

Ensamblaje *de novo* y Anotación Funcional *in silico* de las Toxinas Encontradas en la Glándula de Duvernoy de las Serpientes *Boiruna sertaneja* y *Erythrolamprus aesculapii*.

Brayan Fahir Castillo Calderón

Trabajo de Grado para Optar al Título de Biólogo

Tutor

Juan David Bayona Serrano

Biólogo

Co-tutor

Hermínsul de Jesús Cano Calle

Doctor en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2022

Dedicatoria

A Ana Rosa López, quien cuidó de mí como una madre y su destello en vida guío mis pasos hacia días felices. Ahora su memoria brillará por siempre cerca de mí. Este logro también es tuyo, abuelita, quien desde el cielo me acompaña y compartes esta gran felicidad conmigo.

Agradecimientos

A mi mamá, quien dio lo mejor de sí misma para enseñarme las cosas bellas de la vida y por sacarme adelante. Sin tu esfuerzo y dedicación no sería lo que soy. ¡Te amo madre!

A mi papá, que me ha enseñado mil cosas valiosas en la vida y a ser objetivo en muchas decisiones. Gracias por ser también un gran amigo.

A mi abuelita Transito, quien ha vivido siempre a mi lado y ha sido mi apoyo incondicional. ¡Gracias por tanto!

A Néstor Sanabria, quien me hizo sentir como un hijo y miembro más de la familia. Siempre estaré agradecido.

A Héctor Manuel Calderón, quien más que un tío, fue el hermano mayor que no tuve, un guía espiritual y consejero enorme.

A mis hermanitos y hermanitas, que en ellos puedo recordar mi infancia y sonreír de nuevo como un niño. Espero siempre que nuestra unión siga bella y firme.

¡A toda mi familia, su ejemplo y apoyo han forjado en mi lo que soy!

A María Alejandra Navarro, quien con su inmejorable ser, ha estado incondicionalmente conmigo cuando más lo necesité. ¡Gracias por tantas sonrisas y momentos bellos!

A Juan Sebastián Navarro, quien me abrió las puertas de su casa para sacar adelante nuestros estudios en este “mundo de los venenos”.

A todos mis amigos, que fueron compinches y compañeros de estudio, no se imaginan lo feliz que me siento de dar con cada uno de ustedes.

Un agradecimiento especial para Juan David Bayona, quien es ejemplo, maestro y parcerero. Sin él no hubiera podido sacar este trabajo adelante. ¡Gracias!

Al profesor Herminsul de Jesús Cano, quien confió en mi y brindó tiempo y ayuda en estos últimos años.

Al profesor Francisco José Martínez, quien confió en mí, me brindó consejos y fue una guía en mis estudios de pregrado.

Contenido

	Pág.
Introducción	14
1. Objetivos	17
1.1 Objetivo General	17
1.2 Objetivos Específicos	17
2. Competencias adquiridas	18
3. Metodología	19
3.1 Procesamiento de Lecturas Brutas Obtenidas a partir de Secuenciación Illumina™	19
3.2 Ensamblaje <i>de novo</i> de los transcriptomas	20
3.3 Identificación de las Toxinas	21
3.4 Análisis de Cobertura y Contigs Quiméricos	22
3.5 Obtención de los Perfiles Composicionales de la Glándula de Duvernoy	23
3.6 Alineamiento de Secuencias y Modelado Estructural de las Proteínas Reportadas	23
4. Resultados	24
4.1 Ensamblaje <i>de novo</i> de los Transcriptomas	24
4.2 Anotación de las Toxinas a partir de los Contigs Ensamblados	26
4.3 Análisis de Cobertura y Contigs Quiméricos	27
4.4 Familias Reportadas en la glándula De Duvernoy de <i>B. sertaneja</i> y <i>E. aesculapii</i>	31

4.4.1 Toxinas Validadas en <i>B. sertaneja</i>	31
4.4.2 Toxinas Validadas en <i>E. aesculapii</i>	32
4.5 Perfiles Composicionales de la Glándula de Duvernoy.....	34
4.5.1 Individuo 1 de <i>B. sertaneja</i>	34
4.5.2 Individuo 2 de <i>B. sertaneja</i>	36
4.5.3 Individuo 3 de <i>B. sertaneja</i>	38
4.5.4 Individuo 1 de <i>E. aesculapii</i>	40
4.5.5 Individuo 2 de <i>E. aesculapii</i>	42
4.5.6 Individuo 3 de <i>E. aesculapii</i>	43
5. Discusión.....	46
5.1 Ensamblaje del Transcriptoma de <i>B. sertaneja</i> y <i>E. aesculapii</i>	46
5.2 Familias de toxinas Reportadas en <i>B. sertaneja</i> y <i>E. aesculapii</i>	46
5.3 Componentes Tóxicos en la Glándula de Duvernoy.....	47
5.3.1 MMPs: Un Nuevo Grupo de Metalopeptidasas en los Venenos de Serpiente.....	47
5.3.2 Metalopeptidasas de Veneno de Serpiente (SVMPs) encontradas en la Glándula de Duvernoy.....	52
5.3.3 Fosfolipasas A2 de tipo IIE (PLA2-IIE) Reportados y su Clasificación.....	56
5.3.4 Lectinas Tipo C (CTL) reportadas.....	60
5.3.5 Proteínas Secretoras Ricas en Cisteína (CRISP) Reportadas.....	62
5.4 Grupos de Toxinas Menores.....	63
5.5 Variación en la Composición del Veneno de <i>B. sertaneja</i> y <i>E. aesculapii</i>	66
5.5.1 Variación Interespecífica entre <i>B. sertaneja</i> y <i>E. aesculapii</i>	66
5.5.2 Variación Intraespecífica en <i>B. sertaneja</i>	68

5.5.3 Variación Intraespecífica en <i>E. aesculapii</i>	70
5.6 Efectos.....	71
5.6.1 Efectos de SVMPs	72
5.6.2 Efectos de MMPs.....	74
5.6.3 Efectos de CRISP.....	76
5.6.4 Efectos de PLA ₂	76
5.6.5 Efectos de CTLs.....	78
6. Conclusiones.....	80
Referencias Bibliográficas	82

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Comparación del Ensamblaje de los 3 Individuos de B. sertaneja</i>	26
Tabla 2. <i>Comparación del Ensamblaje de los 3 Individuos de E. aesculapii</i>	26
Tabla 3. <i>Toxinas sin Curar y Curadas para cada Individuo de las Dos Especies Después de la Anotación</i>	27
Tabla 4. <i>Presencia y Ausencia de Toxinas Curadas Luego del Ensamblaje</i>	30
Tabla 5. <i>Tipos de CTLs y cantidad de isoformas encontradas en B. sertaneja y E. aesculapii</i> ...	61

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. <i>Perfiles de Mapeo de Lectura Buenos y Malos</i>	29
Figura 2. <i>Niveles de Expresión Génica en B. sertaneja y E. aesculapii</i>	33
Figura 3. <i>Perfil Composicional del Individuo 1 de B. sertaneja</i>	35
Figura 4. <i>Perfil Composicional del Individuo 2 de B. sertaneja</i>	37
Figura 5. <i>Perfil Composicional del Individuo 3 de B. sertaneja</i>	39
Figura 6. <i>Perfil Composicional del Individuo 1 de E. aesculapii</i>	41
Figura 7. <i>Perfil Composicional del Individuo 2 de E. aesculapii</i>	43
Figura 8. <i>Perfil Composicional del Individuo 3 de E. aesculapii</i>	45
Figura 9. <i>Estructura de las MMPs Reportadas en B. sertaneja y E. aesculapii</i>	49
Figura 10. <i>Modelo Evolutivo de las svMMPs Propuesto a Través de Pérdidas de Dominio</i>	50
Figura 11. <i>Estructura de las SVMP-PIII reportadas en los individuos de B. sertaneja y E. aesculapii</i>	54
Figura 12. <i>Modelo Evolutivo de las SVMPs Propuesto a través de Pérdidas de Dominio</i>	54
Figura 13. <i>Dominios Estructurales de las PLA₂</i>	57

Lista de Apéndices

Apéndice A. Alineamiento de las MMPs reportadas en *B. sertaneja* y *E. aesculapii*

Apéndice B. Alineamiento entre las SVMP-PIII reportadas en *B. sertaneja* y los subtipos de diferentes SVMPs

Apéndice C. Alineamiento entre las PLA₂-IIE reportadas en *B. sertaneja* y las PLA₂-IA y PLA₂-IIA

Apéndice D. Alineamiento de las diferentes CTLs (Snaclecs y Verdaderas)

Apéndice E. Alineamiento de las CRISP reportadas en las familias Elapidae, Colubridae y Viperidae

Apéndice F. Localidades de *B. sertaneja* y *E. aesculapii*

Nota. Los apéndices están adjuntos y puede visualizarlos en la base de datos de la biblioteca UIS

Glosario

3FTx: Toxinas de 3 Dedos

5'NUCL: 5' Nucleotidasas

ACES: Acetilcolinesterasas

CNP: Péptidos Natriuréticos Tipo C

CRISP: Proteínas Secretoras Ricas en Cisteína

CTL: Lectinas Tipo C

CYST: Cistatina

DIES: Diesterasas

DPP: Dipeptidil Peptidasas

FactV: Factor V de Veneno de Serpiente

HYAL: Hialuronidasas

KU-WAP: Proteínas fusión KU-WAP

OHAN: Ohanina

PLA₂: Fosfolipasa A₂

PLA₂i: Inhibidores de Fosfolipasas A₂

PLA₂-IIE: Fosfolipasas A₂ Tipo IIE

PLB: Fosfolipasas Tipo B

seMMP-9: Metalopeptidasas de Matriz Endógenas

SVLIPA: Lipasas Ácidas de Veneno de Serpiente

svMMP-A: Metalopeptidasas de Matriz de Veneno de Serpiente Tipo A

svMMP-B: Metalopeptidasas de Matriz de Veneno de Serpiente Tipo B

svMMPs: Metalopeptidasas de Matriz de Veneno de Serpiente

SVMP-PIII: Metalopeptidasas de Veneno de Serpiente Tipo III

SVMPs: Metalopeptidasas de Veneno de Serpiente

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

WAP: Waprina

Resumen

Título: Ensamblaje *de novo* y anotación funcional *in silico* de las toxinas encontradas en la glándula de Duvernoy de las serpientes *Boiruna sertaneja* y *Erythrolamprus aesculapii**

Autor: Castillo-Calderón, Brayan Fahir**

Palabras Clave: *Boiruna sertaneja*, *Erythrolamprus aesculapii*, Ensamblaje, Toxinas, Secuenciación, Venenos.

Descripción: Durante más de un siglo, los venenos de serpiente se han sometido a análisis mediante técnicas de primera generación, que incluyen la química de proteínas, la farmacología comparativa y los métodos cladísticos generados de la biología evolutiva. Además, los avances en biología molecular, particularmente en las llamadas técnicas de secuenciación “ómicas” (Genómica, Transcriptómica y Proteómica) ampliaron la comprensión de la composición y catalogación de los venenos. En la actualidad, los métodos de nueva generación, en los cuales se incluyen la secuenciación transcriptómica (RNA-seq), la secuenciación genómica y la espectrometría de masas de alta resolución, han acelerado la obtención de secuencias y los análisis composicionales, sentando las bases para la exploración biotecnológica a gran escala de los venenos de serpiente. Debido a que la mayoría de información importante de las familias y superfamilias de toxinas reportadas, ha sido a partir de venenos de serpientes que principalmente representan un riesgo para la salud humana (Viperidae, Elapidae y Atractaspididae), la diversidad de toxinas en serpientes productoras de veneno no se ha evaluado de forma homogénea en todos los grupos, dejando un enorme vacío en el conocimiento del repertorio de toxinas en especies pertenecientes a la familia Colubridae. En la presente pasantía se ensamblaron *de novo* los transcriptomas de la glándula de Duvernoy de *Boiruna sertaneja* y *Erythrolamprus aesculapii* utilizando diferentes tipos de software en el proceso de ensamblaje (enfoque híbrido), identificando un total de 20 familias de toxinas, siendo las SVMP-PIII, CRISPs y CTLs las familias de toxinas predominantes en la glándula de Duvernoy de los individuos estudiados de estas dos especies. Además, se identificaron dos familias de toxinas (MMPs y PLA₂-IIE) que han sido poco reportadas en los venenos de serpientes.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Tutor: Juan David Bayona Serrano. Biólogo. Cotutor: Herminsul de Jesús Cano Calle. Doctor en Química.

