



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización funcional del veneno de la serpiente de coral mexicana *Micrurus diastema*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Yañez Mendoza Manuel Francisco

TUTOR PRINCIPAL

[Dr. Alejandro Alagón Cano IBt-UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

[Dra. Rita Restano Cassulini IBt-UNAM](#)

[Dr. Manuel Benigno Aguilar INB-UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Mayo 2024



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.



El presente trabajo para obtener el grado de Maestro en Ciencias Bioquímicas se realizó bajo la tutoría del Dr. Alejandro Alagón Cano, en el laboratorio que pertenece al departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco el financiamiento otorgado por parte del Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) como beca de maestría a nombre de Manuel Francisco Yañez Mendoza y a el proyecto CONACyT-FORDECyT # 303045 “Venenos y antivenenos” a nombre del Dr. Alejandro Alagón Cano.

## Agradecimientos

Al Doctor Alejandro Alagón Cano por brindarme la oportunidad de realizar el proyecto en su laboratorio. Grandes enseñanzas tanto académicas como personales adquirí durante mi estadía.

A la Doctora Melisa Bénard Valle, quien me brindó sus conocimientos, paciencia y amistad. Agradezco que siempre encontrara tiempo para apoyarme y enseñarme, no hay duda de que su amistad es invaluable.

A mi comité sinodal, la Dra. Rita Restano por todo el apoyo brindado no solo a mi sino a todo el equipo de trabajo de coralillos, y al Dr. Manuel Benigno por todo su apoyo académico.

A la M.V.Z. María Elena Elizabeth Mata Moreno y a todo su equipo, por el invaluable trabajo que desempeñan en el bioterio del Instituto de Biotecnología UNAM.

Personalmente a mis padres Elizabeth y Francisco quienes me han brindado todo su amor y apoyo desde el momento en que llegue a esta vida, con palabras no lograría expresar lo agradecido que estoy con ellos.

A mi hermana Nef, por todas las risas, peleas, pláticas y experiencias. Que divertido ha sido crecer juntos.

A mis abuelos Pina, Gloria y Ramiro de quienes he aprendido algunas de las cosas que considero más valiosas en la vida. Especialmente a mi abuelo José Cruz, agradezco todas las pláticas y toda la sabiduría que compartió conmigo.

A mis hermanos hijos de otros fulanos: Mitzi, Blanca y Garley. Que sería de esta vida sin amistad.

A mis amigos de generación: Juan, Raziél, Indra, Cesar y los que me faltaron.

A mis amigos del laboratorio: Sam, Mike, Gibran, Cris, Vane, Dr. Simio, Alid y todos los integrantes del consorcio Alagón-Corzo, son brillantes muchachos.

Al M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez (A.K.A. Pichón) por todo el apoyo técnico, académico y personal, muchas gracias por la amistad brindada y la confianza.

Al Dr. Edgar Neri Castro por su apoyo durante el proceso de este proyecto.

Al Dr. Gerardo Corzo Burguete por la convivencia tan amena y las enseñanzas académicas.

A La M. en C. Herlinda Catalina Clement por su atención y apoyo académico.

Al Biól. Felipe Olvera Rodríguez por todo el apoyo técnico y consejos, así como al auxiliar de laboratorio Ricardo Mondragón Cortés.

A la secretaria del laboratorio Angélica Linares Labastida por todo su apoyo en las cuestiones administrativas.

A Manuela Ávila por su calidez humana y su valioso trabajo en el laboratorio, que sin ella sería un desastre.

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM ¡GOYA!

# Contenido

1. Introducción .....	11
1.1 Animales venenosos.....	11
1.2 El veneno y su importancia .....	13
1.3 Serpientes venenosas .....	15
1.4 Ofidismo.....	17
1.5 Serpientes de coral .....	18
1.6 <i>Micrurus diastema</i> .....	21
1.7 Venenos de serpientes de coral .....	22
1.8 Toxinas de 3 dedos .....	24
1.9 Fosfolipasas A <sub>2</sub> .....	27
2. Antecedentes .....	29
2.1 Investigación de los venenos de serpientes de coral .....	29
2.2 Venenos mexicanos de serpientes de coral .....	30
2.3 Letalidad y neurotoxicidad .....	31
3. Justificación .....	33
4. Hipótesis	33
5. Objetivo general.....	33
6. Objetivos particulares .....	33
7. Estrategia experimental.....	34
8. Metodología .....	35
8.1 Venenos .....	35
8.2 Cuantificación de proteínas .....	36
8.3 SDS–PAGE.....	37
8.4 RP-HPLC .....	37
8.5 Determinación de Masa Molecular por espectrometría de masas con ionización por electro spray (ESI-MS).....	38
8.6 Fraccionamiento del veneno por intercambio catiónico.....	38
8.7 Actividad fosfolipasa .....	39
8.8 Permisos de bioética .....	40
8.9 Determinación de Dosis Letal Media (DL <sub>50</sub> ) .....	40
8.10. Preparación neuromuscular de nervio frénico y hemidiafragma de ratón.....	41
9. Resultados y discusión .....	44
9.1 Análisis proteómico de la mezcla Córdoba/Actopan .....	44
9.2 Caracterización funcional de la mezcla empleada en el análisis proteómico .....	46
9.3 Evaluación de letalidad .....	46
9.4 Preparación de nervio frénico-diafragma (NFD) de ratón.....	47

9.5 Fraccionamiento en condiciones no desnaturalizantes .....	50
9.6 Caracterización de las fracciones de intercambio catiónico .....	50
9.7 Actividad letal de las fracciones .....	54
9.8 Actividad enzimática .....	55
9.9 Análisis de fracciones con actividad letal .....	57
9.9.1 Fracción 1 .....	57
9.9.2 Fracción 6 .....	58
9.9.3 Fracción 8 .....	60
9.9.4 Fracción 9 .....	61
9.9.5 Fracción 10 .....	63
10. <i>Micrurus diastema</i> en Veracruz .....	65
10.1 Perfiles electroforéticos de individuos <i>Micrurus diastema</i> de Veracruz .....	65
10.2 Perfiles cromatográficos de <i>Micrurus diastema</i> en Veracruz .....	67
10.3 Dosis letales de mezclas por localidad .....	68
10.3 Variaciones en la letalidad y composición del veneno de <i>M. diastema</i> .....	69
11. Conclusiones .....	72
12. Perspectivas .....	73
13. Referencias .....	74
14. Anexos .....	82
Análisis proteómico .....	82
Tabla suplementaria de la identificación proteómica de los péptidos presentes en el veneno .....	84
Extracciones de veneno y mantenimiento de las serpientes .....	88
Primer reporte de nacimiento de serpientes de coral mexicanas en cautiverio .....	90
Perfiles cromatográficos por RP-HPLC de los neonatos <i>M. diastema</i> .....	93
15. Protocolos .....	95

## Índice de Figuras

Figura 1. Árbol esquemático de la vida venenosa en el reino animal. ....	12
Figura 2. Tipo de dentición de las serpientes. ....	17
Figura 3. Géneros que constituyen al grupo de las serpientes de coral. ....	19
Figura 4. Patrones de coloración de <i>Micrurus</i> . ....	20
Figura 5. <i>Micrurus diastema</i> .....	22
Figura 6. Aparato venenoso de <i>Micrurus</i> sp. (fotografías de Neri-Castro) .....	22
Figura 7. Patrón divergente de composición del veneno del género <i>Micrurus</i> en América.	
24	
Figura 8. Estructura del receptor nicotínico muscular y ejemplo de toxina de 3 dedos. ....	26

Figura 9. Efecto de neurotoxinas presinápticas y postsinápticas en la unión neuromuscular. ....	26
Figura 10 Estructura de un fosfolípido y el sitio de acción de las fosfolipasas .....	27
Figura 11. Patrones divergentes de composición en los venenos de <i>Micrurus</i> .....	30
Figura 12. Composición proteica del veneno de <i>Micrurus browni</i> y <i>Micrurus tener</i> .....	31
Figura 13. Efecto del veneno de <i>Micrurus browni</i> y <i>Micrurus laticollaris</i> sobre preparaciones neuromusculares de ratón. ....	32
Figura 14. Estrategia experimental .....	34
Figura 15. Ensayo titulométrico de actividad PLA <sub>2</sub> .....	40
Figura 16.Esquematización de la preparación de nervio frénico-hemidiafragma de ratón.43	
Figura 17. Fraccionamiento por RP-HPLC de la mezcla <i>Micrurus diastema</i> y SDS-PAGE de las fracciones obtenidas. ....	44
Figura 18. Composición del veneno de <i>Micrurus diastema</i> .....	45
Figura 19. Dosis letal <i>Micrurus diastema</i> .....	47
Figura 20. Registro de la fuerza de contracción del diafragma.....	48
Figura 21. Gráfica del porcentaje de inhibición de la contracción muscular en la preparación neuromuscular con diferentes dosis de veneno. ....	49
Figura 22. Registro de la fuerza de contracción del diafragma.....	49
Figura 23. Intercambio catiónico fuerte. (CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> <sup>--</sup> ).....	50
Figura 24.Perfiles electroforéticos de las fracciones obtenidas por intercambio catiónico. 51	
Figura 25. Perfiles cromatográficos del sub-fraccionamiento por RP-HPLC de las fracciones obtenidas del intercambio catiónico. ....	53
Figura 26. Gráfica de las unidades específicas de actividad fosfolipasa. ....	56
Figura 27. Fracción 1.....	58
Figura 28. Fracción 6.....	59
Figura 29. Gráfica del porcentaje de inhibición de la contracción muscular por actividad de r.D.H y F6 a diferentes concentraciones.....	60
Figura 30. Fracción 8.....	61
Figura 31. Fracción 9.....	62
Figura 32. Gráfica del porcentaje de inhibición de la contracción muscular por actividad de F9.           63	
Figura 33. Fracción 10.....	63
Figura 34. Gráfica del porcentaje de inhibición de la contracción muscular por actividad de F10.           64	
Figura 35. Perfiles electroforéticos de <i>M. diastema</i> provenientes de diferentes localidades de Veracruz. 66	
Figura 36. Gel en condiciones reductoras del individuo IBt-138 y los 11 neonatos (Los Tuxtlas).       67	
Figura 37. Perfiles cromatográficos de los individuos de las 5 localidades .....	68

## Índice de Tablas

Tabla 1. Lealidad de algunos venenos de coralillos de género <i>Micrurus</i> .....	31
Tabla 2. Tabla de los individuos <i>Micrurus diastema</i> que se ocuparon para la caracterización.....	35
Tabla 3. Gradiente utilizado en RP-HPLC .....	38
Tabla 4. Gradiente utilizado en intercambio catiónico.....	39
Tabla 5. Condiciones de estimulación .....	41
Tabla 6. Tabla de letalidad de diferentes especies de <i>Micrurus</i> .....	47
Tabla 7. Contribución de las fracciones a la actividad letal del veneno completo .....	54
Tabla 8. Unidades específicas de actividad PLA <sub>2</sub> y su contribución enzimática. ....	56
Tabla 9. Tabla de resumen de actividades de las fracciones obtenidas por intercambio catiónico	64
Tabla 10. Dosis letales de las mezclas de veneno provenientes de diferentes localidades de Veracruz	69
Tabla 11. Porcentajes de abundancia de PLA <sub>2</sub> y 3FTx y potencias letales .....	70



## Resumen

En el presente trabajo se presenta la composición proteómica del veneno de la serpiente de coral *Micrurus diastema* (realizado en colaboración con el grupo de trabajo del laboratorio de Dr. Bruno Lomonte Vigliotti del Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica), así como la caracterización de sus actividades biológicas y bioquímicas (Instituto de Biotecnología UNAM).

El veneno de *Micrurus diastema* está mayormente compuesto por fosfolipasas tipo A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y toxinas de 3 dedos (3FTx), representando el 62.6% y 22.3% respectivamente del veneno total. Estas familias proteicas son relevantes en la actividad letal/neurotóxica del veneno completo, el cual posee una potencia letal alta (6.5 µg/ratón), comparable a la de otras serpientes de coral mexicanas.

Se identificaron cuatro PLA<sub>2</sub> con alta actividad enzimática, sugiriendo una función pre digestiva enfocada hacia las presas. La actividad neurotóxica proviene de una 3FTx con actividad  $\alpha$  neurotóxica identificada como D.H., la cual ya se ha encontrado presente en venenos de otros coralillos mexicanos, actuando a nivel postsináptico en la unión neuromuscular. Y al menos 2 PLA<sub>2</sub> con actividad  $\beta$ -neurotóxica, las cuales actúan a nivel presináptico en la unión neuromuscular. Las actividades neurotóxicas de estos componentes, así como del veneno completo fueron caracterizadas a través de una preparación de nervio frénico-hemidiafragma de ratón.

Se encontró que el veneno de *Micrurus diastema* posee mayor potencia letal en individuos crías o juveniles (DL<sub>50</sub>= 2.2 y 4.2 µg/ratón respectivamente) en comparación con las potencias letales reportadas para individuos adultos (DL<sub>50</sub>= 6 y 6.5 µg/ratón), indicando una clara variación ontogenética.

Los accidentes ofídicos ocasionados por estas serpientes hacia humanos suelen ser escasos, aunque pueden llegar a ser severos por su alta actividad neurotóxica. Por lo que el estudio de sus venenos no solo ayuda a la comprensión, desarrollo y/o mejora de tratamientos médicos, sino que también presenta una oportunidad para la comprensión de sus mecanismos de acción, diversidad y evolución. Este proyecto representa una contribución significativa en el conocimiento actual de los venenos de coralillos norteamericanos.

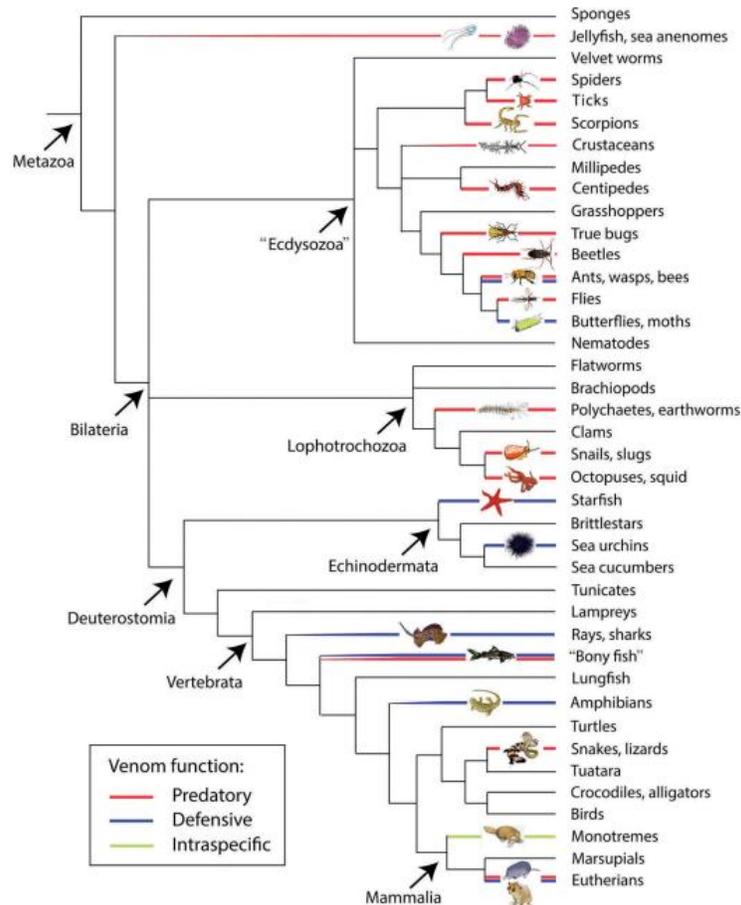
# 1. Introducción

## 1.1 Animales venenosos

La aparición de venenos y el desarrollo de toxinas ha sido una estrategia ampliamente utilizada en la historia evolutiva de los organismos en general (Figura 1). Es importante destacar la importancia que tiene el estudio de esta rama de la toxicología, que no solo ha sido reconocida con premios Nobel, sino que también ha dado origen a terapias clínicas cruciales para abordar diversas problemáticas de salud. Además los sistemas venenosos proporcionan modelos valiosos para investigar interacciones ecológicas, la influencia de la selección natural, casos extremos de evolución molecular y neofuncionalización de proteínas (Casewell et al., 2013; Mackessy, 2020; Fry, 2015; Zhang, 2015)

Los animales tóxicos a grandes rasgos se clasifican en 2 tipos: aquellos que acumulan metabolitos y toxinas provenientes de una fuente externa como el alimento (ranas dardo, aves Pitohui, ratas crestadas) y aquellos con sistemas especializados para la producción de toxinas, en donde las serpientes son los maestros de los sistemas especializados en términos de sofisticación, eficiencia y diversidad (Atractaspidos, Viperidos y Elapidos). (Zhang *et al*, 2015; Casewell *et al*, 2013).

Actualmente se estima que existen más de 170,000 especies de animales conocidos por ser venenosos (Calvete, 2013), esto representa aproximadamente el 10% de la diversidad animal conocida del planeta. En consecuencia, han evolucionado una amplia gama de estructuras innovadoras para facilitar la administración de venenos, incluidas púas, picos, colmillos o dientes modificados, arpones, nematocistos, pinzas, probóscides, espinas, espuelas y agujones. Ya que la respuesta evolutiva a la producción de veneno es una estrategia ampliamente distribuida por su eficacia, la diversidad biológica de nuestro planeta ofrece un enorme conjunto de moléculas con potencial aprovechable para el humano (Casewell, et al 2013; Fry, 2015).



**Figura 1. Árbol esquemático de la vida venenosa en el reino animal.**

El árbol representa las relaciones evolutivas entre linajes animales y destaca la frecuencia con la que se encuentran sistemas venenosos en el reino animal. Las ramas coloreadas destacan los principales linajes animales que incluyen miembros con sistemas venenosos. Las ramas rojas indican un papel depredador del veneno, las azules un papel defensivo y las verdes un papel en la competición intraespecífica. Tomado de (Casewell et al., 2013).

Los sistemas venenosos evolucionaron para competir por la supervivencia y desempeñan funciones vitales como depredación; esta estrategia favorece a los venenos de acción rápida, como los neurotóxicos y hemotóxicos, aunque también pueden optar por una estrategia que provoque una excesiva e incontrolable reacción proinflamatoria. Defensa; la cual está enfocada principalmente en causar dolor intenso e incapacitante a los depredadores, ejemplos de esta función serían los venenos del monstruo de Gila (*Heloderma suspectum*) y el de las abejas (*Apis sp.*). Existen casos extraordinarios como el de algunos conos marinos capaces de

modificar la composición de su veneno según el estímulo recibido, ya sea en situaciones de depredación o como medida defensiva. Y en competencias; esta función tiene diferentes usos ecológicos dependiendo de la especie, se ha observado en hormigas compitiendo por territorio, o en ornitorrincos en situaciones de competencia sexual. Estas estrategias de supervivencia por parte de los venenos se comparten por los diferentes grupos de animales venenosos (Brodie, 2009; B. G. Fry et al., 2009; Zhang, 2015).

La composición y destino del veneno están intrínsecamente vinculados a su función. Se ha observado que los venenos defensivos tienden a ser relativamente simples y altamente conservados en su composición. (Church & Hodgson, 2002; Casewell et al., 2013; Fry et al., 2009; Peiren et al., 2005). Por el contrario, los venenos utilizados por depredadores tienden a ser más complejos y exhiben una considerable variabilidad en composición y efectos. Tal diversidad puede resultar en una variación extrema en la toxicidad del veneno entre poblaciones de una sola especie (Calvete et al., 2010; Glenn & Straight, 1978), diferencias relacionadas con el sexo (Menezes et al., 2006), variaciones ontogenéticas y entre taxones estrechamente relacionados (Andrade et al., 1999; Casewell et al., 2013). Los procesos por los cuales se ha dado la diversificación de la composición de los venenos, sus actividades específicas, la relación entre estos y la historia natural de los venenos se encuentra en debate (Barlow et al., 2009). Algunos sostienen que esta diversificación se debe a procesos de evolución neutral, mientras que otros asignan una mayor importancia a procesos adaptativos. La comprensión de estos procesos y sus interacciones es esencial para desentrañar los mecanismos evolutivos que han dado forma a la rica diversidad de venenos observada en la naturaleza (Casewell et al., 2013; Mebs, 2001; Sasa, 1999).

## **1.2 El veneno y su importancia**

El veneno en este contexto se define como: secreción producida en células especializadas, administrada a un animal diana mediante la inflicción de una herida, que altera los procesos fisiológicos o bioquímicos del animal receptor, facilitando la alimentación, la defensa o la competencia del animal productor (Fry, 2015)

La mayoría de los venenos de animales son cocteles muy complejos de compuestos bioactivos, generalmente comprenden una mezcla de proteínas (con o sin actividad enzimática), péptidos, aminoácidos, neurotransmisores, iones metálicos, sales, entre otros, siendo los componentes proteicos los más abundantes. El proceso de coevolución de los organismos ha creado toxinas peptídicas diversas que actúan específicamente sobre elementos fisiológicos clave de los organismos objetivo. Este proceso junto con la presión selectiva dotó a las toxinas animales de una fuerte actividad, especificidad y una enorme diversidad molecular. (Casewell et al., 2013; Fry et al., 2015; Fry et al., 2012). Estas características han hecho de ellas una fuente valiosa de productos naturales para el descubrimiento de fármacos (Harvey, 2014; King, 2011).

El estudio de los venenos de animales nos ha llevado al entendimiento de componentes fisiológicos clave tanto para humanos como para otros organismos. Un ejemplo de esto es el descubrimiento de los factores de crecimiento nervioso, reconocido con el premio nobel en 1986 (Cohen, S., Levi-Montalcini, R., 1956). De manera similar el esclarecimiento de la arquitectura y los mecanismos de acción de los canales iónicos de potasio ( $K^+$ ), merecedor del premio Nobel en 2003, ha representado un hito en nuestra comprensión de la fisiología celular (MacKinnon, 2003). En este contexto, el estudio de neurotoxinas provenientes de serpientes ha sido fundamental para entender la estructura y función de los canales iónicos sensibles al pH (ASIC). Específicamente, el análisis de venenos que contienen péptidos como MitTx, capaz de desencadenar señales de dolor, y las mambalginas, que inhiben estos canales para suprimir el dolor, ha destacado la importancia de los canales ASIC en la nocicepción (Bohlen et al., 2011; Bohlen & Julius, 2012; Diochot et al., 2012). Este conocimiento no solo contribuye a la comprensión fundamental de los mecanismos de señalización del dolor, sino que también sugiere nuevas dianas terapéuticas para abordar el tratamiento del dolor.

Aunado a lo anterior existen diversos fármacos desarrollados gracias al estudio de venenos. En 1977 el fármaco antihipertensivo captopril se desarrolló a partir de un péptido potenciador de la bradiquinina hallado en el veneno de la víbora brasileña *Bothrops jararaca* (Cushman & Ondetti, 1991). La eptifibatida, empleada en cardiopatías, se diseñó a partir de una desintegrina descubierta en el veneno de la víbora *Sistrurus miliaris* (Scarborough et al., 1993; Scarborough, 1999). La

ziconotida (prialt), polipéptido proveniente de conos marinos que fue desarrollado a partir de un bloqueador selectivo de los canales de  $\text{Ca}^+$  tipo N, se utiliza para el tratamiento de pacientes con dolor crónico (Pope & Deer, 2013). Por otro lado, la aparición de cepas de bacterias resistentes a los antibióticos en todo el mundo ha abierto la puerta a la búsqueda de nuevas terapias como los péptidos antimicrobianos catelicidinas, encontrados en venenos de serpientes elapidas (Zhao et al., 2008).

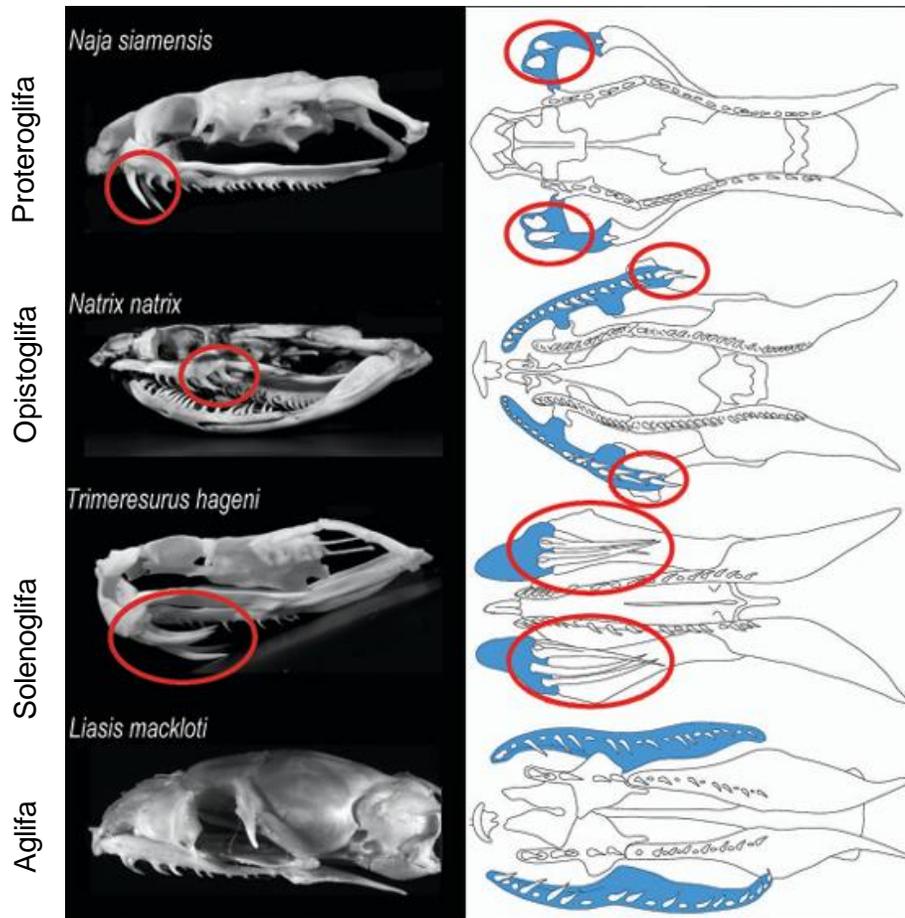
### **1.3 Serpientes venenosas**

Las serpientes son depredadores ágiles pero carentes de extremidades, por lo que utilizan sus venenos para ampliar significativamente la gama de presas a las que pueden acceder. Esta capacidad no solo les permite alimentarse de presas más diversas, sino que también constituye un mecanismo eficaz de defensa contra animales que, de lo contrario, podrían representar una amenaza para ellas. La sorprendente convergencia entre diversos linajes venenosos se manifiesta en el reclutamiento de toxinas y su evolución funcional. En el caso de las serpientes, este fenómeno se destaca, especialmente en la selección de toxinas que atacan los sistemas hemostático y neurológico como dianas principales. Este enfoque selectivo permite a las serpientes no solo asegurar presas de manera eficiente sino también defenderse de amenazas potenciales de manera efectiva, contribuyendo así a su éxito en los ecosistemas en los que se desarrollan (Fry et al., 2012; Fry, 2015).

Se han descrito alrededor de 4000 especies de serpientes en el mundo (reptile data base, 2024) de las cuales aproximadamente el 20% poseen secreciones tóxicas para los humanos. Las especies de serpientes venenosas se clasifican dentro de la superfamilia Caenophidia, este grupo incluye a las familias Atractaspididae (distribuidas en África y medio oriente), Colubridae, Viperidae y Elapidae, siendo las dos últimas familias las más importantes en cuanto a relevancia médica en el mundo, aunque como consideración existen algunos integrantes de la familia Colubridae que producen ciertas enzimas y toxinas que pueden ocasionar algunos daños a personas mordidas. Sin embargo, sus venenos no son considerados de relevancia médica (Campbell and Lamar, 2004).

En México existen taxones provenientes de 3 familias

- Colubridae, familia de serpientes que encontramos en todo el país, algunas especies poseen dentición aglifa (sin dientes inoculadores de veneno) y otras con dentición opistoglifa (Figura 2), es decir, con dientes inoculadores situados en la parte posterior de la mandíbula superior, son pequeños y se encuentran conectados por un pequeño conducto a las glándulas salivales modificadas, éstas producen ciertas enzimas y toxinas que van dirigidas a sus presas naturales (Campbell and Lamar, 2004; Lawson et al., 2005).
- Viperidae, familia de serpientes venenosas, representada por 73 especies. Poseen dentición solenoglifa (Figura 2), es decir, un par de dientes inoculadores de veneno situados en la parte anterior de la mandíbula superior, éstos se mueven de manera independiente y se conectan por medio de un pequeño conducto a la glándula venenosa (Campbell and Lamar, 2004).
- Elapidae, comúnmente conocidas como serpientes de coral o “coralillos. Se distribuyen principalmente en el centro y sur del país, todas las especies de esta familia son venenosas y poseen una dentición proteroglifa (Figura 2), en la siguiente sección se profundizará más al respecto.



