The mounted preparation was left to stabilize under nerve stimulation for 20 min. Ten  $\mu$ M of  $\delta$ -tubocurarine (Sigma-Aldrich), a reversible blocker of neuromuscular transmission [47], was added to the solution, incubated for 5 min and then washed off, to ensure that stimulation of nerve and muscle are completely independent from each other. Finally, *Micrurus browni* venom was added to the Tyrode solution to final concentrations of 1, 5 and 10  $\mu$ g/ml and left in contact with the tissue for 2 h, or until 100% inhibition of muscle twitches was observed. T<sub>90</sub> values, defined as the time from the addition of the toxin to the time when the force of indirectly evoked twitches reaches 10% of original, were calculated for each venom dose.

### 2.9.2. Electrophysiology

Patch clamp recordings were performed as previously described [32]. Briefly, rhabdomyosarcoma TE671 cells were maintained in DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum), at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> and humidified atmosphere. Extracellular solution contained 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES and 5 mM D-glucose, pH 7.3, and intracellular solution contained 130 mM KCl-aspartate, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA and 10 mM HEPES. ACh and toxins were added to the extracellular solution from a stock in distilled water. Fresh working solutions of ACh at final concentrations of 10  $\mu$ M were prepared every 2 h. Whole-cell currents were recorded using a MultiClamp 700B amplifier along with Digidata 1440A (Molecular Device, USA) and pClamp10 software were used during data acquisition (all from Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Softwares Clampfit 10 and Origin 7 (OriginLab, Northampton, MA, USA) were used for offline analysis.

The effect of the  $\alpha$ -neurotoxin D.H (originally described in the

venom glands of *M. diastema* [33] and purified from the venom of *M. b. browni* in the present work) was evaluated from 3 to 300 nM by application of the toxin 40–60s, immediately followed by an ACh pulse. For the dose-response curve, data obtained from different concentrations were normalized, plotted and fitted using a sigmoid equation of the Logistic form. This was performed in order to obtain an IC<sub>50</sub> value, defined as the toxin concentration (nM) that causes a 50% inhibition of the ACh-generated current.

## 2.10. In vivo characterization

### 2.10.1. Determination of LD<sub>50</sub> in mice

Median lethal dose (LD<sub>50</sub>) is defined as the dose of venom that kills 50% of an experimentally envenomated animal population. LD<sub>50</sub> was determined by the intravenous (*i.v.*) and intraperitoneal (*i.p.*) routes on ICR mice. Mortality determinations were performed 48 h after injection. The values were calculated through non-linear regression [48] using the software GraphPad Prism V6.0 and expressed in  $\mu$ g of venom per gram of body weight ( $\mu$ g/g).

All animals were observed periodically during the whole length of the experiment in order to register the appearance of signs of toxicity. Furthermore, the time of appearance of local and/or generalized flaccid paralysis (complete inability to move but maintaining respiratory function) and time of death, were recorded.

### 2.10.2. Neutralization by commercial antivenom

The ability of the commercial antivenom Coralmyx® (Batch # B-5H-16) to neutralize lethality of *M. b. browni* whole venom was determined *i.v.* on ICR mice. Various volumes of antivenom were preincubated for 30 min at 37 °C with 3 or 6 venom LD<sub>50</sub>s and percent survival was recorded 48 h after injection. ED<sub>50</sub>, defined as the amount of antivenom that prevents death of 50% of envenomated mice, was determined using a non-linear regression [48] using the software GraphPad Prism V6.0.

### 2.10.3. Analysis of lethality and paralysis in snakes

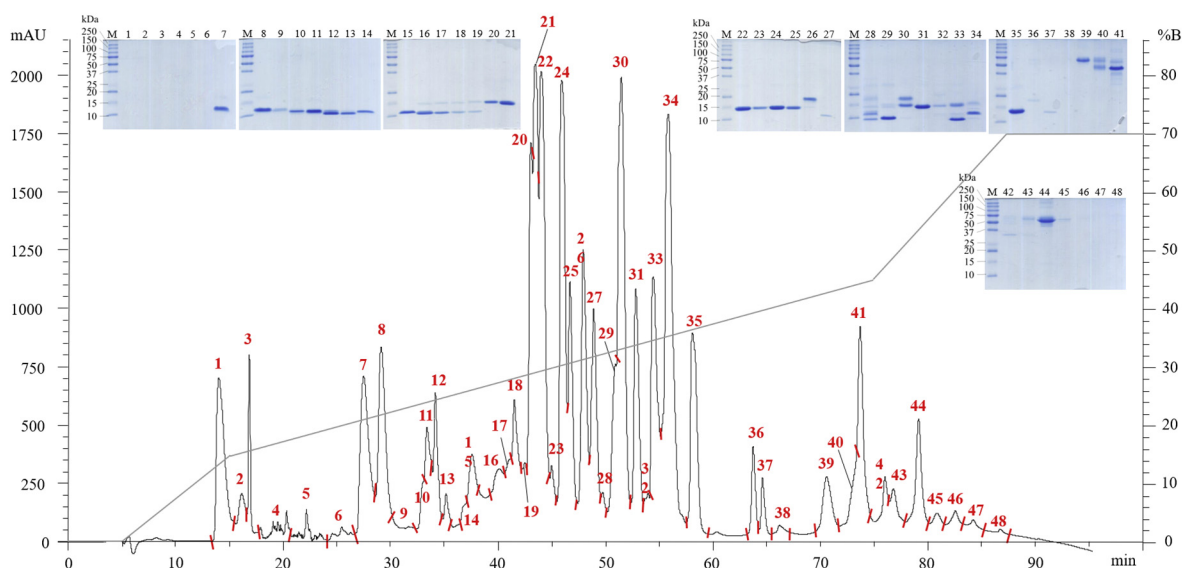
In snakes, different amounts of venom in a volume of 50  $\mu$ l of 150 mM NaCl were injected *i.p.* into the last third of the body. Groups of 2 or 3 adult *Conopsis* sp. between 4 and 7 g of body weight were used. Mortality determinations were performed 72 h after injection. All animals were observed periodically during the whole length of the experiment in order to register the presence of possible signs of toxicity. Furthermore, the time of appearance of local and/or generalized flaccid paralysis (complete inability to move but maintaining respiratory function) and time of death, were recorded.

## 3. Results

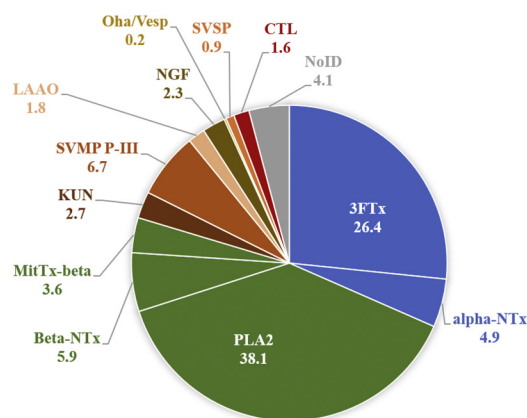
### 3.1. Proteomic analysis

The peptides obtained through RP-HPLC and MS/MS analysis were assigned to 33 distinct proteins from the SwissProt/Uniprot database. Considering their elution times in RP-HPLC, SDS-PAGE pattern and ESI-MS molecular weights, they could belong to approximately 40 different proteins (Fig. 1 and Table S1) though higher sequence coverage would be necessary for their precise identification. These components belong to 9 protein families and the most abundant, based on RP-HPLC chromatogram integration, are PLA<sub>2</sub>s (47.6%) and 3FTxs (31.3%). Furthermore, snake venom metalloproteases (SVMPs), C-type lectins, Kunitz type serine protease inhibitors and L-amino acid oxidases (LAOs) represent 12.8%. The remaining percentage is composed of proteins with similarities to Thaicobrin from *Naja kaoutia* and a Snake venom Serine protease (SVSP) in very low proportions and around 4.1% of proteins were not identified (Supplementary Table S1 and Fig. 1). Also, three main non-protein components, as shown by their high absorbance at 260 nm (data not shown) were observed (Fig. 1, peaks 1–3).

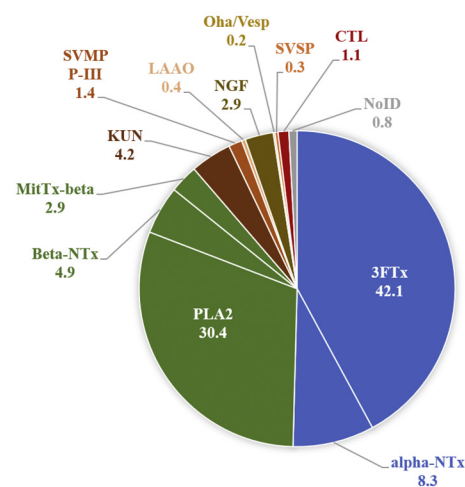
A



B



C



**Fig. 1.** Proteomic analysis of *M. b. browni* (Pool of 6 adults). A. RP-HPLC profile and 15% SDS-PAGE (inset) in reducing conditions of obtained fractions. Detection at 214 nm. B. Relative abundance of protein families calculated using area under curve from RP-HPLC and densitometry of SDS-PAGE bands and C. Relative abundance corrected considering average molecular weight per protein family (Supplementary Table S2). PLA<sub>2</sub>. Phospholipase A<sub>2</sub>. Beta-NTx.  $\beta$ -neurotoxic PLA<sub>2</sub>. MitTx-beta.  $\beta$ -subunit of pain-inducing dimer MitTx (PLA<sub>2</sub> homolog). KUN.  $\alpha$ -subunit of pain-inducing dimer MitTx (Kunitz-type serine protease homolog). SVMP P-III. Snake venom metalloprotease type P-III. LAAO. L-amino acid oxidase. NGF. Nerve growth factor. Oha/Vesp. Ohanin/vespryn. SVSP. Snake Venom Serine Protease. CTL. C-type lectin.

### 3.2. Transcriptomic analysis

A total of 28,572,384 reads were obtained from the venom gland of the adult *M. b. browni* sequenced. *De novo* assembly on the merged reads yielded a total of 272 unique annotated transcripts, 39 of which were identified as toxins. Expression in the venom gland was extremely biased towards venom transcripts with the latter representing 79.4% of the total (Fig. 2A). The most abundant protein family in terms of TPMs (Transcripts per million reads) were PLA<sub>2</sub>s (52.7%) followed by 3FTx (35.1%). These families were also the most diverse with 11 and 15 unique coding transcripts identified, respectively (Fig. 2B and C). The obtained translated sequences for these protein families can be observed in Supplementary Fig. S2.

### 3.3. Lethality and neurotoxicity

The whole venom of *M. b. browni* had an *i.v.* LD<sub>50</sub> of 3.2  $\mu$ g/mouse (CI<sub>95</sub> = 3.1–3.3) equivalent to 0.17  $\mu$ g/g. Intraperitoneally, the determined LD<sub>50</sub> was 8.8  $\mu$ g/mouse (CI<sub>95</sub> = 8.6–8.9) equivalent to 0.46  $\mu$ g/g. The only clear sign of envenomation observed was flaccid paralysis and cause of death was respiratory failure in all cases. The venom of the South American species used for comparison, *M. ibiboboca*, had an *i.p.* LD<sub>50</sub> of 30.3  $\mu$ g/mouse, equivalent to 1.59  $\mu$ g/g.