Abstract

Title: *De novo* assembly and *in silico* functional annotation of toxins found in the Duvernoy gland of *Boiruna sertaneja* and *Erythrolamprus aesculapii* snakes *

Author(s): Castillo-Calderón, Brayan Fahir**

Key Words: *Boiruna sertaneja*, *Erythrolamprus aesculapii*, Assembly, Toxins, Sequencing, Poisons.

Description: For more than a century, snake venoms have been subjected to analyses using first-generation techniques, including protein chemistry, comparative pharmacology, and cladistic methods generated from evolutionary biology. In addition, advances in molecular biology, particularly in the so-called "omics" sequencing techniques (Genomics, Transcriptomics and Proteomics) broadened the understanding of the composition and cataloging of poisons. Today, new-generation methods, including transcriptomic sequencing (RNAseq), genomic sequencing, and high-resolution mass spectrometry, have accelerated sequencing and compositional analysis, laying the groundwork for large-scale biotechnological exploration of snake venoms. Because most of the important information on toxin families and superfamilies reported has been from snake venoms that primarily pose a risk to human health (Viperidae, Elapidae, and Atractaspididae), the diversity of toxins in toxin-producing snakes has not been evaluated homogeneously in all groups, leaving a huge gap in the knowledge of the repertoire of toxins in species belonging to the Colubridae family. In this internship, the transcriptomes of the Duvernoy gland of *Boiruna sertaneja* and *Erythrolamprus aesculapii* were assembled *de novo* using different types of software in the assembly process (hybrid approach), identifying a total of 20 families of toxins, being SVMP-PIII, CRISPs and CTLs the main families of toxins in the Duvernoy's gland of the studied individuals of these two species. In addition, it was possible to identify two families of toxins (MMPs and PLA₂-IIE,) that have been scarcely reported in snake venoms.

* Bachelor thesis

** Science Faculty. School of Biology. Director: Juan David Bayona Serrano. Biologist. Co-director: Herminul de Jesús Cano Calle. Doctor in Chemistry.

Introducción

Los venenos de serpiente, durante más de un siglo se han sometido a análisis mediante técnicas de primera generación, que incluyen la química de proteínas, la farmacología comparativa y los métodos cladísticos generados de la biología evolutiva (Mackessy et al., 2021). Además, los avances en biología molecular, particularmente en las llamadas técnicas de secuenciación “ómicas” (Genómica, Transcriptómica y Proteómica) ampliaron la comprensión de la composición y catalogación de los venenos (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016). En la actualidad, los métodos de nueva generación, en los cuales se incluyen la transcriptómica de secuenciación profunda (RNA-seq), la secuenciación genómica y la espectrometría de masas de alta resolución (Brahma et al., 2015; Calvete, 2013; Ducancel et al., 2014), han acelerado la obtención de secuencias y los análisis composicionales sentando las bases para la exploración biotecnológica a gran escala de los venenos de serpiente (Gilles y Servent, 2014).

Estos estudios han creado bases de datos con información importante acerca de las familias y superfamilias de toxinas presentes, principalmente, en especies que representan un riesgo para la salud humana. Además, profundizaron el conocimiento de las abundancias relativas, las modificaciones postraduccionales y la conservación estructural de proteínas en diferentes géneros (Aird et al., 2013, 2015; Chapeaurouge et al., 2015; Durban et al., 2011). Las diferencias observadas en la composición del veneno entre grupos relacionados se están convirtiendo en un modelo interesante para hacer inferencias evolutivas sobre la especiación y diversificación ecológica de las especies (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016). A su vez, la asociación de toxinas cuantificadas con actividades demostradas empíricamente ha permitido

predecir los roles funcionales que estas juegan en la ecología de las especies que las producen (Casewell et al., 2014; Facente et al., 2015; Gibbs y Mackessy, 2009).

Sin embargo, debido a que la mayoría de estos esfuerzos fueron impulsados por intereses antropocéntricos para comprender las toxinas que causan cuadros de envenenamiento, se dio prioridad al estudio de especies pertenecientes a las familias de serpientes Viperidae, Elapidae y Atractaspidae (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016; Uetz et al., 2021). Esto causó que la diversidad de toxinas en serpientes productoras de veneno no se evaluara de forma homogénea en todos los grupos, dejando un enorme vacío en el conocimiento del repertorio de toxinas en especies pertenecientes a la familia Colubridae (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016; Modahl et al., 2015). Estas poseen una capacidad limitada para inyectar una dosis letal de veneno en los seres humanos, disminuyendo la probabilidad de una ofidiotoxicosis grave, lo que se refleja en un menor número de trabajos enfocados en caracterizar sus toxinas y describir la actividad biológica de sus venenos (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016).

Debido a que pocos estudios se han centrado en los venenos de colúbridos, y las pocas secuencias de toxinas que se han obtenido provienen de técnicas como la purificación/secuenciación directa de proteínas, análisis proteómicos y/o técnicas de secuenciación de baja resolución, existe una necesidad de aumentar la cantidad de toxinas completas reportadas en bases de datos para esta familia (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016). Además, la información sobre los tipos de toxinas que dominan los venenos de estos grupos poco estudiados puede ser una herramienta vital para entender su evolución y cómo los venenos han moldeado la diversidad de especies, ecologías o nichos tróficos (Bayona-Serrano et al., 2020; Modahl et al., 2015). Por otro lado, la mayoría de las especies de colúbridos no cuentan con un genoma de referencia, haciendo necesario el uso de softwares que ensamblen *de novo* los contigs

de toxinas encontrados, para incrementar la eficacia del ensamblaje del transcriptoma y la anotación de toxinas de la glándula de Duvernoy (Bayona-Serrano et al., 2020; Junqueira-de-Azevedo et al., 2016; Rokyta et al., 2012). Por ende, realizar un enfoque híbrido usando diferentes softwares especializados en el ensamblaje *de novo*, causa un mayor aprovechamiento de las ventajas que posee cada uno, para generar un conjunto de datos de secuencia más completas.

El proyecto dentro del cual se enmarca esta pasantía ya posee lecturas brutas obtenidas de la secuenciación Illumina™ de las librerías de cDNA construidas a partir del RNA total extraído del veneno de serpientes pertenecientes a la familia Colubridae. Por ende, se hizo uso de dichos datos para caracterizar las toxinas encontradas en el transcriptoma de la glándula de Duvernoy de las serpientes *Boiruna sertaneja* y *Erythrolamprus aesculapii*, proporcionando un catálogo actualizado de proteínas que se encontraron en los venenos de estas especies y aportando información nueva sobre los posibles efectos de estos.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Caracterizar las toxinas encontradas en el transcriptoma de la glándula de Duvernoy de las serpientes *Boiruna sertaneja* y *Erythrolamprus aesculapii*.

1.2 Objetivos Específicos

Procesar las lecturas brutas obtenidas de la secuenciación Illumina™ de las librerías cDNA construidas a partir del RNA total extraído del veneno de las serpientes *Boiruna sertaneja* y *Erythrolamprus aesculapii*.

Ensamblar *de novo* los transcriptomas de la glándula de Duvernoy de las serpientes *Boiruna sertaneja* y *Erythrolamprus aesculapii*.

Identificar las toxinas presentes en las glándulas de Duvernoy de las serpientes *Boiruna sertaneja* y *Erythrolamprus aesculapii*, mediante anotación y revisión manual.

Determinar la presencia de contigs quiméricos mediante un análisis de cobertura.

Obtener un perfil composicional de los contigs presentes en las glándulas de Duvernoy de las serpientes *Boiruna sertaneja* y *Erythrolamprus aesculapii*.

2. Competencias adquiridas

Entender las bases metodológicas de un análisis de RNA-seq desde la extracción de las muestras, la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS), el procesamiento previo de las lecturas obtenidas y los algoritmos de ensamblaje *de novo* de los contigs.

Familiarizarse con los diferentes softwares **(1)** de edición de datos transcriptómicos, **(2)** de ensamblaje *de novo* y **(3)** de cálculo de expresión génica.

Comprender los diferentes métodos que se utilizan para calcular la expresión de datos obtenidos con Secuenciación de Nueva Generación (NGS) y aplicar estas herramientas para describir la composición de los transcriptomas de las especies estudiadas.

Identificar la presencia de artefactos de ensamblaje como contigs quiméricos realizando un análisis de cobertura.

Aprender a realizar el proceso de revisión y curación manual de las diferentes toxinas, demostrando conocimiento estructural sobre los diferentes tipos de dominios proteicos presentes en cada una de ellas.

3. Metodología

3.1 Procesamiento de Lecturas Brutas Obtenidas a partir de Secuenciación Illumina™

Para la presente pasantía se utilizaron un total de 6 conjuntos de datos de lecturas Illumina™ pareadas obtenidas de librerías de cDNA. Estas fueron construidas a partir del RNA total extraído de la glándula de Duvernoy de 3 individuos de *B. sertaneja* y de 3 individuos de *E. aesculapii*. Las lecturas utilizadas fueron obtenidas dentro del marco del proyecto “Análises venômicas de serpentes Dipsadidae focando em adaptações à ofiofagia.” (Proceso número 2017/24498-9 de la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP) que se está desarrollando en el Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA) del Instituto Butantan, siguiendo la metodología descrita por Bayona-Serrano et al. (2020). Las lecturas sin procesar que pasaron el filtro de calidad de Illumina, se editaron para remover los adaptadores de secuenciación, verificando la existencia de contaminación cruzada y finalmente se fusionaron sobre la base de sus superposiciones 3' (Krueger, 2015; Rokyta et al., 2012; Zhang et al., 2014).

La existencia de contaminación cruzada entre las lecturas de las muestras sin procesar que pasaron el filtro de calidad de Illumina se determinó con un script de python que implementa los softwares Jellyfish (Marçais y Kingsford, 2011) y k-mer Analysis Toolkit (KAT) (Mapleson et al., 2017), teniendo en cuenta los siguientes parámetros: **1)** Los k-mers que en una muestra **X** tuvieron conteos superiores a 1000 se consideraron para otras muestras **Y** como posibles contaminantes y **2)** Los k-mers con conteos menores a $k\text{-mers con } > \text{frecuencia}/1000$ en una muestra **Y** que concordaron con los determinados para otra muestra **X** en el parámetro 1, se consideraron contaminantes dentro de la muestra **Y** (Bayona-Serrano et al., 2020). A las lecturas

de extremos pareados de 150 pb sin procesar se le removieron los adaptadores de secuenciación y se conservaron únicamente las que poseían una longitud superior a 75 pb y aquellas que contaran con un score PHRED de determinación de bases igual o superior a 5 utilizando TrimGalore v. 0.6.6 (Krueger, 2015). Posteriormente, se utilizó FastQC (Andrews, 2010) para confirmar la calidad de las lecturas, ya que en Illumina™ se ha observado una tendencia a disminuir la confiabilidad de la secuencia en los extremos 3' (Zhang et al., 2014). Finalmente, las lecturas que pasaron el filtro de calidad se fusionaron sobre la base de sus superposiciones en sus extremos 3' empleando el software PEAR v. 0.9.6 con parámetros por defecto (Rokyta et al., 2012; Zhang et al., 2014).

3.2 Ensamblaje *de novo* de los transcriptomas

El ensamblaje *de novo* de las 6 muestras obtenidos de los transcriptomas de las glándulas de Duvernoy de *B. sertaneja* y *E. aesculapii*, se realizó mediante 3 métodos de ensamblaje diferentes: **1)** Trinity v. 2.8.5 (Grabherr et al., 2011), con longitud de k-mer 31, **2)** Extender v. 1.0 (Rokyta et al., 2012) utilizó 1000 lecturas combinadas como semillas, extendiendo las semillas en función de superposiciones exactas de 120 pares de bases, y **3)** rnaSPAdes v. 3.14.1 (Bushmanova et al., 2018), con longitud de k-mer 75. Trinity es el ensamblador más eficiente desde el punto de vista computacional, pero generalmente hace un mal trabajo ensamblando secuencias codificantes de toxinas completas, y suele generar secuencias quiméricas (Archer et al., 2014). Extender es eficaz para generar contigs más largos, pero tiende a ensamblar solo aquellos altamente expresados (Rokyta et al., 2012). Finalmente, rnaSPADES, ensambla un número relativamente alto del total de genes esperados (entre el 50% y 95%), sin embargo, presenta errores a la hora de realizar el ensamblaje, y una tasa de duplicación moderada (Bayona-

Serrano et al., 2020; Bushmanova et al., 2018; Holding et al., 2018). Posteriormente, para cada set de datos de *B. sertaneja* y *E. aesculapii* se concatenaron los resultados de estos 3 ensambladores en un archivo final, el cual se utilizó para evaluar la calidad e integridad mediante la búsqueda de un conjunto de 233 genes centrales de vertebrados utilizando Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs (BUSCO v5) implementado en gVolante2 (Manni et al., 2021; Nishimura et al., 2017).