**Figura 2. Tipo de dentición de las serpientes.**

Fondo negro: vistas laterales de cráneos de adultos; fondo blanco: esquemas del paladar, vista ventral. Tomado de (Vonk et al., 2008) modificado por (Fry, 2015).

### 1.4 Ofidismo

Los accidentes ocasionados por mordeduras de serpientes llamado ofidismo, representan un problema de salud pública el cual varía de gravedad de acuerdo con la región geográfica. En América el mayor porcentaje de accidentes ofídicos (mordeduras ocasionadas por serpientes) es provocado por víboras (familia *Viperidae*), ocasionando aproximadamente el 95% de ellos anualmente (Gutiérrez et al., 2010). En contraste, los accidentes ocasionados por serpientes de coral, pertenecientes a los géneros *Micrurus* y *Micruroides*, son relativamente raros debido a los hábitos y conducta de estas serpientes (Roze, 1996). Para Estados

Unidos, los casos de envenenamiento por corales representan un 3.6% de los accidentes anuales y en Sudamérica el 2% (Manock et al., 2008).

Para el caso de México se reportaron un promedio de 3,712 accidentes ofídicos anuales durante los años 2018, 2019 y 2020 (1,237 mordeduras anuales en promedio), según el boletín epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia y Epidemiología. En este tipo de bases de datos no se reporta la especie causante del accidente; sin embargo, por las observaciones realizadas en cuanto a epidemiología en América y a la experiencia de médicos colaboradores del grupo de trabajo del Dr. Alejandro Alagón Cano (IBt-UNAM), se estima que menos del 2% de los accidentes ofídicos anuales es causado por serpientes de coral en México (Bénard-Valle, 2020).

### **1.5 Serpientes de coral**

Las serpientes de coral pertenecen a la familia Elapidae, esta familia abarca tanto serpientes marinas como terrestres (406 especies en el mundo) y se encuentran divididas en las subfamilias Hydrophiinae (especies marinas) y Elapinae (especies terrestres). El grupo de las serpientes de coral, representan una radiación de la subfamilia Elapinae, este grupo visualmente llamativo comprende 4 géneros (Figura 3), 2 distribuidos en Asia (*Calliophis* y *Sinomicrurus*) y 2 en América (*Micruroides* y *Micrurus*) (Castoe et al., 2007; reptile data base, 2024).

La longitud de las serpientes de coral americanas varía considerablemente dependiendo de la especie, pero la mayoría pueden medir desde los 50 centímetros hasta 1 metro (se han encontrado organismos de 150 cm de longitud en coralillos sudamericanos). En su mayoría tienen hábitos semifosoriales, crepusculares y algunos pueden presentar hábitos diurnos, en consecuencia, la selección de sus presas se ha dirigido hacia animales con hábitos similares, por lo que tienen dietas restringidas y especializadas a los microambientes donde se desarrollan (Roze, 1996).

Existen pocos análisis de las relaciones evolutivas de las serpientes de coral Americanas, lo cual impide una completa reconstrucción de su historia evolutiva. Sin embargo Gutberlet y Harvey (2004) presentaron una filogenia consenso en la que se identifica a *Micruroides euryxanthus* (único taxón representante del género) como el elárido más primitivo del nuevo mundo y se establece como el taxón

hermano del género *Micrurus* y la conexión filogenética con los corales asiáticos (Figura 3). Es probable que las serpientes de coral invadieran América desde Asia a través del estrecho de Bering durante la era glacial a finales del oligoceno (aproximadamente hace 23 millones de años) (Kelly et al., 2009), similar a otros linajes importantes de serpientes del Nuevo Mundo (Castoe et al., 2007; Guo et al., 2012).



*Calliophis bivirgatus*



*Sinomicrurus japonicus*



*Micruroides euryxanthus*



*Micrurus sp.*

**Figura 3. Géneros que constituyen al grupo de las serpientes de coral.**

En América el género *Micrurus* es el más diverso en cuanto a serpientes de coral, este género se encuentra constituido por 84 especies reconocidas hasta la fecha, las cuales se distribuyen desde el sur de Estados Unidos, México, Centroamérica y Sudamérica (Campbell y Lamar, 2004; reptile data base, 2024).

La clasificación taxonómica de estas serpientes a lo largo del tiempo ha dependido principalmente de características fenotípicas, como variaciones de color, patrones en el mismo, tipo de escamas y morfología de hemipenes. De acuerdo a esta clasificación se reconocen 2 grupos. El primer grupo se denomina de triadas con cola corta, presentan un patrón de anillos en triadas (3 anillos negros intercalados por 2 anillos de color claro) y su distribución se restringe a sudamérica (Figura 4).

El segundo es el grupo monadal de cola larga, presentan un patrón tricolor (típica coloración asociada a estas serpientes) y anillos dispuestos en mónadas (Figura 4) se distribuyen por la zona centro y norte de América (Campbell y Lamar, 2004; Streicher et al., 2016; Roze, 1996).

Hay que tener en cuenta que tanto los colores como los patrones de coloración muestran gran variabilidad, tanto entre diferentes taxones como entre poblaciones de una misma especie (Figura 4). Esto ha ocasionado complicaciones en su clasificación e identificación, lo que destaca la necesidad de integrar estudios moleculares para lograr una comprensión más completa de su diversidad. Lamentablemente esto se vuelve difícil en la práctica ya que los muestreos muchas veces se ven limitados.



**Figura 4. Patrones de coloración de *Micrurus*.**

Representación de los patrones de coloración en mónadas (arriba) y en tríadas (abajo). Tomado de (Roze, 1996).

En México se distribuyen de entre 15 a 17 especies de Elápidos, incluida la serpiente marina *Hydrophis platurus* y *Micruroides euryxanthus*. El número de especies del género *Micrurus* presentes en México varía dependiendo la fuente consultada, existen reportes de 14 especies (Campbell y Lamar, 2004), y otros de 16 especies según el Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad SNIB-CONABIO (<https://www.snib.mx/ejemplares/descarga/>). Por otro lado, Reyes Velasco y colaboradores (2020), propusieron un arreglo taxonómico en el que se reconocen únicamente 10 especies del género *Micrurus* en México. La propuesta filogenética modifica considerablemente la taxonomía de varias localidades de

comunidades de *Micrurus*, evidenciando la importancia de algunas barreras biogeográficas. El estudio evidencia que, como se mencionó anteriormente, la clasificación basada en coloración ha desorientado los esfuerzos para estimar la diversidad de las serpientes de coral y sus relaciones filogenéticas.

### 1.6 *Micrurus diastema*

La especie *M. diastema* (Figura 5) es un taxón, que se creía constituido por 7 subespecies (*M. d. diastema*, *M. d. aglaeope*, *M. d. alienus*, *M. d. affinis*, *M. d. apiatus*, *M. d. macdougalli* y *M. d. sapperi*) (Uetz, 2019), la especie poseía una amplia distribución abarcando los estados de Puebla, Veracruz, Oaxaca, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas y parte de Centro América (Belice, Guatemala y Honduras) (Campbell y Lamar, 2004; Uetz, 2024). Alcanzan tallas máximas de hasta 80 a 90 centímetros de longitud (Roze, 1996).

El trabajo de Reyes Velasco sugiere una modificación considerable para *M. diastema*, quitando todas las designaciones de subespecies y dividiendo a *M. diastema* en dos taxones diferentes. Las subespecies que se distribuían al oeste del Istmo de Tehuantepec (*M.d. diastema*, *M.d.affinis*, *M.d. macdougalli*) ahora representan un solo taxón y conservan la designación de *Micrurus diastema*. Y se propone *Micrurus apiatus* como nueva designación para aquellas subespecies que se distribuían al este del Istmo (*M.d. apiatus*, *M.d. aglaeope*, *M.d. alineus*, *M.d. sapperi* además de la especie *Micrurus hippocrepis*).



**Figura 5. Micrurus diastema**

Se pueden observar dos patrones diferentes de coloración en individuos provenientes de Veracruz.

### 1.7 Venenos de serpientes de coral

Los venenos de las serpientes de coral son mezclas complejas de proteínas, péptidos, carbohidratos, lípidos, iones metálicos y otros compuestos orgánicos, siendo proteínas y péptidos los que representan alrededor del 90% de su peso seco. Estos componentes son producidos, almacenados e inoculados por el aparato venenoso, el cual consta de una dentición de tipo proteroglifa, músculos compresores y glándulas de veneno (Figura 6) situadas hacia atrás y por debajo de los ojos (Aird, 2002; Roze, 1996).

Los mecanismos de acción de sus venenos se pueden agrupar en 2 estrategias fundamentales. La primera está dirigida a la inmovilización y captura de la presa por parálisis, la segunda estrategia es digestiva y comienza una degradación interna de la presa aun antes de ser engullida (Aird, 2002).



**Figura 6. Aparato venenoso de Micrurus sp. (fotografías de Neri-Castro)**

Los venenos de las serpientes de coral están compuestos en promedio por 6 a 8 familias proteicas relevantes, entre las cuales se encuentran metaloproteasas (MP), L- amino oxidasas (LAO), Inhibidores de serino proteasas tipo kunitz (Kun), serino proteinasas (SP), fosfolipasas tipo A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y toxinas de tres dedos (3FTx) (Harris & Scott-Davey, 2013; Lomonte, Rey-Suárez, et al., 2016).

A través de análisis proteómicos y transcriptómicos de las glándulas venenosas de estas serpientes, se han identificado dos patrones divergentes en cuanto a la composición de sus venenos, destacando las familias proteicas de 3FTx y PLA<sub>2</sub> como los componentes dominantes. Esta dicotomía muestra una relación con su patrón de distribución geográfica (Figura 7). Se observa que las especies con venenos ricos en PLA<sub>2</sub> tienden a concentrarse en el Norte y Centro de América, mientras que aquellas con venenos predominantemente compuestos por 3FTx se encuentran más presentes en el Sur de América (Lomonte, Rey-Suárez, et al., 2016).

A pesar de estos hallazgos, se carece aún de estudios exhaustivos sobre especies norteamericanas, lo que subraya la necesidad de investigaciones adicionales para comprender completamente la variabilidad en la composición de los venenos de las serpientes de coral. Este aspecto pendiente representa una oportunidad para profundizar en el conocimiento de estos fascinantes organismos y sus adaptaciones locales.



**Figura 7. Patrón divergente de composición del veneno del género *Micrurus* en América.**

Representado de acuerdo con la predominancia de PLA<sub>2</sub> (morado) y 3FTx (naranja) (Tomado de Lomonte et al., 2016).

Como es de esperarse algunos integrantes de la familia de las 3FTx como de las PLA<sub>2</sub> son fundamentales para comprender el cuadro clínico asociado al envenenamiento por serpientes de coral. La sintomatología observada mayormente refleja problemas neurotóxicos, manifestándose con pérdida de fuerza muscular que comienza en los músculos faciales. Entre los síntomas más comunes se destacan la ptosis palpebral, visión doble, disartria (dificultad del habla) y disfagia (dificultad al deglutir), con sialorrea siendo la afección más frecuente. En casos graves, la afectación alcanza al diafragma y los músculos intercostales, provocando insuficiencia respiratoria que puede llevar a la muerte (De Roodt et al., 2012; Manock et al., 2008; Wood et al., 2013). Estas manifestaciones resultan de la parálisis a nivel pre o post sináptico en la placa neuromuscular.

Los informes médicos indican que el inicio de los síntomas puede variar, desde una hora después de la mordedura hasta cinco o más horas después (Bucarechi et al., 2006). Estudios en animales experimentales han observado que los venenos de coralillos también pueden causar disminución de la presión sanguínea (Vital Brazil et al., 1987), actividad hemorrágica leve, mioglobinuria y actividad miotóxica (De Roodt et al., 2012). Sin embargo, estos efectos no son clínicamente relevantes.

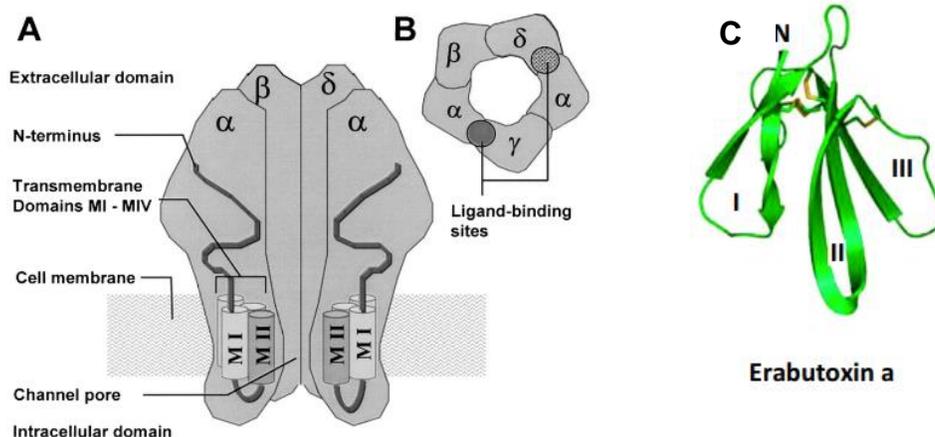
### **1.8 Toxinas de 3 dedos**

Las 3FTx son una familia de proteínas sin actividad enzimática, relativamente pequeñas (60 a 75 residuos de aminoácidos) con 4-5 puentes disulfuro los cuales conforman un núcleo hidrofóbico que les confiere estabilidad. De este núcleo sobresalen 3 asas (dedos) conformadas por láminas beta, que les otorgan el nombre a estas toxinas (V. Tsetlin, 1999; V. I. Tsetlin & Hucho, 2004).

Un gran número de miembros de esta familia proteica son neurotoxinas que interfieren con la transmisión colinérgica a nivel postsináptico tanto en el sistema

nervioso periférico como central. Basándose en su selectividad, esta familia incluye  $\alpha$ -neurotoxinas (curaremiméticas),  $\kappa$ -toxinas y toxinas muscarínicas, que tienen sus sitios blancos en los receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR) musculares, neuronales y diversos subtipos de receptores muscarínicos, respectivamente (Kini, 2002). Además, las 3FTx son capaces de ejercer una amplia gama de actividades farmacológicas como, inhibidores de acetilcolinesterasas, inhibidoras de agregación plaquetaria, toxinas que bloquean canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y cardiotoxinas (Casewell et al., 2013; V. I. Tsetlin & Hucho, 2004).

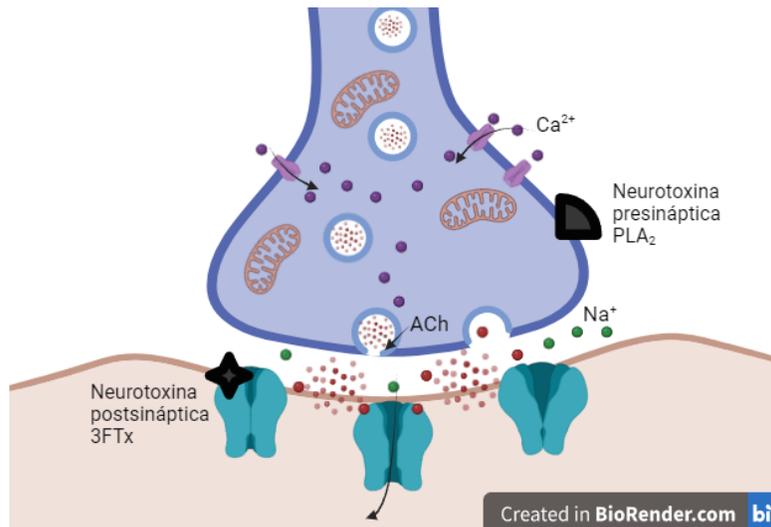
Las  $\alpha$ -neurotoxinas (curaremiméticas) pueden subclasificarse en 3 grupos. I.) Toxinas de cadena corta que contienen de 60 a 62 residuos de aminoácidos y 4 puentes disulfuro, de las cuales se ha visto tienen una alta capacidad de asociación y disociación hacia nAChRs musculares (Figura 8). II.) Toxinas de cadena larga (66 a 75 residuos de aminoácidos), éstas además de unirse (con menor afinidad) a los nAChRs musculares son capaces de unirse con alta afinidad a los receptores nicotínicos neuronales y III.) Toxinas atípicas que comparten homología con las toxinas de cadenas larga en cuanto a secuencia. También denominadas neurotoxinas débiles debido a su baja afinidad por nAChRs musculares. Sin embargo, se propone que en este grupo de toxinas se podrían encontrar aquellas con especificidad hacia presas naturales, debido a que ya se ha encontrado, en experimentos de preparaciones neuromusculares, afinidad de toxinas por preparaciones de ave y rana. Sin embargo, aún se desconoce bastante sobre este grupo de toxinas (Nirthanan & Gwee, 2004; Pawlak et al., 2006; Fry, 2015).



**Figura 8. Estructura del receptor nicotínico muscular y ejemplo de toxina de 3 dedos.**

A: el receptor nicotínico de acetilcolina es un pentámero compuesto de 5 subunidades homólogas. La estequiometría  $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$  se representa en este modelo. B: vista superior del receptor pentámero, el dominio extracelular del amino terminal de la subunidad  $\alpha 1$  y la subyacente ( $\gamma$  o  $\delta$ ) cooperan para formar dos sitios de unión distintos para acetilcolina (u otros agonistas y antagonistas competitivos). C: 3FTx de cadena corta (Erabutoxina a). Tomado de (Nirthanan & Gwee, 2004; V. I. Tsetlin & Hucho, 2004)

Las  $\alpha$ -neurotoxinas de cadena corta, son las que han sido más comúnmente descritas en venenos de coralillos. Estas toxinas, como se mencionó, bloquean eficientemente los canales nicotínicos de acetilcolina de la unión neuromuscular, imitando los efectos de bloqueo neuromuscular del alcaloide vegetal tubocurarina al actuar como antagonistas de la acetilcolina en sus sitios alostéricos. Pero con aproximadamente 15 a 20 veces mayor afinidad y escasa reversibilidad de acción, lo que impide la generación del potencial de acción en la placa muscular inhibiendo la contracción (Figura 9), lo que a su vez provoca una parálisis flácida de los músculos (Nirthanan & Gwee, 2004; V. I. Tsetlin & Hucho, 2004).



**Figura 9. Efecto de neurotoxinas presinápticas y postsinápticas en la unión neuromuscular.**

Esquema de unión neuromuscular mostrando la liberación de ACh mediante vesículas sinápticas y su posterior unión a receptores nicotínicos de ACh en la placa neuromuscular; esta unión ocasiona la entrada de iones, que a su vez generan la contracción muscular.

## 1.9 Fosfolipasas A<sub>2</sub>

Las fosfolipasas son un grupo de enzimas cuya actividad enzimática consiste en catalizar la hidrólisis de diversos fosfolípidos y se clasifican de acuerdo con el sitio en el que actúan. Las fosfolipasas A<sub>1</sub> actúan en el enlace éster *sn*-1, el tipo A<sub>2</sub> actúan sobre el enlace *sn*-2, las fosfolipasas B actúan en ambos sitios, las C actúan sobre el enlace glicerofosfato y las D eliminan el grupo polar de la cabeza (Figura 10). Las fosfolipasas que se encuentran en los venenos de las serpientes son de tipo A<sub>2</sub> (Harris & Scott-Davey, 2013).

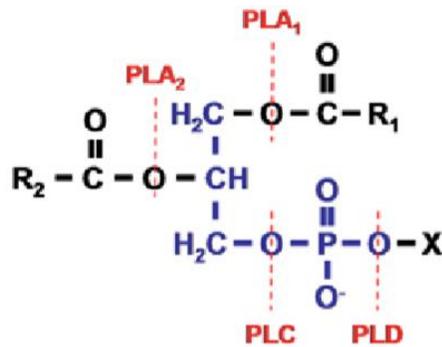


Figura 10. Estructura de un fosfolípido y el sitio de acción de las fosfolipasas (Harris y Scott-Davey, 2013).

Las fosfolipasas derivadas de los venenos se dividen en 4 subtipos principales, siendo los tipos 1 y 2 las que se encuentran presentes en los venenos de serpientes. Éstas se caracterizan por estar conformadas por 115 a 125 residuos de aminoácidos y por tener un sitio de unión a Ca<sup>2+</sup>, que es un cofactor indispensable para la activación de estas enzimas. Las PLA<sub>2</sub> tipo 1 están presentes en los elápidos; la mayoría de ellas poseen actividad enzimática mientras que el tipo 2 se encuentran principalmente en vipéridos y pueden tener o no actividad enzimática. Estas enzimas presentan una gran diversidad de efectos farmacológicos como miotoxicidad, efectos anticoagulantes y neurotoxicidad (Kini, 2003; Rigoni et al., 2007).

Las PLA<sub>2</sub> con actividad neurotóxica denominadas β-neurotoxinas, pueden encontrarse en ambos grupos de serpientes y se caracterizan por inhibir la liberación de acetilcolina del botón presináptico en la placa neuromuscular y

eventualmente generando una lisis del botón (Figura 9). Sin embargo, aún se desconoce con exactitud que les confiere su alta afinidad hacia la membrana de la neurona presináptica, aunque se ha hipotetizado sobre su unión a uno o diversos receptores celulares.

Las  $\beta$ -neurotoxinas, al unirse a la membrana celular, desencadenan un aumento notable en la exocitosis de acetilcolina almacenada en las vesículas sinápticas de la terminal nerviosa (Montecucco et al., 2008; Rowan, 2001). Este fenómeno resulta probablemente de la alteración de la membrana celular debido a la actividad enzimática de las  $\beta$ -neurotoxinas sobre los fosfolípidos de la membrana. Esta perturbación en la membrana conlleva a un incremento en la permeabilidad a iones, elevando así la concentración intracelular de calcio. Este aumento desencadena una serie de eventos degenerativos, entre los cuales se destaca el daño a las mitocondrias, culminando eventualmente en la destrucción del botón presináptico. Es importante destacar que este daño no alcanza el cuerpo celular de la motoneurona. Por consiguiente, una vez inactivada la  $\beta$ -neurotoxina, se abre la posibilidad de reinervación y regeneración del músculo afectado (Harris & Scott-Davey, 2013).

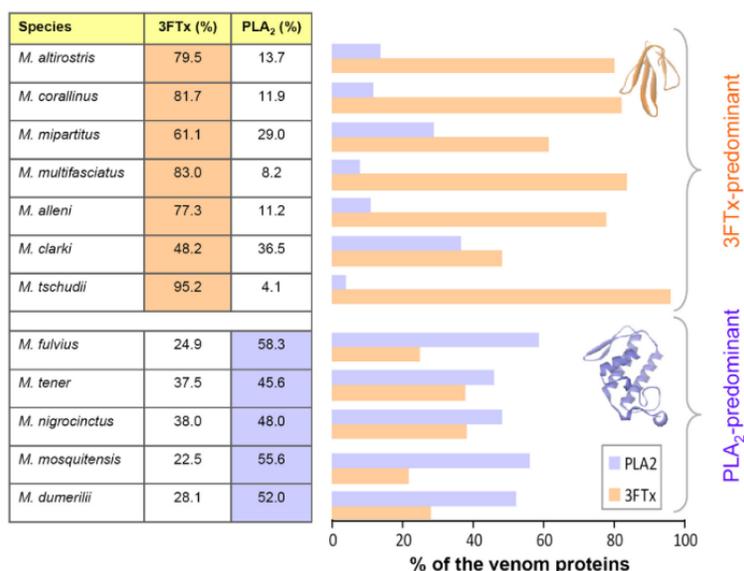
A partir de experimentos de electrofisiología se observó el mecanismo de acción de estas toxinas, las cuales generan un efecto trifásico sobre la liberación del neurotransmisor, el cual durante un primer evento genera una inhibición de la liberación de acetilcolina, seguida de un breve aumento de este neurotransmisor y posteriormente en la última fase hay una disminución progresiva que continúa hasta su ausencia. Es importante mencionar que estas fases no son distinguibles en cuadros de envenenamiento (Caccin et al., 2006).

## 2. Antecedentes

### 2.1 Investigación de los venenos de serpientes de coral

La investigación de los venenos de las serpientes de coral inició hace aproximadamente 40 años y aunque se han utilizado diferentes estrategias, tradicionalmente se realiza aislando toxinas individuales para su posterior caracterización funcional (Gutierrez, 2002). Sin embargo, en la última década los análisis proteómicos y transcriptómicos han brindado una visión más amplia de las proteínas presentes en los venenos y proporciona una estimación de la abundancia relativa que representa cada familia proteica, así como de las relaciones moleculares desde ARN a proteína (Calvete, 2014). Actualmente se han caracterizado con estrategias proteómicas los venenos de 22 especies de coralillos (Aird et al., 2017; Bénard-Valle et al., 2020; Lomonte, Rey-Suárez, et al., 2016).

Se ha realizado el transcriptoma de 10 especies de *Micrurus* (Aird et al., 2017; Bénard-Valle et al., 2020; Fernández et al., 2011; Leão et al., 2009; Margres et al., 2013b). Como es de esperarse, el patrón dicotómico en las familias de mayor abundancia es correlativo entre los análisis proteómicos y transcriptómicos, siendo las familias predominantes las 3FTx y PLA<sub>2</sub>, éstas representan más del 85% de los transcritos. Aunque se han identificado más de 20 familias proteicas presentes en los transcritos.



**Figura 11. Patrones divergentes de composición en los venenos de *Micrurus*.**

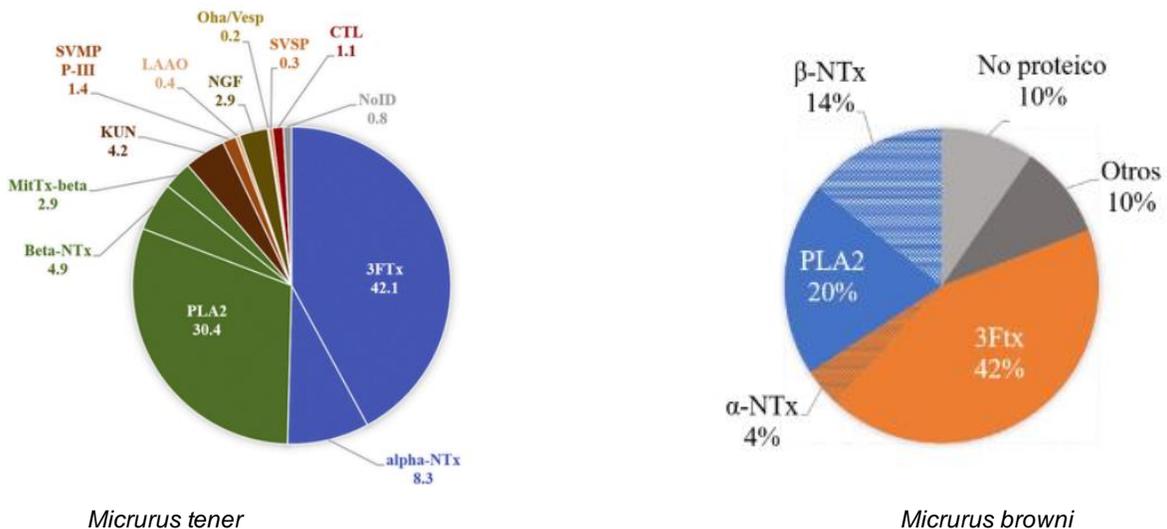
Las barras representan abundancia de PLA<sub>2</sub> (naranja) y 3FTx (azul). Sus porcentajes están en la Tabla. El grupo abundante en PLA<sub>2</sub> se distribuye en el centro, Norte del continente americano, mientras que el grupo abundante en 3FTx se distribuye en el sur. Tomado de Lomonte, 2016.

Gracias a análisis proteómicos y transcriptómicos fue como se logró identificar el patrón de predominancia en las familias proteicas de 3FTx y PLA<sub>2</sub> (Figura 11) en los venenos de las serpientes de coral (Lomonte, Rey-Suárez, et al., 2016).

Por otro lado, este enfoque también ha permitido encontrar variaciones intraespecíficas, ontogenéticas y ligadas al sexo, en serpientes de la familia viperidae (Alape-Girón et al., 2008; Calvete, 2014; Calvete et al., 2010; Menezes et al., 2006). Sin embargo, se desconoce si existe este tipo de variaciones en los venenos los Elápidos americanos.

## 2.2 Venenos mexicanos de serpientes de coral

A pesar de los avances que ha habido en el estudio de los venenos de las serpientes de coral americanas, solo algunos de ellos se han enfocado en especies con distribución en México: *Micrurus fulvius* (Vergara et al., 2014), *Micrurus laticollaris* (Carbajal, 2014), *Micrurus tener* (Bénard-Valle et al., 2014) (Bénard-Valle et al., 2014), *Micrurus browni* (Bénard-Valle et al., 2020) y *Micruroides euryxanthus* (Bénard-Valle et al., 2021). A partir de caracterizaciones proteómicas se han caracterizado únicamente 2 especies con distribución en México (Figura 12), *Micrurus tener* y *Micrurus browni* (Bénard-Valle et al., 2014, 2020).