When tested on the reptile model *Conopsis sp.*, *M. b. browni* whole venom pool had an *i.p.* LD<sub>50</sub> of between 5 and 6  $\mu$ g/g, though weakness of the injection area was observed with doses as low as 1  $\mu$ g/g (See [49] for a more detailed description of the observed signs). On the other side, whole *M. ibiboboca* venom, which has been previously described to have higher lethal potency on snakes than mice [9], caused no observable effects when a maximum of 8  $\mu$ g/g were injected *i.p.* to a group

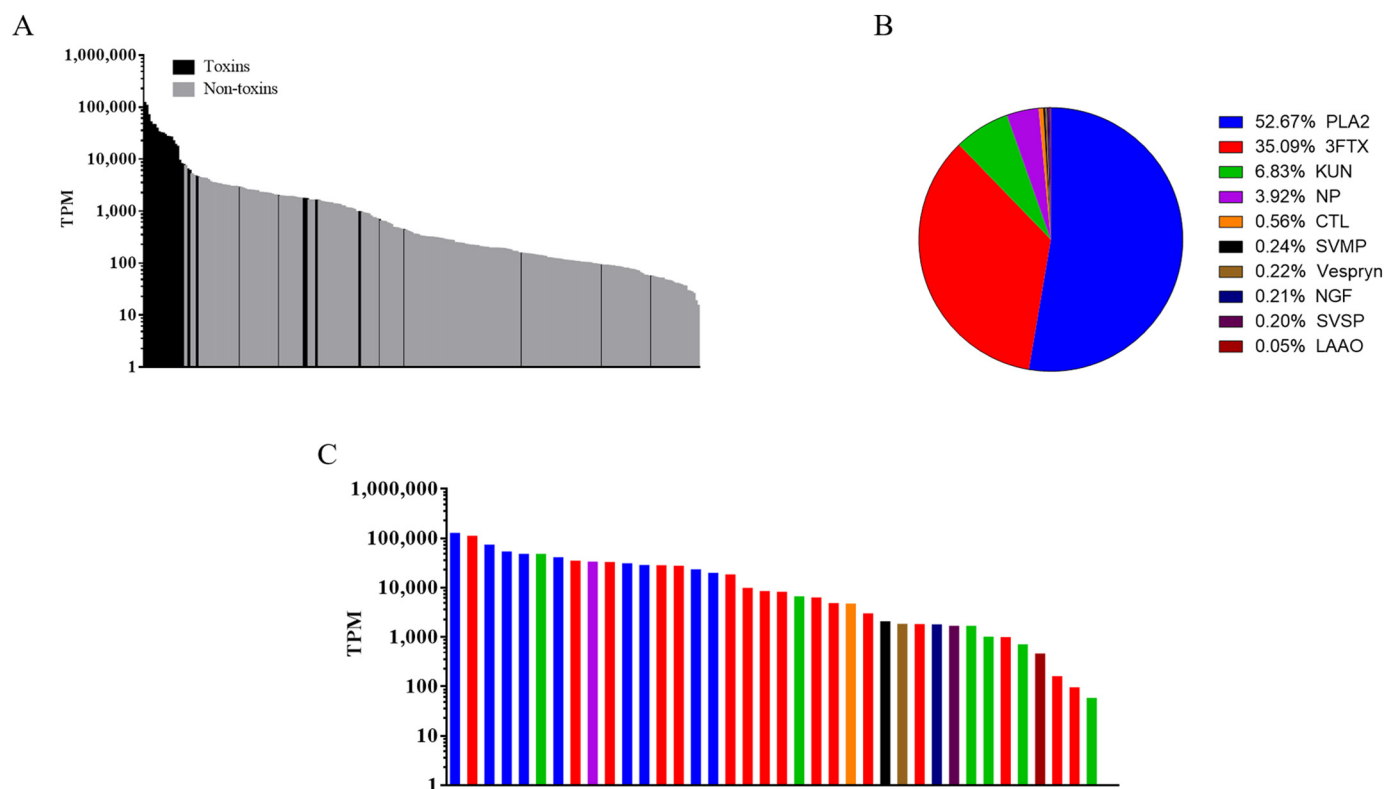


Fig. 2. Venom gland transcriptome of an individual *M. b. browni*. A. Expression of toxins and non-toxins in the venom glands. B. Proportion of expression per toxin family based in total TPMs. C. Expression of each toxin transcript. *TPM*. Transcripts per million. *3FTx*. Three-finger toxins. *PLA<sub>2</sub>*. Phospholipases A<sub>2</sub>. *KUN*. Kunitz-type serine protease inhibitors. C-type Lectins. *NGF*. Nerve Growth Factor. *LAAO*. L-amino-acid Oxidases.

of 3 *Conopsis* sp.

Whole *M. b. browni* venom caused a progressive and dose-dependent decrease in indirectly evoked twitch strength when applied to a murine PND neuromuscular preparation. Determined  $T_{90}$  values were 67.4 min at 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 38.8 min at 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Fig. 3) and there was a latency time of approximately 10 min in both cases. No recovery was observed even after several washes and tension of directly evoked twitches was only partially affected (Fig. 3A).

### 3.4. PLA<sub>2</sub> activity and its relation to toxicity

In order to analyze the role of PLA<sub>2</sub> enzymatic activity on venom toxicity, *M. b. browni* venom pool was treated using pBBP, an irreversible PLA<sub>2</sub> inhibitor [50]. The treated venom had no detectable enzymatic activity and its *i.p.* LD<sub>50</sub> (89.1  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ , IC<sub>95</sub> = 81.8–97.0) was ten-fold less potent than that of the non-treated venom (Fig. 4A). Signs observed during lethality testing were mainly flaccid paralysis and cause of death was respiratory failure.

Both untreated and pBBP-treated venom were also tested on mouse PND neuromuscular preparation to study the role of non PLA<sub>2</sub> toxins on paralysis (Fig. 4B). In this experiment, we calculated a  $T_{90}$  value of 61.1 min for treated venom, higher than the one determined for the non-treated venom (38.8 min). Finally, a RP-HPLC was performed to observe the modification of the general venom profile (Fig. 4C). Here, we observed that the general profile between 10 and 65 min of elution time is only slightly modified, while the fractions eluting after 65 min, which were identified as P-III SVMPs and LAAOs, almost disappear with the pBBP treatment.

### 3.5. Cation exchange chromatography and fraction characterization

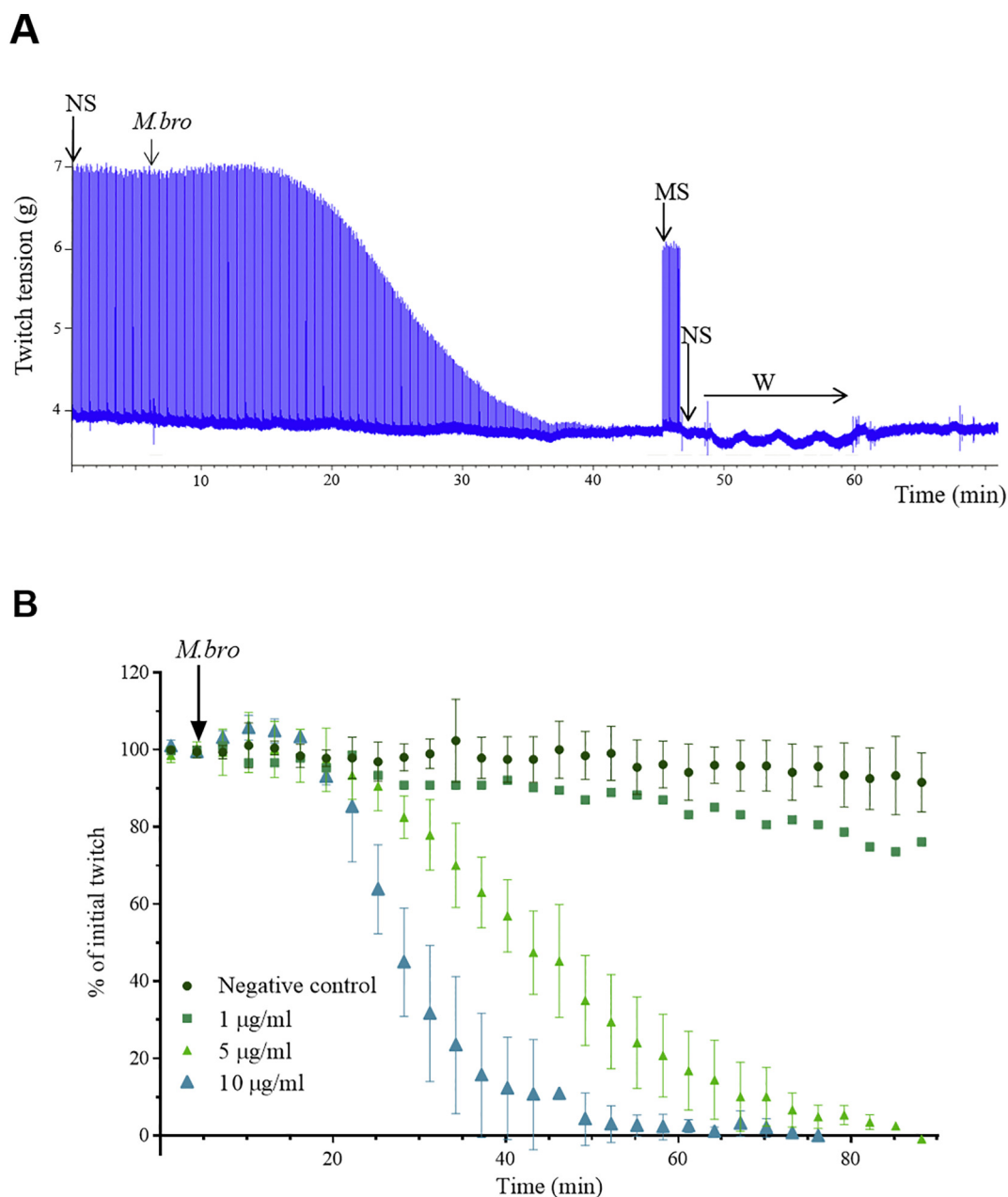
We performed a cation exchange chromatography on a FPLC system, obtaining 19 fractions, each of which was analyzed using 15%

SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions (Fig. 5). Here, we observed that most of the fractions presented components around 10 and 15 kDa, consistent with 3FTxs and PLA<sub>2</sub>s respectively. Fractions XII to XVII presented an anomalous migration under non-reducing conditions, elevating significantly their apparent molecular weights.

Each fraction was injected *i.p.* in groups of three mice or two snakes of the genus *Conopsis*; the only sign of envenomation observed was flaccid paralysis (Fractions X, XVII and XVIII). Table 1 shows the observed toxic effects of whole *M. b. browni* venom as well as its cation exchange fractions. Also, PLA<sub>2</sub> activity was determined using a titrimetric assay with 10% egg yolk as substrate (Table 1).

Under these cation exchange conditions, PLA<sub>2</sub>s elute in almost every fraction, evidencing the great diversity of the members of this protein family within *M. b. browni* venom. They also showed great variation in terms of enzymatic activity, from undetectable (FXVI) to extremely high (FIV; 1974.0 U/mg). It is important to note that purity of these fractions was also variable, sometimes containing more than one PLA<sub>2</sub> and/or components from other toxin family (Fig. 5), which could also cause variation in the observed enzymatic activity (For RP-HPLC analysis of individual fractions, see [51]). Also, the anomalous migration of the PLA<sub>2</sub>s in fractions FXI to FXVII is worth mentioning.

Only three of the obtained fractions (FX, FXVII and FXVIII) were lethal to mice (Table 1 shows their LD<sub>50</sub>'s as well as their toxicity score [52] and relative contribution to overall venom lethality). Among them, FXVII has a MW of 13,428.4 Da and a BLAST analysis revealed that the assembled transcript of the mature peptide (Supplementary Fig. S2) has 95% sequence identity with Nigroxin A (P81166.1) from *M. nigrocinctus* [21]. Our observations during LD<sub>50</sub> determination showed that it causes a severe and dose-dependent flaccid paralysis to both *Conopsis* sp. and mice which, in the latter, develops to respiratory failure and death. All the previous results strongly suggest that FXVII is a presynaptic neurotoxin. Fractions FX and FXVIII were characterized in more detail as described in the following sections.