3.3 Identificación de las Toxinas

La anotación de las toxinas para cada una de las 3 muestras correspondientes a *B. sertaneja* se realizó inicialmente mediante el script ToxinHunter (<https://github.com/gebarros/ToxinHunter>) como ha sido previamente descrito (Bayona-Serrano et al., 2020). Para llevar a cabalidad la anotación de toxinas, ToxinHunter implementa dos algoritmos de BLAST de la siguiente forma: **1)** ToxinHunter realiza un alineamiento con el algoritmo incorporado en tBlastN de 381 toxinas de referencia (banco de datos) contra los contigs previamente ensamblados. Posteriormente, los transcritos con una cobertura $\geq 90\%$ se seleccionan, y así, predecir los marcos abiertos de lectura utilizando el software TransDecoder v. 5.5.0 (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder>); **2)** Posteriormente, ToxinHunter utiliza el algoritmo de BlastP con el fin de alinear los marcos abiertos de lectura de los contigs seleccionados contra las toxinas de referencia. Finalmente, ToxinHunter filtra y realiza una anotación de los marcos abiertos de lectura, para eliminar redundancias y generar 4 archivos de salida: **(a)** secuencias aminoacídicas con una cobertura $\geq 90\%$ e identidad $\geq 50\%$ contra las toxinas incluidas en el banco de datos; **(b)** secuencias nucleotídicas con una cobertura $\geq 90\%$ e identidad $\geq 50\%$ contra las toxinas incluidas en el banco de datos; **(c)** secuencias aminoacídicas

con una cobertura $\geq 90\%$ e identidad $\leq 50\%$ contra las toxinas incluidas en el banco de datos; y (d) secuencias aminoacídicas con una cobertura entre el 50% y el 89.99% y una identidad $\geq 50\%$ contra las toxinas incluidas en el banco de datos. Posteriormente, se combinaron los resultados obtenidos de los tres ensambladores utilizados en el ensamblaje *de novo* de los transcriptomas, y la revisión de cada transcrito se realizó de forma manual con la ayuda de búsquedas en las aplicaciones BlastN y BlastX (Altschul et al., 1990) con un valor de corte e-value de $1e^{-6}$. Finalmente, se identificó el marco abierto de lectura (ORF) correcto, el cual contenía los dominios esperados para cada clase de toxina anotada, revisando a la par la existencia de un péptido señal en cada ORF con la herramienta SignalP v5.0 Server (Almagro et al., 2019).

3.4 Análisis de Cobertura y Contigs Quiméricos

Para la identificación de contigs quiméricos en las toxinas previamente curadas, se utilizó el script ChimeraKiller v. 0.7.4 (<http://github.com/masonaj157/ChimeraKiller>), con el cual se analizó la distribución de las lecturas para cada posición del transcrito. Un transcrito se consideró como quimérico cuando los sesgos distribucionales de las lecturas fueron mayores al 75% hacia cada lado en cada posición del transcrito (Krueger, 2015). Siendo esta una aproximación similar a la descrita por Bayona-Serrano et al. (2020). Las lecturas que se utilizaron para el ensamblaje fueron mapeadas contra los contigs previamente curados, para determinar irregularidades en el perfil de cobertura en contigs quiméricos (Kerkvliet et al., 2019). Finalmente, para determinar el nivel de expresión de los contigs ensamblados en cada una de las especies, se tomaron aquellos contigs finales que pasaron el filtro de cobertura, y se agruparon con un 99% de identidad usando el software CD-HIT (Fu et al., 2012). El resultado final, fue un archivo con una lista no redundante de toxinas para cada individuo.

3.5 Obtención de los Perfiles Composicionales de la Glándula de Duvernoy

Para la obtención de los perfiles composicionales de la glándula de Duvernoy, se realizó una búsqueda con BlastN utilizando los contigs generados en el ensamblaje con Trinity, contra la lista de toxinas finales de cada individuo generadas previamente en el inciso 3.4, con un e-value de $1e^{-5}$; un puntaje (Match – Mismatch) de 2 a 3 y un costo del GAP de 52 (Bayona-Serrano et al., 2020). Posteriormente, se removieron todos los contigs del ensamblaje Trinity que tuvieran por lo menos una coincidencia contra el banco de datos de toxinas, para obtener un ensamblaje libre de contigs tóxicos. Luego, el conjunto de contigs no tóxicos se fusionó con las toxinas finales reportadas, generando un archivo que corresponde al transcriptoma completo de la glándula de Duvernoy de cada individuo, el cual se utilizó para determinar los niveles de expresión de todos los contigs ensamblados para cada individuo utilizando el software RSEM v. 1.3.3 (Li y Dewey, 2011). Las lecturas de cada muestra fueron mapeadas utilizando el software Bowtie2 v. 2.4.4 (Langmead y Salzberg, 2012) y los datos de expresión se calcularon en Transcritos por Millón (TPM) como se ha descrito previamente (Bayona-Serrano et al., 2020). Finalmente se realizaron gráficos comparativos, con el fin de mostrar la diferencia entre presencia y ausencia de diferentes toxinas entre las especies estudiadas. Los resultados expresados en TPM fueron tabulados y la intensidad del color es directamente proporcional al valor de TPM x log.

3.6 Alineamiento de Secuencias y Modelado Estructural de las Proteínas Reportadas

Para la obtención de los alineamientos (Apéndices A, B, C, D y E) de las diferentes toxinas encontradas en los individuos de *B. sertaneja* y *E. aesculapii*, fue necesario traducir las secuencias nucleotídicas en el servidor DNA to Protein Translation (Bikandi et al., 2004) y

posteriormente alinearlas con ayuda del servidor Clustal Omega (Sievers et al., 2011). Estos alineamientos fueron realizados para dar soporte a las proteínas modeladas. En seguida, para la obtención de los modelos estructurales de toxinas reportadas en *B. sertaneja* y *E. aesculapii* fueron necesarios 4 pasos. **1)** Los contigs de toxinas obtenidos de la glándula de Duvernoy de cada individuo, fueron revisados para seleccionar una secuencia de referencia por clase de toxina. **2)** Las secuencias de referencia nucleotídicas se tradujeron a sus respectivas secuencias proteicas con ayuda del servidor DNA to protein translation (Bikandi et al., 2004). **3)** Una vez obtenidas las secuencias proteicas, se utilizó el servidor SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018), donde se descargó la plantilla de cada modelado estructural de las proteínas. **4)** Finalmente, se visualizó y editó cada proteína utilizando el programa PyMOL Molecular Graphics System, v 2.5, Schrödinger, LLC. El modelaje fue realizado sólo para grupos de toxinas previamente desconocidas o poco reportadas en las glándulas de Duvernoy de la familia Colubridae (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016).

4. Resultados

4.1 Ensamblaje *de novo* de los Transcriptomas

Para cada uno de los individuos de *B. sertaneja* y *E. aesculapii* se realizó el ensamblaje (ver inciso **3.2**) con un enfoque híbrido de las lecturas obtenidas de Illumina™, con Trinity, rnaSPAdes y Extender. Posteriormente, se concatenaron los resultados de estos 3 ensambladores en un archivo final combinado. Este archivo se utilizó para evaluar la calidad e integridad del

ensamblaje del transcriptoma de la glándula de Duvernoy de cada uno de los individuos mediante la búsqueda del conjunto de 233 genes centrales de vertebrados utilizando BUSCO v5 implementado en gVolante (Manni et al., 2021; Nishimura et al., 2017). El resultado de esta evaluación arrojó **(a)** estadísticas de longitud y composición y **(b)** porcentajes del número de genes reportados por BUSCO v5 (Tablas 1 y 2). Entre las estadísticas de longitud y composición se puede observar los valores de longitud del contig más corto necesario para ensamblar el 50% del transcriptoma total (**N50**), el número de contigs necesarios para ensamblar el 50% del transcriptoma total (**L50**) y el porcentaje de contenido Guanina-Citocina (**%contenido de GC**); por otro lado, entre el número de genes reportados por busco se destacan la cantidad de genes completos (**Completo %**) y la cantidad de genes parciales (**Completo + Parcial %**) (Tabla 1 y 2). La evaluación de calidad e integridad del ensamblaje de las glándulas de Duvernoy de los 6 individuos evaluadas mediante BUSCO v5, logró recuperar en los individuos 1, 2 y 3 de *B. sertaneja* 81,12%, 82,40% y 76,39% respectivamente del grupo de los 233 genes centrales consultados en cada individuo. Por otro lado, en los individuos 1, 2 y 3 de *E. aesculapii* se recuperó el 75,11%, 73,39% y 68,67% respectivamente del grupo de los 233 genes centrales consultados en cada individuo (Tablas 1-2).

Tabla 1.*Comparación del Ensamblaje de los 3 Individuos de B. sertaneja*

Comparación del ensamblaje de 3 individuos de <i>B. sertaneja</i>				
Especie		<i>B. sertaneja</i> (1)	<i>B. sertaneja</i> (2)	<i>B. sertaneja</i> (3)
Estadísticas de longitud y composición	Número de secuencias	206846	232028	195211
	Longitud total (Mb)	215,37	243,63	200,18
	Longitud de secuencia N50	1574	1607	1553
	Recuento de secuencia L50	42644	46831	38983
	% Contenido GC	43,20%	43,21%	43,34%
Número de genes reportados por BUSCO	Completo (%)	171 (73.39%)	165 (70.82%)	153 (65.67%)
	Completo + Parcial (%)	189 (81.12%)	192 (82.40%)	178 (76.39%)
	Número de genes principales faltantes (%)	44 (18.88%)	41 (17.60%)	55 (23.61%)
	Número medio de ortólogos por genes centrales	4,51	4,83	4,54
	% de genes centrales detectados que tienen más de 1 ortólogo	95,32%	98,18%	98,04%

Nota. Tabla de genes reportados y estadísticas de longitud y composición de los 3 individuos de *B. sertaneja* obtenidas mediante una búsqueda en Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs. (BUSCO v5) implementado en gVolante2.

Tabla 2.*Comparación del Ensamblaje de los 3 Individuos de E. aesculapii*

Comparación del ensamblaje de 3 individuos de <i>E. aesculapii</i>				
Especie		<i>E. aesculapii</i> (1)	<i>E. aesculapii</i> (2)	<i>E. aesculapii</i> (3)
Estadísticas de longitud y composición	Número de secuencias	168603	182497	154713
	Longitud total (Mb)	173,11	188,02	150,15
	Longitud de secuencia N50	1537	1568	1415
	Recuento de secuencia L50	34582	37073	32981
	% Contenido GC	43,53%	43,47%	43,72%
Número de genes reportados por BUSCO	Completo (%)	138 (59.23%)	146 (62.66%)	119 (51.07%)
	Completo + Parcial (%)	175 (75.11%)	171 (73.39%)	160 (68.67%)
	Número de genes principales faltantes (%)	58 (24.89%)	62 (26.61%)	73 (31.33%)
	Número medio de ortólogos por genes centrales	1,62	4,25	4,15
	% de genes centrales detectados que tienen más de 1 ortólogo	44,20%	97,26%	97,48%

Nota. Tabla de genes reportados y estadísticas de longitud y composición de los 3 individuos de *E. aesculapii* obtenidas mediante una búsqueda en Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs (BUSCO v5) implementado en gVolante2.