**Figura 12. Composición proteica del veneno de *Micrurus browni* y *Micrurus tener*.**

(Tomado de Bénard-Valle et al., 2014, 2020).

De igual manera solo se cuenta con 3 análisis transcriptómicos de especies con distribución en el Norte del continente; *Micrurus fulvius*, *Micrurus tener* y *Micrurus browni* (Bénard-Valle et al., 2014, 2020; Margres et al., 2013a). Lo anterior hace evidente la falta de conocimiento en la comprensión de la composición de los venenos de coralillos mexicanos.

Particularmente se secuenciaron treinta ARNm codificantes de 3FTx diferentes a partir de las glándulas venenosas de cuatro especies de serpientes de coral (*M. diastema*, *M. laticollaris*, *M. browni* y *M. tener*). También cabe destacar que secuencias idénticas se encontraron presentes en más de una de las cuatro especies estudiadas; por ejemplo, las 3Ftx D.M (*M. diastema*) y T.E (*M. tener*) eran idénticas, así como D.J (*M. diastema*) y B.I (*M. browni*) (Guerrero-Garzón et al., 2018).

### 2.3 Letalidad y neurotoxicidad

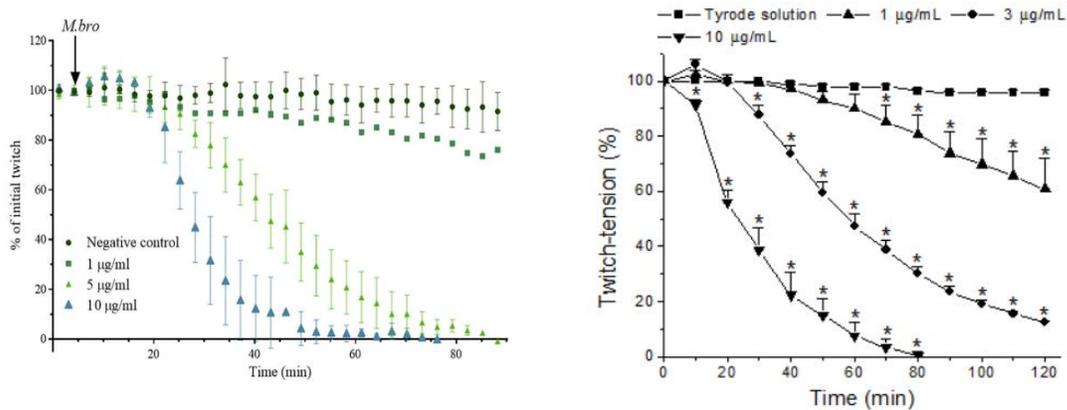
La letalidad de estos venenos está dada por la actividad neurotóxica, por lo que suelen ser particularmente potentes presentando DL<sub>50</sub> bajas, en comparación con venenos no neurotóxicos (Tabla 1).

**Tabla 1. Letalidad de algunos venenos de coralillos de género *Micrurus***

Especie	DL <sub>50</sub> (µg/g)	Cita
<i>M. fulvius</i>	0.3	(Vergara et al., 2014)
<i>M. tener</i>	1.2	(Bénard-Valle et al., 2014)
<i>M. laticollaris</i>	0.6	(Carbajal, 2014)
<i>M. browni</i>	0.16	(Bénard-Valle et al., 2020)
<i>M. euryxanthus</i>	1.31	(Bénard-Valle et al., 2021)
<i>M. mosquitensis</i>	0.4	(Fernández et al., 2015)
<i>M. clarki</i>	0.7	(Lomonte, Sasa, et al., 2016)

Tradicionalmente el análisis de venenos neurotóxicos se evalúa mediante experimentos electrofisiológicos por medio de preparaciones de tejidos neuromusculares o de células aisladas (Caccin et al., 2006; Olamendi-Portugal et al., 2008). Lo anterior ha permitido comprender sus mecanismos de acción dentro del sistema nervioso de mamíferos, reptiles, anfibios y aves (Bénard-Valle et al., 2020; Caccin et al., 2006; Moreira et al., 2010). Particularmente en mamíferos este conocimiento permite tratar de manera eficaz un envenenamiento.

Se han realizado algunas caracterizaciones dirigidas a la neurotoxicidad de sus venenos, utilizando preparaciones neuromusculares la mayoría con distribución en Sudamérica. A la fecha las únicas especies de serpientes de coral mexicanas analizadas son *Micrurus laticollaris* y *Micrurus browni* (Bénard-Valle et al., 2020; Carbajal-Saucedo et al., 2013), venenos que mostraron tener una combinación de efectos neurotóxicos a nivel presináptico y postsináptico, evidenciando la importancia clínica de las familias de PLA<sub>2</sub> y 3FTx.



**Figura 13. Efecto del veneno de *Micrurus browni* y *Micrurus laticollaris* sobre preparaciones neuromusculares de ratón.**

Twitch tensión (%): Fuerza de tensión expresada en porcentaje. Tomado de (Bénard-Valle et al., 2020; Carbajal-Saucedo et al., 2013).

### **3. Justificación**

La investigación de venenos de coralillos mexicanos es escasa, por lo que realizar caracterizaciones lo más completas posibles en cuanto a la diversidad, abundancia, variabilidad y funcionamiento, de los venenos y sus componentes ya sea entre diferentes taxones o poblaciones de una misma especie, se vuelve relevante para la comprensión de las funciones biológicas que desempeña el veneno y como es que actúan aquellos componentes que pudieran ser de importancia médica.

Este trabajo representa un gran aporte al conocimiento de los venenos de las serpientes mexicanas.

### **4. Hipótesis**

Los componentes más abundantes en el veneno serán PLA<sub>2</sub> seguido de 3FTx. La potencia letal, así como la neurotoxicidad serán producto de integrantes de estas dos familias.

Por otro lado, los venenos provenientes de diferentes localidades no mostrarán diferencias significativas en perfiles electroforéticos, cromatográficos o en su letalidad.

### **5. Objetivo general**

Realizar una caracterización funcional del veneno de *Micrurus diastema* con el fin de identificar y evaluar sus componentes neurotóxicos.

### **6. Objetivos particulares**

1. Realizar un fraccionamiento del veneno en condiciones no desnaturalizantes.
2. Caracterizar funciones biológicas del veneno y las fracciones obtenidas.
3. Evaluar la neurotoxicidad de aquellos componentes relevantes.
4. Analizar la composición del veneno y letalidad en muestras de *M. diastema* provenientes de diferentes localidades del estado de Veracruz.

## 7. Estrategia experimental

El presente trabajo parte de la iniciativa de realizar la caracterización proteómica del veneno de *Micrurus diastema*, el cual se realizó en el Instituto Clodomiro Picado, por el Dr. Bruno Lomonte Vigliotti y su equipo de trabajo en Costa Rica (datos en preparación).

Este trabajo se divide en 2 secciones, la primera abarca la caracterización bioquímica y biológica de la mezcla de venenos empleada en la realización del proteoma. En la segunda sección se realizó la caracterización de perfiles cromatográficos, electroforéticos y de letalidad de diferentes localidades que abarcan la distribución de *Micrurus diastema* en el estado de Veracruz, México (Figura 14).

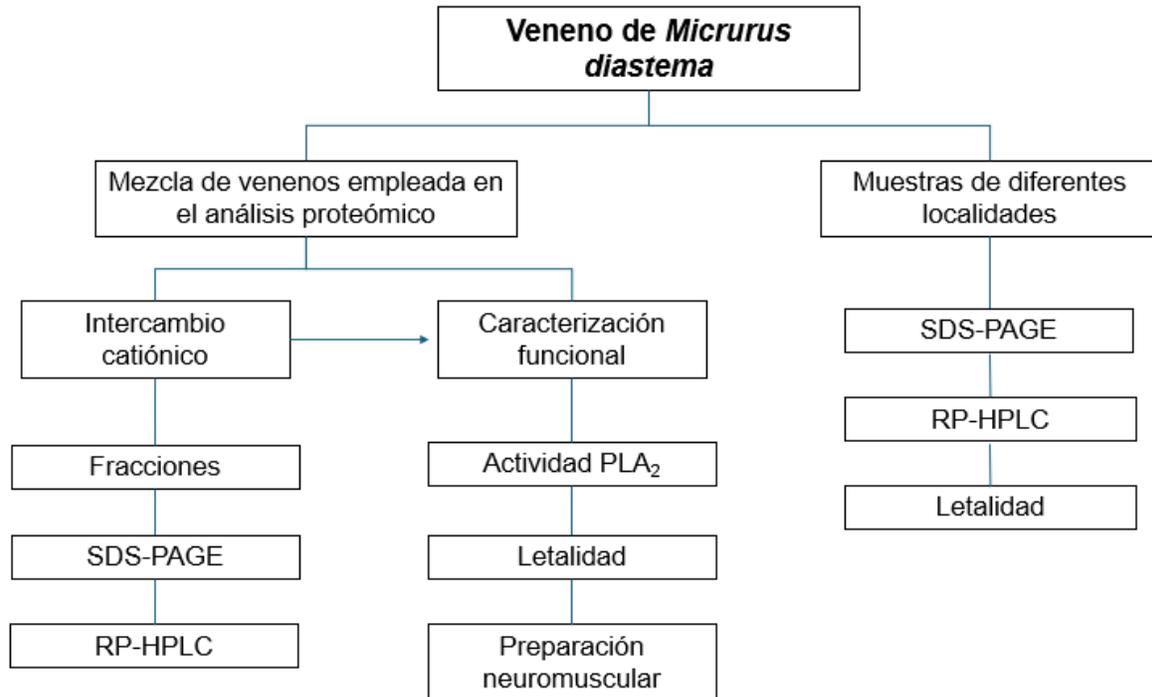


Figura 14. Estrategia experimental

## 8. Metodología

### 8.1 Venenos

Se emplearon venenos individuales de 5 localidades del municipio de Veracruz (Tuxpan, Córdoba, Actopan, Zongolica y los Tuxtlas) y 1 mezcla de venenos de las localidades de Córdoba y Actopan. Las muestras de la localidad de Córdoba y Actopan se obtuvieron del banco de venenos del laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano. Los individuos fueron catalogados como crías, juveniles y adultos, de acuerdo con las tallas máximas reportadas para *M. diastema* (Roze, 1996), catalogando como adultos a aquellos individuos que tuvieran tallas mayores a 50 cm de longitud total, juveniles aquellos con tallas menores a 50 cm y crías nacidas en el herpetario (Tabla 2).

Tabla 2. Tabla de los individuos *Micrurus diastema* que se ocuparon para la caracterización

Clave	Localidad	Cría	Juvenil	Adulto	Talla (LT)
IBt-032	Córdoba			X	ND
IBt-061	Córdoba			X	ND
IBt-093	Córdoba			X	79 cm
IBt-140	Actopan			X	68 cm
IBt-141	Actopan			X	59 cm
IBt-142	Actopan			X	80 cm
IBt-128	Zongolica			X	59 cm
IBt-129	Zongolica			X	63 cm
IBt-124	Tuxpan		X		28 cm
IBt-125	Tuxpan		X		30 cm
IBt-138	Los Tuxtlas			X	99 cm
N1	Los Tuxtlas	X			18 cm
N2	Los Tuxtlas	X			21 cm
N3	Los Tuxtlas	X			23 cm
N4	Los Tuxtlas	X			19 cm
N5	Los Tuxtlas	X			18 cm
N6	Los Tuxtlas	X			23 cm
N7	Los Tuxtlas	X			21 cm
N8	Los Tuxtlas	X			23 cm
N9	Los Tuxtlas	X			20 cm
N10	Los Tuxtlas	X			22 cm
N11	Los Tuxtlas	X			ND

ND. No disponible

LT. Longitud total

Los 12 individuos provenientes de los Tuxtlas fue un caso especial, ya que llegó un individuo adulto (IBt-138) proveniente de colecta en campo (julio 2021) y

aproximadamente a la semana puso 11 huevos (anexos). A los 11 neonatos se les realizaron extracciones de veneno aproximadamente a los 5 días de nacidos.

Para la obtención de muestras del resto de las localidades se realizaron extracciones de manera manual por un año y medio. Los individuos fueron obtenidos de colecta en campo y se mantuvieron en el herpetario "Cantil" del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Lo anterior se realizó sujetando al ejemplar por la cabeza y permitiéndole morder una cuchara cubierta por Parafilm (anexos). La cuchara era lavada con acetato de amonio 20 mM (pH 4.7) para recuperar el veneno que generalmente suele ser un volumen pequeño (10  $\mu$ l a 100  $\mu$ l). Posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 minutos. Después se recuperaba la fracción soluble y congelada a -70 °C para su posterior liofilización. Posteriormente se obtenía el peso seco del veneno obtenido (balanza granataria; Adventurer™, OHAUS) y se almacenaban individualmente.

## **8.2 Cuantificación de proteínas**

Para conocer la cantidad de proteína presente en las muestras de veneno, se determinó por absorbancia a 280 nm ( $A_{280}$ ) y el método del ácido bicinconínico (BCA).

La cuantificación por medio del método BCA se llevó a cabo utilizando un paquete comercial para reacciones de BCA de la marca Pierce™ (protocolos). La técnica se basa en la cuantificación de la interacción del ácido bicinconínico con iones de  $\text{Cu}^{1+}$  generados a partir de la reacción entre la proteína y  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{proteína} + \text{Cu}^{2+} = \text{Cu}^{1+} + \text{proteína}$ ). Esta reacción proporciona un color púrpura a la muestra. El resultado de la reacción exhibe una absorbancia a 570 nm. La concentración se obtiene interpolando los datos de una curva estándar de albúmina de suero bovino de concentraciones conocidas.

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

La cuantificación por medio del método BCA se llevó a cabo utilizando un paquete comercial para reacciones de BCA de la marca Pierce™ (protocolos).

### **8.3 SDS-PAGE**

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) es una de las metodologías más utilizadas para el análisis de mezclas proteicas complejas. Permite estimar la masa molecular de proteínas a través de su migración en un campo eléctrico empleando una matriz de acrilamida-bisacrilamida.

Se ocupó el método descrito por Laemmli (1970), con el fin de analizar los componentes presentes tanto en el veneno completo como en las fracciones que se obtengan de los análisis cromatográficos. Los geles emplean una matriz de acrilamida al 15% para en gel separador y una matriz al 4% en el gel concentrador. Las muestras se prepararon en condiciones reductoras y no reductoras con buffer de corrida desnaturizante 5X (10% glicerol, SDS 2.5%, tris-HCl 50 mM pH 6.8, azul de bromofenol 0.002% y en el caso de las condiciones reductoras 2-mercaptoetanol 5%). Las muestras con 2-mercaptoetanol se hirvieron por 5 minutos. Se emplearon los kits BIO-RAD, Mini PROTEAN® System Glass Plates, corriendo a 60 Volts por 15 minutos e incrementando a 120 Volts por aproximadamente 90 minutos. Terminada la electroforesis, los geles se tiñeron con solución de tinción (50% metanol, 10% ácido acético y 0.2% de azul brillante de coomassie R-250) en agitación constante. Finalmente se destiñen con solución de destinción (10% metanol + 10% ácido acético).

### **8.4 RP-HPLC**

La técnica de RP-HPLC (reverse phase high performance liquid chromatography, por sus siglas en inglés) se emplea con el fin de analizar los perfiles cromatográficos de los venenos individuales y de la mezcla de ellos. En esta técnica los componentes presentes en la muestra que se desea separar o purificar, son selectivamente retenidos por una fase estacionaria en la columna, que está conformada por cadenas de hidrocarburos. La fuerza de las interacciones hidrofóbicas que formen los componentes de la muestra con la fase estacionaria de la columna determinará su separación.

Se utilizó una columna C<sub>18</sub> (GraceVydac) analítica con dimensiones de 250 x 4.6 mm, y tamaño de partícula de 5µm. En la fase móvil se ocupó una solución A (polar) H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA (ácido trifluoroacético) y solución B (apolar) acetonitrilo + 0.1%TFA. Se ocupó un gradiente hacia 70 % solución B con un flujo constante de 1ml/min (Tabla 3).

**Tabla 3. Gradiente utilizado en RP-HPLC**

Tiempo (min)	% solución B
0	0
5	0
15	15
75	45
85	70
94	70

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

Las determinaciones de masa fueron realizadas por el Dr. Fernando Zamudio en el laboratorio de Dr. Lourival Possani. Las fracciones obtenidas por 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 10µL/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.

### **8.6 Fraccionamiento del veneno por intercambio catiónico**

Se empleó el intercambio catiónico en un equipo de FPLC (Cromatografía líquida de rápida resolución; GE, AKTA Pure). El intercambio catiónico permite mantener

una conformación tridimensional muy cercana a la original, la cual se ve afectada en otros métodos de separación como el caso de RP-HPLC.

En la fase estacionaria se ocupó una columna de intercambio catiónico (HiPrep™, SPHP 16/10) con volumen de 20 ml, dimensiones de 16x100 mm y tamaño de partícula de 34 µm, con grupos sulfopropil en ella (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

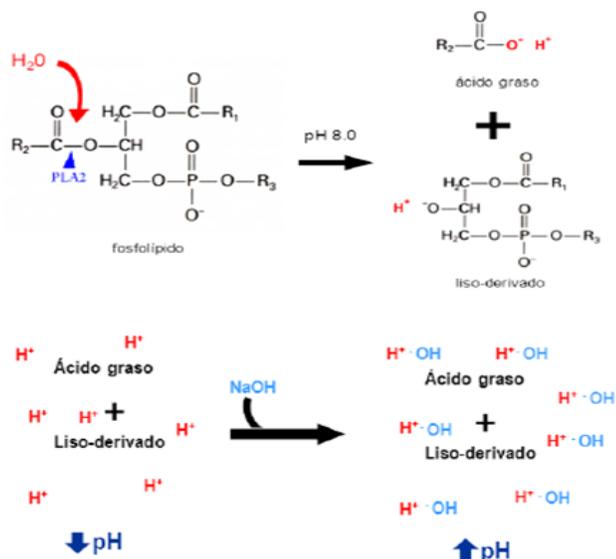
Como buffer A se utilizó acetato de amonio 20 mM pH 4.7-5 y como buffer B, acetato de amonio 20 mM pH 5-7.7 con 2 M de NaCl. Se lava y equilibra la columna antes de iniciar el método (Tabla 3). El gradiente empleado fue de 0 a 1 M de NaCl en 80 minutos, con un flujo constante de 5 mililitros por minuto.

**Tabla 4.** Gradiente utilizado en intercambio catiónico

Tiempo (min)	Molaridad NaCl
0	0
80	50
90	50
95	0

## 8.7 Actividad fosfolipasa

Este experimento proporciona una medición de la actividad enzimática de las fosfolipasas A<sub>2</sub> presentes en el veneno empleando un ensayo titulométrico en el que se emplea como sustrato una preparación de yema de huevo al 10% en buffer estándar (NaCl 0.1 M. CaCl<sub>2</sub> 0.01 M. 0.1% de tritón X-100) y NaOH 50 mM para titular (Shiloah, 1973). Para esto se adicionan en un tubo 500 µl de solución de yema de huevo y se estabiliza el pH a 8.0 con NaOH. La solución se mantiene en agitación constante y bajo burbujeo de N<sub>2</sub>. La actividad generada por la reacción enzimática se reporta en unidades específicas (U/mg) en donde las unidades (U) son definidas como µmol de NaOH consumidas en un minuto por miligramo de veneno. Las µmol de NaOH degradadas durante el ensayo son directamente proporcionales a la cantidad de ácidos grasos liberados por acción de las fosfolipasas A<sub>2</sub> del veneno (Figura 15).



**Figura 15. Ensayo titulométrico de actividad PLA<sub>2</sub>.**

A) Actividad enzimática PLA<sub>2</sub>. B) Efecto de la actividad PLA<sub>2</sub> y la titulación con NaOH (tomado de Bénard Valle, 2009).

## 8.8 Permisos de bioética

Los experimentos con animales fueron aprobados por el comité de bioética del Instituto de Biotecnología de la UNAM, con el proyecto # 385 “Caracterización funcional y análisis de especificidad de venenos de corallillos norteamericanos”.

## 8.9 Determinación de Dosis Letal Media (DL<sub>50</sub>)

La DL<sub>50</sub> se define como la cantidad de veneno necesaria para matar a la mitad de una población de animales envenenados experimentalmente (Casasola *et al.*, 2009).

En todos los experimentos se utilizaron grupos de 3 individuos. La administración se realizó por vía intravenosa, la cantidad de veneno por dosis se diluyó en un volumen total de 500 µl de solución salina isotónica (NaCl 150 mM) por ratón, realizando las lecturas de mortalidad a las 48 horas.

## 8.10. Preparación neuromuscular de nervio frénico y hemidiafragma de ratón

La muestra biológica se obtuvo de ratones de la cepa CD1 en un peso de 30-35 gramos, que se sacrificaron para extraer el nervio frénico izquierdo y el músculo del diafragma al que está adherido (Bénard-Valle et al., 2020; BULBRING, 1946). El tejido se mantendrá aislado y se realizarán diversas estimulaciones eléctricas en presencia y ausencia de las toxinas a estudiar.

El nervio frénico izquierdo con su mitad adherida del músculo del diafragma se montó dentro de un baño de solución Tyrode (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4 mM, KCl 2.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.0 mM, NaCl 137 mM y NaHCO<sub>3</sub> 11.9 mM) con glucosa 11 mM, a 37 °C, bajo burbujeo constante (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Se estimuló de forma indirecta (nerviosas) y directa (musculares) con pulsos de voltaje supramaximal. La preparación se estabilizó bajo estimulación nerviosa durante 20 minutos. Posteriormente se añadió un bloqueador reversible de la transmisión neuromuscular a la solución, se incubó durante 5 minutos y posteriormente se realizaron lavados. Esto para asegurar que la estimulación del nervio y el músculo sean completamente independientes una de otra. Finalmente, se evaluó el efecto del veneno de *Micrurus diastema* en diferentes concentraciones, así como fracciones (con actividad letal y que hayan mostrado efectos neurotóxicos) a la solución hasta que se observe una inhibición del 100% de las contracciones musculares. Se calcularon los valores de T<sub>90</sub>, definidos como el tiempo desde la adición de la toxina hasta el momento en que la fuerza de las contracciones provocadas indirectamente alcance el 10% del total.

Tabla 5. Condiciones de estimulación

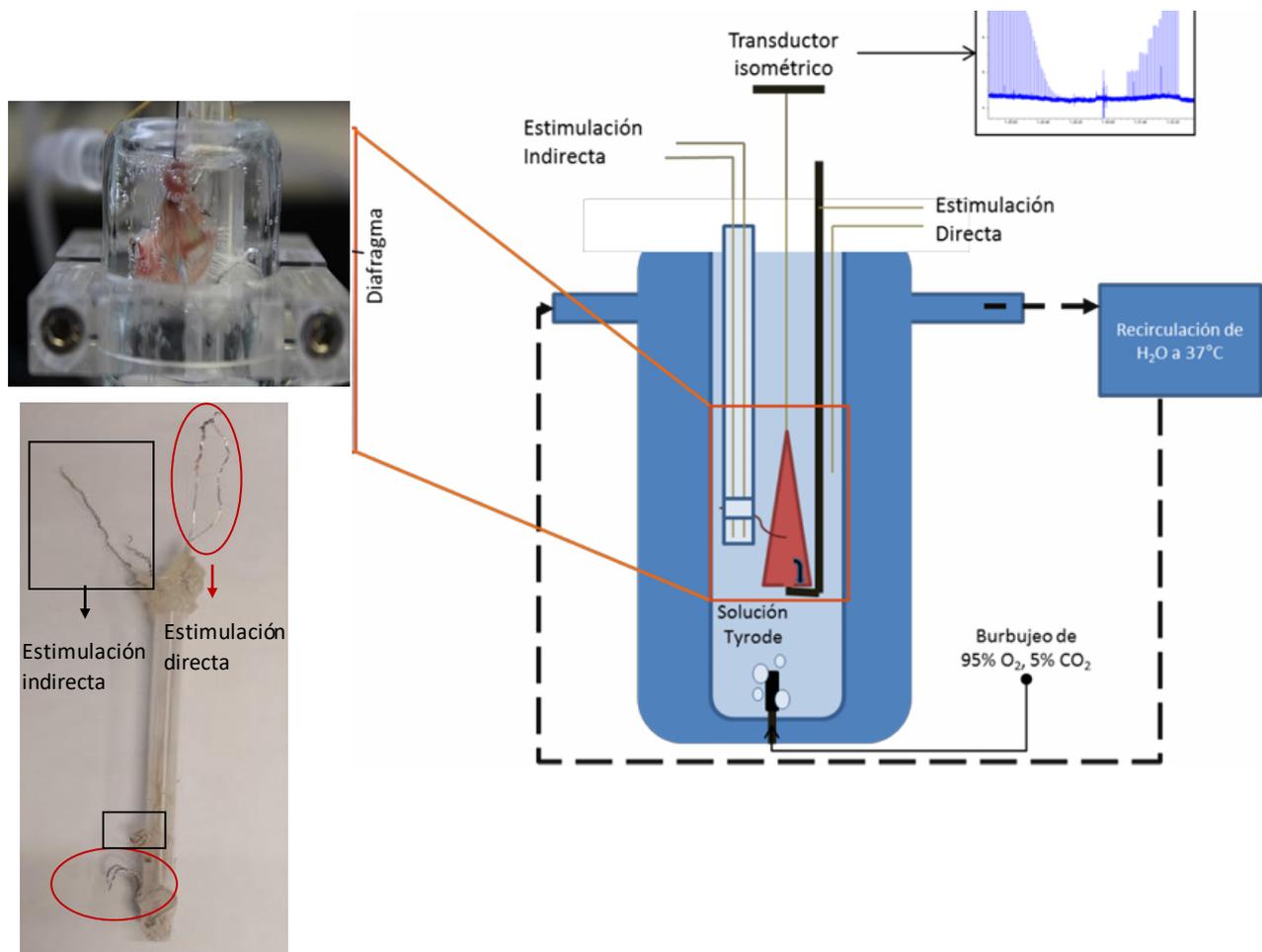
Condiciones de estimulación		
	E. directa (músculo)	E. indirecta (nervio)
Voltaje	Supra máximo (>70 V)	Supra máximo (>70 V)
Duración	1 ms	0.1 ms
Frecuencia	0.2 pps	0.2 pps

ms: milisegundos

pps: pulsos por segundo

El laboratorio del Dr. Alejandro Alagón Cano ya contaba con experiencia utilizando esta metodología. Sin embargo, dependía de colaboraciones externas para poder realizar este experimento. Para la realización del presente trabajo y futuras caracterizaciones de actividades neurotóxicas que se realicen en el laboratorio se montó un equipo transductor de fuerza modelo FT-302 de la marca iWorx®. Que cuenta con un estimulador de corriente multicanal, el cual se empleó para la estimulación directa al nervio. Ya que la estimulación al músculo requería voltajes mayores a los que el equipo lograba suministrar, se necesitó utilizar un equipo de mayor potencia de la marca Grass Stimulator modelo S88. Las lecturas se realizaron con el software del equipo (LabScribe).

El baño de tejido se mantenía en temperatura óptima con el uso de una bomba con termostato que permite al agua circular de manera constante por todo el circuito de la tubería del equipo. Y la cámara en la que se coloca el tejido se mantuvo conectada a un tanque de oxígeno de 40 litros (Figura 16).