**Fig. 3.** Effect of *M. browni* whole venom on indirectly evoked twitch tension on a murine PND neuromuscular preparation. A. Representative preparation treated with 10 µg/ml of *M. b. browni* venom. NS. Nerve stimulation. MS. Muscle stimulation. *M.bro*. Application of *M. browni* venom to a final concentration of 10 µg/ml. W. Washes. B. Normalized twitch tension. No sample was added for the control experiments. Error bars represent standard deviation,  $n = 3$  (1 µg/ml,  $n = 1$ ).

### 3.6. Characterization of $\alpha$ -neurotoxin D.H. from *M. b. browni*

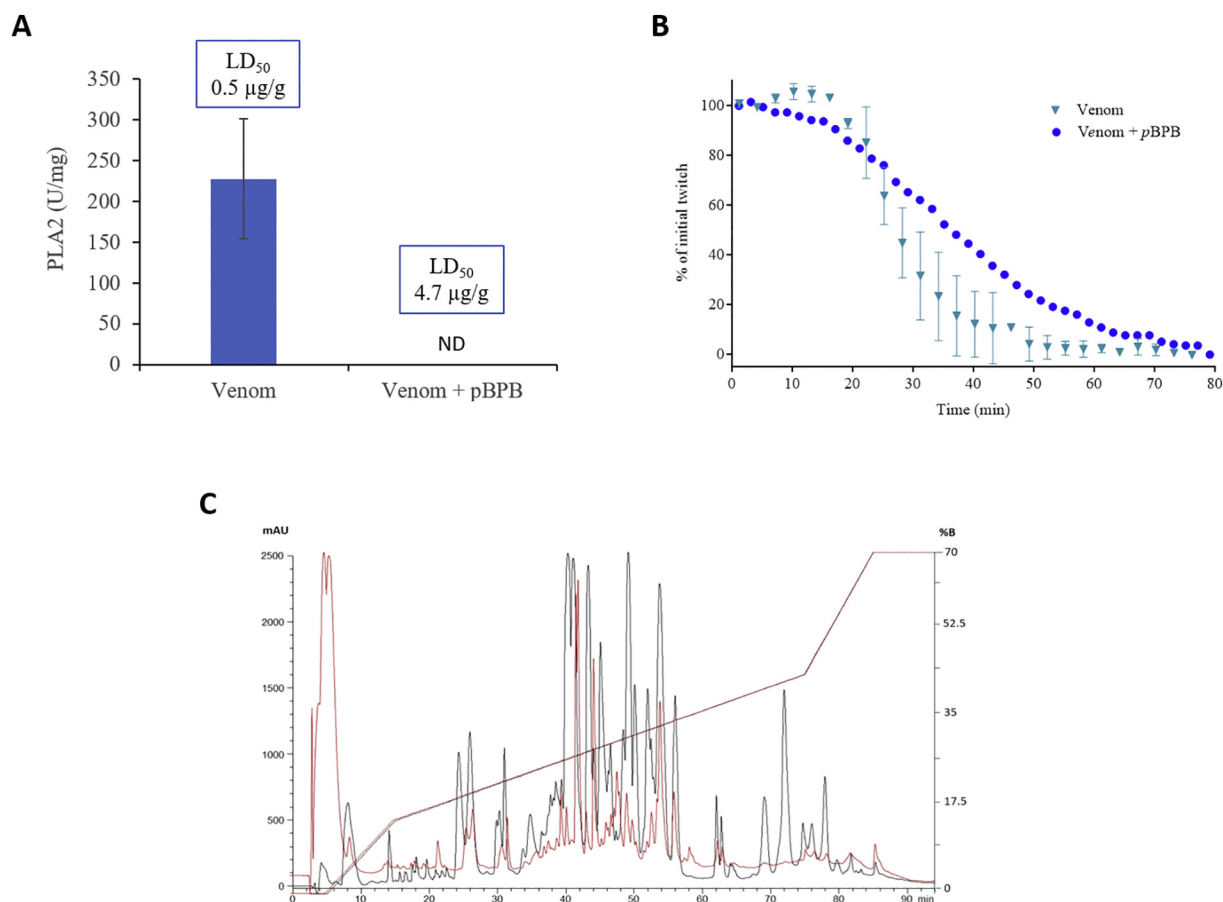
Fraction X (Table 1) was further separated using the same RP-HPLC method previously used for proteomic analysis and its most abundant component was analyzed (Fig. 6A). In the RP-HPLC of the whole venom, this protein was detected in fraction 7 and found to have an identical molecular mass and N-terminal sequence to mRNA sequence D.H. from *M. diastema* [33] and fraction 6.2 from *M. tener* [23] (Fig. 9). The latter toxin has an *i.v.* LD<sub>50</sub> of 0.09 µg/g and was recently sequenced at our laboratory using enzymatic digestion followed by Edman degradation (Supplementary Fig. S1).

As expected, D.H. caused flaccid paralysis to mice and its lethal dose was verified to be identical to that of F6. It displayed a potent blocking effect of the muscular nAChR with an IC<sub>50</sub> of 18.5 ± 1.5 nM and a slope of 1.2 ± 0.1 (Fig. 6). Interestingly, it caused no observable effect when a maximum of 1 µg/g was injected to *Conopsis* sp.

### 3.7. Characterization of Brownitoxin-1

Fraction XVIII (Fig. 7), which has an *i.p.* LD<sub>50</sub> of 0.095 µg/g in mice and causes severe flaccid paralysis to snakes at 0.4 µg/g (Table 1), was further purified using RP-HPLC (Fig. 7A). This re-purification yielded 5 main fractions, none of which was lethal when injected *i.v.* in mice. Interestingly, when all subfractions, excluding subfraction C (that is a contamination from fraction FXVII) are pooled and injected *i.v.* to mice, the lethality is recovered. We therefore analyzed the lethality of paired fractions, observing that only when fractions D and E are pooled together, the lethality is recovered (Table 2). The N-terminal sequence and molecular mass (ESI-MS) of these fractions was determined, identifying them as a PLA<sub>2</sub> (subfraction E) and a 3FTx (subfraction D) with molecular masses of 13,180.6 and 7570.0 Da, respectively (Table 2).

When analyzed in SDS-PAGE under non-reducing conditions, the migration of the combined subfractions is greatly modified compared to



**Fig. 4.** Effect of inhibition of venom PLA<sub>2</sub>s with pBPB. **A.** Enzymatic activity and LD<sub>50</sub>. ND, Not detected. **B.** Effect of 10 µg/ml of treated (Venom + pBPB) and crude (Venom) *M. b. browni* venom on murine PND neuromuscular preparation (Venom, n = 3; Venom + pBPB, n = 1). **C.** C<sub>18</sub> RP-HPLC of treated (red) and untreated (black) venoms. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the migration of the individual subfractions; migration is not modified under reducing conditions (Fig. 7B). These results strongly suggest an interaction of currently unknown nature between subfractions D and E.

The complete amino acid sequences of subfractions D and E were obtained comparing the determined molecular weight and N-terminal sequences with the transcripts assembled from the venom gland transcriptomic analysis. Finally, a BLAST search was performed with both sequences against UniProt/SwissProt databases. The obtained transcripts together with the 4 best matches are shown in Fig. 7C.

### 3.8. Identification of pain-inducing dimer MitTx

Fraction XI (Fig. 8) was identified as a possible isoform of the toxin MitTx, a pain-inducing, dimeric complex which was originally described in the venom of the Texas coral snake *Micrurus tener*. MitTx consists of two subunits, one is a non-enzymatic PLA<sub>2</sub> homolog (MitTxβ) and the other is a Kunitz-type serine protease inhibitor (MitTxα) [53].

Fig. 8 shows the composition of FXI and an alignment of MitTx sequences with the fragments and molecular weights obtained from *M. b. browni* venom. Chromatographic analyses evidence that the dimer remains bound as a single fraction when using cation exchange but is separated through RP-HPLC.

In order to test the pain-inducing activity of this fraction, 4 µg of FXI in a total volume of 20 µl (5 µM) were injected s.c. to the right hind paw of three mice and the time they spent licking the injected paw was measured [53]. All three mice spent at least 150 s licking their paws while the control mice (injected s.c. with PBS) showed no paw-licking behavior.

### 3.9. Neutralization of *M. b. browni* venom with therapeutic equine antivenom

Regarding neutralization with Coralmyne® antivenom, we obtained an ED<sub>50</sub> of 4.24 µlAV/3LD<sub>50</sub> (CI<sub>95</sub> = 4.1–4.4) and < 10 µlAV/6LD<sub>50</sub>s. When we take into account the protein concentration of the antivenom, which was determined to be 7.8 mg/ml (280 nm absorbance with an extinction coefficient - E - of 1.4), these data can be expressed as 3.4 mgAV/mgV (mg of antivenom necessary to neutralize 1 mg of venom), when tested against 3LD<sub>50</sub>s and < 4.1 mgAV/mgV, when tested against 6 LD<sub>50</sub>s.

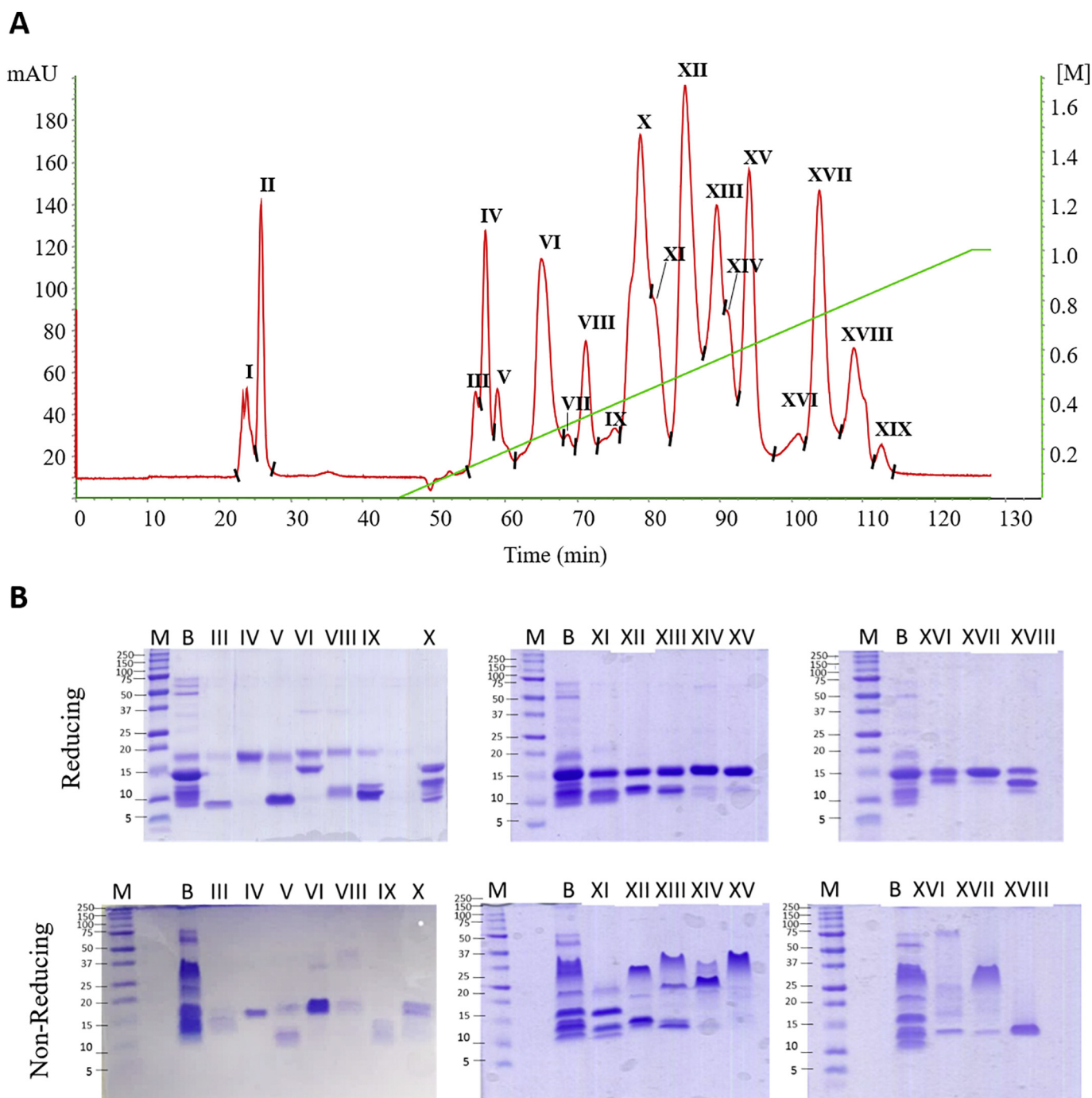
Using the same antivenom, we also tested neutralization of 3LD<sub>50</sub>s of the recombinant α-neurotoxin rD.H [33], and found no protection when using amounts as high as 3.5 mg of antivenom per mouse, equivalent to 416.7 mgAV/mgV.