4.2 Anotación de las Toxinas a partir de los Contigs Ensamblados

Los archivos finales de cada ensamblador fueron concatenados, como se denotó en el inciso 3.2, conteniendo los resultados obtenidos en los 3 individuos de *B. sertaneja* y los 3

individuos de *E. aesculapii*. Con este banco de datos se realizó la revisión de forma manual mediante búsquedas en las plataformas BlastN y BlastX, la identificación del marco abierto de lectura correcto y del péptido señal para cada contig ensamblado.

En *B. sertaneja* se retuvieron un total de 644 contigs en el individuo 1; 451 contigs en el individuo 2; y 546 contigs en el individuo 3 (Tabla 3). Para *E. aesculapii*, se retuvieron un total de 200 contigs en el individuo 1; 278 contigs en el individuo 2; y 317 contigs en el individuo 3. Este proceso de revisión manual para cada especie disminuyó el total de transcritos a ser analizados en etapas futuras como se evidencia en el total de toxinas para cada individuo (Tabla 3).

Tabla 3.

Toxinas sin Curar y Curadas para cada Individuo de las Dos Especies Después de la Anotación

Especie	Individuo	Total de toxinas sin curar	Total de toxinas curadas
<i>B. sertaneja</i>	1	683	644
	2	471	451
	3	591	546
<i>E. aesculapii</i>	1	225	200
	2	314	278
	3	338	317

Nota. En cada individuo se pueden observar el Total de toxinas sin curar y Total de toxinas curadas.

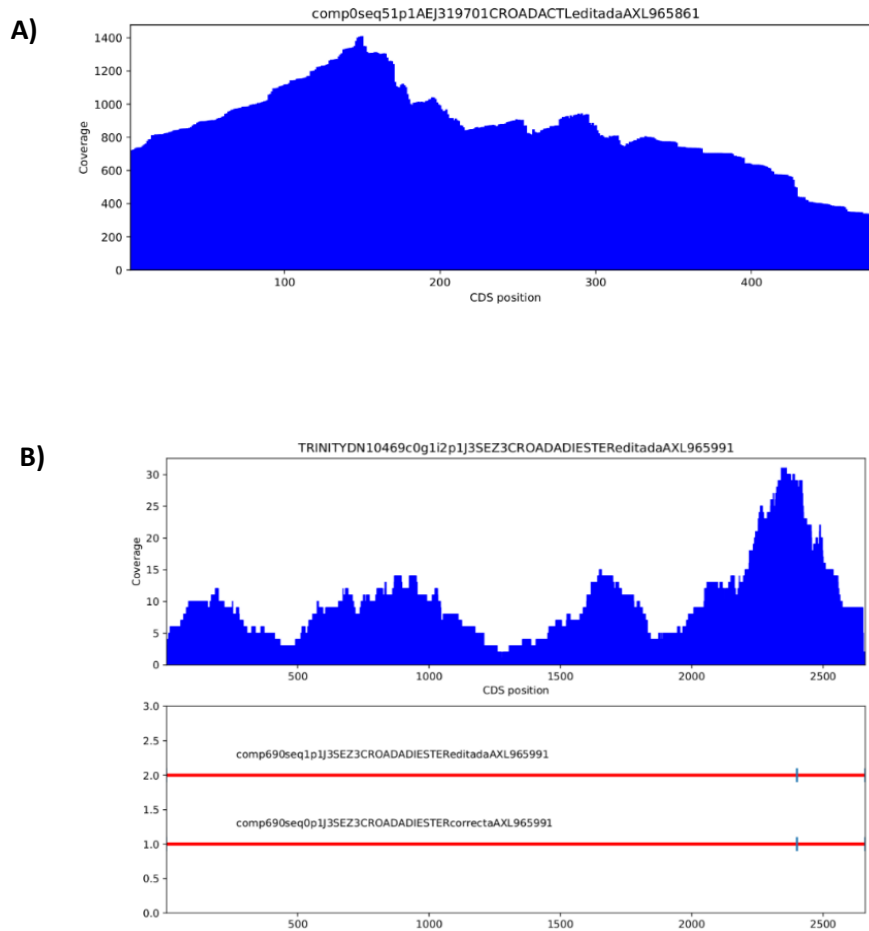
4.3 Análisis de Cobertura y Contigs Quiméricos

Para determinar si los perfiles de mapeo de lectura eran confiables, se consideraron transcritos con una distribución de lecturas (cobertura) homogénea con un sesgo distribucional menor a 75% hacia cada lado en cada posición del transcrito (Krueger, 2015) (Figura 1A). Secuencias quiméricas o resultantes de errores de ensamblaje presentan descensos o incrementos

abruptos en el número de lecturas mapeadas entre posiciones próximas (Nachtigall et al., 2021) (Figura 1B).

Los resultados obtenidos del análisis de cobertura de los contigs de toxinas curadas para cada individuo (Tabla 3) fueron revisados manualmente, de tal modo, que los perfiles de mapeo heterogéneos de lectura obtenidos, se eliminaron y no se tuvieron en cuenta en el presente estudio. Por otro lado, aquellos perfiles de mapeo de lectura homogéneos fueron considerados para determinar el nivel de expresión de los transcritos ensamblados en cada una de las especies (Bayona-Serrano et al., 2020; Krueger, 2015) (Figura 1A y 1B).

Tras excluir las secuencias con algún indicio quimérico o con patrones de cobertura muy heterogéneos, se completó la curación de las secuencias agrupándolas con CD-HIT con base a una identidad mayor a 99% entre grupos de secuencias para reducir la redundancia de los contigs ensamblados (Bayona-Serrano et al., 2020; Fu et al., 2012).

Figura 1.*Perfiles de Mapeo de Lectura Buenos y Malos*

Nota. El gráfico representa en la parte (A) un perfil de mapeo de lectura “confiable” o “bueno”; En la parte (B) representa un perfil de mapeo de lectura “poco confiable” o “malo”.

Una vez realizado el análisis de cobertura y la agrupación con CD-HIT para los 3 individuos de *B. sertaneja* se retuvieron un total de 44, 38 y 37 contigs de toxinas correctos en los individuos 1, 2 y 3 respectivamente. Se excluyeron 600 contigs en el individuo 1, 413 contigs en el individuo 2 y 509 contigs en el individuo 3. Por otro lado, en los 3 individuos de *E. aesculapii*, se retuvieron un total de 23, 20 y 25 contigs de toxinas correctos en los individuos 1,

2 y 3 respectivamente, además, se excluyeron 327 contigs para el individuo 1, 389 contigs para el individuo 2 y 419 contigs para el individuo 3. Por último, el conjunto de transcritos finales se ordenó y se clasificó en un total de 19 familias siguiendo la anotación inicial de ToxinHunter (Tabla 4). En *B. sertaneja* se encontraron 17 familias de toxinas, de las cuales 9 son de tipo enzimáticas y 8 no enzimáticas, mientras que en *E. aesculapii* se reportaron 14 familias de toxinas de las cuales 8 son de tipo enzimáticas y 6 de tipo no enzimáticas (Tabla 4).

Tabla 4.

Presencia y Ausencia de Toxinas Curadas Luego del Ensamblaje

	Familia de toxinas	<i>B. sertaneja</i>			<i>E. aesculapii</i>		
		1	2	3	1	2	3
Enzimáticas	PLA ₂	x	x	x			
	5'NUCL	x	x	x	x	x	x
	ACES				x	x	x
	DIES		x		x	x	x
	FactV	x	x	x			
	HVAL	x	x	x	x	x	x
	PLB	x	x	x	x	x	x
	SVLIPA	x	x	x	x	x	x
	MMPs	x	x	x	x	x	x
SVMPs	x	x	x	x	x	x	
No-Enzimáticas	3FTx				x	x	x
	CNP	x	x	x			
	CRISP	x	x	x	x	x	x
	CTL	x	x	x	x	x	x
	CYST	x	x	x	x	x	x
	KU-WAP		x	x			
	PLA _{2i}		x	x			
	VEGF	x	x	x	x	x	x
WAP	x	x	x	x		x	

Nota. Familias de toxinas enzimáticas y no-enzimáticas reportadas para cada individuo de *B. sertaneja* y *E. aesculapii*. Las familias de toxinas que están marcados con una (x) debajo de cada individuo representan la presencia de dicha familia de toxinas.

4.4 Familias Reportadas en la glándula De Duvernoy de *B. sertaneja* y *E. aesculapii*

En la Figura 2 se presentan las familias de toxinas validadas luego del análisis de cobertura, para ello, se utilizó un formato utilizado anteriormente (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016) con algunas modificaciones, recopilando los tipos de toxinas identificadas en tres grupos: **(A)** "*Componentes Principales del Veneno de Serpiente*", refiriéndose a los tipos de proteínas que generalmente se encuentran en grandes cantidades en los venenos de familias de serpientes venenosas, tales como Viperidae, Elapidae y Atractaspididae, y que ciertamente son de importancia médica (SVMPs, PLA₂s, SVSPs, 3FTxs) (Mackessy et al., 2021); **(B)** "*Componentes de Menor Ocurrencia del Veneno de Serpiente*", indicando los tipos de proteínas descritos en el veneno de algunas especies de serpientes venenosas, pero generalmente en bajas cantidades, y que pueden representar toxinas, proteínas secundarias del veneno o proteínas constitutivas (Mackessy et al., 2021); y **(C)** "*Posibles Nuevas Toxinas del Veneno de Colúbridos*", haciendo énfasis a los tipos de proteínas descubiertos en estudios recientes del veneno de colúbridos, ya sea en cantidades altas o bajas, y que pueden representar toxinas putativas, exclusivas o no exclusivas del grupo.

4.4.1 Toxinas Validadas en *B. sertaneja*

En esta especie, se observó una gran cantidad de contigs de SVMPs que representan uno de los componentes enzimáticos principales del veneno de serpiente (Calvete et al., 2009; Núñez et al., 2009). Entre los componentes no-enzimáticos principales del veneno de serpiente encontrados, se registran CTLs, CRISPs y CNPs (Figura 2).

Los componentes enzimáticos de menor ocurrencia del veneno de serpiente, fueron similares en los 3 individuos de *B. sertaneja*, reportándose 5'NUCL (únicamente en el individuo

2), FactV y HYAL (no reportadas en el individuo 2). Por otro lado, los componentes no-enzimáticos de menor ocurrencia del veneno de serpiente en cada uno de los 3 individuos fueron las CYST (únicamente en el individuo 2), VEGF y WAP. Finalmente, en los individuos 2 y 3 fueron reportados PLA_{2i} y KU-WAP (Doley et al., 2010) en el individuo 2 (Figura 2).

Entre las posibles nuevas toxinas enzimáticas del veneno de colúbridos se reportaron las SVLIPA, PLB, MMPs y PLA₂-IIE que difieren de las PLA₂ descritas en vipéridos y elápidos (IA/IIA). Finalmente, no se tiene registro de posibles nuevas toxinas no-enzimáticas del veneno de Colúbridos (Figura 2).

4.4.2 Toxinas Validadas en E. aesculapii

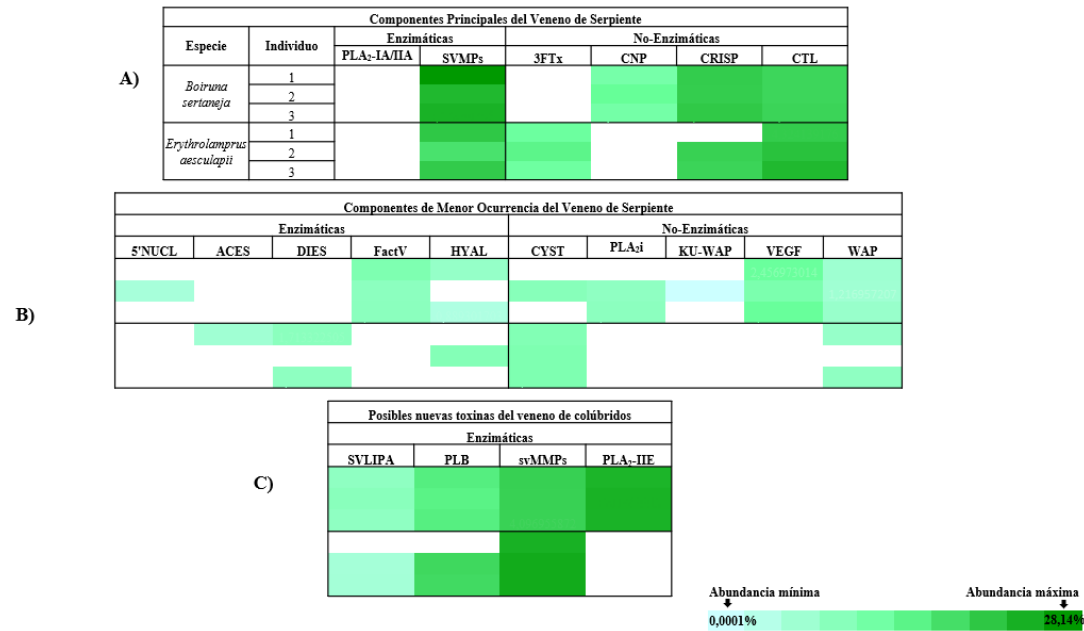
En esta especie, se observó una gran cantidad SVMPS, siendo estos, al igual que en *B. sertenjea*, los únicos componentes enzimáticos principales del veneno de serpiente reportados en los 3 individuos. Por otro lado, entre los componentes no-enzimáticos principales del veneno de serpiente se encontraron 3FTxs, CTLs y CRISPs en los individuos 2 y 3 (Figura 2).