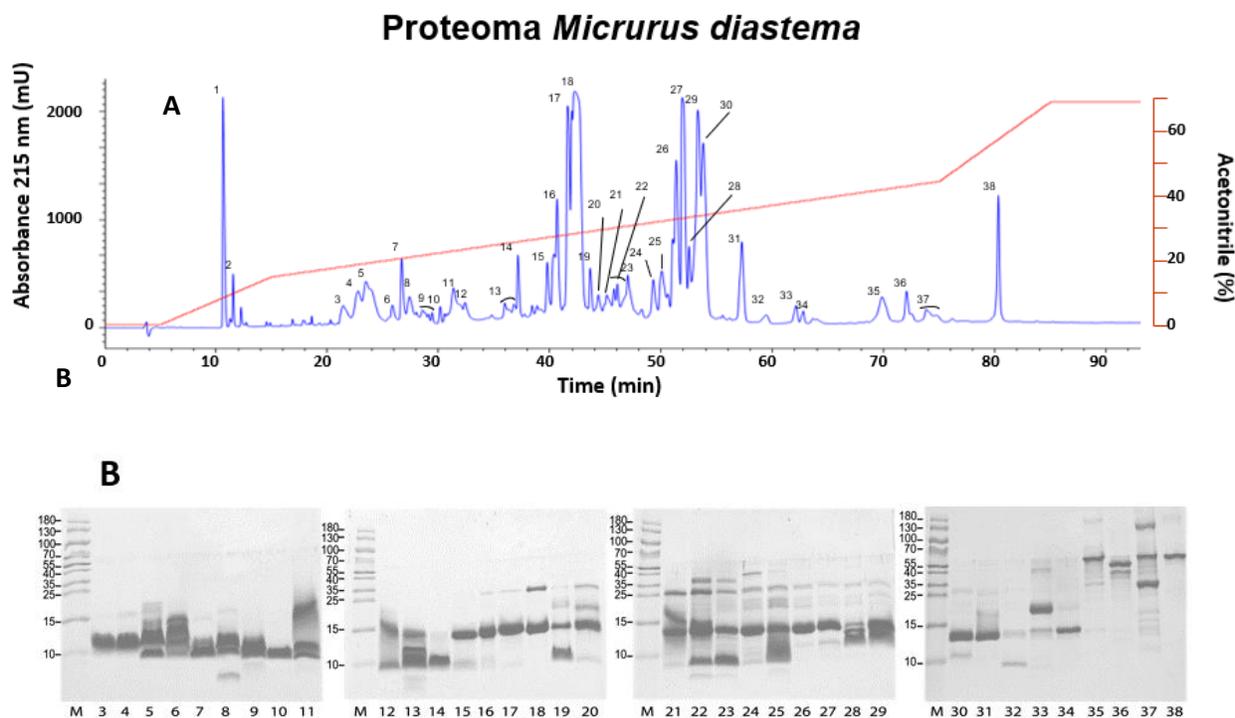
**Figura 16. Esquematación de la preparación de nervio frénico-hemidiafragma de ratón.**

Se ensamblaron estimuladores que fueran eficientes para el tejido utilizado. Esto se logró utilizando un popote de acrílico en el que se introdujeron dos líneas dobles de alambre de platino (dimensiones de 0.5 mm), material inerte resistente a la oxidación. Esto para las estimaciones directa e indirecta. El popote se rellenó con resina epoxica para evitar cualquier dispersión de corriente. Tomado y modificado de (Bénard-Valle et al., 2020).

## 9. Resultados y discusión

### 9.1 Análisis proteómico de la mezcla Córdoba/Actopan

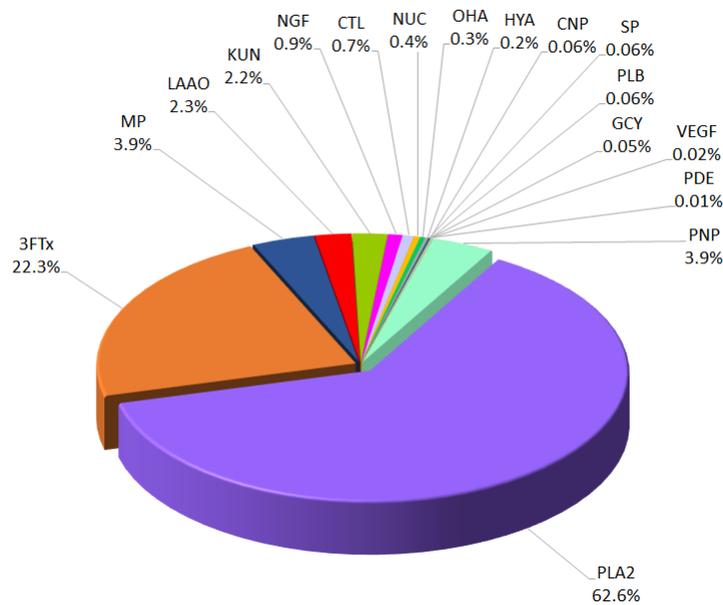
La caracterización proteómica se llevó a cabo con el fin de analizar la composición del veneno, identificar las familias proteicas a las que pertenecen sus componentes y obtener un panorama general de su abundancia. En el fraccionamiento por RP-HPLC se obtuvieron 38 fracciones (Figura 17), cada una de las cuales al examinar por electroforesis (SDS-PAGE) muestran entre una y cuatro bandas. Este número de fracciones es similar al reportado en otros venenos de coralillos con predominancia de PLA<sub>2</sub> (Bénard-Valle et al., 2020; Lomonte, Rey-Suárez, et al., 2016).



**Figura 17. Fraccionamiento por RP-HPLC de la mezcla *Micrurus diastema* y SDS-PAGE de las fracciones obtenidas.**

A: Dos miligramos de venenos disueltos en agua con 0.1% de ácido tricloroacético (TFA) fueron aplicados a una columna analítica C<sub>18</sub> a un flujo de 1 ml/min (línea roja) de acetonitrilo con 0.1% TFA, como se describe en los métodos. La elución fue monitoreada a 215 nm y las fracciones fueron colectadas de manera manual. B: SDS-PAGE (15%) en condiciones reductoras de las fracciones colectadas, teñidas con azul de coomassie R-250. Las bandas proteicas de los geles fueron extraídas y sometidas a digestión por tripsina para su identificación en nLC-MS/MS. Las bandas múltiples en un mismo carril se identificaron como "a", "b", "c", etc. De arriba abajo.

De acuerdo con la integración del cromatograma de RP-HPLC (Figura 17) la familia con mayor abundancia son las PLA<sub>2</sub>, constituyendo el 62.6% del veneno, estas proteínas en su mayoría se identificaron entre las fracciones 14 a 31 seguidas de las 3FTx representando el 22.3%, y eluyendo entre las fracciones 3 a 14. Posteriormente entre las fracciones 35, 36 y 37 se encuentran la mayoría de las metaloproteasas, representado un 3.6% y al final de perfil cromatográfico las L-aminoácido oxidasas con un 2.3% del total del veneno. También se identificaron otras familias proteicas ya reportadas en venenos de serpientes de coral, como inhibidores de proteasas tipo Kunitz (2.2%), factores de crecimiento nervioso (0.9%), entre otras, sin embargo, su representatividad dentro del veneno es menor al 1% (anexos)



**Figura 18. Composición del veneno de *Micrurus diastema*.**

PLA<sub>2</sub>: fosfolipasas A<sub>2</sub>; 3FTx: toxinas de 3 dedos; PNP: péptidos o componentes no proteicos; KUN: inhibidor tipo Kunitz; VEGF: factor de crecimiento vascular de endotelio; CNP: péptidos natriuréticos; MP: metaloproteinasas; SP: serinoproteasas; PLB: fosfolipasas B; HYA: hialuronidasas; GCY: glutaminylcyclasas; NUC: nucleotidasas; BDF: factor de crecimiento derivado de cerebro; LAO: L-aminooxidasas; PDE: fosfodiesterasas; CTL: tipo lectinas C; OHA: ohanin/vespryn; NGF: factor de crecimiento nervioso.

En términos de composición, el veneno de *Micrurus diastema* es similar al reportado para *M. tener* y *M. browni*, con abundancia de PLA<sub>2</sub>, seguida de 3FTx.

Estos venenos junto con el de *M. diastema* pueden considerarse predominantes en PLA<sub>2</sub>, lo cual concuerda con el patrón dicotómico previamente descrito (Lomonte, Rey-Suárez, et al., 2016). Esto no significa que las 3FTx no participen activamente en el funcionamiento de los venenos, ya que se han encontrado  $\alpha$ -neurotoxinas con altas potencial letales en mamíferos, además de algunas con actividad única en sus presas naturales (Bénard-Valle et al., 2014, 2020).

## **9.2 Caracterización funcional de la mezcla empleada en el análisis proteómico**

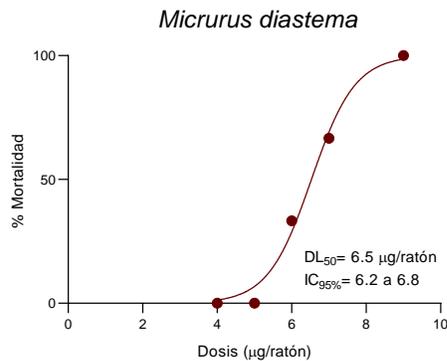
Se obtuvo un total de 30 miligramos (peso seco) al mezclar los venenos de los 6 individuos provenientes de Córdoba y Actopan en cantidades iguales (5 miligramos por individuo) para tener una representatividad equivalente en la mezcla final, la cual se resuspendió en 5 ml de acetato de amonio 20 mM pH 4.7. Posteriormente se cuantificó por el método de BCA, obteniendo una concentración de 6.5 mg/ml.

## **9.3 Evaluación de letalidad**

La determinación de letalidad brindó información básica sobre la severidad del envenenamiento en ratones, así como una base para determinar y estudiar los mecanismos de acción de las toxinas que conforman el veneno. Se determinó la DL<sub>50</sub> en ratones de la cepa CD1 en un peso de entre 18 y 20 gramos, por vía intravenosa. Dando un valor de 6.5  $\mu$ g/ratón (IC<sub>95</sub>= 6.2 a 6.8), equivalente a 0.4  $\mu$ g/g (Figura 18). Lo anterior muestra que el veneno de *Micrurus diastema* posee alta potencia letal, comparable con la letalidad de otras serpientes de coral norteamericanas (Tabla 5).

Durante el envenenamiento los ratones presentaron como signo principal parálisis flácida de las patas traseras y la causa de muerte fue una evidente insuficiencia respiratoria. Lo anterior es indicativo de que algunos integrantes de PLA<sub>2</sub> o 3FTx actúan como neurotoxinas presinápticas y/o postsinápticas respectivamente.

**Tabla 6.** Tabla de letalidad de diferentes especies de *Micrurus*.



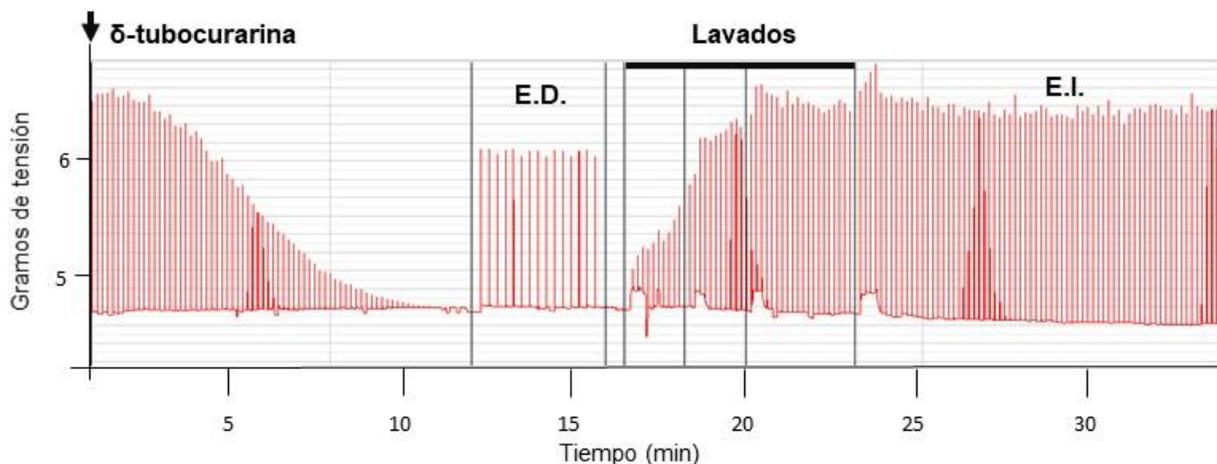
Especie	DL <sub>50</sub> (µg/g)	Cita
<i>M. fulvius</i>	0.3	(Vergara et al., 2014)
<i>M. tener</i>	1.2	(Bénard-Valle et al., 2014)
<i>M. laticollaris</i>	0.6	(Carbajal, 2014)
<i>M. browni</i>	0.17	(Bénard-Valle et al., 2020)
<i>M. diastema</i>	0.34	

**Figura 19.** Dosis letal *Micrurus diastema*

#### 9.4 Preparación de nervio frénico-diafragma (NFD) de ratón

En cada ensayo se verificó la independencia entre las estimulaciones al nervio (estimulación indirecta) y el músculo (estimulación indirecta), añadiendo  $\delta$ -tubocurarina 20  $\mu$ M (antagonista competitivo del receptor de acetilcolina), la cual generó un 100% de inhibición de la contracción bajo estimulación indirecta, pero sin afectar la estimulación directa al músculo, después se realizaron lavados con solución Tyrode hasta recuperar en su totalidad la fuerza de contracción (Figura 20). Posteriormente se permitió que el tejido se estabilizara por 10 minutos antes de agregar veneno de *Micrurus diastema* en distintas concentraciones (10  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 2.5  $\mu$ g/ml y 1  $\mu$ g/ml).

Una vez agregado el veneno al baño de tejido, se empezó a observar una disminución de la contracción muscular a los 5 y 10 minutos aproximadamente con 10  $\mu$ g/ml y 5  $\mu$ g/ml respectivamente (Figura 21) estos tiempos de latencia posteriores a la adición de veneno ya han sido reportados en la evaluación de otros venenos y se han atribuido a una predominancia en la actividad de PLA<sub>2</sub>  $\beta$ -neurotóxicas (Bénard-Valle et al., 2020; Carbajal-Saucedo et al., 2013).



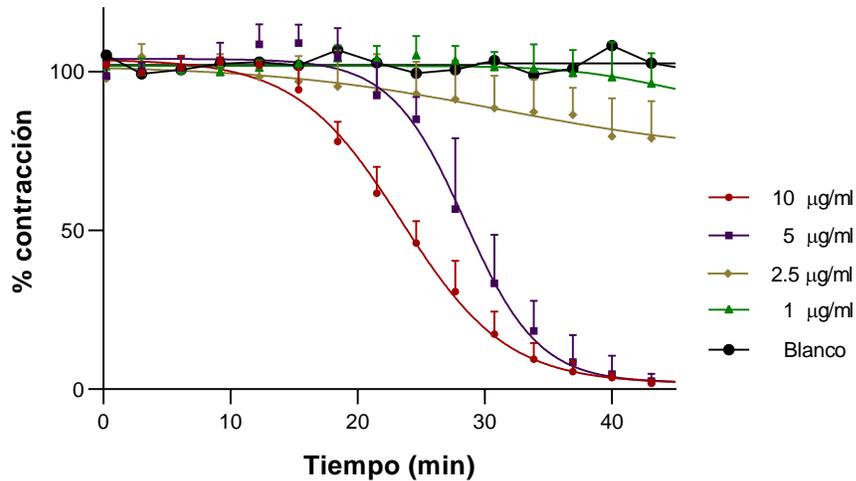
**Figura 20. Registro de la fuerza de contracción del diafragma**

El tejido se expuso a  $\delta$ -tubocurarina 20  $\mu$ M. Nótese la recuperación de la fuerza de contracción al retirar la  $\delta$ -tubocurarina con 3 lavados de solución Tyrode. E.D.: estimulación directa (músculo). E.I.: estimulación indirecta (nervio).

La inhibición aumentó progresivamente hasta generar un bloqueo completo de la contracción. Posteriormente se realizaron lavados con solución Tyrode para comprobar si existía recuperación de la contracción muscular, y al no observar recuperación a través de estimulación indirecta, se puede atribuir el efecto a una actividad presináptica (PLA<sub>2</sub> con actividad neurotóxica). Sin embargo, no se puede descartar la contribución de  $\alpha$ -neurotoxinas como D.H., anteriormente descrita y que ha mostrado una fuerte afinidad por los nAChR (Bénard-Valle et al., 2014, 2020; Guerrero-Garzón et al., 2018). Se determinó el valor de T<sub>90</sub> en 24.5 minutos con 10  $\mu$ g/ml. Y para el caso de 5  $\mu$ g/ml el valor determinado fue T<sub>90</sub>= 36.7 minutos.

Se probaron también dosis de 2.5  $\mu$ g/ml y 1  $\mu$ g/ml, en el caso de 2.5  $\mu$ g/ml se determinó un valor de T<sub>90</sub>= 115 minutos. Por otro lado, con 1  $\mu$ g/ml jamás se observó una reducción del 100 % de la contracción muscular transcurridas 2 horas (Figura 21).

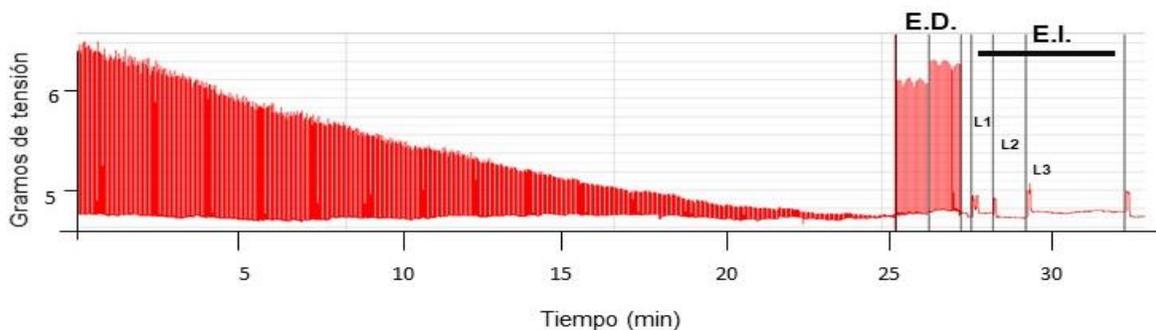
La normalización de los datos se realizó tomando como 100% de la fuerza de contracción al promedio de la tensión en gramos 5 minutos previos a la adición del veneno, calculando posteriormente los cambios en el porcentaje de la fuerza de contracción durante el tiempo, los valores se ajustaron a una curva sigmoidea de dosis-respuesta (Figura 21).



**Figura 21. Gráfica del porcentaje de inhibición de la contracción muscular en la preparación neuromuscular con diferentes dosis de veneno.**

Datos normalizados. Las barras de error representan desviación estándar de tres experimentos. Blanco. 200 µl de solución Tyrode.

También se observó la actividad motora al ser sometida bajo estimulación directa (previa a los lavados) para verificar que la integridad del músculo no hubiera sido afectada por actividad miotóxica, como se ve en la Figura 22 al aplicar estimulación directa el músculo responde correctamente, por lo que se descarta daño ocasionado por miotoxicidad.



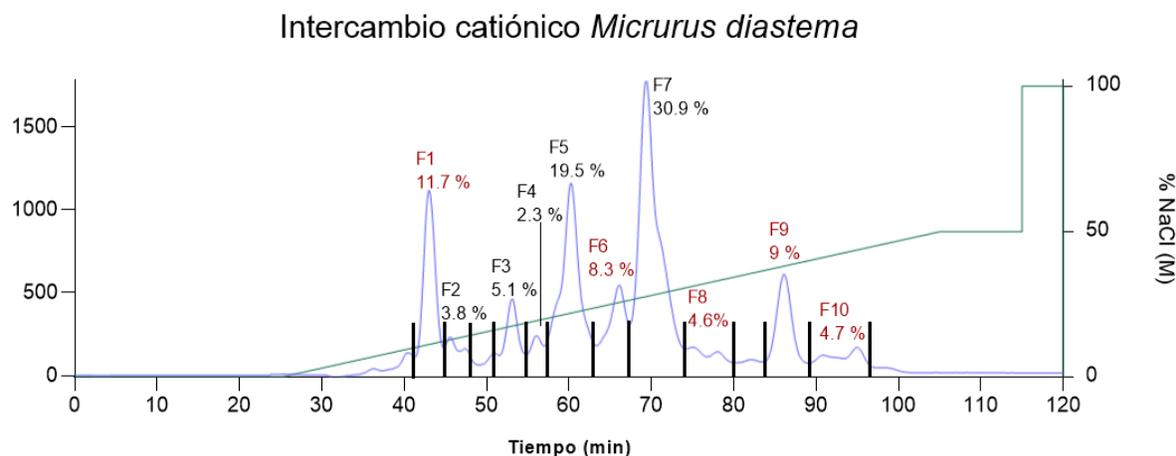
**Figura 22. Registro de la fuerza de contracción del diafragma**

Se expuso a 5 µg/ml de veneno completo de *M. diastema*. E.D. Estimulación directa al musculo. E.I. Estimulación indirecta al músculo. L. Lavados.

## 9.5 Fraccionamiento en condiciones no desnaturalizantes

Anteriormente en el análisis del veneno de *Micrurus browni* (Bénard-Valle et al., 2020) se observó que el fraccionamiento del veneno utilizando RP-HPLC, disociaba posibles interacciones de los componentes del veneno que resultaban ser relevantes en la actividad letal del veneno completo, por lo que el uso de fraccionamientos en condiciones no desnaturalizantes como el intercambio catiónico fuerte permite realizar una mejor caracterización en cuanto a funcionalidad de sus componentes y su contribución en la actividad letal.

Se fraccionó la mezcla de *M. diastema* mediante intercambio catiónico fuerte, utilizando un equipo de FPLC (fast protein liquid chromatography). De este último se obtuvieron 10 fracciones (Figura 23), éstas se colectaron, dializaron, liofilizaron, resuspendieron en acetato de amonio 20mM (pH 4.7) y finalmente cuantificaron por el método de BCA.

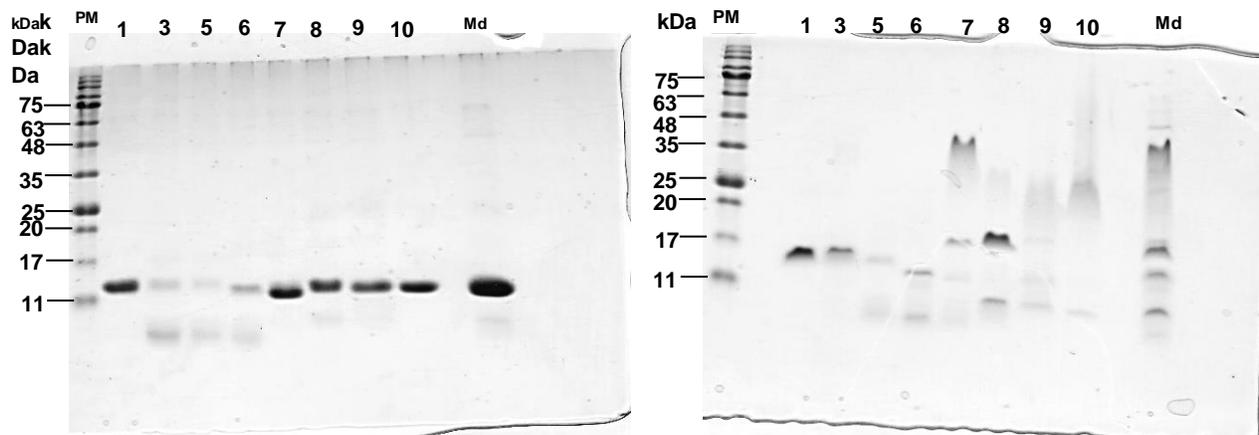


**Figura 23. Intercambio catiónico fuerte. (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>).**

Se cargaron 20 mg totales. 0 -1M NaCl en 80 min. Porcentajes de representatividad obtenidos por área bajo la curva a 214 nm. Las fracciones en fuente color rojo indican actividad letal.

## 9.6 Caracterización de las fracciones de intercambio catiónico

Las fracciones obtenidas durante el intercambio catiónico fueron separadas en geles SDS-PAGE al 15% en condiciones reductoras y no reductoras. Los perfiles electroforéticos en ambas condiciones nos permiten realizar una identificación parcial de los componentes de cada fracción.

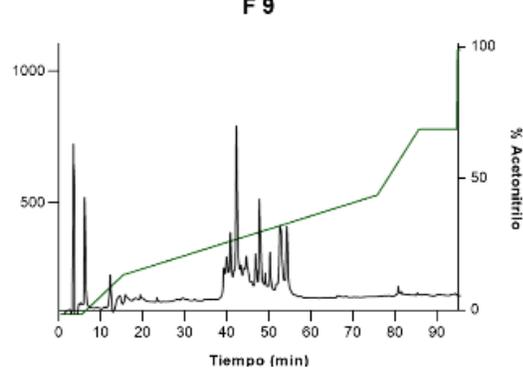
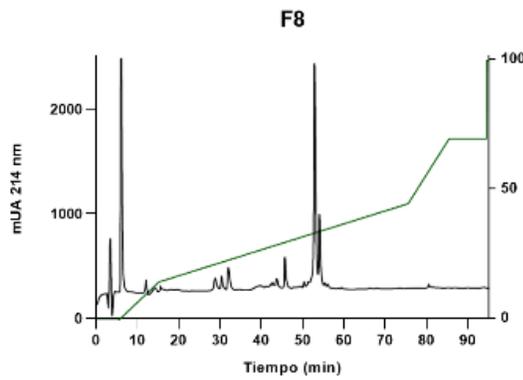
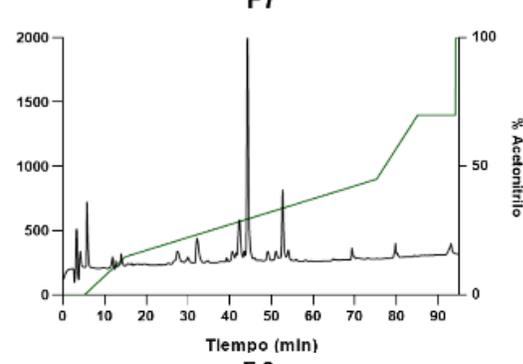
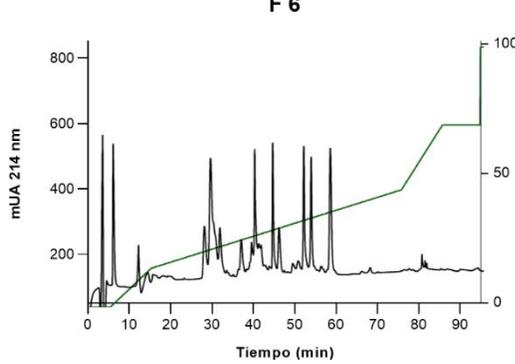
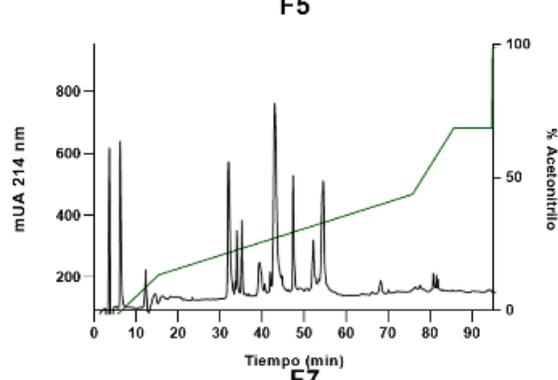
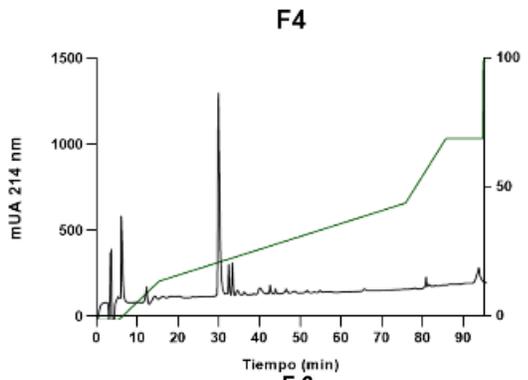
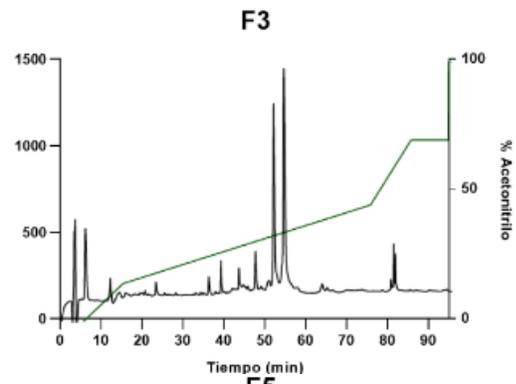
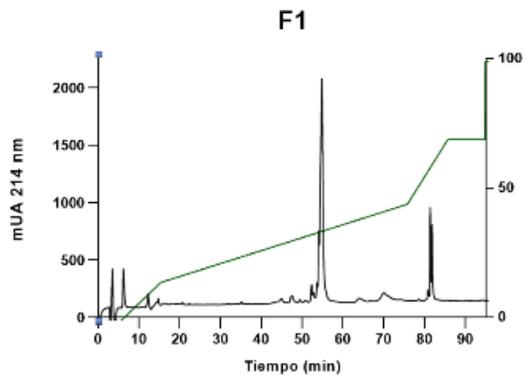


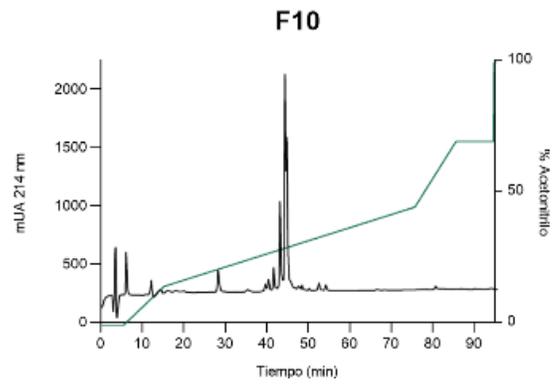
**Figura 24. Perfiles electroforéticos de las fracciones obtenidas por intercambio catiónico.**

Se cargaron 5  $\mu\text{g}$  por fracción y 20  $\mu\text{g}$  de la mezcla *M. diastema*.