## 4. Discussion

### 4.1. Venom composition

Like many other coral snake venoms studied so far, *M. b. browni* venom proteome is composed mainly of PLA<sub>2</sub>s and 3FTxs (Supplementary Table S1, Fig. 1). Protein from these families are also the main lethal components for both mammals and small colubrids (Table 1).

In most studies on venom proteomes, estimation of the relative abundance of each protein family is based on integration of the chromatographic absorbance areas (214 nm) combined to SDS-PAGE densitometry [54]. Though this is a very useful approach to estimate



**Fig. 5.** Cation exchange chromatography (FPLC) of *M. b. browni* venom. A. Chromatogram with detection performed at 214 nm. Gradient from 0 to 1M NaCl is shown in green, secondary y axis. *mAU*. Milli Absorbance units. B. 15% SDS-PAGE of whole venom (B) and venom fractions (III to XVIII) under reducing and non-reducing conditions. M. molecular weight markers (kDa). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

percentages of the total venom protein mass (i.e., g/100 g of total venom protein mass), it does not consider for the molecular mass of the components, and therefore, for the number of molecules that are present per protein family. The latter is undoubtedly relevant to understand the relative role of distinct protein families in the overall envenomation. In the present study, we calculated the approximate number of molecules per protein family using the average molecular weight (ESI-MS) of each group (Supplementary Table S2). When this adjustment was made, we observed that the relative proportion of 3FTxs should account for about half (50.4%) of venom proteins, while PLA<sub>2</sub>s become less abundant (38.2%).

It is important to note that greater abundance of a protein family does not necessarily mean a greater relevance in terms of toxicity. As we will discuss further, only one of the 3FTxs identified in the present study had a high lethal potency towards mice, and none of them was lethal for *Conopsis* sp.

Comparing our proteomic and transcriptomic data, we found that most toxin families identified in the transcriptome were also identified in the proteome. The exceptions to this were the NPs, which were not identified in the venom proteome, likely due to a very low expression in the venom. Aird and collaborators [34], for example, reported a similar finding, showing very low abundance of SVSP in some Brazilian

**Table 1**  
Characteristics of *M. b. browni* cationic exchange fractions.

	% in Venom	PLA <sub>2</sub> <sup>a</sup>	Predominant	Effect in <i>Conopsis</i> sp.	Lethality to ICR mice		
		U/mg ± SD	Protein families <sup>b</sup>	(Dose)	<i>i.p.</i> LD <sub>50</sub> µg/g <sup>c</sup> (CI <sub>95</sub> )	Toxicity score <sup>d</sup>	% Cont <sup>e</sup>
<i>M. browni</i>	100	284.6 ± 28.2		<i>i.p.</i> LD <sub>50</sub> = 5–6 µg/g Flaccid paralysis (from 1 µg/g)	0.46 (0.46–0.47)	217.4	100
III	1.3	87.5 ± 2.4	3FTx	<i>N.E.</i> (1.8 µg/g)	<i>N.L.</i>		
IV	4.2	1974.0 ± 102.3	PLA <sub>2</sub>	<i>N.E.</i> (1.8 µg/g)	<i>N.L.</i>		
V	2	244.5 ± 19.6	3FTx, PLA <sub>2</sub>	<i>N.D.</i>	<i>N.L.</i>		
VI	8.4	272.6 ± 15.3	PLA <sub>2</sub>	<i>N.E.</i> (1.8 µg/g)	<i>N.L.</i>		
VII	0.9	0	3FTx, PLA <sub>2</sub>	<i>N.D.</i>	<i>N.L.</i>		
VIII	3.5	0	3FTx, PLA <sub>2</sub>	<i>N.D.</i>	<i>N.L.</i>		
IX	1.9	ND	Unknown	<i>N.E.</i> (1.8 µg/g)	<i>N.L.</i>		
X	12	273.6 ± 7.1	3FTx, PLA <sub>2</sub>	<i>N.E.</i> (1.8 µg/g)	0.31 (0.29–0.31)	38.7	17.8
XI	6	0	PLA <sub>2</sub> , KUN, 3FTx	<i>N.E.</i> (1.8 µg/g)	<i>N.L.</i>		
XII	14.7	11.5 ± 0.4	PLA <sub>2</sub> , 3FTx	<i>N.E.</i> (1.8 µg/g)	<i>N.L.</i>		
XIII	8.3	11.2 ± 2.8	PLA <sub>2</sub> , 3FTx	<i>N.E.</i> (1.8 µg/g)	<i>N.L.</i>		
XIV	4.2	14.7 ± 0.4	Unknown	<i>N.D.</i>	<i>N.L.</i>		
XV	9.3	35.1 ± 4.4	PLA <sub>2</sub>	<i>N.D.</i>	<i>N.L.</i>		
XVI	1.8	0	PLA <sub>2</sub>	<i>N.D.</i>	<i>N.D.</i>		
XVII	9.6	12.4 ± 0.9	PLA <sub>2</sub>	Flaccid paralysis (1.4 µg/g)	0.36 (0.29–0.37)	26.7	12.3
XVIII	5.4	0	PLA <sub>2</sub> , 3FTx	Flaccid paralysis (0.4 µg/g)	0.095 (0.09–0.1)	56.8	26.1
XIX	0.9	0	Unknown	<i>N.E.</i> (1.8 µg/g)	<i>N.L.</i>		

*N.E.*: No observable effect.

*N.L.*: Non-lethal with a maximum dose of 1 µg/g.

*N.D.*: Not determined.

CI<sub>95</sub>: 95% Confidence interval.

<sup>a</sup> Phospholipase activity. U/mg ± SD. Units per milligram ± Standard deviation. *N* = 3.

<sup>b</sup> Relative abundance in SDS-PAGE.

<sup>c</sup> Median Lethal dose expressed in micrograms per gram.

<sup>d</sup> LD<sub>50</sub>/% in venom [52].

<sup>e</sup> Contribution of each fraction to lethality, considering the toxicity score of the whole venom as 100%.

#### *Micrurus* venoms.

When we compared the assembled transcripts with proteomic data, we observed that 11 of the assembled 3FTxs had identical theoretical MW to a molecule found in the proteome. Of these, six had identical sequences to the ms/ms peptides. Transcripts for the main PLA<sub>2</sub>s observed in the venom proteome were identified through their theoretical molecular weight and MS/MS peptides (Supplementary Fig. S2). By using the MS/MS and transcriptome data together, we were able to obtain the complete sequences for MitTxβ (Fig. 8), the neurotoxic PLA<sub>2</sub> FXVII, Brownitoxin-1 (Fig. 7) and the non-lethal PLA<sub>2</sub> we designated FXII.

Our transcriptomic data is similar to what was found in other studies of *Micrurus* venom glands, all of which showed the highest abundance and diversity of assembled transcripts to be from either PLA<sub>2</sub>s or 3FTxs [34,55,56]. In all those cases, venom transcripts included KUN, LAAO, SVMP, CTL and NGF which were also recovered. Finally, it is important to mention that the present analysis was performed with a single specimen of *M. b. browni* and it likely does not contain all known variants of toxins and does not give us any indication of variation in the species.

#### 4.2. Toxicity to mice

The present work shows that *M. b. browni* venom has a high lethal potency towards mice (*i.v.* LD<sub>50</sub> = 0.17 µg/g) when compared to other North American coral snake venoms such as *M. tener* (*i.v.* LD<sub>50</sub> = 1.2 µg/g) [23], *M. fulvius* (*i.v.* LD<sub>50</sub> = 0.3 µg/g) [5], *M. distans* (*i.v.* LD<sub>50</sub> = 0.8 µg/g) [57] and *M. laticollaris* (*i.v.* LD<sub>50</sub> = 0.5 µg/g) [57].

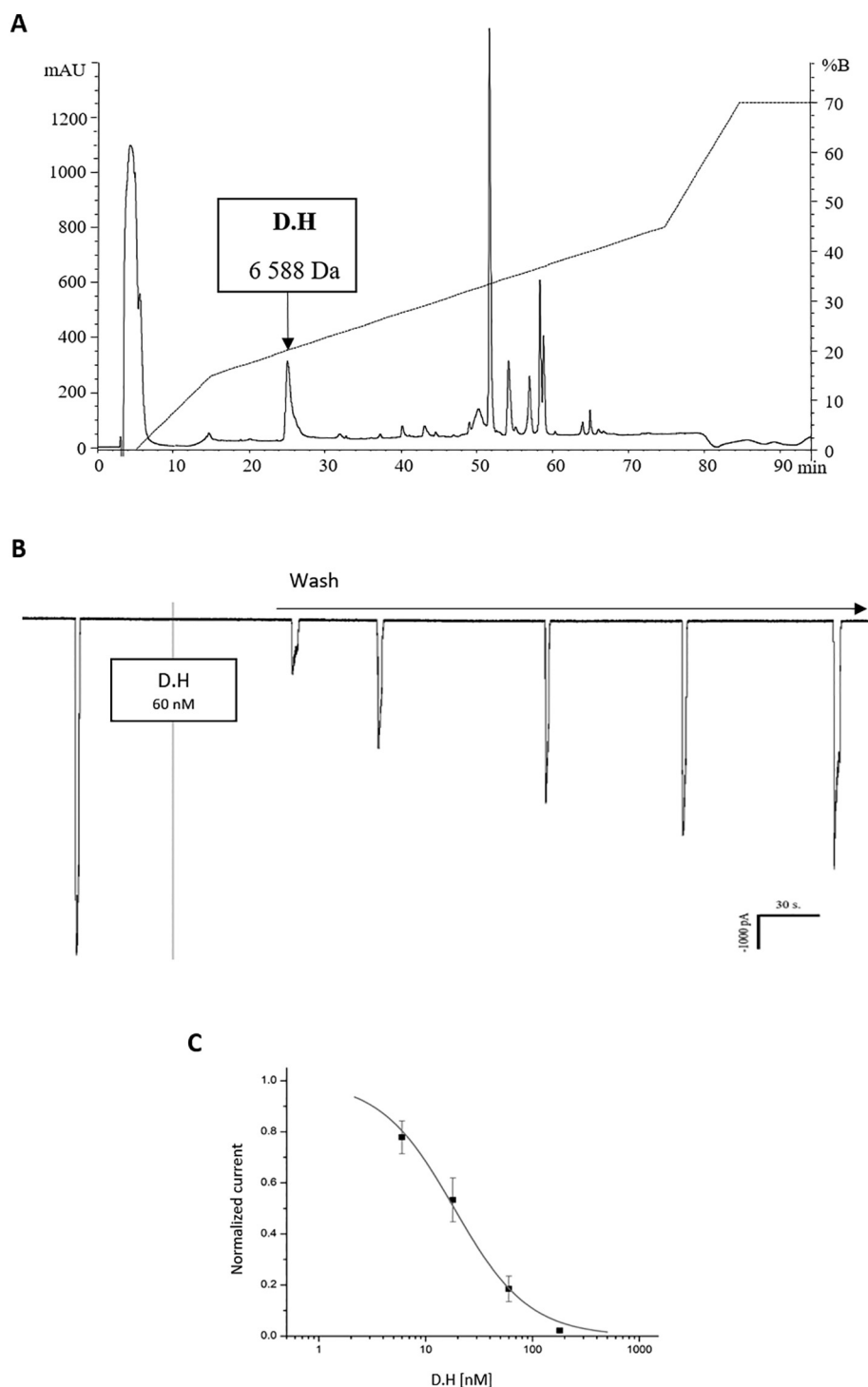
The mechanisms of neurotoxicity to mammals of coral snake venoms have been described to be either postsynaptic or presynaptic. *M. fulvius* has been shown to be an example of a purely presynaptic venom [24] and *M. laticollaris* is mainly presynaptic but has also postsynaptic action [15], while many Central and South American coral snake