En los componentes enzimáticos de menor ocurrencia del veneno de serpiente en los 3 individuos se reportan, ACES (individuo 1) y DIES (individuos 1 y 3), además, se encontró HYAL en el individuo 2. En el caso de los componentes no-enzimáticos de menor ocurrencia del veneno de serpiente se reportaron CYST y WAP en los individuos 2 y 3 (Figura 2).

Entre las posibles nuevas toxinas enzimáticas del veneno de Colúbridos, se reportaron SVLIPA, PLB y MMPs, siendo estas últimas, las toxinas con mayores niveles de expresión en los 3 individuos de *E. aesculapii*. Finalmente, no se encontró registro de posibles nuevas toxinas no-enzimáticas del veneno de Colúbridos en ninguno de los 3 individuos (Figura 2).

Figura 2.

Niveles de expresión génica en *B. sertaneja* y *E. aesculapii*



Nota. Representación de niveles de expresión génica en *B. sertaneja* y *E. aesculapii*. La abundancia se representa con un patrón de colores que varía desde un verde más claro (representación de una menor abundancia) hasta un verde más oscuro (representación de una mayor abundancia). En la parte (A) se representan los “**componentes principales del veneno de serpiente**”; En la parte (B) se representan los “**componentes de menor ocurrencia del veneno de serpiente**” y en la parte (C) se representan las “**posibles nuevas toxinas de venenos de colúbridos**”. La intensidad del color es directamente proporcional al valor de TPM x log.

4.5 Perfiles Composicionales de la Glándula de Duvernoy

Una vez se obtuvo el archivo del transcriptoma completo, incluyendo los transcritos de toxinas y de genes fisiológicos de la glándula de Duvernoy en cada individuo de *B. sertaneja* y *E. aesculapii*, se revisaron las diferentes isoformas (posibles parálogos) de cada clase de toxina, sus valores TPM (Transcritos Por Millón) y los porcentajes de expresión (Figuras 3-8).

4.5.1 Individuo 1 de *B. sertaneja*

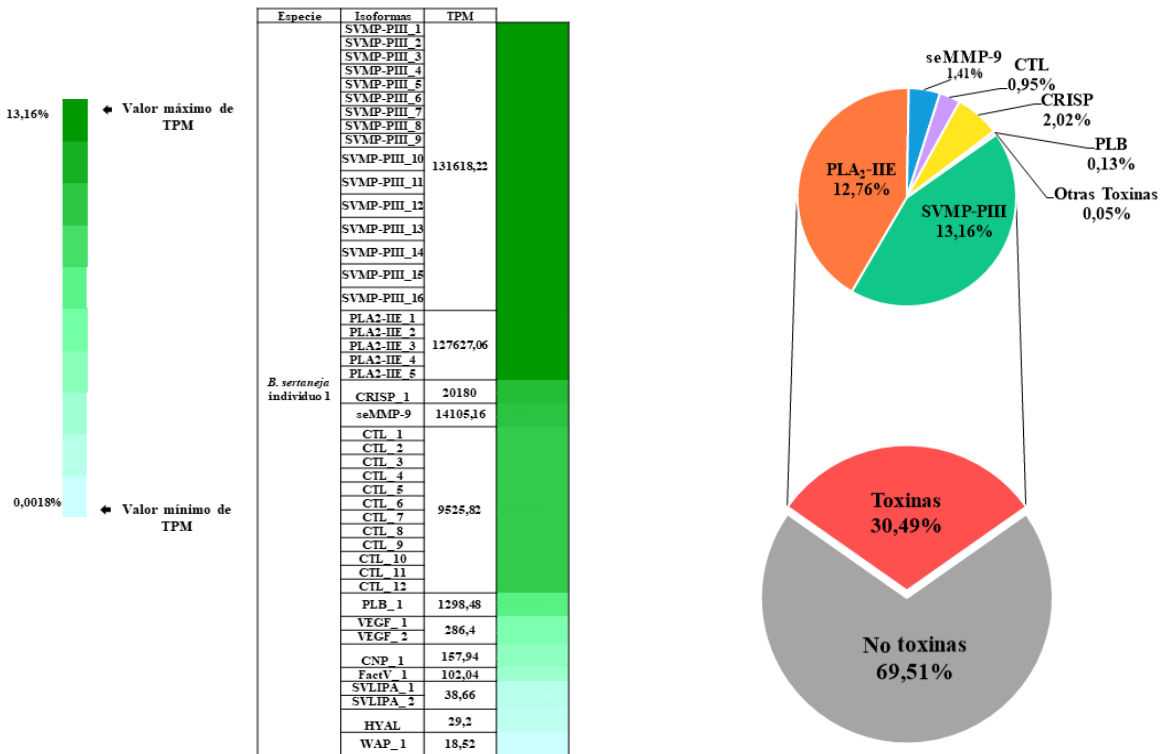
El perfil composicional del transcriptoma de la glándula de Duvernoy del individuo 1 de *B. sertaneja* (Figura 3), mostró un 69,51% de sus lecturas mapeando en contigs que no fueron anotados como toxinas y un 30,49% de estas mapeando en contigs tóxicos validados. De este porcentaje total de las toxinas reportadas en la glándula de Duvernoy, las toxinas principales son las SVMP-PIII, con un porcentaje del 13,16%, y un total de 16 isoformas. En seguida, se reportan como la segunda toxina con mayor abundancia las PLA₂-IIE, con un porcentaje de expresión del 12,76% y 5 isoformas en total. Finalmente, las CRISPs se reportaron como la tercera clase de toxina más abundante, con un porcentaje del 2,02% y 1 sola isoforma. Con una menor abundancia, se encontraron expresadas las MMPs (1,41%) y 1 isoforma; las CTLs (0,95%) y 12 isoformas; y las PLB (0,13%) y 1 sola isoforma.

Por otro lado, entre las toxinas menos expresadas se encontraron VEGF con un valor de TPM de 286,40, CNPs con un valor de TPM de 157,94, FactV con un valor de TPM de 102,04, SVLIPA con un valor de TPM de 38,66, HYAL con un valor de TPM de 29,20 y finalmente las WAP con un valor de TPM de 18,52. Respecto a las isoformas de cada toxina, se reportaron, tanto en las SVLIPA y las VEGF 2 isoformas (posibles parálogos), mientras que, en las CNPs,

FactV, HYAL y WAP se reportó únicamente 1 isoforma. Estas toxinas de menor relevancia, sólo representan el 0,05% de expresión total.

Figura 3.

Perfil Composicional del Individuo 1 de *B. sertaneja*



Nota. La tabla representa los valores obtenidos de Transcritos Por Millón (TPM) y cantidad de isoformas por toxina del individuo 1 de *B. sertaneja*, el color más oscuro representado en las barras de colores indica una mayor expresión de la toxina, mientras que el color más claro indica una menor expresión. La intensidad del color es directamente proporcional al valor de TPM x log. El perfil composicional representado en el diagrama de tortas, indica el porcentaje del total de toxinas del transcriptoma (30,49%). Las toxinas que aparecen en la tabla y no figuran en el perfil composicional, están incluidas dentro del porcentaje de otras toxinas (0,05%).

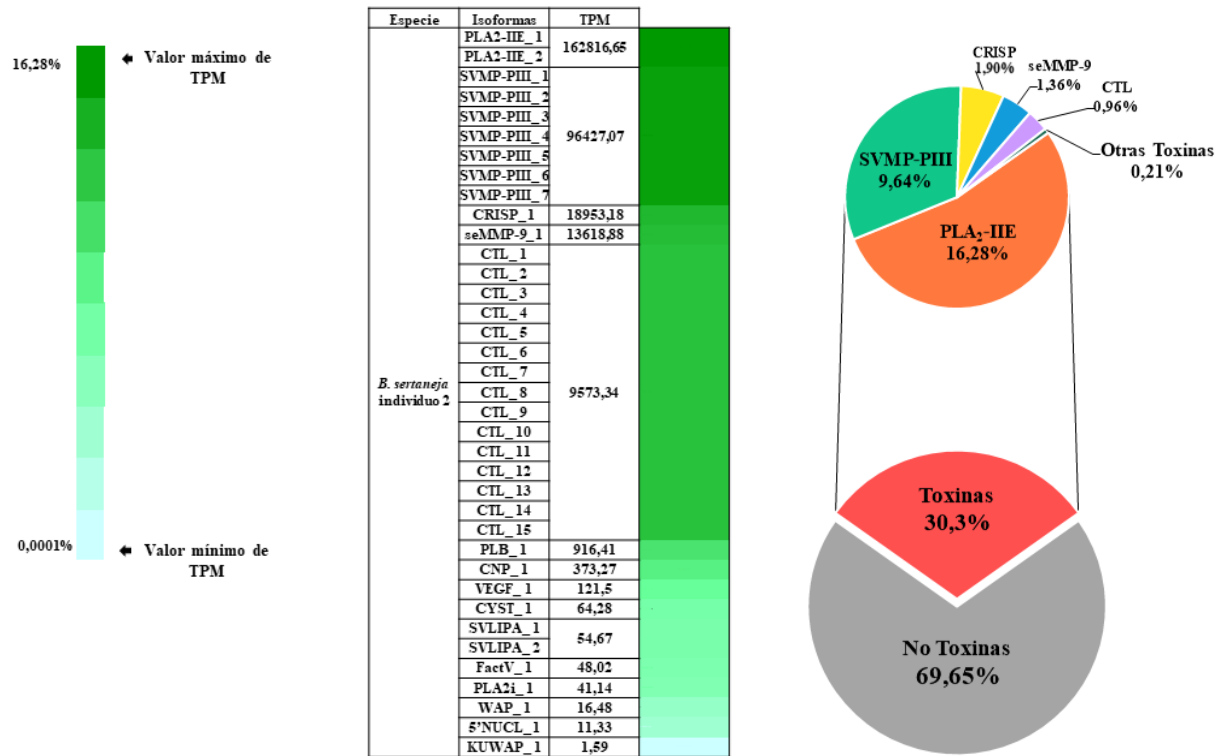
4.5.2 Individuo 2 de *B. sertaneja*

El perfil composicional del transcriptoma de la glándula de Duvernoy del individuo 2 de *B. sertaneja* (Figura 4), mostró un 69,65% de contigs que no fueron anotados como toxinas y un 30,3% de contigs tóxicos validados. De este porcentaje total de las toxinas reportadas en la glándula de Duvernoy, las toxinas principales son las PLA₂-IIE, con un porcentaje de expresión del 16,28%. En seguida, se reporta como la segunda toxina con mayor abundancia las SVMP-PIII, con un porcentaje de expresión del 9,64% y 7 isoformas en total. Finalmente, las CRISPs se reportaron como la tercera clase de toxina más abundante, con un porcentaje del 1,90% y 1 sola isoforma. Con una menor abundancia, se encontraron expresadas las seMMP-9 (1,36%) y 1 isoforma; y las CTLs (0,96%) y 15 isoformas.