En los perfiles electroforéticos (Figura 24) podemos observar que todas las fracciones muestran bandas cercanas a los marcadores de 17 y 11 kDa (condiciones reductoras), que corresponden a integrantes de PLA<sub>2</sub> y 3FTx respectivamente. En los perfiles de las fracciones en condiciones no reductoras se puede observar que a partir de la fracción 7 la migración de sus componentes aparece en pesos moleculares aparentes mucho mayores a los presentes en condiciones reductoras. Esto podría deberse a la presencia de interacciones entre sus componentes, lo que indicaría que dichas interacciones serían de naturaleza covalente (Bénard-Valle et al., 2020). Sin embargo, también podría ser producto de la migración anómala dada por la estructura terciaria de las proteínas, que 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). Posteriormente se obtuvieron los pesos moleculares de algunas de las fracciones por medio de ESI-MS, y no se encontró evidencia de algún tipo de asociación covalente entre proteínas.

Todas las fracciones obtenidas del intercambio catiónico posteriormente se subfraccionaron mediante fase reversa, cargando 200  $\mu\text{g}$  de cada fracción para observar la composición de sus perfiles cromatográficos y la posterior caracterización de aquellas fracciones más relevantes.





**Figura 25. Perfiles cromatográficos del sub-fraccionamiento por RP-HPLC de las fracciones obtenidas del intercambio catiónico.**

Columna C18 analítica. Dimensiones 250 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m. Flujo 1 ml/min. Se cargaron 200  $\mu$ g de veneno completo de los individuos

## 9.7 Actividad letal de las fracciones

También se evaluó la presencia de actividad letal en las 10 fracciones obtenidas del intercambio catiónico, inyectando 40 µg de cada una a ratones de la cepa CD1. Posteriormente se determinó su contribución e importancia en la actividad letal, utilizando el valor del toxicity score (Laustsen et al., 2015), el cual se obtiene considerando la DL<sub>50</sub> de cada fracción y la abundancia relativa en el veneno total. De las 10 fracciones, F1, F6, F8, F9 y F10 presentaron actividad letal.

Posteriormente se realizaron las determinaciones de letalidad de las fracciones: F6. DL<sub>50</sub>= 4.2 µg/ratón; F9. DL<sub>50</sub>= 5 µg/ratón; y F10. DL<sub>50</sub>= 9.2 µg/ratón. Mientras que para F1 y F8 se obtuvo un rango de sus potencias letales (F1= >39 µg/ratón y F8= 6.8 a 14.8 µg/ratón). En conjunto estas DL<sub>50</sub>'s solo explican al alrededor del 32% de la letalidad del veneno completo, tomando el valor de toxicity score del veneno completo como el 100% de la actividad letal (Tabla 6), esto indica que probablemente existan interacciones entre los diferentes componentes del veneno que aumenten la potencia letal.

Tabla 7. Contribución de las fracciones a la actividad letal del veneno completo

	DL <sub>50</sub> (µg/g)	DL <sub>50</sub> (µg/ratón)	Porcentaje de representatividad (%)	Toxicity Score
<i>M.</i>	0.34		100	294.1
<i>diastema</i>				
F1	> 2.1	>40	11.7	< 5.5
F3	-		5.1	
F4	-		2.3	
F5	-		19.4	
F6	0.22	4.2	8.3	37.7
F7	-		30.9	
F8	~ 0.57	~ 10.3	4.6	~ 8
F9	0.28	5	9	32.1
F10	0.48	9.2	4.7	9.7

De acuerdo al toxicity score (Laustsen et al., 2015), se tomó como 100% de letalidad a la DL<sub>50</sub> de *M. diastema*. (%). Porcentaje de representatividad de cada fracción de FPLC tomando en cuenta el área bajo la curva a 214 nm.

## 9.8 Actividad enzimática

La caracterización de la actividad enzimática utilizando como sustrato yema de huevo nos brinda una observación más cercana a lo que pasaría en un modelo *in vivo* ya que el sustrato posee una alta abundancia de glicerofosfolípidos, fosfolípidos que se encuentran en abundancia en las membranas celulares (Mathews *et al.*, 2002; Abousalham & Verger, 2000). Por otro lado, ya se ha observado que las fosfolipasas de venenos de coralillos poseen cierta selectividad hacia el tipo de sustrato empleado en su caracterización, como en el caso del sustrato 4-NOBA, que al poseer una estructura más simple se ve afectada por esterases en general y no solo por fosfolipasas. Para fines comparativos este método es eficiente, pero si se quiere tener una aproximación mejor a su función biológica, el uso de yema de huevo es una mejor opción (Yañez-Mendoza, 2019).

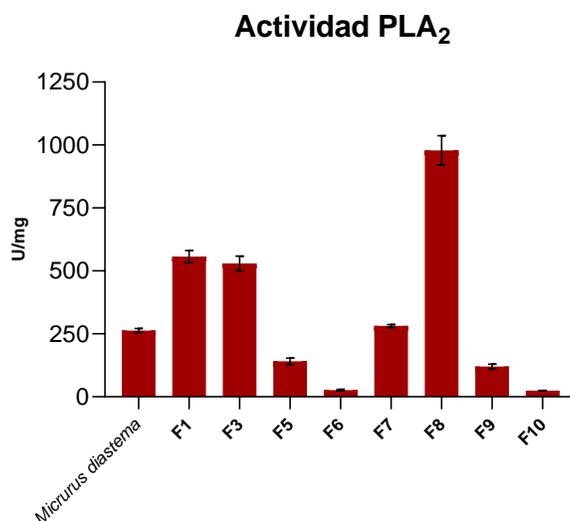
Se realizó la determinación de la actividad enzimática de la mezcla *M. diastema* y sus fracciones. Todas las fracciones presentaron actividad PLA<sub>2</sub> cuantificable con excepción de F4 probando un máximo de 10 µg.

Ajustando la actividad individual de las fracciones con su porcentaje de representatividad (de acuerdo con el área bajo la curva del perfil cromatográfico de intercambio catiónico a 214 nm), la actividad individual de las fracciones explica el 100% de la actividad enzimática total. Lo anterior sugiere que las PLA<sub>2</sub> del veneno no sufrieron pérdida de actividad durante el proceso de fraccionamiento y procesamiento posterior al intercambio (Tabla 8).

**Tabla 8. Unidades específicas de actividad PLA<sub>2</sub> y su contribución enzimática.**

	U/mg	Porcentaje de representatividad (%)	Contribución enzimática (%)
<i>M. diastema</i>	263 ± 10	100	
F1	556 ± 41	11.7	24.7
F3	529 ± 50.7	5	10.2
F4	ND	2.3	0
F5	141 ± 21.9	19.4	10.4
F6	26.5 ± 5.9	8.3	0.8
F7	281 ± 10	30.9	33
F8	978 ± 100	4.6	17.1
F9	120 ± 16.9	9	4.1
F10	24.8 ± 2	4.7	0.4

Se identificó que, con respecto a la actividad enzimática media de todas las muestras analizadas y la actividad total del veneno, las fracciones F1, F3 y F8 muestran actividad significativamente mayor (one way ANOVA  $\alpha=0.05$ ;  $p<0.05$ ), mientras que el resto de las fracciones no presentan actividades enzimáticas relevantes. Con excepción de F7 que muestra una actividad enzimática igual a la que exhibe el veneno completo (Figura 26).



**Figura 26. Gráfica de las unidades específicas de actividad fosfolipasa.**

Lo anterior comprueba la presencia de PLA<sub>2</sub> enzimáticamente activas que representan el 52.2 % del veneno total (Tabla 8). Tomando en cuenta su porcentaje de representatividad, la contribución de la actividad enzimática de las fracciones F1, F3, F7 y F8 al veneno completo, en conjunto es del 85 %. Se ha sugerido que PLA<sub>2</sub> con actividad enzimática influyen en la lisis de tejido muscular (Lomonte et al., 2009; Van der Laat et al., 2013). Por lo que las fosfolipasas responsables de esta actividad podrían estar jugando un papel pre digestivo de las presas.

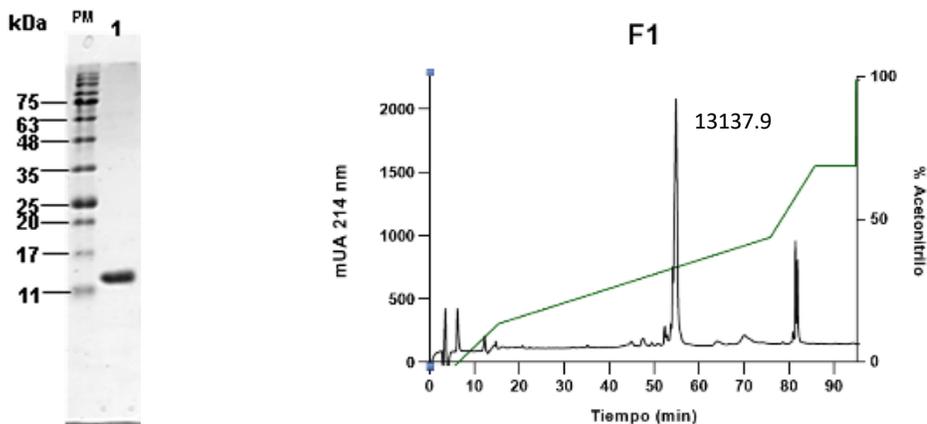
## **9.9 Análisis de fracciones con actividad letal**

### **9.9.1 Fracción 1**

Esta fracción no resultó ser de importancia en la actividad letal del veneno (Tabla 6), a pesar de ser la tercera fracción más abundante (11 %). En su perfil electroforético y cromatográfico podemos observar que muestra al menos un componente mayoritariamente abundante, para el cual se reportó una masa de 13,137.9 Da. En la determinación de actividad PLA<sub>2</sub> la fracción mostró alta actividad (556 U/mg) siendo la segunda fracción con mayor actividad enzimática.

Se realizó una comparación de la secuencia parcial de amino terminal para lograr una identificación parcial de la toxina encontrada mediante BLAST, el cuál arrojó una identificación por similitud del 95 % con la PLA<sub>2</sub> miotóxica descrita en el veneno de *Micrurus dumerilli* (MdumPLA<sub>2</sub>) (Rey-Suárez et al., 2017). Esta PLA<sub>2</sub> también se reporta enzimáticamente activa y con actividad letal muy baja (>50 µg/ratón). Este reporte coincide con las identificaciones obtenidas en el análisis proteómico (anexos).

La falta de actividad letal/neurotóxica en MdumPLA<sub>2</sub>, explicaría la ineficacia en los intentos de caracterizar la actividad de la fracción en la preparación neuromuscular aun probando concentraciones de 24 µg/ml en el baño de tejido (datos no mostrados), por lo que la actividad de esta PLA<sub>2</sub> está más enfocada en la predigestión de las presas.



**Figura 27. Fracción 1**

Perfiles electroforéticos en condiciones reductoras, cromatográfico (RP-HPLC) y masa reportada (ESI-MS) de la fracción 1 obtenida de intercambio catiónico

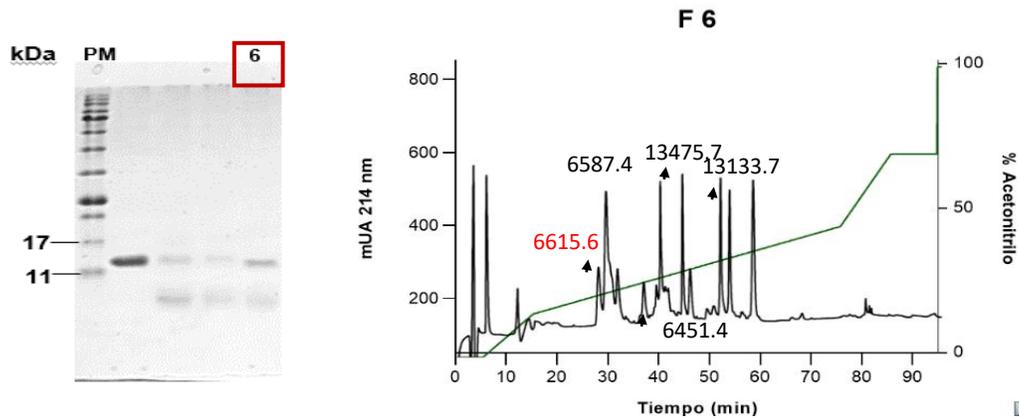
### 9.9.2 Fracción 6

Esta fracción presenta la mayor potencia letal de todas con una  $DL_{50} = 4.18 \mu\text{g}/\text{ratón}$  ( $0.22 \mu\text{g}/\text{g}$ ), ocasionando en el envenenamiento a ratones una notable parálisis flácida. No representa un alto porcentaje dentro del veneno (8.3 %). Sin embargo, de acuerdo con su toxicity score (Tabla 6) es la fracción que desempeña el papel más relevante dentro de la actividad letal del veneno.

La fracción se encuentra compuesta por 8 sub-fracciones principales, entre las cuales se identificó a la  $\alpha$ -neurotoxina de cadena corta D.H., la cual ya se había descrito como neurotoxina presente en el veneno de *Micrurus diastema* (Guerrero-Garzón et al., 2018), así como en el veneno de *Micrurus tener* y *Micrurus browni* (Bénard-Valle et al., 2014, 2020). La identificación se basó de acuerdo con lo observado en su perfil electroforético, perfil cromatográfico, masa reportada de 6615.6 Da, secuencia parcial obtenida de amino terminal y su comparación con las secuencias obtenidas en la identificación proteómica (datos en preparación).

De acuerdo con el resto de las masas reportadas, dos 3FTx más y al menos dos PLA<sub>2</sub>, no presentan actividad enzimática relevante dentro de la fracción (26.5

U/mg). Sin embargo, no se puede descartar la influencia de éstas en la actividad letal de la fracción



**Figura 28. Fracción 6**

Perfiles electroforéticos en condiciones reductoras, cromatográfico (RP-HPLC) y masas reportadas (ESI-MS) de la fracción 6 obtenida de intercambio catiónico. En rojo se marca la  $\alpha$ -neurotoxina de cadena corta D.H.

Para la caracterización de la actividad neurotóxica de la fracción se ocupó como control a la toxina recombinante r.D.H. expresada a partir de los transcritos obtenidos de glándulas de veneno de un individuo de *Micrurus diastema*, para poder observar la actividad de una  $\alpha$ -neurotoxina pura (Guerrero-Garzón et al., 2018). Como se observa en la Figura 28, la r.D.H (1  $\mu$ g/ml) comienza a generar una inhibición de la contracción muscular en los primeros 3 minutos después de la adición de la toxina al baño de tejido. La contracción muscular no se recuperó después de los lavados con solución Tyrode, por lo que se puede concluir que la toxina posee una fuerte afinidad por los canales nicotínicos de acetil colina presentes en la placa neuromuscular. Esta afinidad ya había sido reportada en la misma toxina encontrada en el veneno de *Micrurus browni* (Bénard-Valle et al., 2020), donde la r.D.H obtuvo un valor  $T_{90}$ = 22.5 minutos.

Para la evaluación de F6 (1  $\mu$ g/ml) se obtuvo un valor  $T_{90}$ = 52.5 minutos, generando una inhibición del 100 % de la contracción muscular (Figura 25). Posteriormente se aumentó la cantidad evaluada de F6 a  $2DL_{50}$  (4.1  $\mu$ g/ml) tomando en cuenta la concentración (mg/ml) de toxina que habría en el volumen sanguíneo de un ratón de 20 gramos de peso (2 ml de sangre) al ser inyectada por vía intravenosa. Esto con el fin de comparar la actividad observada por r.D.H.,

obteniendo así una  $T_{90}$  = 23 minutos. La falta de recuperación posterior a los lavados coincide con la actividad generada por la r.D.H.

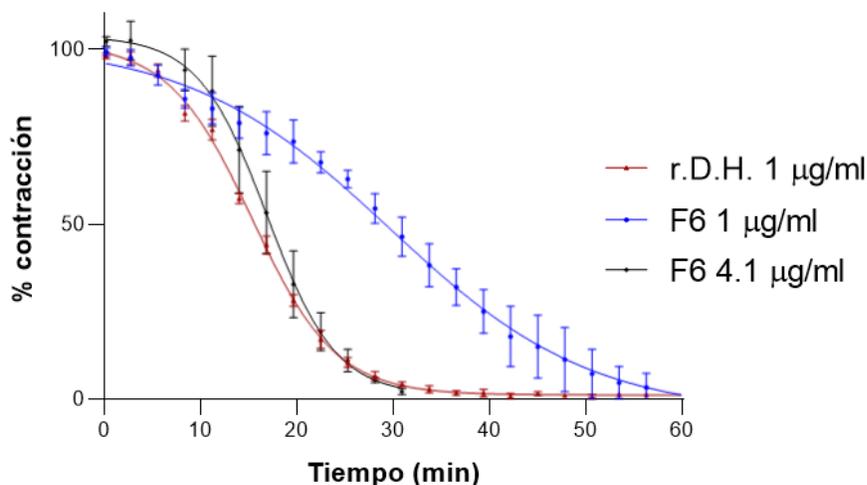


Figura 29. Gráfica del porcentaje de inhibición de la contracción muscular por actividad de r.D.H. y F6 a diferentes concentraciones.

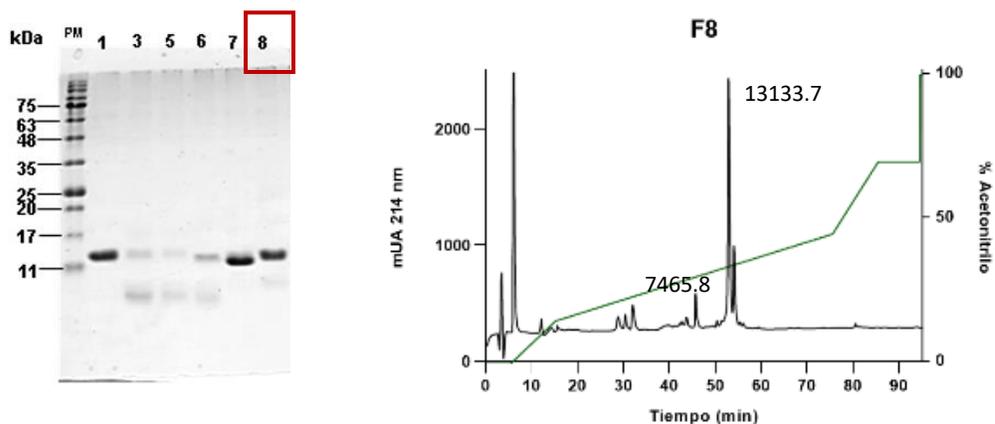
En el estudio del veneno de *Micrurus browni* se observó que D.H. solo tiene actividad en ratones y no presenta actividad en serpientes, las cuales forman parte de su dieta natural (Roze, 1996). Otras  $\alpha$ -neurotoxinas como  $\alpha$ -cobrotoxina y  $\alpha$ -bungarotoxina han presentado baja toxicidad en modelos de presas naturales (Burden et al., 1975; Liu & Xu (Ke Hsu), 1990) por lo que haría falta evaluar la actividad letal de D.H. encontrada en este trabajo, en algún modelo de presa natural para corroborar si se comporta de la misma manera.

### 9.9.3 Fracción 8

La fracción 8 mostró ser letal. Sin embargo, no se logró realizar la determinación de letalidad (0.36 – 0.78 µg/g o 6.8- 14.8 µg/ratón), y según su toxicity score (Tabla 6) esta fracción no contribuye de manera considerable a la actividad letal del veneno. De acuerdo con sus perfiles electroforético y cromatográfico, alta actividad enzimática (978 U/mg), y las masas reportadas (7465.8 Da y 13133.7 Da) (Figura 30), sus actividades son consecuencia de una PLA<sub>2</sub>, aunque su función podría ser principalmente pre digestiva ya que su actividad PLA<sub>2</sub> es la más

alta reportada para todas las fracciones, a pesar de representar únicamente el 4.6% del veneno (área bajo la curva) su actividad enzimática contribuye en un 17 % a la actividad total del veneno. Sin embargo, podemos observar otros componentes en la fracción, por lo que no se podría descartar su participación en la actividad.

Por falta de disponibilidad no fue posible realizar su caracterización en el ensayo de unión neuromuscular.

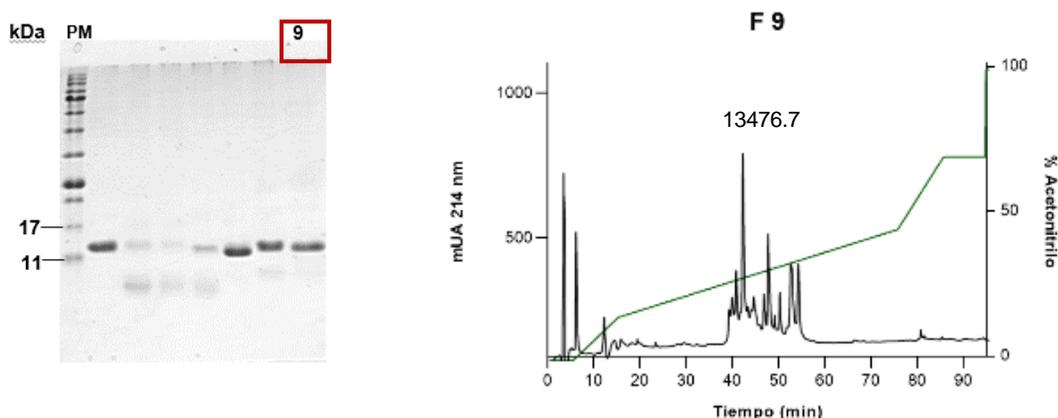


**Figura 30. Fracción 8**

Perfiles electroforéticos en condiciones reductoras, cromatográfico (RP-HPLC) y masas reportadas (ESI-MS) de la fracción 8 obtenida de intercambio catiónico.

### 9.9.4 Fracción 9

De acuerdo con el toxicity score, esta fracción presenta la segunda actividad letal más relevante dentro del veneno  $DL_{50} = 0.28 \mu\text{g/g}$  ( $5.32 \mu\text{g/ratón}$ ), a pesar de representar únicamente el 9 % del veneno (porcentaje de área bajo la curva). La F9 presenta un perfil electroforético con una banda por debajo del marcador de 17 kDa y una masa reportada de 13476.7 Da. Sin embargo, en su perfil cromatográfico se puede observar que es una fracción compleja en composición (Figura 30).



**Figura 31. Fracción 9**

Perfiles electroforéticos en condiciones reductoras, cromatográfico (RP-HPLC) y masa reportada de la sub-fracción más abundante de la fracción 9 obtenida de intercambio catiónico.

La caracterización en el ensayo de unión neuromuscular se realizó probando una concentración equivalente a  $2DL_{50}$  de F9 ( $5.3 \mu\text{g/ml}$ ), tomando en cuenta la concentración (mg/ml) de toxina que habría en el volumen sanguíneo de un ratón de 20 gramos de peso (2 ml de sangre) al ser inyectada por vía intravenosa. Se logró una inhibición del 100% de la contracción muscular obteniendo un  $T_{90} = 40$  minutos. Posterior a los lavados con solución Tyrode, no se logró la recuperación de la contracción por lo que se atribuye la actividad letal de la fracción a una o varias fosfolipasas  $A_2$  con actividad  $\beta$ -neurotóxica.

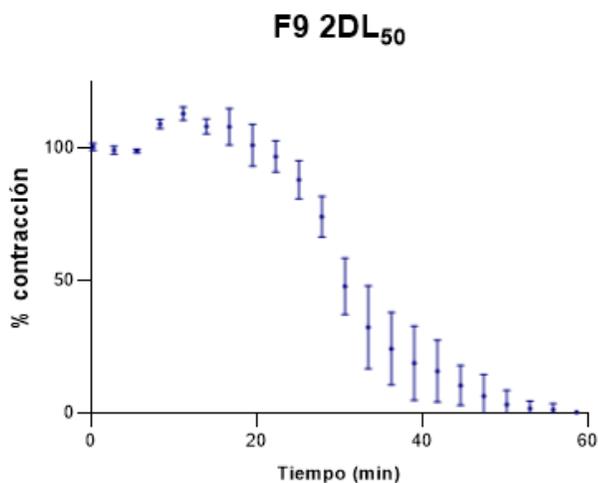


Figura 32. Gráfica del porcentaje de inhibición de la contracción muscular por actividad de F9.

### 9.9.5 Fracción 10

Esta fracción representa únicamente el 4.7 % del veneno (porcentaje de área bajo la curva) y no posee alta actividad letal de acuerdo con el toxicity score (Tabla 7) ( $DL_{50} = 0.48 \mu\text{g/g} / 9.12 \mu\text{g/ratón}$ ). El perfil electroforético presenta una banda por debajo del marcador de 17 kDa y se reportan masas de 6813.7 Da. Y 13476.7 Da., que podrían corresponder a una 3FTx y una PLA<sub>2</sub>, esta última no presenta una actividad enzimática relevante (25 U/mg).

Se obtuvo una secuencia parcial, la cual mediante Blast arrojó una identidad del 85% con un transcrito de  $\alpha$ -neurotoxina descrita en el trabajo de Guerrero-Garzón 2018 y a un péptido con afinidad a AchR encontrado en el veneno de *Micrurus nigrocinctus*.

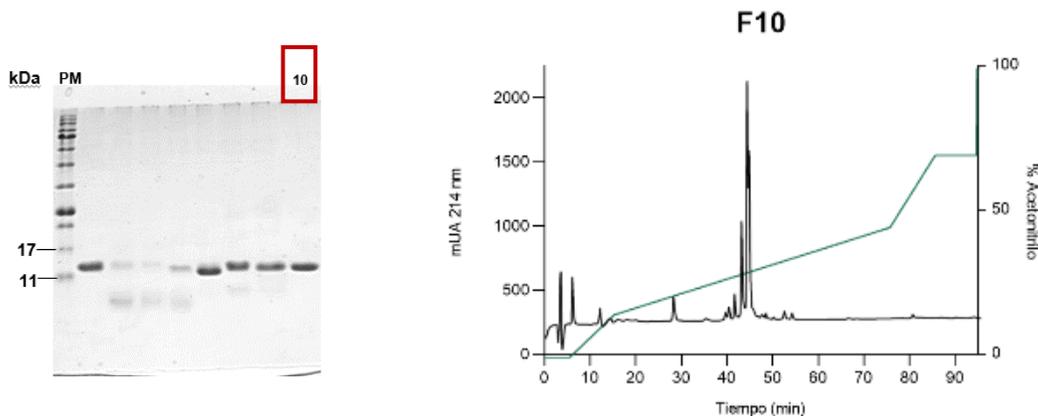


Figura 33. Fracción 10

Perfiles electroforéticos, cromatográfico (RP-HPLC) y masas reportadas de la fracción 10 obtenida de intercambio catiónico. 200  $\mu\text{g}$  por fracción. RP-HPLC.

La caracterización de la actividad neurotóxica se realizó con una concentración equivalente a  $2DL_{50}$  (9.1  $\mu\text{g/ml}$ ) tomando en cuenta la concentración (mg/ml) de toxina que habría en el volumen sanguíneo de un ratón de 20 gramos de peso (2 ml de sangre) al ser inyectada por vía intravenosa. Se logró una total inhibición de la contracción muscular reportando un  $T_{90} = 28$  minutos, posterior a los lavados con solución Tyrode no se logró la recuperación de la contracción muscular.

Queda inconcluso cual es el componente responsable de esta actividad neurotóxica o si es producto de una actividad conjunta entre una 3FTx y una PLA<sub>2</sub>.

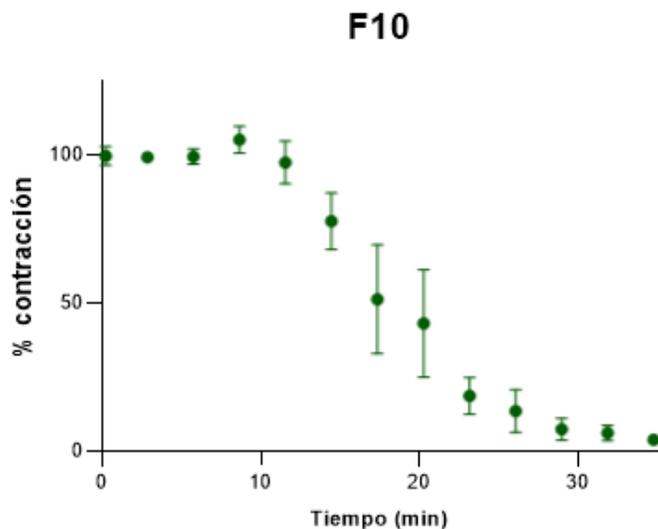


Figura 34. Gráfica del porcentaje de inhibición de la contracción muscular por actividad de F10.