venoms have been observed to be primarily postsynaptic [17,18,32]. In *M. b. browni* venom, lethality to mice was observed to be essentially caused by two PLA<sub>2</sub>s (FXVII and FXVIII), identified as such through their molecular mass and N-terminal sequences, while a short chain α-neurotoxin (D.H) was the only lethal non-PLA<sub>2</sub> protein identified. The characteristics of FXVII, are consistent with a presynaptic neurotoxin (Table 1), having low enzymatic activity (which has been shown to be typical and necessary for β-neurotoxicity) [58], high lethal potency and causing a severe flaccid paralysis to envenomated mice.

The calculation of toxicity scores and further analysis of contribution to venom overall lethality of cation exchange fractions (Table 1) suggested that the most important in this sense is FXVIII. This fraction includes Brownitoxin-1 and has no PLA<sub>2</sub> activity when using egg yolk as a substrate (Table 1) but has a low activity when using the colorimetric substrate 4-nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid (4NOBA; Data not shown). We observed that lethality of whole venom decreased approximately 10-fold upon inhibition of PLA<sub>2</sub> activity with pBPB (Fig. 4A), demonstrating the relevance of PLA<sub>2</sub>s in venom lethality. For comparison, we inhibited the PLA<sub>2</sub> activity of the venom from *M. fulvius* and observed that lethality is completely abolished (LD<sub>50</sub> increase of > 16-fold; Data not shown), supporting the previous report by Vergara and collaborators [24] that, unlike *M. b. browni*, lethality of *M. fulvius* venom is likely driven only by PLA<sub>2</sub>s. In an equivalent experiment, Fernandez and collaborators [35] observed that the venom of *M. alleni*, which is 3FTx-predominant, showed only a marginal decrease in LD<sub>50</sub> upon treatment with pBPB, while the PLA<sub>2</sub>-predominant venom of *M. mosquitensis* decreased its lethality approximately 15-fold. Still, given that fractions eluting between 70 and 80 min in RP-HPLC (which are SVMPs) appear to be affected in some way by pBPB treatment (Fig. 4C), we cannot completely discard the possibility of these proteins having some participation in overall venom lethality.

By analyzing the effect of pBPB-treated and untreated *M. b. browni* venom on the mouse PND preparation, we observed that the neuromuscular block is maintained after PLA<sub>2</sub> activity is inhibited, further



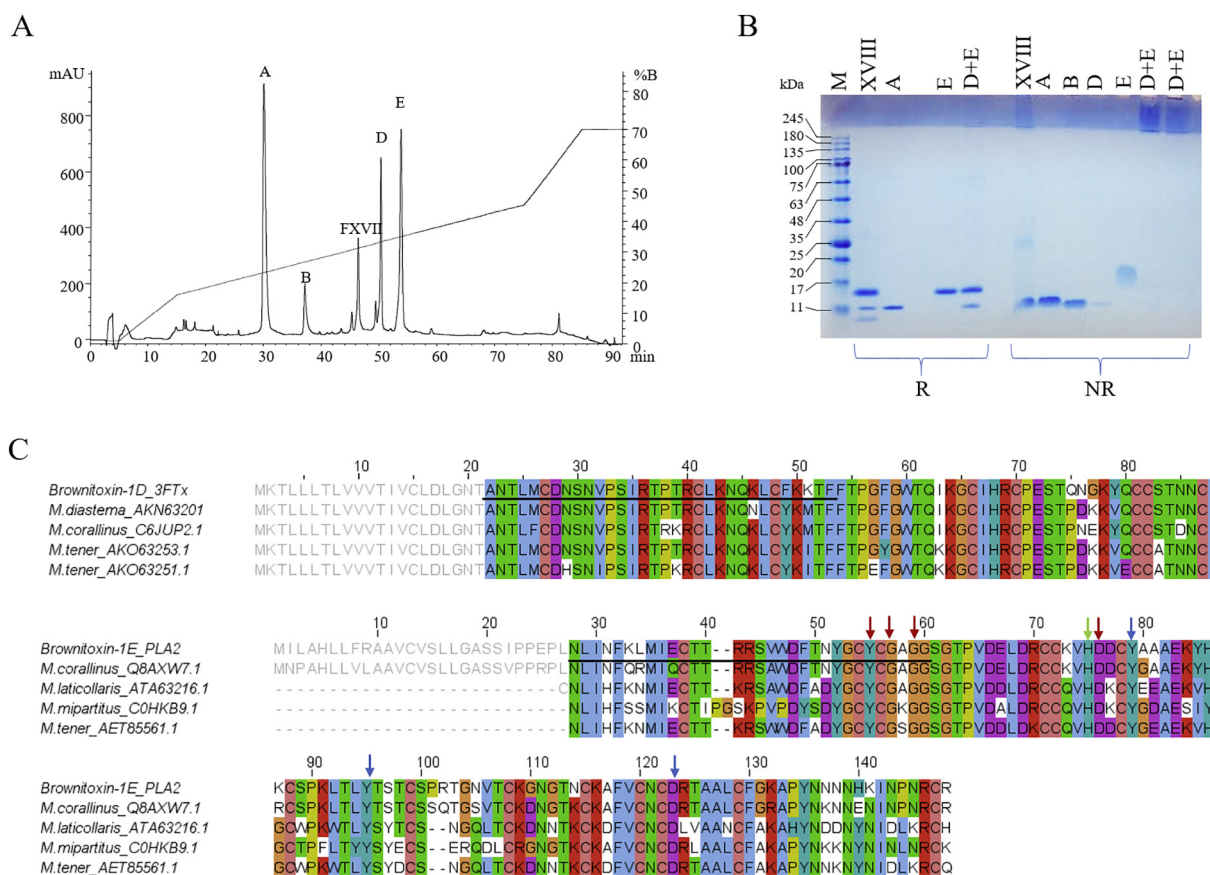


**Fig. 6.** Characterization of D.H from *M. b. browni*. A. Purification of fraction X on RP-HPLC C18. MW determined through ESI-MS. B. Patch clamp recordings on Rhabdomyosarcoma TE671 cells. Effect of 60 nM D.H toxin on ACh-evoked currents and C. Normalized dose response curve.

suggesting the presence of both PLA<sub>2</sub> and non-PLA<sub>2</sub> neuromuscular blockers (Fig. 3B). Toxin D.H, is likely the most important of the latter. It has an *i.v.* LD<sub>50</sub> of 0.09 µg/g, represents 8.6% of the whole venom and was not modified by the treatment with pBPB, as shown by its mass before (6588.3 Da) and after (6587.0 Da) treatment. It belongs to the Type I (short chain) α-neurotoxin subgroup of 3FTxs (82% identity to consensus sequence in Fry and collaborators, 2003) [59] and generates a potent block of the muscular nAChR (IC<sub>50</sub> = 18.5 nM), similar to other α-neurotoxins described, for example, in the venoms of *M. latricollaris* [22], *M. surinamensis* [32] and *M. mipartitus* [25] (Fig. 9).

Phospholipases A<sub>2</sub> with extremely high enzymatic activity on 10% egg yolk substrate were also identified in the venom but none generated an observable toxic effect (FIV, FVI, Table 1). It has been previously suggested that these non-toxic PLA<sub>2</sub>s could have a role in pre-digestion of prey [60] but further work is needed in order to prove this hypothesis or describe their presently unknown bioactivity.

Cation exchange fraction FXVIII showed no detectable enzymatic activity on egg yolk substrate. The lethal component isolated from this fraction, which we designated Brownitoxin-1, appears to be a complex that includes a PLA<sub>2</sub> (Brownitoxin-1E) as well as a 3FTx (Brownitoxin-



**Fig. 7.** Characterization of Brownitoxin-1. A. C18 RP-HPLC, 0.1 mg. B. 15% SDS-PAGE. 1 µg per lane. R. Reducing conditions NR. Non-reducing conditions. *kDa*. kilodaltons *M*. Molecular weight markers. C. Alignment of identified transcript sequences with highest identity proteins (BLAST). Signal peptides are colored in grey. Underlined sequences have been identified in the venom through Edman degradation. For the PLA<sub>2</sub>, amino acids involved in Ca<sup>2+</sup>-binding loop, catalytic site and structural support of the catalytic network are marked with red, green and blue arrows, respectively [61,62]. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

**Table 2**  
Lethality of FXVIII and its subfractions injected *i.v.* to ICR mice.

Fraction <sup>a</sup>	MW <sup>c</sup> (Da)	Dose (µg/mouse)	I.V. Lethality <sup>d</sup> (ToD)
FXVIII <sup>b</sup>		2	LD <sub>50</sub> : 0.2 µg/mouse
A	6812; 6923	2	0/1
B	7076; 7188	2	0/1
D	7570	0.1, 5	0/3, 0/3
E	13,181; 7561	0.1, 5	0/3, 0/3
D(33%) + E(77%)		0.2	3/3 (2.5 h)
A(42%) + B(6%) + D(17%) + E(25%)		0.4	3/3 (2.5 h)

<sup>a</sup> Proportions used to combine fractions were approximately those obtained from RP-HPLC chromatogram at 280 nm and are shown in parenthesis.

<sup>b</sup> Fraction obtained from cation exchange chromatography.

<sup>c</sup> MW. Molecular mass (ESI-MS).