Por otro lado, entre las toxinas menos expresas se encontró PLB con un valor de TPM de 916,41, las CNPs con un valor de TPM de 373,27, VEGF con un valor de TPM de 121,50, CYS con un valor de TPM de 64,28, SVLIPA con un valor de TPM de 54,67, FactV con un valor de TPM de 48,02, PLA₂i con un valor de TPM de 41,14, WAP con un valor de TPM de 16,48, 5'NUCL con un valor de TPM de 11,33 y las KU-WAP con un valor de TPM de 1,59, siendo éstas las de menor expresión. Respecto a las isoformas de cada toxina, se reportaron 2 isoformas (posibles parálogos) únicamente en SVLIPA, ya que en las demás se encontró únicamente 1 isoforma para cada toxina. Estas toxinas, se encuentran entre el porcentaje de otras toxinas, debido a que solo tienen un 0,21% de expresión en total.

Figura 4.

Perfil Composicional del Individuo 2 de *B. sertaneja*



Nota. La tabla representa los valores obtenidos de Transcritos Por Millón (TPM) y cantidad de isoformas por toxina del individuo 2 de *B. sertaneja*, el color más oscuro representado en las barras de colores indica una mayor expresión de la toxina, mientras que el color más claro indica una menor expresión. La intensidad del color es directamente proporcional al valor de TPM x log. El perfil composicional representado en el diagrama de tortas, indica el porcentaje del total de toxinas del transcriptoma (30,3%). Las toxinas que aparecen en la tabla y no figuran en el perfil composicional, están incluidas dentro del porcentaje de otras toxinas (0,21%).

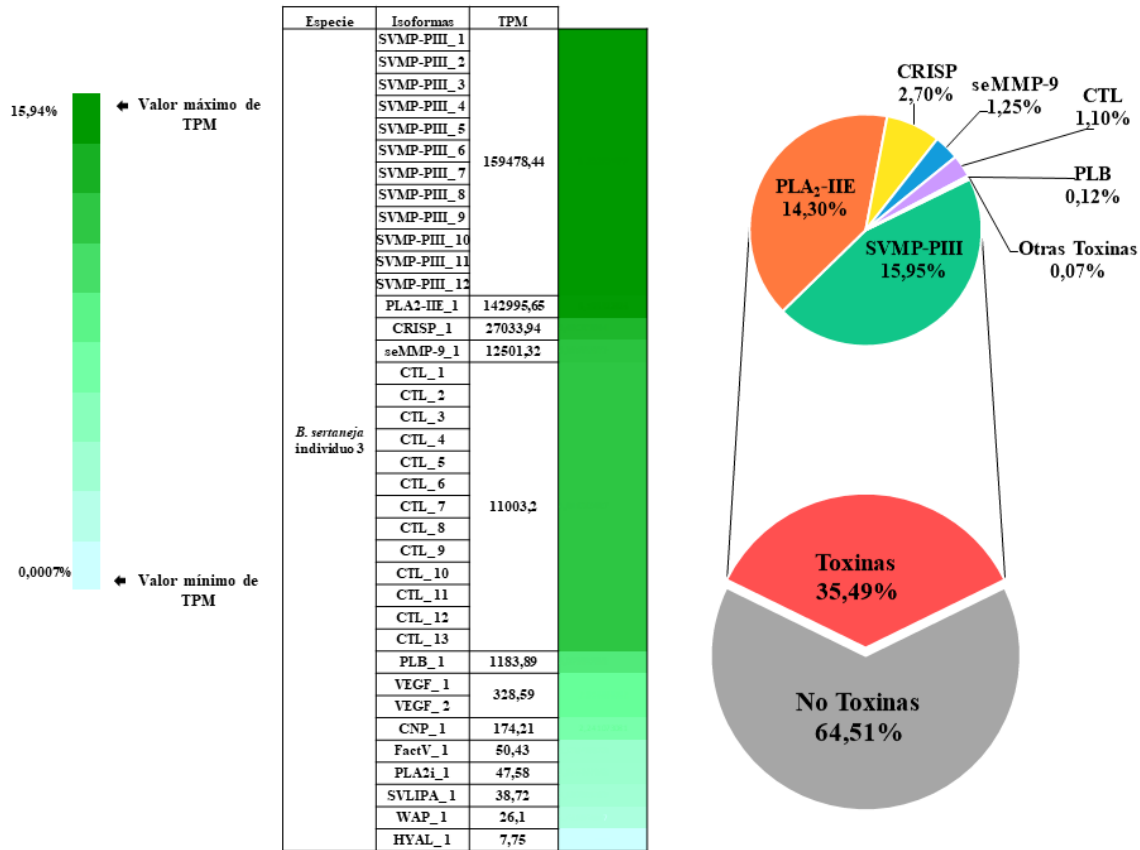
4.5.3 Individuo 3 de *B. sertaneja*

El perfil composicional del transcriptoma de la glándula de Duvernoy del individuo 3 de *B. sertaneja* (Figura 5), mostró un 64,51% de contigs que no fueron anotados como toxinas y un 35,49% de contigs tóxicos validados. De este porcentaje total de las toxinas reportadas en la glándula de Duvernoy, las toxinas principales son las SVMP-PIII con un porcentaje de expresión del 15,95% y 12 isoformas. En seguida, se reporta como la segunda toxina con mayor abundancia las PLA₂-IIE, con un porcentaje de expresión del 14,30% y 1 isoforma en total. Finalmente, las CRISPs se reportaron como la tercera clase de toxina más abundante, con un porcentaje del 2,70% y 1 sola isoforma. Con una menor abundancia, se encontraron expresadas las seMMP-9 (1,25%) y 1 isoforma; las CTLs (1,10%) y 13 isoformas; y las PLB (0,12%) y 1 sola isoforma.

Por otro lado, entre las toxinas menos expresas se encontró VEGF con un valor de TPM de 328,59, CNPs con un valor de TPM de 174,21, FactV con un valor de TPM de 50,43, PLA₂i con un valor de TPM de 47,58, SVLIPA con un valor de TPM de 38,72, WAP con un valor de TPM de 26,1, y las HYAL con un valor de TPM de 7,75, siendo éstas las de menor expresión. Respecto a las isoformas de cada toxina, se reportaron 2 isoformas (posibles parálogos) únicamente en VEGF, ya que en las demás se encontró únicamente 1 isoforma para cada toxina. Estas toxinas, se encuentran entre el porcentaje de otras toxinas, debido a que solo tienen un 0,07% de expresión en total.

Figura 5.

Perfil Composicional del Individuo 3 de *B. sertaneja*



Nota. La tabla representa los valores obtenidos de Transcritos Por Millón (TPM) y cantidad de isoformas por toxina del individuo 3 de *B. sertaneja*, el color más oscuro representado en las barras de colores indica una mayor expresión de la toxina, mientras que el color más claro indica una menor expresión. La intensidad del color es directamente proporcional al valor de TPM x log. El perfil composicional representado en el diagrama de tortas, indica el porcentaje del total de toxinas del transcriptoma (35,49%). Las toxinas que aparecen en la tabla y no figuran en el perfil composicional, están incluidas dentro del porcentaje de otras toxinas (0,07%).

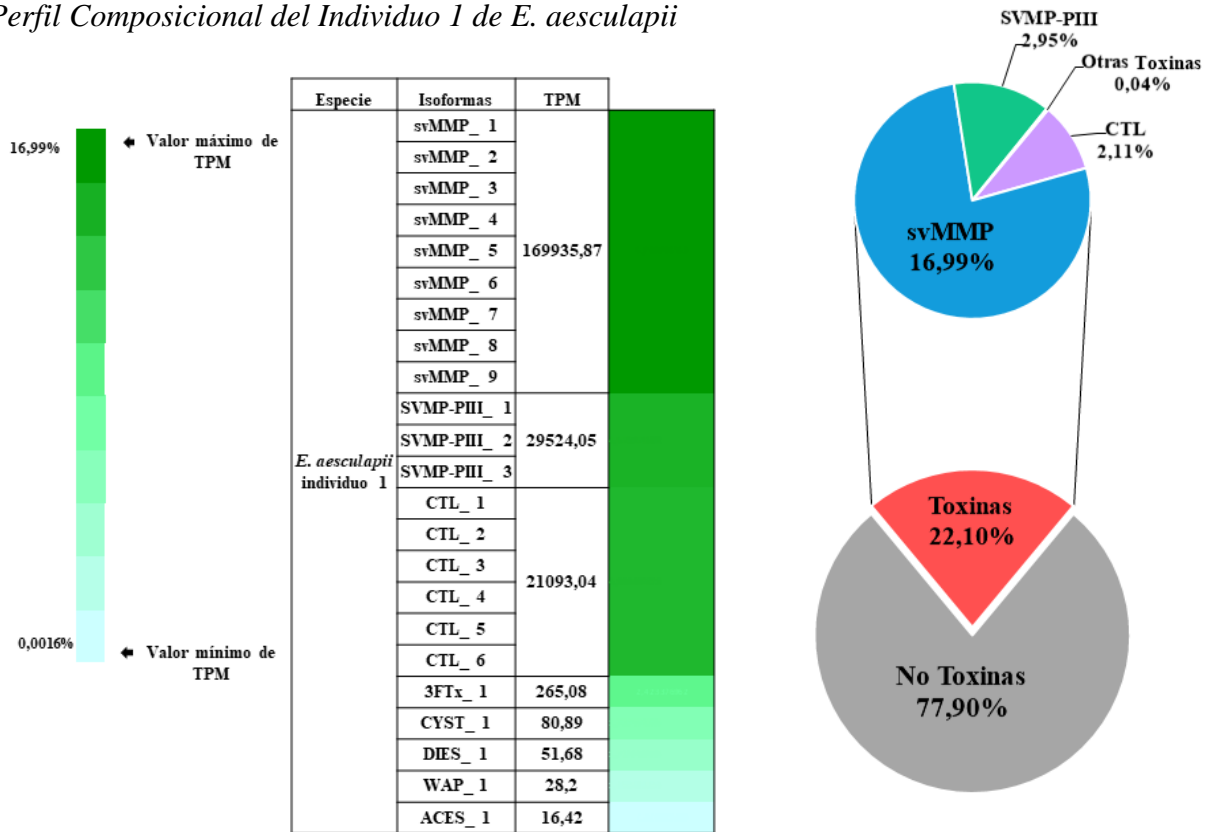
4.5.4 Individuo 1 de *E. aesculapii*

El perfil composicional del transcriptoma de la glándula de Duvernoy del individuo 1 de *E. aesculapii* (Figura 6), mostró un 77,90% de contigs que no fueron anotados como toxinas y un 22,10% de contigs tóxicos validados. De este porcentaje total de las toxinas reportadas en la glándula de Duvernoy, las toxinas principales son las svMMPs con un porcentaje de expresión del 16,99% y 9 isoformas en total. En seguida, se reporta como la segunda toxina con mayor abundancia las SVMP-PIII y 3 isoformas (posibles parálogos). Finalmente, las CTLs se reportaron como la tercera clase de toxina más abundante, con un porcentaje del 2,11% y 6 isoformas (posibles parálogos).

Por otro lado, entre las toxinas menos expresas se encontró 3FTxs con un valor de TPM de 265,08, CYST con un valor de TPM de 80,89, DIES con un valor de TPM de 51,68, WAP con un valor de TPM de 28,2 y las ACES con un valor de TPM de 16,42, siendo éstas las de menor expresión. Respecto a las isoformas de cada toxina, se encontró únicamente 1 isoforma en las toxinas nombradas anteriormente. Estas toxinas, se encuentran entre el porcentaje de otras toxinas, debido a que solo tienen un 0,04% de expresión en total.

Figura 6.

Perfil Composicional del Individuo 1 de *E. aesculapii*



Nota. La tabla representa los valores obtenidos de Transcritos Por Millón (TPM) y cantidad de isoformas por toxina del individuo 1 de *E. aesculapii*, el color más oscuro representado en las barras de colores indica una mayor expresión de la toxina, mientras que el color más claro indica una menor expresión. La intensidad del color es directamente proporcional al valor de TPM x log. El perfil composicional representado en el diagrama de tortas, indica el porcentaje del total de toxinas del transcriptoma (22,10%). Las toxinas que aparecen en la tabla y no figuran en el perfil composicional, están incluidas dentro del porcentaje de otras toxinas (0,04%).