Tabla 9. Tabla de resumen de actividades de las fracciones obtenidas por intercambio catiónico

	% en el veneno	PLA <sub>2</sub> U/mg ± DE	PM (ESI-MS) Da	DL <sub>50</sub> µg/g	Toxicity score	T <sub>90</sub> minutos
<b><i>M. diastema</i></b>	<b>100</b>	263 ± 10		0.34	294.1	
F1	11.7	556 ± 41	13,137.9	> 2.1	~ 5.5	ND
F3	5	529 ± 50.7	ND	-	-	-
F4	2.3	ND	ND	-	-	-
F5	19.4	141 ± 21.9	6773.8	-	-	-
F6	8.3	26.5 ± 5.9	6615.6	0.22	37.7	23
F7	30.9	281 ± 10	15631	-	-	-
F8	4.6	978 ± 100	7465.8/13133.7	0.36 – 0.78	~ 8	ND
F9	9	120 ± 16.9	13476.7	0.28	32.1	33
F10	4.7	24.8 ± 2	6813.7/13476.7	0.48	9.7	28

T<sub>90</sub> reportada con concentraciones equivalentes a 2 DL<sub>50</sub>.

## **10. *Micrurus diastema* en Veracruz**

De los individuos de todas las 5 localidades se analizaron sus perfiles electroforéticos y cromatográficos, y se realizaron determinaciones de sus dosis letales por localidad (con excepción de la mezcla Córdoba/Actopan por ser la mezcla empleada en el análisis proteómico).

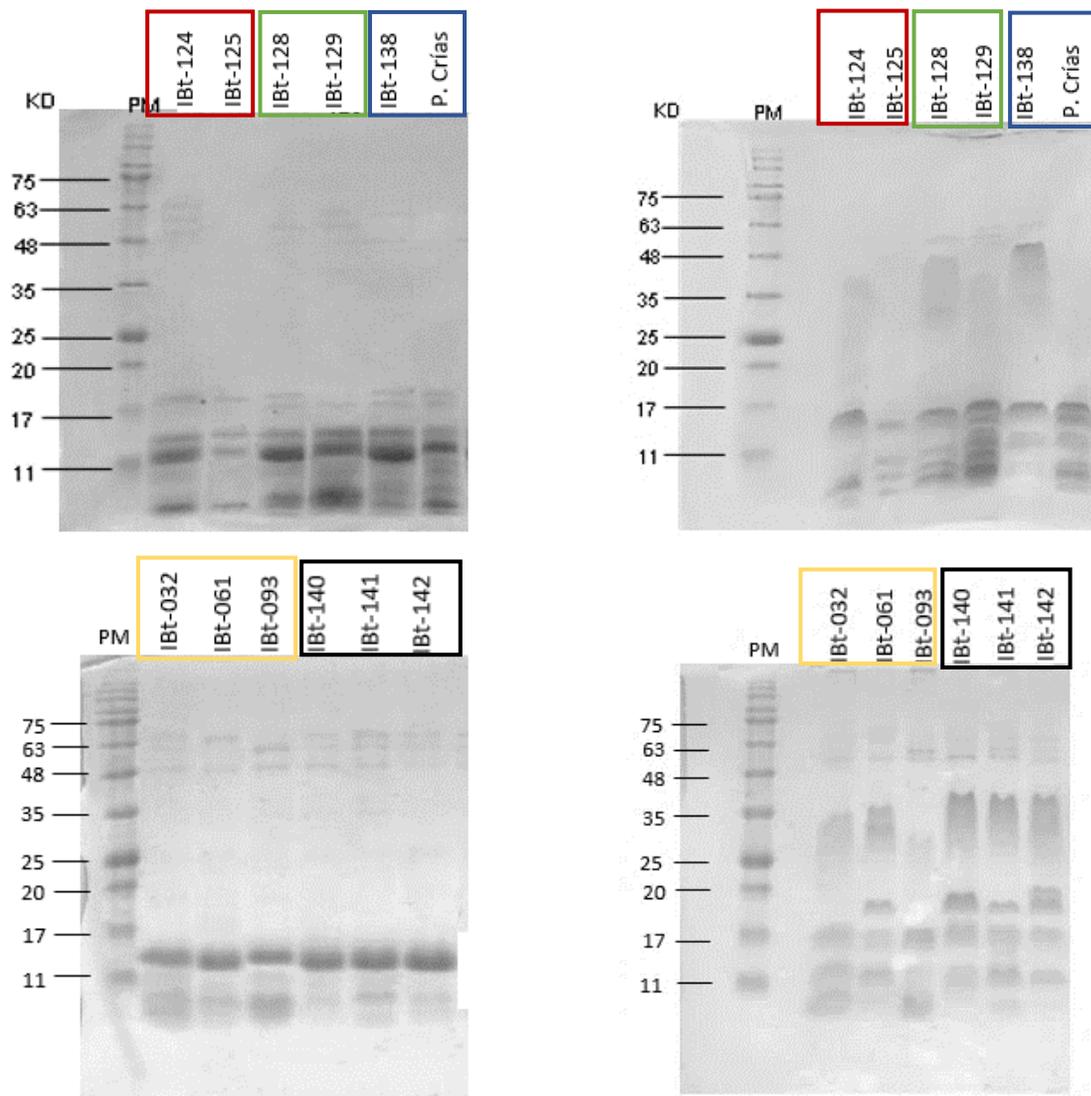
Tomando en cuenta el arreglo taxonómico que se propone en el trabajo de Reyes-Velazco, el presente trabajo se realizó con individuos que representa gran parte de la distribución actual de *M. diastema*.

### **10.1 Perfiles electroforéticos de individuos *Micrurus diastema* de Veracruz**

Los perfiles electroforéticos en condiciones reductoras de todos los individuos muestran presencia de bandas entre los marcadores de 63 y 48 kDa (Figura 33), estos pesos moleculares corresponden a metaloproteasas y L-aminooxidasas, las cuales representa el 3.6% y 2.3 % respectivamente (sección 9.1). Esto ya se ha observado en el veneno de otras serpientes de coral (Aird et al., 2017; Bénard-Valle et al., 2020; Lomonte, Rey-Suárez, et al., 2016).

Las bandas más abundantes en todos los perfiles aparecen cerca de los marcadores de 17 kDa y 11kDa, lo que corresponde a las familias de PLA<sub>2</sub> y 3FTx respectivamente. Sin embargo, se pueden observar diferencias en la abundancia de estas bandas

Por otro lado, en los perfiles electroforéticos en condiciones no reductoras se observan bandas que migran en marcadores con pesos moleculares por arriba de 17 kDa y por debajo de 48 kDa, esto debido a que tanto las 3Ftx como PLA<sub>2</sub> poseen puentes disulfuro que no son reducidos en estas condiciones electroforéticas, por lo que su estructura terciaria, así como la interacción con el SDS modifica considerablemente la migración de las proteínas (Rath et al., 2009).

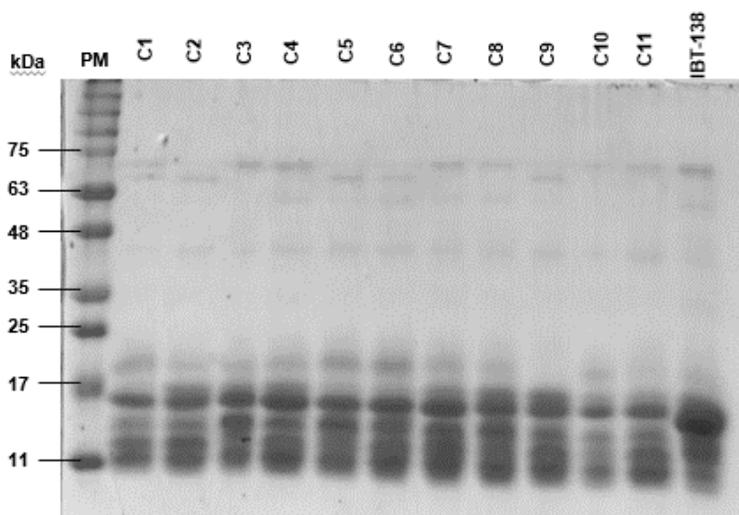


**Figura 35. Perfiles electroforéticos de *M. diastema* provenientes de diferentes localidades de Veracruz.**

Geles en condiciones reductoras (izquierda) y no reductoras (derecha) de los individuos de las localidades de Tuxpan (rojo), Zongolica (verde), Los Tuxtlas (azul), Córdoba (amarillo) y Actopan (negro) del estado de Veracruz. Se cargaron 20  $\mu$ g de cada muestra.

En la Figura 34 se muestra el perfil electroforético en condiciones reductoras de las 11 crías provenientes de Los Tuxtlas, así como el perfil del veneno de la madre (IBt-138). De la misma manera que en los perfiles de los individuos de las demás localidades, aquí también se pueden observar bandas cerca de los marcadores de 63 y 48 kDa. Observando la mayor abundancia de bandas presentes por debajo de los 11 kDa y hasta los 17 kDa. Los perfiles electroforéticos de las crías no

parecen mostrar diferencias evidentes en su composición. Sin embargo, en el caso del individuo IBt-138 se observa una banda bastante abundante justo por debajo del marcador de 17 kDa.

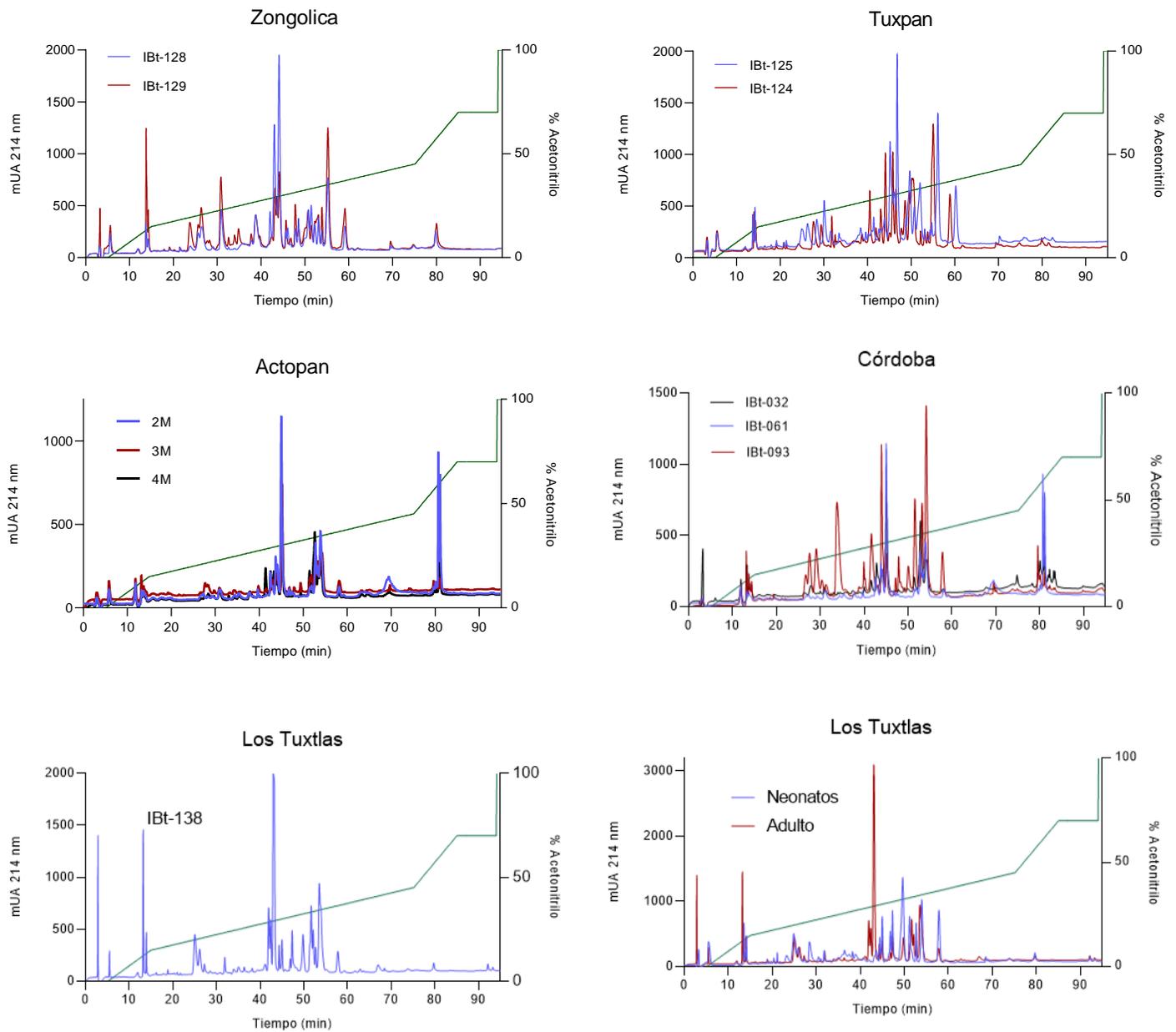


**Figura 36. Gel en condiciones reductoras del individuo IBt-138 y los 11 neonatos (Los Tuxtlas).**

Por la cantidad de veneno en las ordeñas solo se pudo realizar el análisis en condiciones reductoras. Se corrieron 20 µg de cada muestra.

## 10.2 Perfiles cromatográficos de *Micrurus diastema* en Veracruz

En la Figura 35 se observan los perfiles cromatográficos de los individuos por localidad (perfiles sobrepuestos). Las fracciones observadas en los perfiles van desde las 20 fracciones hasta las 31 fracciones. Los perfiles de los individuos adultos muestran el menor número de fracciones (entre 20 y 24 fracciones), siendo los perfiles de la mezcla de neonatos (Los Tuxtlas) y de los juveniles (Tuxpan) aquellos con más número de fracciones (30 y 31). Aunque los perfiles de los individuos de Zongolica catalogados como adultos (por talla) muestran también un alto número de fracciones (26 y 29). Ningún individuo mostró en sus perfiles el número de fracciones reportadas para la mezcla Córdoba/Actopan utilizada en el análisis proteómico (38 fracciones), esto podría deberse a la cantidad analizada que fue mayor para el proteoma, por lo que algunas fracciones no serían lo suficientemente abundantes para ser observadas.



**Figura 37. Perfiles cromatográficos de los individuos de las 5 localidades**

Con excepción de la muestra de los neonatos, que en este caso se muestra el análisis de la mezcla de los 11 individuos (anexos). Se analizaron 200 µg por muestra.

### 10.3 Dosis letales de mezclas por localidad

Para realizar las determinaciones de letalidad de las diferentes localidades y con el fin de poder comparar estos resultados con los obtenidos de la mezcla empleada en el proteoma, se realizaron mezclas de las localidades de Tuxpan y

Zongolica. Para el caso de las potencias letales de la localidad de los Tuxtlas se evaluó la potencia letal del individuo IBt-138 (único disponible) y de la mezcla de los 11 neonatos provenientes de este individuo.

**Tabla 10. Dosis letales de las mezclas de veneno provenientes de diferentes localidades de Veracruz**

<b>Localidad</b>	<b>DL<sub>50</sub> (µg/ratón)</b>	<b>DL<sub>50</sub> (µg/g)</b>
Mezcla Córdoba/Actopan (proteoma)	6.5	0.34
Mezcla Zongolica	4.2	0.22
Mezcla Tuxpan	4.2	0.22
Los Tuxtlas / IBt-38 (adulto)	6	0.31
Mezcla de neonatos los Tuxtlas	2.8	0.14

### **10.3 Variaciones en la letalidad y composición del veneno de *M. diastema***

De acuerdo con la identificación de las familias proteicas en el análisis proteómico, el veneno de *Micrurus diastema* presenta la mayor proporción de integrantes de la familia de las 3FTx en las primeras fracciones de sus perfiles cromatográficos por RP-HPLC (entre el 20% a 30 % de acetonitrilo). Posterior a esto, la mayoría de las PLA<sub>2</sub> (entre 30% a 40% de acetonitrilo), integrantes de estas dos familias proteicas se identificaron como componentes neurotóxicos fundamentales en la actividad letal del veneno de *Micrurus diastema*. Basándose en lo anterior y tomando en cuenta los porcentajes de área bajo la curva (A<sub>214</sub>) de los perfiles cromatográficos individuales, los venenos muestran diferencias en las abundancias relativas de las dos secciones identificadas como ricas en PLA<sub>2</sub> y 3FTx (Tabla 10).

Las diferencias observadas en la actividad letal parecen estar ligadas a la etapa de desarrollo de los individuos y a la composición diferencial que presumiblemente presentan. Aquellos venenos con las potencias letales más bajas, mezcla proteoma e individuo IBT-138 (DL<sub>50</sub>= 6.5 y 6 µg/ratón respectivamente), presentan altos porcentajes de PLA<sub>2</sub> y menores de 3FTx, en comparación con la mezcla de neonatos, la cual presentó el mayor porcentaje de 3FTx y el menor porcentaje de PLA<sub>2</sub>, exhibiendo la mayor potencia letal reportada hasta la fecha para serpientes de coral mexicanas, con una DL<sub>50</sub>= 2.8 ug/ratón (Bénard-Valle et al., 2014, 2020;

Carbajal-Saucedo et al., 2013; Neri-castro et al., 2021). De acuerdo con lo reportado, la toxina D.H. aporta la mayor influencia sobre la actividad letal del veneno y es la única toxina de esta familia identificada como activa dentro del veneno de *Micrurus diastema*, por lo que sus porcentajes de abundancia dentro de los venenos podría estar influenciando fuertemente estas diferencias observadas en letalidad.

**Tabla 11. Porcentajes de abundancia de PLA<sub>2</sub> y 3FTx y potencias letales**

Individuo	Localidad	Etapas de desarrollo	% de abundancia 3FTx	% de abundancia PLA <sub>2</sub>	DL <sub>50</sub> (µg/ratón)
IBt-124	Tuxpan	Juvenil	17	72	4.2
IBt-125	Tuxpan	Juvenil	20	76	
IBt-128	Zongolica	Adulto	25	69	4.2
IBt-129	Zongolica	Adulto	29	60	
IBt-140	Actopan	Adulto	11	63	6.5
IBt-141	Actopan	Adulto	13	62	
IBt-142	Actopan	Adulto	15	66	
IBt-032	Córdoba	Adulto	26	65	
IBt-061	Córdoba	Adulto	22	68	
IBt-093	Córdoba	Adulto	38	58	
IBt-138	Los Tuxtlas	Adulto	17	79	6
Mezcla Neonatos	Los Tuxtlas	Neonatos	45	47	2.8

Porcentajes de abundancia relativa estimados mediante el área bajo la curva A<sub>214</sub> nm.

Las potencias letales reportadas para las localidades de Tuxpan y Zongolica fueron iguales con una DL<sub>50</sub>=4.2 µg /ratón para ambas. En comparación con el resto, su letalidad se encuentra en un punto medio, lo cual podría atribuirse a que todos los individuos se encontraban en una etapa juvenil. Particularmente los individuos de Zongolica a pesar de su talla aun no habrían alcanzado la fase adulta.

La variaciones intraespecíficas en venenos de serpientes han sido reportadas y descritas en veneno de diferentes especies de Vipéridos mexicanos (Borja et al., 2018; Castro et al., 2013; Durban et al., 2013). Se desconoce cuál es el factor ecológico y/o evolutivo que provoca estos cambios en composición. Sin embargo,

parecen estar asociados con la dieta, edad y/o distribución (Chippaux, 1991). El veneno de *Micrurus diastema* presenta variación ontogenética en la actividad letal del veneno, la cual parece estar asociada a la abundancia diferencial de miembros de las familias proteicas de 3FTx y PLA<sub>2</sub>. Se ha observado que la variación ontogenética de componentes específicos (como PLA<sub>2</sub>), se da de manera gradual, esto significa que los cambios en la expresión de las proteínas presentes en los venenos se dan a lo largo del crecimiento del individuo (Schonour et al., 2020). Esta variación ontogenética no había sido reportada hasta la fecha en venenos de serpientes de coral mexicanas.

La variación en los venenos podría estar mediada por diferentes mecanismos moleculares, como la presencia de polimorfismos genéticos en donde la presencia o ausencia de genes en ciertos linajes determine la composición del veneno (Dagda et al., 2013). Asimismo, podría relacionarse a la intervención de procesos de modulación en la expresión de las diferentes proteínas, como accesibilidad a la cromatina y niveles de metilación (Margres et al., 2021).

## 11. Conclusiones

El análisis proteómico mostró que el veneno de *Micrurus diastema* es similar en cuanto a composición de familias proteicas reportadas en venenos de otras serpientes de coral, destacando la mayor abundancia de PLA<sub>2</sub>, seguidas de 3FTx. Se realizó una caracterización completa y detallada de las actividades bioquímicas y biológicas del veneno de *Micrurus diastema* y de las fracciones obtenidas mediante intercambio catiónico.

*Micrurus diastema* posee un veneno con gran potencia letal, asociada a la actividad neurotóxica, tanto a nivel presináptico como postsináptico; sin embargo, no se logra recuperar el 100% de la potencia letal del veneno completo, sugiriendo que existen interacciones no identificadas que potencian la letalidad del veneno completo.

La  $\alpha$  neurotoxina D.H (F6) muestra una afinidad muy alta a los receptores nicotínicos de acetil colina, generando bloqueo postsináptico irreversible en los ensayos de unión neuromuscular. Esta toxina es la más relevante en cuanto a la actividad letal. También se identificó una PLA<sub>2</sub> la cual es la segunda con mayor relevancia en la contribución de la actividad letal.

Se identificaron cuatro PLA<sub>2</sub> enzimáticamente activas que pudieran estar desempeñando un papel en la predigestión de las presas, ofreciendo un panorama más amplio sobre la función del veneno en la serpiente.

Finalmente se reportó por primera vez la presencia de variación intraespecífica ligada a la edad en el veneno de una serpiente de coral mexicana, en donde los individuos más jóvenes mostraron los venenos con las potencias letales más altas con respecto a los individuos adultos.

## 12. **Perspectivas**

Realizar una caracterización más detallada de las fracciones que no pudieron ser evaluadas a profundidad.

Evaluar la existencia de posibles interacciones entre componentes del veneno que pudieran potenciar su actividad letal.

Tener una muestra más robusta de las diferentes localidades.

Analizar el veneno con un enfoque de función sobre presas naturales.

Realizar análisis proteómico por lo menos del veneno de los neonatos.

### 13. Referencias

- Abousalham, A., & Verger, R. (2000). Egg yolk lipoproteins as substrates for lipases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1485(1), 56–62. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00033-0](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00033-0)
- Aird, S. D. (2002). Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon*, 40(4), 335–393. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00232-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00232-X)
- Aird, S. D., da Silva, N. J., Qiu, L., Villar-Briones, A., Saddi, V. A., Telles, M. P. de C., Grau, M. L., & Mikheyev, A. S. (2017). Coralsnake venomomics: Analyses of venom gland transcriptomes and proteomes of six Brazilian taxa. *Toxins*, 9(6), 1–64. <https://doi.org/10.3390/toxins9060187>
- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., & Calvete, J. J. (2008). Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*. Geographic, individual, and ontogenetic variations. *Journal of Proteome Research*, 7(8), 3556–3571. <https://doi.org/10.1021/pr800332p>
- Barlow, A., Pook, C. E., Harrison, R. A., & Wüster, W. (2009). Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1666), 2443–2449. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0048>
- 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>
- Bénard-Valle, M., Neri-Castro, E., Yañez-Mendoza, M. F., Lomonte, B., Olvera, A., Zamudio, F., Restano-Cassulini, R., Possani, L. D., Jiménez-Ferrer, E., & Alagón, A. (2020). Functional, proteomic and transcriptomic characterization of the venom from *Micrurus browni browni*: Identification of the first lethal multimeric neurotoxin in coral snake venom. *Journal of Proteomics*, 225, 103863. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103863>
- Bohlen, C. J., Chesler, A. T., Sharif-naeini, R., Medzihradzsky, K. F., Zhou, S., King, D., Burlingame, A. L., Basbaum, A. I., Julius, D., & Sa, E. E. (2011). *acid-sensing ion channels to produce pain. V*. <https://doi.org/10.1038/nature10607>
- Bohlen, C. J., & Julius, D. (2012). Receptor-targeting mechanisms of pain-causing toxins: How ow? *Toxicon*, 60(3), 254–264. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.336>
- Borja, M., Neri-castro, E., Rebeca, P., Strickland, J. L., Ponce-I, R., Parkinson, C. L., Espinosa-fematt, J., Jorge, S., Flores-mart, E., & Alag, A. (2018). *Tailed Rattlesnakes ( Crotalus molossus nigrescens )*. <https://doi.org/10.3390/toxins10120501>
- Brodie, E. D. (2009). Toxins and venoms. *Current Biology*, 19(20), R931–R935. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.011>
- Bucarechi, F., Hyslop, S., Vieira, R. J., Toledo, A. S., Madureira, P. R., & De Capitani, E. M. (2006). Bites by coral snakes (*Micrurus* spp.) in Campinas,

State of São Paulo, southeastern Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 48(3), 141–145. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000300005>

- BULBRING, E. (1946). Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 1, 38–61. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1946.tb00025.x>
- Burden, S. J., Hartzell, H. C., & Yoshikami, D. (1975). Acetylcholine receptors at neuromuscular synapses: phylogenetic difference detected by snake  $\alpha$  neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(8), 3245–3249. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.8.3245>
- Caccin, P., Rigoni, M., Bisceglie, A., Rossetto, O., & Montecucco, C. (2006). Reversible skeletal neuromuscular paralysis induced by different lysophospholipids. *FEBS Letters*, 580(27), 6317–6321. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.039>
- Calvete, J. J. (2013). Snake venomomics: From the inventory of toxins to biology. *Toxicon*, 75, 44–62. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.03.020>
- Calvete, J. J. (2014). Next-generation snake venomomics: Protein-locus resolution through venom proteome decomplexation. *Expert Review of Proteomics*, 11(3), 315–329. <https://doi.org/10.1586/14789450.2014.900447>
- Calvete, J. J., Sanz, L., Cid, P., De La Torre, P., Flores-Díaz, M., Dos Santos, M. C., Borges, A., Bremo, A., Angulo, Y., Lomonte, B., Alape-Girón, A., & Gutiérrez, J. M. (2010). Snake venomomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *Journal of Proteome Research*, 9(1), 528–544. <https://doi.org/10.1021/pr9008749>
- Campbell, J. A., Lamar, W. W., 2004. The venomous Reptiles of the Western Hemisphere, vol. 1. Cornell University Press, New York.
- Carbajal-Saucedo, A., Floriano, R. S., Dal Belo, C. A., Olvera-Rodríguez, A., Alagón, A., & Rodrigues-Simioni, L. (2013). Neuromuscular activity of *Micrurus laticollaris* (Squamata: Elapidae) venom in Vitro. *Toxins*, 6(1), 359–370. <https://doi.org/10.3390/toxins6010359>
- Carbajal, A. (2014). *Caracterización biológica, bioquímica e inmunoquímica del veneno de Micrurus laticollaris: baes para el desarrollo del antiveneno de amplio espectro contra coralillos*. 90.
- Casewell, N. R., Wüster, W., Vonk, F. J., Harrison, R. A., & Fry, B. G. (2013). Complex cocktails: The evolutionary novelty of venoms. *Trends in Ecology and Evolution*, 28(4), 219–229. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.10.020>
- Castoe, T. A., Smith, E. N., Brown, R. M., & Parkinson, C. L. (2007). Higher-level phylogeny of Asian and American coral snakes, their placement within the Elapidae (Squamata), and the systematic affinities of the enigmatic Asian coral snake *Hemibungarus calligaster* (Wiegmann, 1834). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 151(4), 809–831. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2007.00350.x>

- Castro, E. N., Lomonte, B., Gutiérrez, C., Alagón, A., & Gutiérrez, J. M. (2013). Intraspecies variation in the venom of the rattlesnake *Crotalus simus* from Mexico: Different expression of crotoxin results in highly variable toxicity in the venoms of three subspecies. *Journal of Proteomics*. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.024>
- Church, J. E., & Hodgson, W. C. (2002). The pharmacological activity of fish venoms. *Toxicon*, *40*(8), 1083–1093. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00126-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00126-5)
- CONABIO (comp.). 2021 catálogo de autoridades taxonómicas de los reptiles (Reptilia: Craniata) nativos de México. Base de datos SNIB-CONABIO. México.
- Cushman, D. W., & Ondetti, M. A. (1991). History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension*, *17*(4), 589–592. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.17.4.589>
- Dagda, R. K., Gasanov, S., Oiii, Y. D. La, Rael, E. D., & Lieb, C. S. (2013). *Genetic Basis for Variation of Metalloproteinase-Associated Biochemical Activity in Venom of the Mojave Rattlesnake ( Crotalus scutulatus scutulatus )*. 2013, 14–16.
- De Roodt, A. R., Lago, N. R., & Stock, R. P. (2012). Myotoxicity and nephrotoxicity by *Micrurus* venoms in experimental envenomation. *Toxicon*, *59*(2), 356–364. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.11.009>
- Diochot, S., Baron, A., Salinas, M., Douguet, D., Scarzello, S., Dabert-Gay, A. S., Debayle, D., Friend, V., Alloui, A., Lazdunski, M., & Lingueglia, E. (2012). Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature*, *490*(7421), 552–555. <https://doi.org/10.1038/nature11494>
- Durban, J., Pérez, A., Sanz, L., Gómez, A., Bonilla, F., Rodríguez, S., Chacón, D., Sasa, M., Angulo, Y., Gutiérrez, J. M., & Calvete, J. J. (2013). *Integrated “ omics ” profiling indicates that miRNAs are modulators of the ontogenetic venom composition shift in the Central American rattlesnake , Crotalus simus simus*. 1–17.
- 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). *Journal of Proteome Research*, *10*(4), 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., Calvete, J. J., & Lomonte, B. (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>
- Fry, B. G., Roelants, K., & Norman, J. A. (2009). Tentacles of venom: Toxic protein convergence in the kingdom Animalia. *Journal of Molecular Evolution*, *68*(4), 311–321. <https://doi.org/10.1007/s00239-009-9223-8>
- Fry, Bryan G., Casewell, N. R., Wüster, W., Vidal, N., Young, B., & Jackson, T. N. W. (2012). The structural and functional diversification of the Toxicofera reptile

venom system. *Toxicon*, 60(4), 434–448.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.013>

Glenn, J. L., & Straight, R. (1978). Mojave rattlesnake *Crotalus scutulatus* scutulatus venom: variation in toxicity with geographical origin. *Toxicon*, 16(1), 81–84. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(78\)90065-X](https://doi.org/10.1016/0041-0101(78)90065-X)

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>

Guo, P., Liu, Q., Xu, Y., Jiang, K., Hou, M., Ding, L., Alexander Pyron, R., & Burbrink, F. T. (2012). Out of Asia: Natricine snakes support the Cenozoic Beringian Dispersal Hypothesis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63(3), 825–833. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.02.021>

Gutiérrez, José María. (2002). Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Revista de Biología Tropical*, 50(2), 377-394. Retrieved January 27, 2024, from [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-77442002000200002&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442002000200002&lng=en&tlng=es).