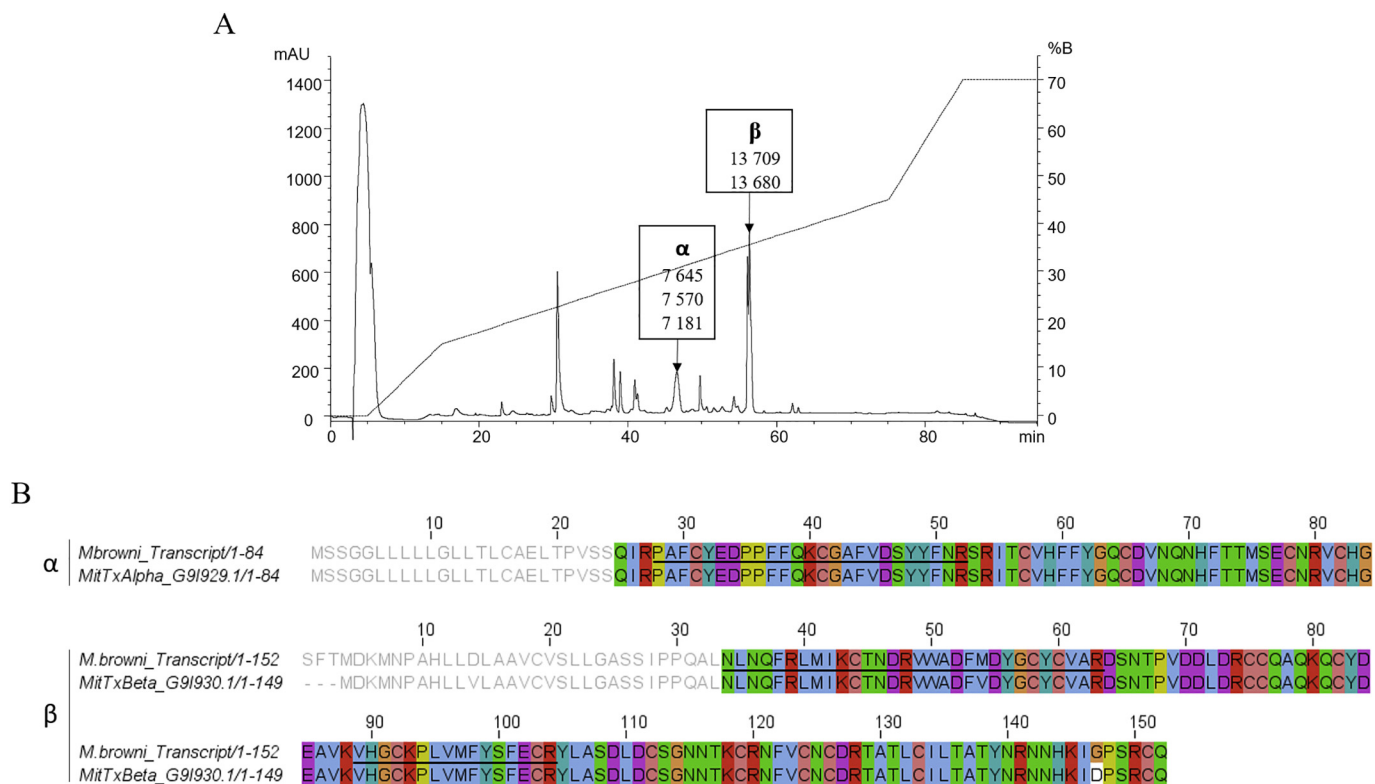
<sup>d</sup> Number of dead/number of IV injected mice. ToD. Time of death. LD<sub>50</sub>. Median lethal dose.

1D) (Fig. 7). Interestingly, no PLA<sub>2</sub> activity was detected for Brownitoxin-1E when analyzed using egg yolk as a substrate (Data not shown) but the sequence obtained from the transcriptome shows the presence of the His/Asp dyad that is most relevant for enzymatic activity and the amino acids that conform the Ca<sup>2+</sup>-binding loop (Fig. 7C) [61,62]. It is likely that the formation of a multimeric complex decreases enzymatic activity of this toxin, as has been observed to happen with Crotoxin, an heterodimeric β-neurotoxin [63], but further characterization is needed

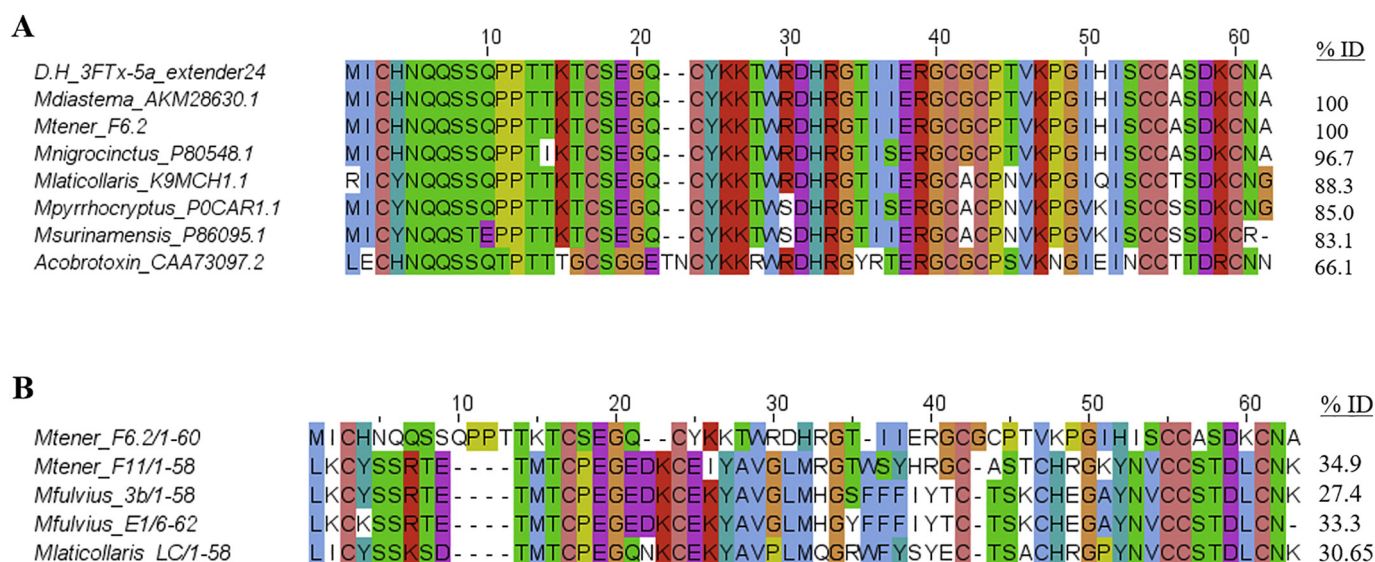
to prove such hypothesis.

In the present work, we showed that, individually, Brownitoxin-1D and Brownitoxin-1E have no or very low lethality while when combined the *i.v.* LD<sub>50</sub> is lower than 0.2 µg/g (Table 2). The nature of the interaction between these proteins is currently under investigation. This is, to the best of our knowledge, the first report of a lethal, multimeric neurotoxin in the venom of a coral snake. Given that the fractionation using RP-HPLC separates this complex, it was not possible to identify it with our initial approach. This result stresses the relevance of a thorough biochemical analysis in order to elucidate the mechanism of action of snake venom toxins. So far, sequences with more than 80% identity to both components of Brownitoxin-1 have been reported in the venom gland transcriptome of *M. tener* (3FTx AKO63253.1, AKO63251.1; PLA<sub>2</sub> AET85561.1) and *M. corallinus* (3FTx C6JUP2.1; PLA<sub>2</sub> Q8AXW7.1), suggesting that similar synergisms could also occur in those venoms (Fig. 7C).

Finally, the commercial antivenom Coralmyn® was very efficient to neutralize 3 and 6 LD<sub>50</sub>s of *M. b. browni* whole venom. Interestingly, no neutralization or delay of time of death was observed even when using 3.5 mg of antivenom against 3LD<sub>50</sub>s of purified rD.H. This apparent contradiction could be explained by the amount of α-neurotoxin present in the venom (8.6%). When 19.2 µg of whole venom, equivalent to 6 LD<sub>50</sub>s, are injected to a mouse, only 1.6 µg/mouse (0.08 µg/g) of D.H are being inoculated. This amount is close to than the calculated LD<sub>50</sub> for the purified toxin (0.09 µg/g; see Section 3.5) and, therefore, lethality due to this component is not certain at this dose. In a study using chick neuromuscular preparations and the same antivenom, Yang and collaborators [13] observed that the neurotoxicity of *M. fulvius* venom



**Fig. 8.** Identification of a MitTx-like dimeric toxin. A. RP-HPLC, 0.1 mg, molecular weights in Da of subfractions are shown as inserts ( $\alpha$ . alpha subunit;  $\beta$ . beta subunit). B. Alignment of identified transcripts with MitTx sequences Peptides that were identified in the proteome (MS/MS) are underlined.



**Fig. 9.** Sequence alignment of short-chain  $\alpha$ -neurotoxins relevant to the present work. (A) Short chain  $\alpha$ -neurotoxins with high lethality towards mice. (B) Toxins with tested (*Mtener\_F11*) or possible snake specificity aligned with the *mouse specific*  $\alpha$ -neurotoxin F6.2.

could be efficiently neutralized while this was not the case for the venom from *M. tener*. As mentioned before, the venom of the latter has an  $\alpha$ -neurotoxin, designated F6.2 (Fig. 9), that is identical to D.H. and could be involved in the observed lack of neutralization. Consequently, a very good neutralizing potency in a real envenomation, where much higher amounts of venom are likely to be delivered, should not be taken for granted.

#### 4.3. Toxicity to natural prey

In terms of overall venom lethality, *M. b. browni* venom is 11-fold less potent when tested in *Conopsis* sp. than when tested in mice, but flaccid paralysis occurs at approximately the same dose in both animal models. A similar case was previously reported by our group for the venom of *M. tener* [23], concluding that the difference in LD<sub>50</sub> is likely due to physiological differences between snakes and mice rather than a case of specific resistance to the venom.

Remarkably, lethality to *Conopsis* sp. appears to be caused mainly by

the two described PLA<sub>2</sub>s, while D.H causes no apparent effect (Table 1), even when we injected almost 10-fold of a dose lethal to mice (1 µg/g). In order to analyze a possible resistance of *Conopsis* sp. to D.H, we then injected 1 µg/g of the pure toxin *i.p.* to other two species of small colubrids: one adult specimen each of *Ninia sebae* and one adult specimen of *Chersodromus liebmanni*. No effect was observed in any of the snakes, which could suggest a low toxicity of this protein in small colubrids in general, rather than a resistance specifically in *Conopsis* sp. Unfortunately, further repetition of these experiments was impossible due to the low availability of the colubrid models.

Even though α-neurotoxins are known to be extremely lethal to mice [31], their lethality to natural prey has only been analyzed in a few cases [9,64–66]. Some venomous and non-venomous snakes, have been reported to be extremely resistant to α-cobrotoxin (66% sequence identity to D.H; Fig. 9) and α-bungarotoxin, a short and a long chain α-neurotoxin, respectively [67,68]. A resistance to the venom of *Micrurus nigrocinctus* by two colubrid snakes of the genus *Ninia* has also been described [8].

Analysis of 3FTx sequences previously described by our group in the venom of *M. tener* [23] and the venom glands of four species of North American coral snakes [33] yielded some interesting observations. First, short chain α-neurotoxins with much higher toxicity to mice than snakes are present in the venom of *M. tener* and *M. diastema* (100% sequence identity to D.H) and very similar components (> 90% sequence identity) exist in the venoms of *M. laticollaris*, *M. nigrocinctus* and *M. surinamensis* [3,32,33] (Fig. 9A). Biological significance of the presence of these toxins in the venoms of coral snakes, which feed strictly upon ectotherms, remains mainly speculation. However, their high conservation in several species suggests that they could have a function within the venom. Dashevsky and collaborators [69], reported that the toxins of *Micrurus* are some of the most rapidly evolving proteins, observation that supports the idea of a functional role for these extremely conserved proteins in *Micrurus* venoms. It is also likely that they are lethal to snakes at much higher doses. MS1, a short chain α-neurotoxin from *M. surinamensis*, with 83% sequence identity to D.H (Fig. 9A), is lethal to fish and mice at 5 µg/g, but no lower doses were analyzed. Toxin F6 from *M. tener* (100% identical to D.H) causes no effect on *Conopsis* sp. when 2 µg/g are inoculated *s.c.* but no higher doses were tested [23].