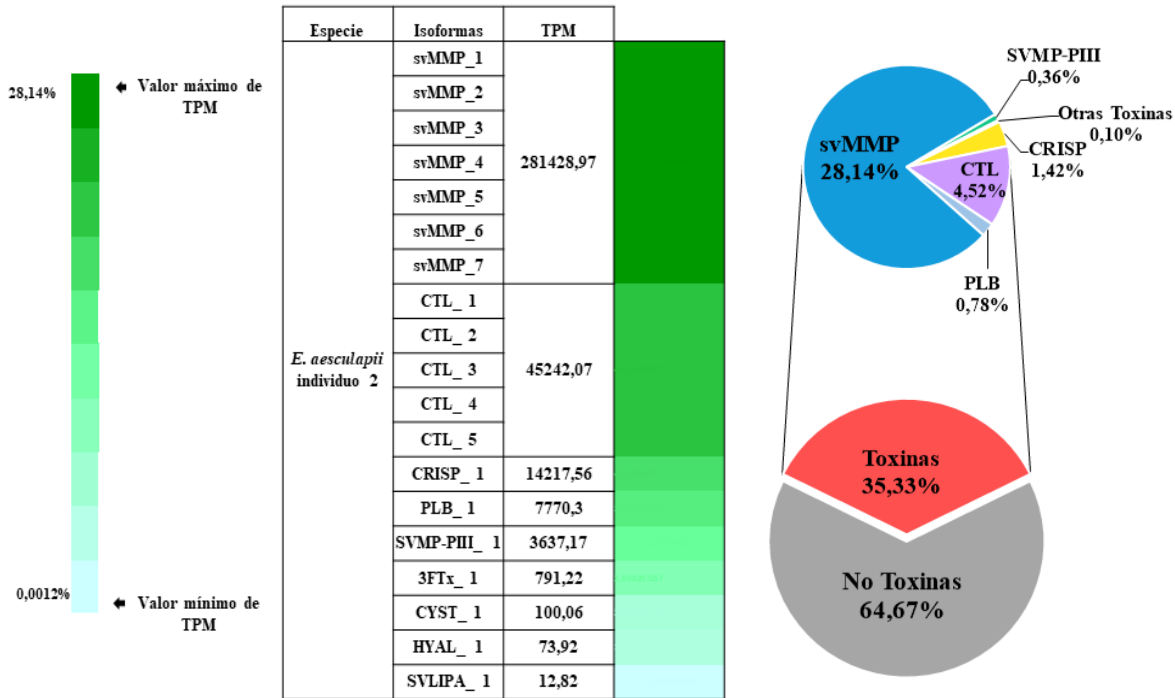
4.5.5 Individuo 2 de *E. aesculapii*

El perfil composicional del transcriptoma de la glándula de Duvernoy del individuo 2 de *E. aesculapii* (Figura 7), mostró un 64,67% de contigs que no fueron anotados como toxinas y un 35,33% de contigs tóxicos validados. De este porcentaje total de las toxinas reportadas en la glándula de Duvernoy, las toxinas principales son las svMMPs con un porcentaje de expresión del 28,14% y 7 isoformas en total. En seguida, se reporta como la segunda toxina con mayor abundancia las CTLs con un porcentaje de expresión de 1,42% y 5 isoformas (posibles parálogos). Finalmente, las CRISPs se reportaron como la tercera clase de toxina más abundante, con un porcentaje del 1,42% y 1 sola isoforma. Con una menor abundancia, se encontraron expresadas las PLB (0,78%) y 1 isoforma; y las SVMP-PIII (0,36%) y 1 sola isoforma.

Por otro lado, entre las toxinas menos expresas se encontró 3FTxs con un valor de TPM de 791,22, CYST con un valor de TPM de 100,06, HYAL con un valor de TPM de 73,92 y las SVLIPA con un valor de TPM de 12,82, siendo éstas las de menor expresión. Respecto a las isoformas de cada toxina, se encontró únicamente 1 isoforma en las toxinas nombradas anteriormente. Estas toxinas, se encuentran entre el porcentaje de otras toxinas, debido a que solo tienen un 0,10% de expresión en total.

Figura 7.

Perfil Composicional del Individuo 2 de *E. aesculapii*



Nota. La tabla representa los valores obtenidos de Transcritos Por Millón (TPM) y cantidad de isoformas por toxina del individuo 2 de *E. aesculapii*, el color más oscuro representado en las barras de colores indica una mayor expresión de la toxina, mientras que el color más claro indica una menor expresión. La intensidad del color es directamente proporcional al valor de TPM x log. El perfil composicional representado en el diagrama de tortas, indica el porcentaje del total de toxinas del transcriptoma (35,33%). Las toxinas que aparecen en la tabla y no figuran en el perfil composicional, están incluidas dentro del porcentaje de otras toxinas (0,10%).

4.5.6 Individuo 3 de *E. aesculapii*

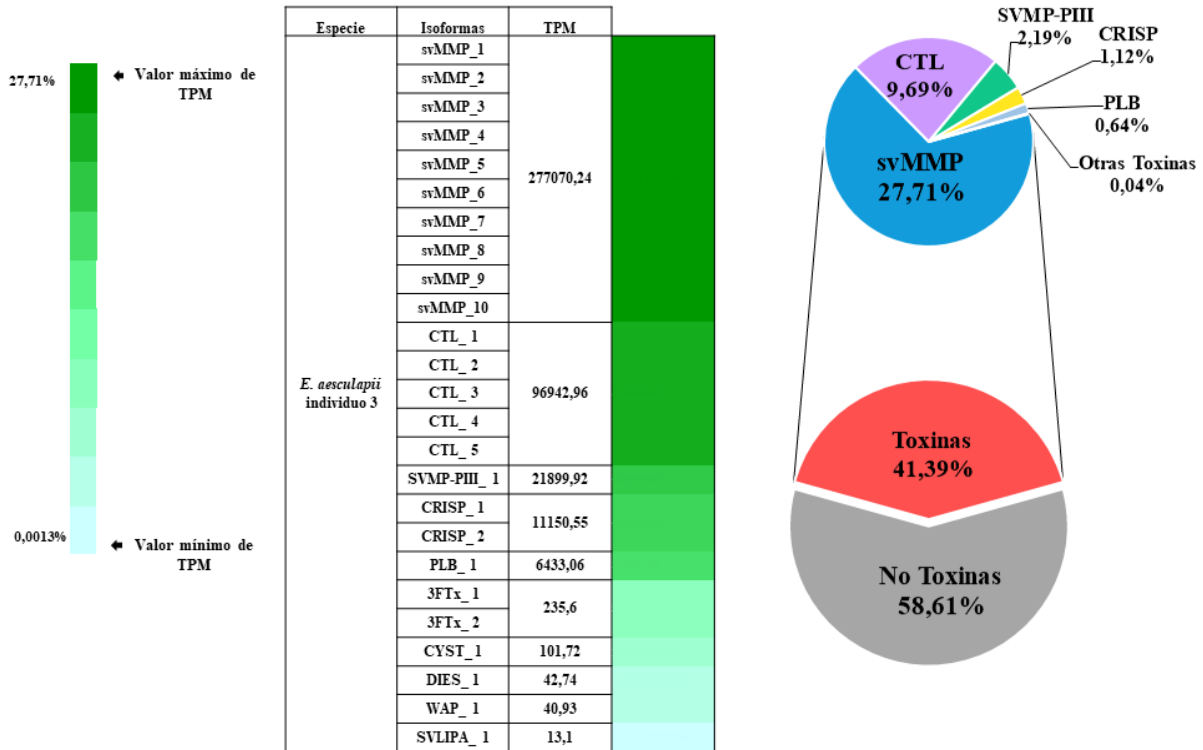
El perfil composicional del transcriptoma de la glándula de Duvernoy del individuo 3 de *E. aesculapii* (Figura 8), mostró un 58,61% de contigs que no fueron anotados como toxinas y un

41,39% de contigs tóxicos validados. De este porcentaje total de las toxinas reportadas en la glándula de Duvernoy, las toxinas principales son las svMMPs con un porcentaje de expresión del 27,71% y 10 isoformas en total. En seguida, se reporta como la segunda toxina con mayor abundancia las CTLs y 5 isoformas (posibles paralogos). Finalmente, las SVMP-PIII se reportaron como la tercera clase de toxina más abundante, con un porcentaje del 1,42% y 1 sola isoforma. Con una menor abundancia, se encontraron expresadas las CRISPs (1,12%) y 2 isoformas; y las PLB (0,64%) y 1 sola isoforma.

Por otro lado, entre las toxinas menos expresas se encontró 3FTx con un valor de TPM de 235,6, CYST con un valor de TPM de 101,72, DIES con un valor de TPM de 42,74, las WAP con un valor de TPM de 40,93 y las SVLIPA con un valor de TPM de 13,1, siendo éstas las de menor expresión. Respecto a las isoformas de cada toxina, se encontró que únicamente las 3FTxs tienen 2 isoformas (posibles parálogos), las demás toxinas nombradas anteriormente tienen 1 isoforma. Estas toxinas, se encuentran entre el porcentaje de otras toxinas, debido a que solo tienen un 0,04% de expresión en total.

Figura 8.

Perfil Composicional del Individuo 3 de *E. aesculapii*



Nota. La tabla representa los valores obtenidos de Transcritos Por Millón (TPM) y cantidad de isoformas por toxina del individuo 3 de *E. aesculapii*, el color más oscuro representado en las barras de colores indica una mayor expresión de la toxina, mientras que el color más claro indica una menor expresión. La intensidad del color es directamente proporcional al valor de TPM x log. El perfil composicional representado en el diagrama de tortas, indica el porcentaje del total de toxinas del transcriptoma (41,39%). Las toxinas que aparecen en la tabla y no figuran en el perfil composicional, están incluidas dentro del porcentaje de otras toxinas (0,04%).

5. Discusión

5.1 Ensamblaje del Transcriptoma de *B. sertaneja* y *E. aesculapii*

La evaluación de calidad e integridad del ensamblaje con BUSCO (completitud), logró recuperar una media del 79,97% y 72,39% en *B. sertaneja* y *E. aesculapii* respectivamente (Tablas 1-2) de los 233 genes de vertebrados consultados en cada uno de los 6 transcriptomas ensamblados de la glándula de Duvernoy. Estos valores de completitud de BUSCO, aunque son menores a los esperados en un ensamblaje *de novo* (Shibata et al., 2018), son niveles ya observados en trabajos realizados con glándulas de veneno de serpiente (Holding et al., 2018). Posiblemente, esto se deba a los altos niveles de especialización de la glándula de Duvernoy para la producción de toxinas (Mackessy et al., 2021). Por ende, consideramos que los datos utilizados en la presente pasantía contenían un nivel de completitud suficiente para realizar una buena predicción de los niveles de expresión de cada uno de los contigs ensamblados.

5.2 Familias de Toxinas Reportadas en *B. sertaneja* y *E. aesculapii*

En la presente pasantía se lograron identificar contigs de toxinas ya reportadas en las familias de serpientes Elapidae y Viperidae tanto en *B. sertaneja* como en *E. aesculapii*. Familias de toxinas principales del veneno de serpiente y posibles nuevas toxinas del veneno en colúbridos, tales como SVMP-PIII, PLA₂-IIE, MMPs (seMMP-9; svMMP-A y svMMP-B), CRISPs y CTLs fueron predominantes en los transcriptomas de estas especies. Por otro lado, entre las familias de toxinas incluidas dentro de “otras toxinas”, se encontraron componentes tales como PLB, VEGF, CNPs, FactV, SVLIPA, HYAL, WAP, DIES, ACES, CYST, PLA_{2i} y

3FTxs. Adicionalmente, en los perfiles composicionales del transcriptoma obtenidos de las glándulas de Duvernoy, se detectó la presencia de diferentes isoformas de los diferentes componentes tóxicos de mayor y menor expresión en cada uno de los individuos en *B. sertaneja* y *E. aesculapii*, revelando un patrón variable tanto intra como interespecíficamente (Figuras 3-8).