Gutiérrez, J. M., Williams, D., Fan, H. W., & Warrell, D. A. (2010). Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*, 56(7), 1223–1235. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.020>

Harris, J. B., & Scott-Davey, T. (2013). Secreted phospholipases A2 of snake venoms: Effects on the peripheral neuromuscular system with comments on the role of phospholipases A2 in disorders of the CNS and their uses in industry. *Toxins*, 5(12), 2533–2571. <https://doi.org/10.3390/toxins5122533>

Harvey, A. L. (2014). Toxins and drug discovery. *Toxicon*, 92, 193–200.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.020>

Kelly, C. M. R., Barker, N. P., Villet, M. H., & Broadley, D. G. (2009). Cladistics Elapoidea : a rapid radiation in the late Eocene. *Molecular Ecology*, 25, 38–63.

King, G. F. (2011). *King2011*. 1469–1484.

Kini, R. M. (2002). Molecular moulds with multiple missions: Functional sites in three-finger toxins. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29(9), 815–822. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2002.03725.x>

Kini, R. M. (2003). Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon*, 42(8), 827–840.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.002>

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685 (1970).

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>

- Lawson, R., Slowinski, J. B., Crother, B. I., & Burbrink, F. T. (2005). Phylogeny of the Colubroidea (Serpentes): New evidence from mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *37*(2), 581–601. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.07.016>
- Leão, L. I., Ho, P. L., & Junqueira-de-Azevedo, I. de L. M. (2009). Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. *BMC Genomics*, *10*, 1–14. <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*(9), 1071–1076. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90145-W](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90145-W)
- Lomonte, B., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J. M., Rica, D. C., José, S., & Rica, C. (2009). <*The Phospholipase A2 Homologues of Snake Venoms - Lomonte 2009.pdf*>. 860–876.
- 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. (2016). 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. (2016). Venom of the coral snake *Micrurus clarki*: Proteomic profile, toxicity, immunological cross-neutralization, and characterization of a three-finger Toxin. *Toxins*, *8*(5). <https://doi.org/10.3390/toxins8050138>
- MacKinnon, R. (2003). Potassium channels. *FEBS Letters*, *555*(1), 62–65. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01104-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01104-9)
- 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. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *102*(11), 1127–1132. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.03.026>
- Margres, M. J., Aronow, K., Loyacano, J., & Rokyta, D. R. (2013a). *The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake ( Micrurus fulvius ) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms.*
- Margres, M. J., Aronow, K., Loyacano, J., & Rokyta, D. R. (2013b). The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. *BMC Genomics*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-531>
- Margres, M. J., Rautsaw, R. M., Strickland, J. L., Mason, A. J., Schramer, T. D., Bartlett, D. A., Colston, T. J., Gilbert, D. M., Rokyta, D. R., & Parkinson, C. L. (2021). *The Tiger Rattlesnake genome reveals a complex genotype underlying a simple venom phenotype.* 1–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.2014634118/-/DCSupplemental.y>

- Mebs, D. (2001). Toxicity in animals. Trends in evolution? *Toxicon*, 39(1), 87–96. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00155-0](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00155-0)
- Menezes, M. C., Furtado, M. F., Travaglia-Cardoso, S. R., Camargo, A. C. M., & Serrano, S. M. T. (2006). Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen Bothrops jararaca siblings. *Toxicon*, 47(3), 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.11.007>
- 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. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(18), 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). *Toxicon Frontoxins , three- finger toxins from Micrurus frontalis venom , decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction. 56.* <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.02.030>
- Neri-castro, E., Olvera-rodríguez, A., Strickland, J., Acosta, G., & Alag, A. (2021). *Biochimie Protein composition and biochemical characterization of venom from Sonoran Coral Snakes ( Micruroides euryxanthus ). 182.* <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.01.003>
- Nirathanan, S., & Gwee, M. C. E. (2004). Three-Finger  $\alpha$ -Neurotoxins and the Nicotinic Acetylcholine Receptor, Forty Years On. *Journal of Pharmacological Sciences*, 94(1), 1–17. <https://doi.org/10.1254/jphs.94.1>
- Olamendi-Portugal, T., Batista, C. V. F., Restano-Cassulini, R., Pando, V., Villa-Hernandez, O., Zavaleta-Martínez-Vargas, A., Salas-Arruz, M. C., De La Vega, R. C. R., 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(9), 1919–1932. <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. *Journal of Biological Chemistry*, 281(39), 29030–29041. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605850200>
- Peiren, N., Vanrobaeys, F., De Graaf, D. C., Devreese, B., Van Beeumen, J., & Jacobs, F. J. (2005). The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1752(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.07.017>
- Pope, J. E., & Deer, T. R. (2013). Ziconotide: A clinical update and pharmacologic review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 14(7), 957–966. <https://doi.org/10.1517/14656566.2013.784269>
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., & Deber, C. M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

*States of America*, 106(6), 1760–1765.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0813167106>

REVIEW ARTICLE SNAKE VENOM VARIABILITY : METHODS OF STUDY ,,  
(1991). 11, 1279–1303.

Rey-Suárez, P., Núñez, V., Saldarriaga-Córdoba, M., & Lomonte, B. (2017). Primary structures and partial toxicological characterization of two phospholipases A2 from *Micrurus mipartitus* and *Micrurus dumerilii* coral snake venoms. *Biochimie*, 137, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.03.008>

Rigoni, M., Pizzo, P., Schiavo, G., Weston, A. E., Zatti, G., Caccin, P., Rossetto, O., Pozzan, T., & Montecucco, C. (2007). Calcium influx and mitochondrial alterations at synapses exposed to snake neurotoxins or their phospholipid hydrolysis products. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 11238–11245. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610176200>

Rowan, E. G. (2001). What does  $\beta$ -bungarotoxin do at the neuromuscular junction? *Toxicon*, 39(1), 107–118. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00159-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00159-8)

Sasa, M. (1999). Diet and snake venom evolution: Can local selection alone explain intraspecific venom variation? *Toxicon*, 37(2), 249–252. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00121-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00121-4)

Scarborough, R. M., Naughton, M. A., Teng, W., Rose, J. W., Phillips, D. R., Nannizzi, L., Arfsten, A., Campbell, A. M., & Charo, I. F. (1993). Design of potent and specific integrin antagonists: Peptide antagonists with high specificity for glycoprotein IIb-IIIa. *Journal of Biological Chemistry*, 268(2), 1066–1073. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)54042-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)54042-4)

Schonour, R. B., Hu, E. M., Holding, M. L., Claunch, N. M., Ellsworth, S. A., Hogan, M. P., Wray, K., Mcgovern, J., Margres, M. J., Colston, T. J., & Rokyta, D. R. (n.d.). *Gradual and Discrete Ontogenetic Shifts in Hormonal and Ecological Correlates*.

Streicher, J. W., McEntee, J. P., Drzich, L. C., Card, D. C., Schield, D. R., Smart, U., Parkinson, C. L., Jezkova, T., Smith, E. N., & Castoe, T. A. (2016). Genetic surfing, not allopatric divergence, explains spatial sorting of mitochondrial haplotypes in venomous coral snakes. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 70(7), 1435–1449. <https://doi.org/10.1111/evo.12967>

Tsetlin, V. (1999). 281±286 (1999) q FEBS 1999. *Eur. J. Biochem*, 264(February), 281–286.

Tsetlin, V. I., & Hucho, F. (2004). Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: Fundamental aspects and medical applications. *FEBS Letters*, 557(1–3), 9–13. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01454-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01454-6)

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. *Journal of Proteomics*, *105*, 295–306. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.027>

Vonk, F. J., Admiraal, J. F., Jackson, K., Reshef, R., De Bakker, M. A. G., Vanderschoot, K., Van Den Berge, I., Van Atten, M., Burgerhout, E., Beck, A., Mirtschin, P. J., Kochva, E., Witte, F., Fry, B. G., Woods, A. E., & Richardson, M. K. (2008). Evolutionary origin and development of snake fangs. *Nature*, *454*(7204), 630–633. <https://doi.org/10.1038/nature07178>

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. *Clinical Toxicology*, *51*(8), 783–788. <https://doi.org/10.3109/15563650.2013.828841>

Zhang, Y. (2015). Why do we study animal toxins? *Dong Wu Xue Yan Jiu = Zoological Research*, *36*(4), 183–222. <https://doi.org/10.13918/j.issn.2095-8137.2015.4.183>

Zhao, H., Gan, T. X., Liu, X. D., Jin, Y., Lee, W. H., Shen, J. H., & Zhang, Y. (2008). Identification and characterization of novel reptile cathelicidins from elapid snakes. *Peptides*, *29*(10), 1685–1691. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.06.008>

## 14. Anexos

### Análisis proteómico

Los experimentos detallados en esta sección se llevaron a cabo por el Dr. Bruno Lomonte en el Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica. Los fragmentos proteicos obtenidos de los geles SDS-PAGE se sometieron a una reducción de puentes disulfuro (10 mM ditioneol, 30 min, 60 °C) y a una alquilación de cisteínas (50 mM iodacetamida, 1 h, temperatura ambiente), seguido de una digestión con tripsina (66 ng/mL en 25 mM de bicarbonato de amonio) (Intavis DigestPro™ MSi Workstation). Los péptidos resultantes fueron secados por centrifugación y resuspendidos en 25 µL de 0.1% de ácido fórmico, para posteriormente ser analizados por nano-LC-MS/MS usando un equipo cromatográfico EASY-nLC™ 1200 acoplado a un espectrómetro de masas Q-Exactive Plus™ (Thermo). Muestras de 10 µL fueron cargadas en una pre-columna C<sub>18</sub> (75 µm x 2 cm, 3 µm particle; PepMap™, Thermo), los lavados se realizaron con ácido fórmico al 0.1%, y la separación se realizó a un flujo de 200 nL/min en una columna C<sub>18</sub> Easyspray™ (75 µm x 15 cm, 3 µm particle; Thermo). Se utilizó un gradiente 80% acetonitrilo/0.1% ácido fórmico (solvente B) en un tiempo total de 35 min (1-5% B en 1 min, 5-26% B en 25 min, 26-79% B en 4 min, 79-99% B en 1 min, y 99% B 4 min), Los espectros de las masas fueron analizados en modo positivo 1.7 kV, en un rango de 400-1600 m/z, en un tiempo máximo de inyección de 50 msec, Los espectros de la fragmentación MS/MS se analizaron frente a la base de datos UniProt (Serpentes) utilizando Peaks X™ (Bioinformatics Solutions) las identificaciones se asignaron a familias proteicas conocidas por similitud.

Las abundancias relativas de los picos obtenidos por separación RP-HPLC del veneno se calcularon dividiendo el área de cada pico por el área total del cromatograma utilizando el software ChemStation™ (Agilent). En el caso de los picos cromatográficos que contienen bandas únicas, según se juzga por SDS-PAGE, esta cifra es una buena estimación del % en peso (g/100 g) del componente del veneno. Cuando una fracción cromatográfica contenía más de una banda de proteína en SDS-PAGE, sus proporciones se asignaron por densitometría del correspondiente carril de gel teñido con Coomassie utilizando el software ImageLab™ (Bio-Rad). Por último, en el caso de los digestos trípticos de

una banda de proteínas que mostraban la presencia de péptidos pertenecientes a más de una familia de proteínas, se estimaron las abundancias relativas basándose en las áreas de los picos iónicos correspondientes. Estos tres niveles jerárquicos de descomplejación/análisis se integraron para generar una representación porcentual final de la distribución de familias de proteínas de los componentes del veneno.

## Tabla suplementaria de la identificación proteómica de los péptidos presentes en el veneno

Asignación familiar de las proteínas del veneno de *Micrurus diastema*, tras el análisis MS/MS de los péptidos obtenidos por descomplejación RP-HPLC y SDS-PAGE

Peak	% prot	Peso Molecular		Ion		Cov %	C. Acceso	Proteína relacionada y especie	Supporting unique peptides
		ESI-MS (Da)	SDS-PAGE (KDa)	m/z	z				
3	1.2	6583	11.3	721.81	4	87	P80548	Three-finger toxin Mnn I, <i>Micrurus nigrocinctus</i>	MIC(+57.02)HNQ(+.98)Q(+.98)SSQPPTIKTC(+57.02)SEGQC(+57.02)GC(+57.02)GC(+57.02)PTVKPGIHISC(+57.02)C(+57.02)AS
4	2.0	6583	11.4	850.36	3	83	P80548	Three-finger toxin Mnn I, <i>Micrurus nigrocinctus</i>	R.GC(+57.02)GC(+57.02)PTVKPGIHISC(+57.02)C(+57.02)AS
5	2.1	6583	12.1	638.02	4	83	P80548	Three-finger toxin Mnn I, <i>Micrurus nigrocinctus</i>	R.GC(+57.02)GC(+57.02)PTVKPGIHISC(+57.02)C(+57.02)AS
	1.1	9591	10.0	702.67	3	36	P58370	Alpha-neurotoxin homolog 8, <i>Micrurus corallinus</i>	R.GC(+57.02)AATC(+57.02)PTVKPGVNIIC(+57.02)C(+57.02)
		7294		461.21	2	28	P25660	Kunitz-type serine protease inhibitor IX, <i>Bungarus</i>	K.TIDEC(+57.02)QR.T
6	0.2	8532	15.0	427.54	3	41	Q9PRI1	Alpha-neurotoxin homolog 7, <i>Micrurus corallinus</i>	S.RGVKVDVC(+57.02)C(+57.02)MR.D
	0.5	8572	13.1	607.55	4	38	Q9PUB7	Alpha-neurotoxin homolog 1, <i>Micrurus corallinus</i>	R.HASDSQTTTC(+57.02)LSGIC(+57.02)YKKITR.G
	0.3	6583	11.5	551.75	4	87	P80548	Three-finger toxin Mnn I, <i>Micrurus nigrocinctus</i>	R.GC(+57.02)GC(+57.02)PTVKPGIHISC(+57.02)C(+57.02)AS
7	1.3	7038	10.3	660.95	3	27	B3EWF8	Mipartoxin-1, <i>Micrurus mipartitus</i>	C.HRGPYNVC(+57.02)C(+57.02)STDLC(+57.02)NK
		9158		759.84	2	17	Q90W99	Kunitz-type serine protease inhibitor textilinin-3, <i>F</i>	E.FLYGGC(+57.02)GGNANNFK.T
8	0.9	6583	11.6	850.36	3	82	P80548	Three-finger toxin Mnn I, <i>Micrurus nigrocinctus</i>	R.GC(+57.02)GC(+57.02)PTVKPGIHISC(+57.02)C(+57.02)AS
		10010		500.72	2	9	H6VC05	Kunitz-type serine protease inhibitor DrKln-I, <i>Dab</i>	I.YYNPDSNK.C
	0.4	7038	10.4	615.27	3	25	B3EWF8	Mipartoxin-1, <i>Micrurus mipartitus</i>	H.RGPYNVC(+57.02)C(+57.02)STDLC(+57.02)NK
		9158			3	30	Q90W99	Kunitz-type serine protease inhibitor textilinin-3, <i>F</i>	F.YYNPRQHQC(+.98)C(+57.02)IEFLYGGC(+57.02)GGNANNFK.T
		22548		468.24	3	9	C0K3N4	Vascular endothelial growth factor A, <i>Agkistrodon</i>	K.HLYKQDPLTC(+57.02)K.C
	0.2	6583	7.9	420.85	3	30	Q9PRQ4	Three-finger toxin Mnn I, <i>Micrurus nigrocinctus</i>	K.TC(+57.02)SEGQC(+57.02)YKK.T
		12915		583.26	2	9	F5CPE8	Natriuretic peptide, <i>Micrurus altirostris</i>	R.IGDVSGMGC(+57.02)NR.R
		9241		461.22	2	8	E7FL12	Kunitz serine protease inhibitor Pr-mulgin 2, <i>Pse</i>	K.TIDEC(+57.02)KR.T
9	1.1	2871	10.6	514.98	4	92	Q9PRQ4	Nicotinic ACh receptor-binding protein Mnn-4 (Fr	S.SRTETMTC(+57.02)PEGKDKC(+57.02)EK.Y
10	0.3	3005	10.0	640.97	3	69	Q9PRQ2	Nicotinic ACh receptor-binding protein Mnn-4 (Fr	K.C(+57.02)RIGKDGFSVTC(+57.02)TEK.E
		8777		481.21	2	10	C1IC50	Protease inhibitor 1, <i>Walterinnesia aegyptia</i>	L.EFTYGGC(+57.02)K.G
		14881		448.69	2	6	P79799	Natriuretic peptide Mc-NP, <i>Micrurus corallinus</i>	L.GDGC(+57.02)FGQR.I
11	1.3	8623	18.0	767.31	2	15	K9MCX0	Three-finger toxin A2, <i>Micrurus laticollaris</i>	P.YNVC(+57.02)C(+57.02)STDLC(+57.02)NK
		14881		427.53	3	8	P79799	Natriuretic peptide Mc-NP, <i>Micrurus corallinus</i>	L.GDGC(+57.02)FGQRIDR.I
	0.8	8623	10.8	844.35	2	18	K9MCX0	Three-finger toxin A2, <i>Micrurus laticollaris</i>	E.GPYNVC(+57.02)C(+57.02)STDLC(+57.02)NK
	0.5	8623	10.0	844.34	2	18	K9MCX0	Three-finger toxin A2, <i>Micrurus laticollaris</i>	E.GPYNVC(+57.02)C(+57.02)STDLC(+57.02)NK
		14881		427.53	3	8	P79799	Natriuretic peptide Mc-NP, <i>Micrurus corallinus</i>	L.GDGC(+57.02)FGQRIDR.I
		8777		481.21	2	10	C1IC50	Protease inhibitor 1, <i>Walterinnesia aegyptia</i>	L.EFTYGGC(+57.02)K.G
12	0.5	8623	15.2	685.78	2	28	K9MCX0	Three-finger toxin A2, <i>Micrurus laticollaris</i>	Y.NVC(+57.02)C(+57.02)STDLC(+57.02)NK
		13341		458.52	3	15	P81166	Basic phospholipase A2 nigroxin A, <i>Micrurus nigr</i>	K.C(+57.02)KDFVC(+57.02)NC(+57.02)DR.T
	0.3	8623	10.0	844.35	2	32	K9MCX0	Three-finger toxin A2, <i>Micrurus laticollaris</i>	E.GPYNVC(+57.02)C(+57.02)STDLC(+57.02)NK
		9077		548.23	2	13	Q8AY43	Kunitz-type serine protease inhibitor A, <i>Bungarus</i>	Y.GGC(+57.02)GGNANNFK.S
13	0.3	13312	14.0	546.49	4	70	P81167	Basic phospholipase A2 nigroxin B, <i>Micrurus nigr</i>	M.YSYDC(+57.02)SEGKLTTC(+57.02)KDNNTK.C
		9984		854.39	2	25	C6JUP2	Three-finger toxin 3FTx-2, <i>Micrurus corallinus</i>	T.ANTLFC(+57.02)DNSNVPSIR.T
	0.2	13341	11.7	571.99	4	37	P81166	Basic phospholipase A2 nigroxin A, <i>Micrurus nigr</i>	V.DELDKC(+57.02)C(+57.02)QVHDKC(+57.02)YDTAK.H
		9771		569.28	2	21	Q8QGR0	Muscarinic toxin 7, <i>Dendroaspis angusticeps</i>	P.DGQNLC(+57.02)FKR.W
	0.7	7038	10.4	575.73	4	32	B3EWF8	Mipartoxin-1, <i>Micrurus mipartitus</i>	T.SAC(+57.02)HRGPYN(+.98)VC(+57.02)C(+57.02)STDLC(+57.02)NK
		9031		686.31	2	16	B5L5Q1	Kunitz-type serine protease inhibitor textilinin-7, <i>F</i>	F.IYGGC(+57.02)GGNANNFK.T
14	1.4	8623	10.3	844.35	2	18	K9MCX0	Three-finger toxin A2, <i>Micrurus laticollaris</i>	E.GPYNVC(+57.02)C(+57.02)STDLC(+57.02)NK
		13312		526.24	4	49	P81167	Basic phospholipase A2 nigroxin B, <i>Micrurus nigr</i>	Y.GSGTPVDELDKC(+57.02)C(+57.02)QVHDK.C

15	1.6	13312	13.6	583.25	4	77	P81167	Basic phospholipase A2 nigroxin B, <i>Micrurus nigrocinctus</i>	T.M(+15.99)YSYDC(+57.02)SEGKLT(+57.02)KDNNTK.C
16	4.2	13188	13.9	659.04	4	49	C0HKB8	Acidic phospholipase A2, <i>Micrurus dumerilii</i>	N.GQLTC(+57.02)KDNNTKC(+57.02)KDFVC(+57.02)NC(+57.02)
17	5.5	13188	14.3	659.04	4	44	C0HKB8	Acidic phospholipase A2, <i>Micrurus dumerilii</i>	N.GQLTC(+57.02)KDNNTKC(+57.02)KDFVC(+57.02)NC(+57.02)
18	3.9	15441	30.2	549.98	4	35	F5CPF0	Phospholipase A2, <i>Micrurus altirostris</i>	F.YSYEC(+57.02)SEGKLT(+57.02)KDNNTK.C
	12.1	13312	14.3	628.65	3	92	P81167	Basic phospholipase A2 nigroxin B, <i>Micrurus nigrocinctus</i>	NLIDFKNM(+15.99)IKC(+57.02)TNTR.H
19	0.5	13312	14.5	757.06	4	82	P81167	Basic phospholipase A2 nigroxin B, <i>Micrurus nigrocinctus</i>	N.YGC(+57.02)YC(+57.02)GYGGSGTPVDELDKC(+57.02)C(+57.02)
	0.9	27030	10.7	480.73	2	23	Q5YF89	Venom nerve growth factor 2, <i>Naja sputatrix</i>	R.EDHPVHNL.G
		13312		572.00	4	61	P81167	Basic phospholipase A2 nigroxin B, <i>Micrurus nigrocinctus</i>	V.DELDKC(+57.02)C(+57.02)QVHDKC(+57.02)YDTAK.H
		7285		439.94	4	37	P81782	Bucandin, <i>Bungarus candidus</i>	MEC(+57.02)YRC(+57.02)GVSGC(+57.02)HLK.I
20	0.1	13312	31.6	546.49	4	75	P81167	Basic phospholipase A2 nigroxin B, <i>Micrurus nigrocinctus</i>	M.YSYDC(+57.02)SEGKLT(+57.02)KDNNTK.C
		69181		553.47	4	6	D3TTC2	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atragin, <i>Naja sputatrix</i>	K.LQHEAQC(+57.02)DSEEC(+57.02)C(+57.02)EK(+57.02)K(+57.02)
		27334		471.89	3	10	Q3HXZ0	Venom nerve growth factor 2, <i>Oxyuranus microlepidotus</i>	K.C(+57.02)RNPVPSGC(+57.02)R.G
	0.2	13188	19.5	668.95	3	44	C0HKB8	Acidic phospholipase A2, <i>Micrurus dumerilii</i>	Y.SYDC(+57.02)SNGQLTC(+57.02)KDNNTK.C
		27030		582.25	3	28	Q5YF89	Venom nerve growth factor 2, <i>Naja sputatrix</i>	R.EDHPVHNLGEHSVC(+57.02)D.S
		6583		420.85	3	30	P80548	Three-finger toxin Mnn I, <i>Micrurus nigrocinctus</i>	K.TC(+57.02)SEGQC(+57.02)YKKT
		27773		553.78	2	7	Q8QG74	Brain-derived neurotrophic factor, <i>Ptyas major</i>	L.KQYFYETK.C
	0.7	13312	14.5	757.06	4	82	P81167	Basic phospholipase A2 nigroxin B, <i>Micrurus nigrocinctus</i>	N.YGC(+57.02)YC(+57.02)GYGGSGTPVDELDKC(+57.02)C(+57.02)
		9498		836.67	3	29	G9I929	Kunitz-type neurotoxin MitTx-alpha, <i>Micrurus tener</i>	F.FYGQC(+57.02)DVNQNHFTTMSEC(+57.02)NR.V
21	0.2	13312	26.9	579.25	4	77	P81167	Basic phospholipase A2 nigroxin B, <i>Micrurus nigrocinctus</i>	T.MYSYDC(+57.02)SEGKLT(+57.02)KDNNTK.C
		27334		471.89	3	13	Q3HXZ0	Venom nerve growth factor 2, <i>Oxyuranus microlepidotus</i>	K.C(+57.02)RNPVPSGC(+57.02)R.G
		26753		764.31	2	22	Q3HXY4	Venom nerve growth factor, <i>Pseudechis porphyria</i>	R.GIDSSHWSY(+57.02)TT.T
		9984		854.39	2	28	C6JUP2	Three-finger toxin 3FTx-2, <i>Micrurus corallinus</i>	T.ANTLFC(+57.02)DNSNVPSIR.T
		9498		618.26	3	18	G9I929	Kunitz-type neurotoxin MitTx-alpha, <i>Micrurus tener</i>	C.DVNQNHFTTMSEC(+57.02)NR.V
22	0.6	13188	13.4	716.79	2	44	C0HKB8	Acidic phospholipase A2, <i>Micrurus dumerilii</i>	Y.SYDC(+57.02)SNGQLTC(+57.02)K.D
22	0.1	27207	37.1	471.88	3	18	Q3HXY2	Venom nerve growth factor 2, <i>Pseudechis australis</i>	K.C(+57.02)RNPVPSGC(+57.02)R.G
		13312		505.72	4	74	P81167	Basic phospholipase A2 nigroxin B, <i>Micrurus nigrocinctus</i>	Y.SYDC(+57.02)SEGKLT(+57.02)KDNNTK.C
		69181		641.58	3	8	D3TTC2	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atragin, <i>Naja sputatrix</i>	K.LQHEAQC(+57.02)DSEEC(+57.02)C(+57.02)EK.C
		22264		489.73	2	4	Q1X703	Brain-derived neurotrophic factor (Frag.), <i>Morelia spilargenteus</i>	K.QYFYETK.C
	0.2	13188	28.1	659.52	4	56	C0HKB8	Acidic phospholipase A2, <i>Micrurus dumerilii</i>	R.C(+57.02)C(+57.02)KVHDDC(+57.02)YGEAEKVHGC(+57.02)
		27207		471.89	3	13	Q3HXY2	Venom nerve growth factor 2, <i>Pseudechis australis</i>	K.C(+57.02)RNPVPSGC(+57.02)R.G
	0.8	13312	13.8	941.64	4	85	P81167	Basic phospholipase A2 nigroxin B, <i>Micrurus nigrocinctus</i>	N.YGC(+57.02)YC(+57.02)GYGGSGTPVDELDKC(+57.02)C(+57.02)
		9498		787.65	3	23	G9I929	Kunitz-type neurotoxin MitTx-alpha, <i>Micrurus tener</i>	F.FYGQC(+57.02)DVNQNHFTTMSEC(+57.02)NR.V
		9984		854.39	2	36	C6JUP2	Three-finger toxin 3FTx-2, <i>Micrurus corallinus</i>	T.ANTLFC(+57.02)DNSNVPSIR.T
	0.4	9498	10.0	671.60	3	51	G9I929	Kunitz-type neurotoxin MitTx-alpha, <i>Micrurus tener</i>	Q.C(+57.02)DVNQNHFTTMSEC(+57.02)NR.V
		16793		674.62	3	48	G9I930	Basic phospholipase A2 homolog MitTx-beta, <i>Micrurus tener</i>	R.DSNTPVDDLDR(+57.02)C(+57.02)QAQK.Q
		12038		647.00	3	42	P82885	Thaibocobrin, <i>Naja kaouthia</i>	K.KTVENVGVSVQVADNPER.F
		21119		471.75	2	9	F8RKW2	Vespryn-21, <i>Drysdalia coronoides</i>	K.TVENVGVPQ.V
23	0.2	27207	37.1	480.48	4	18	Q3HXY2	Venom nerve growth factor 2, <i>Pseudechis australis</i>	F.FETKC(+57.02)RNPVPSGC(+57.02)R.G
		13312		505.72	4	63	P81167	Basic phospholipase A2 nigroxin B, <i>Micrurus nigrocinctus</i>	Y.SYDC(+57.02)SEGKLT(+57.02)KDNNTK.C
	0.3	13312	28.5	579.25	4	77	P81167	Basic phospholipase A2 nigroxin B, <i>Micrurus nigrocinctus</i>	T.MYSYDC(+57.02)SEGKLT(+57.02)KDNNTK.C