Another noteworthy observation arising from this analysis is that, while a snake-specific toxin designated F11 was found in the venom of *M. tener*, no components with such specificity were found in the venom of *M. b. browni*. Sequencing by direct Edman degradation of F11, which causes a generalized flaccid paralysis to *Conopsis* sp. with 1 µg/g *s.c.* but has no observable effect on mice with up to 2 µg/g *i.v.* [23], showed that it has only 34.9% identity to D.H (Fig. 9B; Supplementary Fig. S1). No sequences with higher identity to F11 were found in the present work but similar ones have been described as transcripts in the venom glands of *M. laticollaris* and *M. fulvius*. Alpha-neurotoxins with high specificity towards prey models have been described in colubrid venoms [64–66] and 3FTxs with different prey specificity have been previously described to coexist in the venom of the colubrid *Spilotes* sp. [70] In coral snake venoms, F11 is, to the best of our knowledge, the only prey specific toxin described so far.

Other 3FTx identified in the present work appear to be devoid of significant toxicity towards both tested models (Table 1) though we are not able to discard that some low toxicity molecules could have relevance in both murine and reptile envenomation. The identified PLA<sub>2</sub> with β-neurotoxic activity caused flaccid paralysis to both mice and *Conopsis* sp.

As mentioned before, prey specificity of venoms from several South American coral snakes was previously reported by da Silva and Aird [9], who found that the venom of many South American species had higher toxicity on natural prey models than when tested on murine or non-prey animals. This does not appear to be the case for the two Mexican coral snake venoms analyzed so far ([23] and present work)

which could be in part a consequence of both venoms being abundant in presynaptic neurotoxins.

## 5. Conclusions

The present work represents one of the most complete characterizations of a coral snake venom performed so far. Among other things, we were able to observe that PLA<sub>2</sub>s and, in less extent 3FTxs, represent the main toxic components of the venom.

Also, the observation of multimeric toxins that are not identified with regular proteomic approaches, stresses the need for the use of classic biochemistry studies in combination with high throughput techniques in order to understand venom function. This work could serve as a basis for the finding of several other multimeric toxins in coral snake venoms.

Finally, we report the absence of prey specificity in the venom of a strictly ophiophagus snake, providing data that may be of relevance when posing further questions on the biological role of venom.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103863>.

## Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest regarding the present work.

## Acknowledgements

The authors deeply thank the following:  
Jason Strickland for providing advice processing, analyzing, and discussing the transcriptomic data. Maribel Herrera-Ruiz, Jonathan Cortés, Jonathan Orduño and Arturo Pérez from CIBIS-IMSS for their invaluable assistance during the mounting of neuromuscular junction experiments. Jimena Cid for her extremely patient guidance during the interpretation of transcriptomic data. Timoteo Olamendi for his help with protein digestion and Edman degradation sequencing. Juan Manuel Hurtado, David Castañeda and Roberto Pablo Rodríguez for all their help with diverse software installations and technical support. Stephen Mackessy and his team for extensive discussions and insights regarding the present work. Gibrán Rodríguez and Luis García for their help during PLA<sub>2</sub> activity determination.

## Funding

The present work was funded by the grants PAPIIT-DGAPA IN207218 and CONACyT-FORDECyT 303045 to Alejandro Alagón. MB was supported with a PhD scholarship from CONACyT (#290496).

## References

- [1] P. Uetz, P. Freed, J. Hošek, Reptile Database, Reptile Database, 2020, [www.reptile-database.org](http://www.reptile-database.org) accessed January 3, 2019.
- [2] J.A. Roze, Coral Snakes of the Americas Biology Identification and Venoms, Krieger Publishing Company, Malabar, USA, 1996.
- [3] J.-P. Rosso, O. Vargas-Rosso, J.M. Gutierrez, H. Rochat, P.E. Bougis, Characterization of α-neurotoxin and phospholipase A<sub>2</sub> activities from *Micrurus* venoms determination of the amino acid sequence and receptor-binding ability of the major α-neurotoxin from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*, Eur. J. Biochem. 238 (1996) 231–239.
- [4] F. Bucarechi, E. Mello De Capitani, R.J. Vieira, C.K. Rodrigues, M. Zannin, N.J. Da Silva Jr, L.L. Casais-E-Silva, S. Hyslop, Coral snake bites (*Micrurus* spp.) in Brazil: a review of literature reports, Clin. Toxicol. 54 (2016) 222–234, <https://doi.org/10.3109/15563650.2015.1135337>.
- [5] E. Sánchez, J.C. López-Johnston, A. Rodríguez-Acosta, J.C. Pérez, Neutralization of two North American coral snake venoms with United States and Mexican anti-venoms, Toxicon 51 (2008) 297–303, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.10.004>.
- [6] A. Wood, J. Schauben, J. Thundiylil, T. Kunisaki, D. Sollee, C. Lewis-Younger, J. Bernstein, R. Weisman, Review of Eastern coral snake (*Micrurus fulvius fulvius*) exposures managed by the Florida Poison Information Center Network: 1998–2010,