	1.1	13188	13.8	659.52	4	74	C0HKB8	Acidic phospholipase A2, <i>Micrurus dumerilii</i>	R.C(+57.02)C(+57.02)KVHDDC(+57.02)YGAEKVVHGC(+57.02)
		26753		549.26	2	7	Q3HXY4	Venom nerve growth factor, <i>Pseudechis porphyria</i>	R.NPNPVPSGC(+57.02)R.G
	1.3	9498	10.0	596.27	4	62	G9I929	Kunitz-type neurotoxin MitTx-alpha, <i>Micrurus tener</i>	R.SRITC(+57.02)VHFFYGGC(+57.02)DVNQNH.F
		16793		674.63	3	48	G9I930	Basic phospholipase A2 homolog MitTx-beta, <i>Micrurus dumerilii</i>	R.DSNTPVDDLDRC(+57.02)C(+57.02)QAQK.Q
		7543		400.20	3	48	C0HK04	Clarkitoxin-1, <i>Micrurus clarki</i>	K.IFKIEC(+57.02)C(+57.02)TK.D
24	0.2	69181	40.9	703.80	2	14	D3TTC2	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atragin, <i>Naja naja</i>	R.AAKDDC(+57.02)DLPELC(+57.02).T
		27514		471.89	3	8	P34128	Venom nerve growth factor, <i>Bungarus multicinctus</i>	K.C(+57.02)RNPVPSGC(+57.02)R.G
	0.2	13312	30.7	546.49	4	75	P81167	Basic phospholipase A2 nigroxin B, <i>Micrurus niger</i>	M.YSYDC(+57.02)SEGKLTLC(+57.02)KDNNTK.C
		68988		664.87	2	3	A8QL49	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like BmMP, <i>Bombina orientalis</i>	R.KRNDNAQLLTR.I
		27156		471.89	3	13	Q3HXY3	Venom nerve growth factor 1, <i>Pseudechis australis</i>	K.C(+57.02)RNPVPSGC(+57.02)R.G
	1.2	16793	13.7	674.62	3	68	G9I930	Basic phospholipase A2 homolog MitTx-beta, <i>Micrurus dumerilii</i>	R.DSNTPVDDLDRC(+57.02)C(+57.02)QAQK.Q
		68988		443.58	3	3	A8QL49	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like BmMP, <i>Bombina orientalis</i>	R.KRNDNAQLLTR.I
25	0.5	16793	33.0	623.78	2	24	G9I930	Basic phospholipase A2 homolog MitTx-beta, <i>Micrurus dumerilii</i>	R.DSNTPVDDLDR.C
		68988		600.82	2	2	A8QL49	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like BmMP, <i>Bombina orientalis</i>	K.RNDNAQLLTR.I
		27138		549.26	2	4	Q3HXY1	Venom nerve growth factor 3, <i>Pseudechis australis</i>	R.NPNPVPSGC(+57.02)R.G
	2.3	13188	14.0	659.52	4	67	C0HKB8	Acidic phospholipase A2, <i>Micrurus dumerilii</i>	R.C(+57.02)C(+57.02)KVHDDC(+57.02)YGAEKVVHGC(+57.02)
26	5.8	13188	14.0	659.52	4	59	C0HKB8	Acidic phospholipase A2, <i>Micrurus dumerilii</i>	R.C(+57.02)C(+57.02)KVHDDC(+57.02)YGAEKVVHGC(+57.02)
27	6.7	13188	14.6	659.52	4	63	C0HKB8	Acidic phospholipase A2, <i>Micrurus dumerilii</i>	R.C(+57.02)C(+57.02)KVHDDC(+57.02)YGAEKVVHGC(+57.02)
28	0.3	13188	14.8	668.95	3	55	C0HKB8	Acidic phospholipase A2, <i>Micrurus dumerilii</i>	Y.SYDC(+57.02)SNGQLTLC(+57.02)KDNNTK.C
		7543		565.27	3	62	C0HK04	Clarkitoxin-1, <i>Micrurus clarki</i>	R.TPQLC(+57.02)PKGQDVC(+57.02)YK.K
		22460		427.70	4	7	C0K3N5	Vascular endothelial growth factor A, <i>Vipera ammocera</i>	Q.SQIHPM(+15.99)SFQQHSC.C
		21119		471.75	2	14	F8RKW2	Vespryn-21, <i>Drysdalia coronoides</i>	K.TVENGVVPQ.V
		7543		456.23	4	73	C0HK04	Clarkitoxin-1, <i>Micrurus clarki</i>	R.TPQLC(+57.02)PKGQDVC(+57.02)YKK.T
	1.0	7543	12.7	456.23	4	76	C0HK04	Clarkitoxin-1, <i>Micrurus clarki</i>	R.TPQLC(+57.02)PKGQDVC(+57.02)YKK.T
		13188		659.52	4	44	C0HKB8	Acidic phospholipase A2, <i>Micrurus dumerilii</i>	R.C(+57.02)C(+57.02)KVHDDC(+57.02)YGAEKVVHGC(+57.02)
		21119		471.75	2	9	F8RKW2	Vespryn-21, <i>Drysdalia coronoides</i>	K.TVENGVVPQ.V
29	7.9	7543	14.5	456.23	4	74	C0HK04	Clarkitoxin-1, <i>Micrurus clarki</i>	R.TPQLC(+57.02)PKGQDVC(+57.02)YKK.T
		16793		674.63	3	48	G9I930	Basic phospholipase A2 homolog MitTx-beta, <i>Micrurus dumerilii</i>	R.DSNTPVDDLDRC(+57.02)C(+57.02)QAQK.Q
30	5.5	13188	13.3	659.52	4	68	C0HKB8	Acidic phospholipase A2, <i>Micrurus dumerilii</i>	R.C(+57.02)C(+57.02)KVHDDC(+57.02)YGAEKVVHGC(+57.02)
		7543		567.60	3	41	C0HK04	Clarkitoxin-1, <i>Micrurus clarki</i>	K.IFKIEC(+57.02)C(+57.02)TKDNC(+57.02)I
31	2.6	16793	13.3	587.77	4	81	G9I930	Basic phospholipase A2 homolog MitTx-beta, <i>Micrurus dumerilii</i>	C.VARDSNTPVDDLDRC(+57.02)C(+57.02)QAQK.Q
32	0.5	7543	10.0	599.80	2	35	C0HK04	Clarkitoxin-1, <i>Micrurus clarki</i>	K.IFKIEC(+57.02)C(+57.02)TK.D
33	0.5	27138	19.4	471.89	3	13	Q3HXY1	Venom nerve growth factor 3, <i>Pseudechis australis</i>	K.C(+57.02)RNPVPSGC(+57.02)R.G
		18521		463.91	3	19	C6JUN9	C-type lectin, <i>Micrurus corallinus</i>	Y.C(+57.02)VHLLASQ(+98)GYLK.W
	0.1	13312	14.3	421.93	4	47	P81167	Basic phospholipase A2 nigroxin B, <i>Micrurus niger</i>	K.C(+57.02)C(+57.02)QVHDKC(+57.02)YDTAK.H
		18521		644.78	2	22	C6JUN9	C-type lectin, <i>Micrurus corallinus</i>	W.NEGEPNNSWNK.E
34	0.3	13312	14.3	505.72	4	57	P81167	Basic phospholipase A2 nigroxin B, <i>Micrurus niger</i>	Y.SYDC(+57.02)SEGKLTLC(+57.02)KDNNTK.C
		18521		781.34	2	28	C6JUN9	C-type lectin, <i>Micrurus corallinus</i>	T.SWNEGEPNNSWNK.E
35	1.8	68087	62.0	649.28	2	12	F8RKV9	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like MTP9, <i>Drysdalia coronoides</i>	Q.SAEC(+57.02)PTDSFQR.N
36	0.8	69181	56.6	821.00	3	14	D3TTC2	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atragin, <i>Naja naja</i>	R.DPN(+98)YGMVEPGTKC(+57.02)GDGM(+15.99)VC(+57.02)
		64434		513.72	2	4	B6EWW8	Snake venom 5'-nucleotidase, <i>Gloydus brevicaudus</i>	G.Q(+98)DC(+57.02)YGGVAR.R
	0.4	69181	41.9	672.82	2	13	D3TTC2	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atragin, <i>Naja naja</i>	R.RTKPAYQFSSC(+57.02).S

		64434		555.77	2	7	B6EWW8	Snake venom 5'-nucleotidase, <i>Gloydius brevicaudus</i>	K.QAFEHSVHR.H
37	0.3	91752	139.7	478.76	4	19	J3SBP3	Venom phosphodiesterase 2, <i>Crotalus adamanti</i>	K.LKPAPNN(+.98)GTHGSLNHLLK.N
		64434		463.92	3	14	B6EWW8	Snake venom 5'-nucleotidase, <i>Gloydius brevicaudus</i>	E.LTILHTNDVHAR.V
		68988		600.82	2	4	A8QL49	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like BmMP, <i>Bombina orientalis</i>	K.RNDNAQLLTR.I
	0.4	64434	64.7	777.40	2	27	B6EWW8	Snake venom 5'-nucleotidase, <i>Gloydius brevicaudus</i>	R.HGQGMGELLQVSGIK.V
		68988		664.87	2	11	A8QL49	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like BmMP, <i>Bombina orientalis</i>	R.KRNDNAQLLTR.I
		91752		645.30	2	5	J3SBP3	Venom phosphodiesterase 2, <i>Crotalus adamanti</i>	L.YIEEPDTTGHK.Y
		58811		506.26	2	7	A8QL51	L-amino-acid oxidase, <i>Bungarus multicinctus</i>	K.IFLT(+57.02)TQ(+.98)K.F
	0.5	64434	35.2	463.92	3	14	B6EWW8	Snake venom 5'-nucleotidase, <i>Gloydius brevicaudus</i>	E.LTILHTNDVHAR.V
		69181		553.47	4	8	D3TTC2	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like atragin, <i>Naja atra</i>	N.LQHEAQC(+57.02)DSEEC(+57.02)C(+57.02)EKC(+57.02)K
		28996		487.00	4	7	Q5MCS0	Serine protease harobin, <i>Hydrophis hardwickii</i>	R.LGVHNVHVHYEDEQIR.V
		58920		523.78	2	5	A6MFL0	L-amino-acid oxidase, <i>Demansia vestigiata</i>	Y.FETVAAPVGR.I
38	2.6	58811	64.3	487.99	4	18	A8QL51	L-amino-acid oxidase, <i>Bungarus multicinctus</i>	F.LTC(+57.02)TQ(+.98)KFWIADGIHGGK.S
		64434		419.25	3	12	B6EWW8	Snake venom 5'-nucleotidase, <i>Gloydius brevicaudus</i>	N.FPILSANIRPK.G
		68087		455.54	3	9	F8RKV9	Zinc metalloproteinase-disintegrin-like MTP9, <i>Drysdalia maculata</i>	E.FSSC(+57.02)SVQEHQR.Y
				649.28	2				Q.SAEC(+57.02)PTDSFQR.N
		64103		673.33	3	8	F8J2D3	Phospholipase-B 81, <i>Drysdalia coronoides</i>	K.QNSGTYNQYMILDTKK.I
		52255		504.22	2	4	A3QVP0	Hyaluronidase-2, <i>Bitis arietans</i>	K.C(+57.02)PDIEMSR.N
		42204		408.47	4	7	Q9YIB5	Glutaminyl-peptide cyclotransferase, <i>Bothrops jarrovi</i>	R.RHPVEDDHIFLR.R

## Extracciones de veneno y mantenimiento de las serpientes

Todas las extracciones de venenos se realizaron de manera manual, tanto a los individuos adultos como a los neonatos de *Micrurus diastema*. Para el manejo de los individuos se utilizó un gancho herpetológico, con el cual se introducían en una bolsa de plástico transparente para su seguridad y la del manejador (A), con ayuda de una pinza grande se facilitaba sujetar la cabeza del animal (B). Esta se sostenía de manera firme y se aproximaba a la cuchara cubierta por Parafilm (C). Una vez las serpientes sentían la cuchara frente a ella, estas mordían (D) y liberaban el veneno en la cuchara (E), en algunas ocasiones era necesario el estimular las glándulas con un compresión suave sobre sus cabezas. Posteriormente el veneno era recuperado y almacenado para su posterior procesamiento en el laboratorio (F).

<https://youtu.be/XA-WfJ0sce0>

[https://youtube.com/shorts/vbPwo6mA9\\_w?feature=share](https://youtube.com/shorts/vbPwo6mA9_w?feature=share)





Los ejemplares de los que se les realizaron las extracciones de veneno fueron mantenidos en el herpetario “Cantil” del Instituto de Biotecnología de la UNAM, se mantuvieron a temperaturas aproximadas de 25 °C, en encierros con sustrato de corteza de madera (G), agua *ad libitum* y se alimentaban con alimento vivo (H) o de manera forzada mediante sondas con alimento hospitalario de uso veterinario alto en proteínas (I) Recovery (Hills), cada 15 a 20 días.



## **Primer reporte de nacimiento de serpientes de coral mexicanas en cautiverio**

En mayo de 2021 llegaron de colecta de campo varios individuos de la especie *Micrurus diastema*, entre ellos se encontraba el coralillo adulto IBt-138 proveniente de Los Tuxtlas, Veracruz. El individuo presentó una longitud hocico-cloaca de 90 cm y una longitud total de 99 cm (el coral mexicano más grande reportado hasta la fecha). Se reporta que las serpientes de coral alcanzan su madurez sexual entre los primeros 21 a 27 meses de vida, o cuando sus condiciones fisiológicas son óptimas para el desarrollo de embriones, adelantando este proceso incluso hasta en sus primeros 15 meses de vida. Por lo que se asume que este individuo tendrá una edad igual a mayor a 2 años.

Una semana después de la llegada al herpetario, el día 28 de mayo de 2021 se encontraron 11 huevos en su hábitat. Este reporte de fechas concuerda con la literatura, ya que según Roze (1996) las serpientes de coral suelen depositar sus huevos en periodos próximos a las estaciones de lluvia (dependiendo el lugar del taxón del que se hable) para alternar la incubación y desarrollo entre temporadas secas y lluviosas. Para el caso de la región de México de donde provienen, la estación de lluvias abarca los meses de junio a octubre.

Los huevos presentaban un color blanco con forma elongada y semicilíndrica, de una consistencia suave y elástica. Con medidas promedio de 2.4 cm de largo por 1.4 cm de ancho. El tamaño y número de huevos depende totalmente de la talla de la hembra, por lo que cada caso es muy variable. Los reportes indican que los huevos a pesar de su coloración blanca suelen ser transparentes (variando entre taxones), por lo que se verificó la viabilidad de los huevos a contraluz utilizando una lámpara. Se logró observar a los 11 embriones utilizando esta técnica por lo que se comprobó su viabilidad.



## Tabla de las medidas obtenidas de los huevos

Individuo	Largo del huevo (cm)	Ancho del huevo (cm)
C1	2.46	1.43
C2	2.54	1.47
C3	2.52	1.41
C4	2.42	1.42
C5	2.23	1.40
C6	2.47	1.40
C7	2.37	1.45
C8	2.43	1.47
C9	2.28	1.41
C10	2.42	1.49
C11	2.37	1.39

Los huevos en vida libre suelen depositarse en troncos podridos, en restos orgánicos bajo piedras, en túneles poco profundos y en otros lugares resguardados y ocultos. Además de estos datos existe muy poca información sobre el proceso de incubación y eclosión de los huevos de serpientes de coral, por lo que lograr esta puesta representaba todo un desafío para el grupo de trabajo. Debido a esto, para su posterior incubación, se decidió solicitar ayuda del Biólogo Fabricio Varela (experto en reproducción de reptiles), ya que el laboratorio no contaba con la experiencia necesaria ni el equipo para lograr el correcto manejo de los huevos. El proceso se realizó en una incubadora Repti Bathor (Zoomed), a 28 °C, con un sustrato de vermiculita a 80% de humedad.

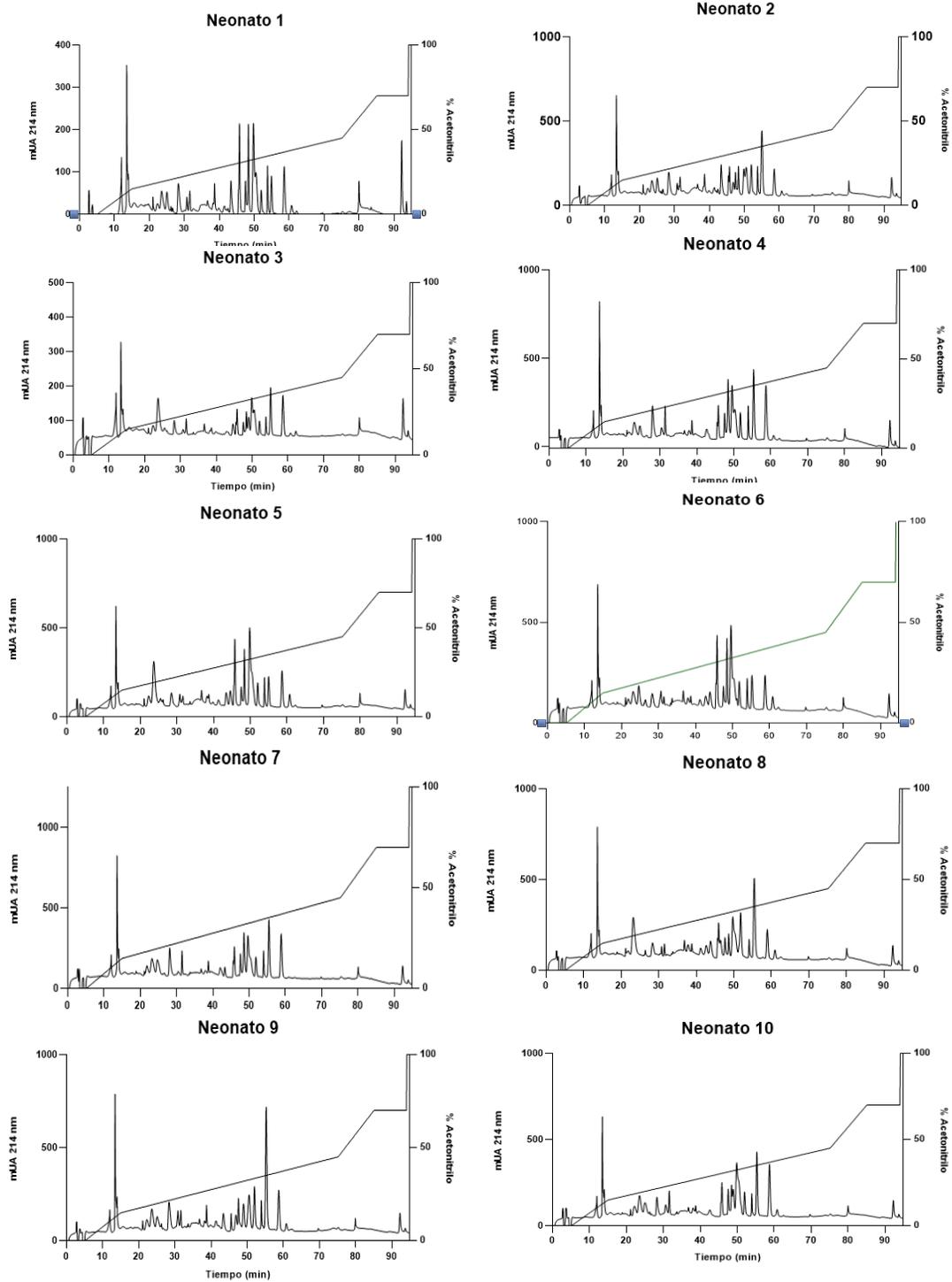
Transcurridos 47 días a estas condiciones, se logró la eclosión de los 11 neonatos, logrando el primer registro mexicano de nacimiento de serpientes de coral en cautiverio. Todos los individuos nacieron sin complicaciones ni ayuda para sacarlos de los huevos y todos presentaban una morfología normal, con excepción de C11 que presentó una deformidad en la mandíbula inferior.

Llegadas al herpetario "Cantil" se les realizó una extracción de veneno, sorpresivamente se logró extraer con éxito muestras de los 11 neonatos.

Posteriormente se mantuvieron en el herpetario bajo las mismas condiciones que el resto de las serpientes de coral.



## Perfiles cromatográficos por RP-HPLC de los neonatos *M. diastema*



Perfiles cromatográficos por RP-HPLC de 10 neonatos de *Micrurus diastema*.

Tabla de recuperación de fracciones del intercambio catiónico.

Tubo	Tiempo	Fracción	A <sub>280</sub> (mg/ml)	Post diálisis (ml)	A <sub>280</sub> (mg/ml)	mg totales
3	45-46.7	5.2	2	0.139	15.2	2.1128
4	46.7-50.2	10.5	2			
5	50.2-52.3	6.4	3	0.046	15.6	0.7176
6	52.3-55.3	9	3			
7	55.3-57	5	4	0.015	11	0.165
8	57-60.3	9.9	5	0.062	31.7	1.9654
9	60.3-62.4	6.5	5			
10	62.4-	15	6	0.062	25.7	1.5934
11	-68.7	4	6			
12	68.7-72.7	12	7	0.104	49.6	5.1584
13	72.7-76.6	11.8	7			
14	76.6-79.9	10	8	0.095	22	2.09
15	79.9-82.2	7				
16	82.2-86.7	13.5	9	0.015	41.8	0.6
17	86.7-89.3	8.1	9			
18	89.3-94.4	15	10	0.05	27.8	1.4

Total= 15.8

Recuperación= 79%

## 15. Protocolos

### Cuantificación de proteínas por BCA

#### Materiales:

- Reactivo A: carbonato de sodio, ácido bicinconínico y tartrato de sodio en 0.01M de hidróxido de sodio.
- Reactivo B: 4% de sulfato cúprico.
- Albumina sérica bovina (BSA): solución stock a 2 mg/mL en 0.9% NaCl y 0.05% de azida de sodio.
- Lector de Elisa con filtro de 570 nm con software Magallan®.
- Microplacas de 96 pozos marca Falcon®.

#### Preparación de estándares (ST):

I. Rotular 5 tubos de 2 mL con la siguiente enumeración (equivalente a la concentración de BSA)

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

II. Colocar 1 mL de PBS pH 7.2 del tubo 2 al 5.

III. A partir de una solución de stock de BSA (2 mg/mL), en el tubo 1 se coloca 320 µL del stock de BSA y 1680 µL de PBS 1X.

IV. Realizar diluciones seriadas 1:2 partiendo del tubo 1 al 5 (transfiriendo 1 mL a cada tubo).

#### Preparación de la muestra problema:

- Decidir la dilución en que debe prepararse la muestra para que se encuentre dentro del rango de la curva estándar (20 µg/mL a 320 µg/mL).

#### Preparación de la mezcla de reacción:

- Determinar el volumen total de muestras, tomando en cuenta muestras, estándares y blancos, se multiplica por 200  $\mu\text{L}$  y el resultado es el volumen requerido.
- Preparar la mezcla reacción con 50 partes del reactivo A y 1 parte del reactivo B del kit de Pierce®

Procedimiento de lecturas de microplacas:

1. Añadir 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción a cada pozo.
2. Transferir 25  $\mu\text{L}$  de cada muestra, estándar y blanco.
3. Cubrir la placa con una tapa e incubar a 37 °C por dos horas.
4. Leer la absorbancia en un lector de ELISA con un filtro de 570 nm (Wiechelman *et al.*, 1988).

## **Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Soluciones:

- Solución de acrilamida (30% de acrilamida + 0.8% bis-acrilamida). Disolver 49.5 g de acrilamida y 1.32 g de bis-acrilamida en un volumen final de 165 mL, filtrar la solución en membrana hidrofílica.
- Amortiguador inferior (1.5M Tris + 0.4% SDS): Disolver 18.8 g de Tris en 50 mL de agua desionizada y adicionar 2 mL de SDS 20%. Ajustar pH a 8.8 con HCl concentrada y aforar a 100 mL (filtrar la solución).
- Amortiguador superior (0.5M 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 y aforar a 100 mL (filtrar la solución).
- Amortiguador de corrida desnaturante 5X (10% glicerol + 2.5% SDS + 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 + 5% 2  $\beta$ -mercaptoetanol + 0.002% azul de bromofenol) Mezclar 2.5 mL de glicerol, 3.125 mL SDS 20%, 1.25 mL 1M Tris-HCL pH6.8, 1.25 mL de 2  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.5 mL de 1% de azul de bromofenol y aforar a 10 mL con agua desionizada.
- Persulfato de amonio 10%: Disolver 0.1 g de persulfato de amonio en 1 mL de agua deionizada.

- Solución de tinción (25% isopropanol + 10% ácido acético + 0.2% azul de Coomasie R-250): Disolver 1 g de azul de Coomasie en 125 mL de isopropanol, 50 mL de ácido acético y aforar a 500 mL de agua desionizada.
- Solución para desteñir (10% metanol + 10% ácido acético): Mezclar 400 mL de agua desionizada, 50 mL de metanol y 50 mL de ácido acético.

Geles separadores según la concentración deseada.

Reactivos	4%	6%	10%	11%	12%	15%	17%	20%
<b>Low buffer (mL)</b>	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
<b>Acrilamida (mL)</b>	0.8	1.2	1.95	2.2	2.4	3	3.4	4.05
<b>Agua destilada (mL)</b>	3.7	3.3	2.55	2.3	2.3	1.5	1.1	0.45
<b>TEMED (μL)</b>	20	20	20	20	20	20	20	20
<b>10% PSA (μL)</b>	40	40	40	40	40	40	40	40

Gel concentrador.

Reactivos	Volúmen
<b>Upper buffer</b>	0.63 mL
<b>Agua destilada</b>	1.54 mL
<b>Acrilamida</b>	0.33 mL
<b>TEMED</b>	15 μL
<b>10% PSA</b>	30 μL

## Preparación de las yemas de huevo para actividad PLA<sub>2</sub>

1. Obtener una yema de huevo lo más limpia posible (sin clara ni chalaza).
2. Pesarla y diluirla con 0.1M Tris HCl pH 7.95 + 5 mM CaCl<sub>2</sub> + 0.5% Triton X-100 para dar una concentración final de 10% (P/V). Por ejemplo, si la yema pesa 10 g hay que aforar a 100 mL.
3. Agitar muy bien con agitador magnético, durante 10 minutos y centrifugar a 1500 rpm por 5 min.
4. Rescatar el sobrenadante

Buffer:

- 200 µL de 1M Tris-HCl pH 7.95.
- 50 µL de CaCl<sub>2</sub> µM.
- 1 mL de Triton X-100.