- Clin. Toxicol. 51 (2013) 783–788, <https://doi.org/10.3109/15563650.2013.828841>.
- [7] J.M. Gutiérrez, Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina, Rev. Biol. Trop. 50 (2002) 377–394.
- [8] A.H. Urdaneta, F. Bolaños, J.M. Gutiérrez, Feeding behavior and venom toxicity of coral snake *Micrurus nigrocinctus* (Serpentes: Elapidae) on its natural prey in captivity, Comp. Biochem. Physiol. C 138 (2004) 485–492, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.08.018>.
- [9] N.J. da Silva Jr, S.D. Aird, Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms, Comp. Biochem. Physiol. C 128 (2001) 425–456.
- [10] A.R. de Roodt, J. Estévez-Ramírez, J.F. Paniagua-Solis, S. Litwin, A. Carvajal-Saucedo, J.A. Dolab, L.E. Robles-Ortiz, A. Alagón, Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México, Gac. Med. Mex. 141 (2005) 13–21.
- [11] T.M. Camargo, A.R. de Roodt, M.A. da Cruz-Höfling, L. Rodrigues-Simioni, The neuromuscular activity of *Micrurus pyrrochryptus* venom and its neutralization by commercial and specific coral snake antivenoms, J. Venom Res. 2 (2011) 24–31.
- [12] P.H.C. Ciscotto, B. Rates, D. a F. Silva, M. Richardson, L.P. Silva, H. Andrade, M.F. Donato, G.A. Cotta, W.S. Maria, R.J. Rodrigues, E. Sanchez, M.E. De Lima, A.M.C. Pimenta, Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species, J. Proteome 74 (2011) 1810–1825, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.07.011>.
- [13] D.C. Yang, J. Dobson, C. Cochran, D. Dashevsky, K. Arbuckle, M. Benard, L. Boyer, A. Alagón, I. Hendrikx, W.C. Hodgson, B.G. Fry, The bold and the beautiful: a neurotoxicity comparison of new world coral snakes in the *Micruroides* and *Micrurus* genera and relative neutralization by antivenom, Neurotox. Res. 32 (2017) 487–495, <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9771-4>.
- [14] R. Weis, R.J. McIsaac, Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake, *Micrurus fulvius*, Toxicon 9 (1971) 219–228, [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(71\)90073-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(71)90073-0).
- [15] A. Carbajal-Saucedo, R.S. Floriano, C.A. Dal Belo, A. Olvera-Rodríguez, A. Alagón, L. Rodrigues-Simioni, Neuromuscular activity of *Micrurus laticollaris* (Squamata: Elapidae) venom in vitro, Toxins (Basel). 6 (2013) 359–370, <https://doi.org/10.3390/toxins6010359>.
- [16] F.C. Goularte, M.A. Cruz-Höfling, J.C. Cogo, J.M. Gutierrez, L. Rodrigues-Simioni, The ability of specific antivenom and low temperature to inhibit the myotoxicity and neuromuscular block induced by *Micrurus*, Toxicon 33 (1995) 67–89.
- [17] C. Renjifo, E.N. Smith, W.C. Hodgson, J.M. Renjifo, A. Sanchez, R. Acosta, J.H. Maldonado, A. Riveros, Neuromuscular activity of the venoms of the Colombian coral snakes *Micrurus dissolucus* and *Micrurus mipartitus*: an evolutionary perspective, Toxicon 59 (2012) 132–142, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.10.017>.
- [18] F.G. Serafim, M. Reali, M.A. Cruz-Höfling, M.D. Fontana, Action of *Micrurus dumerilii carinicauda* coral snake venom on the mammalian neuromuscular junction, Toxicon 40 (2002) 167–174.
- [19] K.G. Moreira, M.V. Prates, F.A.C. Andrade, L.P. Silva, P.S.L. Beirão, C. Kushmerick, L.A. Naves, C. Bloch, Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurus frontalis* venom, decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction, Toxicon 56 (2010) 55–63, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.02.030>.
- [20] A.L.C. Terra, L.S. Moreira-Dill, R. Simões-Silva, J.R.N. Monteiro, W.L.G. Cavalcante, M. Gallacci, N.B. Barros, R. Nicolette, C.B.G. Teles, P.S.M. Medeiros, F.B. Zanchi, J.P. Zuliani, L.A. Calderon, R.G. Stábeli, A.M. Soares, Biological characterization of the Amazon coral *Micrurus spixii* snake venom: isolation of a new neurotoxic phospholipase A2, Toxicon 103 (2015) 1–11, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.06.011>.
- [21] A. Alape-Girón, B. Stiles, J. Schmidt, M. Girón-Cortes, M. Thelestam, H. Jörnvall, T. Bergman, Characterization of multiple nicotinic acetylcholine receptor-binding proteins and phospholipases A2 from the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*, FEBS Lett. 380 (1996) 29–32, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01543-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01543-4).
- [22] A. Carbajal-Saucedo, E. López-Vera, M. Bénard-Valle, E.N. Smith, F. Zamudio, A.R. de Roodt, A. Olvera-Rodríguez, Isolation, characterization, cloning and expression of an alpha-neurotoxin from the venom of the Mexican coral snake *Micrurus laticollaris* (Squamata: Elapidae), Toxicon 66 (2013) 64–74, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.006>.
- [23] M. Bénard-Valle, A. Carbajal-Saucedo, A. De Roodt, E. López-Vera, A. Alagón, Biochemical characterization of the venom of the coral snake *Micrurus tener* and comparative biological activities in the mouse and a reptile model, Toxicon 77 (2014) 6–15, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.10.005>.
- [24] I. Vergara, M. Pedraza-Escalona, D. Paniagua, R. Restano-Cassulini, F. Zamudio, C.V.F. Batista, L.D. Possani, A. Alagón, Eastern coral snake *Micrurus fulvius* venom toxicity in mice is mainly determined by neurotoxic phospholipases A2, J. Proteome 105 (2014) 295–306, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.027>.
- [25] P. Rey-Suárez, R.S. Floriano, S. Rostelato-Ferreira, M. Saldarriaga-Córdoba, V. Núñez, L. Rodrigues-Simioni, B. Lomonte, Mipartoxin-I, a novel three-finger toxin, is the major neurotoxic component in the venom of the redtail coral snake *Micrurus mipartitus* (Elapidae), Toxicon 60 (2012) 851–863, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.05.023>.
- [26] B. Lomonte, P. Rey-Suárez, J. Fernández, M. Sasa, D. Pla, N. Vargas, M. Bénard-Valle, L. Sanz, C. Corrêa-Netto, V. Núñez, A. Alape-Girón, A. Alagón, J.M. Gutiérrez, J.J. Calvete, Venoms of *Micrurus* coral snakes: evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses, Toxicon 122 (2016) 7–25, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.09.008>.
- [27] R.M. Kini, Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes, Toxicon 42 (2003) 827–840, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.002>.
- [28] L.L.M. Van Deenen, G.H. De Haas, The substrate specificity of phospholipase A, Biochim. Biophys. Acta Spec. Sect. Lipids Relat. Subj. 70 (1963) 538–553, [https://doi.org/10.1016/0926-6542\(63\)90081-7](https://doi.org/10.1016/0926-6542(63)90081-7).
- [29] R.W. Dixon, J.B. Harris, Nerve terminal damage by b-bungarotoxin: its clinical significance, Am. J. Pathol. 154 (1999) 447–455.
- [30] R.M. Kini, R. Doley, Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets, Toxicon 56 (2010) 855–867, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.07.010>.
- [31] S. Nirthanan, M.C.E. Gwee, Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on, J. Pharmacol. Sci. 94 (2004) 1–17, <https://doi.org/10.1016/j.jphs.94.1>.
- [32] T. Olamendi-Portugal, C.V.F. Batista, R. Restano-Cassulini, V. Pando, O. Villahernandez, A. Zavaleta-Martínez-Vargas, M.C. Salas-Arruz, R.C. Rodríguez de la Vega, B. Becerril, L.D. Possani, Proteomic analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: novel toxins, their function and phylogeny, Proteomics 8 (2008) 1919–1932, <https://doi.org/10.1002/pmic.200700668>.
- [33] J.F. Guerrero-Garzón, M. Bénard-Valle, R. Restano-Cassulini, F. Zamudio, G. Corzo, A. Alagón, A. Olvera-Rodríguez, Cloning and sequencing of three-finger toxins from the venom glands of four *Micrurus* species from Mexico and heterologous expression of an alpha-neurotoxin from *Micrurus diastema*, Biochimie 147 (2018) 114–121, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.01.006>.
- [34] S.D. Aird, N. da Silva, L. Qiu, A. Villar-Briones, V. Saggi, M. Pires de Campos Telles, M. Grau, A. Mikheyev, Coralsnake venomomics: Analyses of venom gland transcriptomes and proteomes of six Brazilian taxa, Toxins (Basel) 9 (2017) 1–64, <https://doi.org/10.3390/toxins9060187>.
- [35] J. Fernández, N. Vargas-Vargas, D. Pla, M. Sasa, P. Rey-Suárez, L. Sanz, J.M. Gutiérrez, Snake venomomics of *Micrurus alleni* and *Micrurus surinamensis* from the Caribbean region of Costa Rica reveals two divergent compositional patterns in New World elapids, Toxicon 107 (2015) 217–233, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.08.016>.
- [36] NaturaLista, <https://www.naturalista.mx/home>, (2019) accessed August 25, 2019.
- [37] D. Lorke, A new approach to practical acute toxicity testing, Arch. Toxicol. 54 (1983) 275–287, <https://doi.org/10.1007/BF01234480>.
- [38] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227 (1970) 680–685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- [39] J.L. Strickland, A.J. Mason, D.R. Rokyta, C.L. Parkinson, Phenotypic variation in Mojave Rattlesnake (*Crotalus scutulatus*) venom is driven by four toxin families, Toxins (Basel). 10 (2018) 1–23, <https://doi.org/10.3390/toxins10040135>.
- [40] D.R. Rokyta, A.R. Lemmon, M.J. Margres, K. Aronow, The venom-gland transcriptome of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*), BMC Genomics 13 (2012) 1–23.
- [41] B. Langmead, S.L. Salzberg, Fast gapped-read alignment with Bowtie 2, Nat. Methods 9 (2013) 357–359, <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- [42] J. Shiloah, C. Klibansky, A. de Vries, A. Berger, Phospholipase B activity of a purified phospholipase A from *Vipera palestinae* venom, J. Lipid Res. 14 (1973) 267–278.
- [43] M.T. Crachi, L.W. Hammer, W.C. Hodgson, A pharmacological examination of venom from the Papuan taipan (*Oxyururus scutellatus canni*), Toxicon. 37 (1999) 1721–1734, [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00114-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00114-2).
- [44] H. Zhao, L. Tang, X. Wang, Y. Zhou, Z. Lin, Structure of a snake venom phospholipase A2 modified by p-bromo-phenacyl-bromide, Toxicon 36 (1998) 875–886, [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00169-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00169-4).
- [45] E. Bulbring, Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat, Br. J. Pharmacol. Chemother. 1 (1946) 38–61.
- [46] E. Neri-Castro, B. Lomonte, M. Valdés, R. Ponce-López, M. Bénard-Valle, M. Borja, J.L. Strickland, J.M. Jones, C. Grünwald, F. Zamudio, A. Alagón, Venom characterization of the three species of *Ophryoxys* and proteomic profiling of *O. sphenophrys* unveils Sphenotoxin, a novel Crotoxin-like heterodimeric  $\beta$ -neurotoxin, J. Proteome 192 (2018) 196–207, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.09.002>.
- [47] C.M. Garland, R.C. Foreman, J.E. Chad, L. Holden-Dye, R.J. Walker, The actions of muscle relaxants at nicotinic acetylcholine receptor isoforms, Eur. J. Pharmacol. 357 (1998) 83–92.
- [48] A. Casasola, B. Ramos-Cerrillo, A.R. de Roodt, A.C. Saucedo, J.P. Chippaux, A. Alagón, R.P. Stock, Paraspecific neutralization of the venom of African species of cobra by an equine antiserum against *Naja melanoleuca*: a comparative study, Toxicon 53 (2009) 602–608, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.011>.
- [49] M.F. Yañez-Mendoza, Undergraduate thesis: Efecto del veneno de la serpiente de coral *Micrurus browni* en modelo de mamífero y reptil, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico, 2019.
- [50] C. Díaz-Oreiro, J.M. Gutiérrez, Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties, Toxicon 35 (1997) 241–252, [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00128-6).
- [51] M. Benard-Valle, Caracterización integral y análisis de especificidad del veneno de la serpiente de coral *Micrurus browni browni*, Universidad Nacional Autónoma de México, 2020, <http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F?RN=993305129>.
- [52] A.H. Laustsen, B. Lohse, B. Lomonte, M. Engmark, J.M. Gutiérrez, Selecting key toxins for focused development of elapid snake antivenoms and inhibitors guided by a Toxicity Score, Toxicon 104 (2015) 43–45, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.07.334>.
- [53] C.J. Bohlen, A.T. Chesler, R. Sharif-Naeini, K.F. Medzihradsky, S. Zhou, D. King, E.E. Sánchez, A.L. Burlingame, A.I. Basbaum, D. Julius, A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain, Nature 479 (2011) 410–414, <https://doi.org/10.1038/nature10607>.
- [54] J.J. Calvete, L. Sanz, Y. Angulo, B. Lomonte, J.M. Gutiérrez, Venoms, venomomics, antivenomics, FEBS Lett. 583 (2009) 1736–1743, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.07.011>.

- 2009.03.029.
- [55] C. Corrêa-Netto, I. de L.M. Junqueira-de-Azevedo, D.A. Silva, P.L. Ho, M. Leitão-de-Araújo, M.L.M. Alves, L. Sanz, D. Foguel, R.B. Zingali, J.J. Calvete, Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*, *J. Proteome* 74 (2011) 1795–1809, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.04.003>.
- [56] M.J. Margres, K. Aronow, J. Loyacano, D.R. Rokyta, The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms, *BMC Genomics* 14 (2013) 531, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-531>.
- [57] M. Bénard-Valle, Undergraduate thesis: Similitud bioquímica e inmunológica entre venenos de coralillos Norteamericanos, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México, 2009.
- [58] C. Bon, B. Saliou, Ceruleotoxin: identification in the venom of *Bungarus fasciatus*, molecular properties and importance of phospholipase A2 activity for neurotoxicity, *Toxicon* 21 (1983) 681–698.
- [59] B.G. Fry, W. Wüster, R.M. Kini, V. Brusica, A. Khan, D. Venkataraman, A.P. Rooney, Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins, *J. Mol. Evol.* 57 (2003) 110–129, <https://doi.org/10.1007/s00239-003-2461-2>.
- [60] M. Van der Laat, J. Fernández, J. Durban, E. Villalobos, E. Camacho, J.J. Calvete, B. Lomonte, Amino acid sequence and biological characterization of BlatPLA2, a non-toxic acidic phospholipase A2 from the venom of the arboreal snake *Bothriechis lateralis* from Costa Rica, *Toxicon* 73 (2013) 71–80, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.07.008>.
- [61] D.L. Scott, S.P. White, Z. Otwinowski, W. Yuan, M.H. Gelb, P.B. Sigler, Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2, *Science* (80-) 250 (1990) 1541–1546, <https://doi.org/10.1126/science.2274785>.
- [62] D.L. Scott, Phospholipase A2: structure and catalytic properties, in: R. Manjunatha Kini (Ed.), *Venom Phospholipase A2 Enzym. Struct. Funct. Mech.* John Wiley & Sons, 1997, p. 511.
- [63] F.R. Radvanyi, C. Bon, Catalytic activity and reactivity with p-bromophenacyl bromide of the phospholipase subunit of crotoxin. Influence of dimerization and association with the noncatalytic subunit, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 12616–12623.
- [64] J. Pawlak, S.P. Mackessy, N.M. Sixberry, E.A. Stura, M. He, L. Du, C.S. Foo, Irditoxin, a novel covalently linked heterodimeric three-finger toxin with high taxon-specific neurotoxicity, *FASEB J.* 23 (2009) 534–545, <https://doi.org/10.1096/fj.08-113555>.
- [65] J. Pawlak, S.P. Mackessy, B.G. Fry, M. Bhatia, G. Mourier, C. Fruchart-Gaillard, D. Servent, R. Ménez, E. Stura, A. Ménez, R.M. Kini, Denmotoxin, a three-finger toxin from the colubrid snake *Boiga dendrophila* (mangrove catsnake) with bird-specific activity, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 29030–29041, <https://doi.org/10.1074/jbc.M605850200>.
- [66] W.H. Heyborne, S.P. Mackessy, Identification and characterization of a taxon-specific three-finger toxin from the venom of the Green Vinesnake (*Oxybelis fulgidus*; Family Colubridae), *Biochimie* 95 (2013) 1923–1932, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.025>.
- [67] S.J. Burden, H.C. Hartzell, D. Yoshikami, Acetylcholine receptors at neuromuscular synapses: phylogenetic differences detected by snake a-neurotoxins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72 (1975) 3245–3249.
- [68] Y.-B. Liu, K. Xu (Ke Hsu), Lack of the blocking effect of cobrotoxin from *Naja naja atra* venom on neuromuscular transmission in isolated nerve muscle preparations from poisonous and non-poisonous snakes, *Toxicon* 28 (1990) 1071–1076, [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90145-W](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90145-W).
- [69] D. Dashevsky, B. Fry, Ancient diversification of three-finger toxins in *Micrurus* coral snakes, *J. Mol. Evol.* 86 (2018) 58–67, <https://doi.org/10.1007/s00239-017-9825-5>.
- [70] C.M. Modahl, S. Mrinalini, S.P. Frieze, Mackessy, adaptive evolution of distinct prey-specific toxin genes in rear-fanged snake venom, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 285 (2018) 1–10, <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1003>.