5.3 Componentes Tóxicos en la Glándula de Duvernoy

La mayoría de los trabajos enfocados a la caracterización de las toxinas de serpiente, se han concentrado en especies que son de importancia médica (Familias Atractaspididae, Elapidae y Viperidae), dejando un gran vacío en las toxinas secretadas por las serpientes pertenecientes a la familia Colubridae (Casewell et al., 2009; Jiang et al., 2011; Leão y Junqueira-de-Azevedo, 2009; Rokyta et al., 2012). En la presente pasantía se identificaron tanto en *B. sertaneja* y *E. aesculapii* contigs de toxinas ya reportadas en las familias de serpientes de importancia médica, así como familias de nuevas toxinas putativas de esta familia de serpientes.

5.3.1 MMPs: Un Nuevo Grupo de Metalopeptidasas en los Venenos de Serpiente

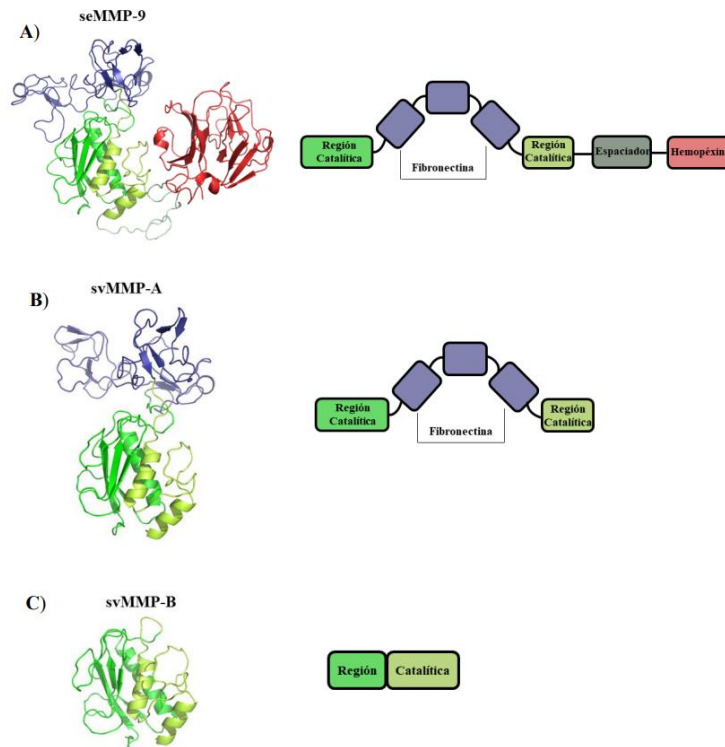
Recientemente fue reportada la ocurrencia de un nuevo grupo de proteínas enzimáticas en la glándula de Duvernoy de tres tribus de colúbridos (Bayona-Serrano et al., 2020). Estas proteínas, denominadas MMPs (Metalopeptidasas de matriz) son un diverso grupo de metalopeptidasas que desenvuelven un sinnúmero de funciones fisiológicas en todos los grupos de vertebrados (Mackessy et al., 2021). Además, están involucradas en la remodelación de tejidos, cambios ontogenéticos y en procesos reguladores de la matriz extracelular (Burrage y Brinckerhoff, 2007; Nagase et al., 2006).

Sin embargo, dentro de la familia Colubridae algunos grupos mostraron niveles de expresión variables de transcritos de MMPs en sus glándulas de Duvernoy (Bayona-Serrano et al., 2020; Grazziotin et al., 2012). Estas proteínas son el componente principal de la glándula de Duvernoy en tres tribus (Conophiini, Tachymenini y Xenodontini) con niveles de expresión entre 5.8% al 72.1% del total del transcriptoma, comparables a los observados en las SVMMPs en la familia Viperidae (Junqueira-de-Azevedo et al., 2015). Sin embargo, resaltamos la necesidad de realizar otros estudios que consideren más datos, para que estas comparaciones sean estadísticamente significativas. Adicionalmente, las MMPs se reportaron como el producto más abundante en los transcriptomas, de los géneros *Thamnodynastes*, *Tomodon*, *Ptychophis* y *Gomesophis* (Tachymenini); *Erythrolamprus* y *Lygophis* (Xenodontini); y *Conophis* (Conophiini), reportando valores de TPM de más de 700000 en *E. aesculapii*. Las MMPs encontradas en la presente pasantía en *E. aesculapii* pertenecen a los subtipos svMMP-A y svMMP-B (Figura 9) que son las formas típicamente abundantes en los transcriptomas de la glándula de Duvernoy de este grupo de serpientes (Bayona-Serrano et al., 2020). Los resultados obtenidos en la presente pasantía en los 3 individuos estudiados de *E. aesculapii* son consistentes con los ya reportados para la tribu Xenodontini (Bayona-Serrano et al., 2020) (Figuras 5-8).

Por otro lado, también se encontraron MMPs en *B. sertaneja*, pero estas mostraron niveles medios de expresión mucho menores a los observados en *E. aesculapii* (1,34% y 24,28% respectivamente). Además, en esta especie, las MMPs poseen la misma organización de dominio de las MMP-9 que se encuentran en varios vertebrados y difieren de las estructuras observadas en *E. aesculapii* (Bayona-Serrano et al., 2020) (Figura 9 y Apéndice A).

Figura 9.

Estructura de las MMPs Reportadas en B. sertaneja y E. aesculapii



Nota. Representación de las estructuras de las MMPs reportadas en *B. sertaneja* y *E. aesculapii*. En la parte izquierda, se puede observar cada estructura modelada de las seMMPE-9 (A); svMMP-A (B) y svMMP-B (C). En la parte derecha se puede observar la representación de los diferentes dominios en cada tipo de proteína.

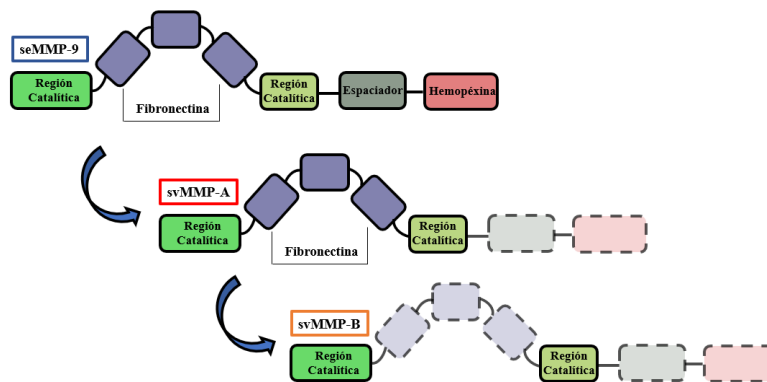
En la presente pasantía se detectaron en los individuos de *B. sertaneja* y *E. aesculapii* los 3 subtipos de MMPs reportados por Bayona-Serrano et al. (2020) (seMMP-9, svMMP-A y svMMP-B) en el transcriptoma de la glándula de Duvernoy. (Bayona-Serrano et al., 2020; Junqueira-de-Azevedo et al., 2016). Estos tres subtipos han sido catalogados en dos grandes grupos: las MMPs endógenas de serpiente (seMMP-9) y las MMPs de veneno de serpiente (svMMP-A y svMMP-B) (Bayona-Serrano et al., 2020). El primer grupo corresponde a una

MMP-9 endógena que presenta un nivel de expresión moderado en la glándula de Duvernoy de algunas tribus de serpiente, pero que mantiene todas las características estructurales de una MMP-9 (Bayona-Serrano et al., 2020). El segundo grupo, contiene proteínas que son los componentes principales de tres tribus de colúbridos (Tachymenini, Xenodontini y Conophiini) y sufrieron modificaciones estructurales únicas que las diferencian de las MMPs endógenas que son encontradas en otras serpientes y vertebrados (Bayona-Serrano et al., 2020) (Figuras 9-10; Apéndice A).

Un análisis reciente de la evolución de estas proteínas reveló que las svMMPs de tipo A y B, que son las toxinas principales de varios grupos de serpiente, provienen de una seMMP-9 que sufrió pérdidas de dominios secuenciales (Bayona-Serrano et al., 2020) (Figuras 9-10; Apéndice A).

Figura 10.

Modelo Evolutivo de las svMMPs Propuesto a Través de Pérdidas de Dominio



Nota. Representación del modelo evolutivo a través de la pérdida de dominios de las diferentes svMMPs obtenidas en *B. sertaneja* y *E. aesculapii*. Las regiones más oscuras y señaladas con el nombre representan los dominios pertenecientes a cada tipo de svMMPs; mientras que, las regiones más claras, representan los dominios que se han perdido en cada tipo de svMMPs.

En *E. aesculapii* se encontraron MMPs de veneno de serpiente de los dos subtipos. En primer lugar, las svMMP-A, no poseen el enlazador ni el dominio hemopexina en la región C-terminal y se cree que surgieron de forma independiente en la tribu Xenodontini a partir de una seMMP-9, a través de una delección del dominio hemopexina (Figura 10; Apéndice A). Además, se encontraron también transcritos del subtipo svMMP-B. Estas proteínas están conformadas únicamente por el dominio catalítico ininterrumpido, es decir, no poseen los 3 dominios de fibronectina reportados en las seMMP-9 y las svMMP-A (Bayona-Serrano et al., 2020) (Figura 9-10; Apéndice A). Esta tendencia a la pérdida de dominios hacia una conformación estructural más simple ya se ha observado en las SVMPs de la familia Viperidae (Casewell et al., 2011). Además, tanto el dominio hemopexina como los dominios fibronectina se encuentran codificados por exones bien definidos, por lo que el proceso de delección en las transiciones de seMMP-9 a svMMP-A y, posteriormente, a svMMP-B, no requiere de mecanismos genéticos tan complejos, ni compromete otras partes de la proteína (Bayona-Serrano et al., 2020). De hecho, la delección de exones, junto con la duplicación de genes, es el mecanismo propuesto para la diversificación ancestral de las MMPs (Fanjul-Fernández et al., 2010).

Por otro lado, en *B. sertaneja* sólo encontramos MMPs correspondientes a seMMP-9, lo que coincide con lo reportado en trabajos anteriores. Estas proteínas corresponden a la forma endógena de las MMP-9 que presenta niveles de expresión elevados en la glándula de Duvernoy de algunos grupos de colúbridos (Bayona-Serrano et al., 2020).

Para finalizar, las secuencias de MMPs encontradas en el presente trabajo soportan la hipótesis de la secuencia de eventos para el reclutamiento y evolución de estas proteínas en el veneno de los colúbridos (Bayona-Serrano et al., 2020): **1)** El gen seMMP-9 que cumple funciones endógenas, se expresó a un nivel mayor al promedio reportado, en las glándulas de

Duvernoy de algunos grupos de colúbridos ancestrales. **2)** Las duplicaciones de genes independientes de seMMP-9 en tres tribus (Conophiini, Xenodontini y Tachymenini) generaron copias de svMMPs ancestrales en cada uno de los grupos mencionados. Este proceso pudo estar acompañado o seguido, por la pérdida del dominio de hemopexina, generando las svMMP-A. Además, debió ocurrir una modificación en la región promotora que causó un aumento en el nivel de expresión en algún momento para explicar la alta expresión observada (como se observó en los individuos de *E. aesculapii* de la presente pasantía). **3)** El gen svMMP-A pudo expandirse en el genoma, esta observación se realiza, debido a que se observan múltiples transcripciones parálogos y sus respectivas proteínas en la misma especie (Figura 10; Apéndice A). **4)** Dentro de las tribus Xenodontini, uno o más de estos genes svMMP-A evolucionaron, probablemente por una pérdida secuencial de exones que codifican los tres dominios de fibronectina, generando así las svMMP-B (Figura 10; Apéndice A).

5.3.2 Metalopeptidasas de Veneno de Serpiente (SVMPs) encontradas en la Glándula de Duvernoy

Esta familia de toxinas se caracteriza por su abundancia en el veneno de las serpientes, y se clasifica en 3 subclases según los dominios que posea (SVMP-PI; SVMP-PII y SVMP-PIII). Las SVMP-PI se caracterizan por tener únicamente un dominio metalopeptidasa; las SVMP-PII, además de poseer el dominio previamente mencionado, poseen un dominio desintegrina; y las SVMP-PIII, poseen un dominio parecido a la desintegrina, un dominio rico en cisteína y el dominio metalopeptidasa (Fox y Serrano, 2005) (Figuras 11-12).

En la presente pasantía, en los individuos estudiados se reportaron contigs de SVMP-PIII, con una media de expresión de 12,91% en *B. sertaneja* y una media de expresión de 1,83% en *E.*

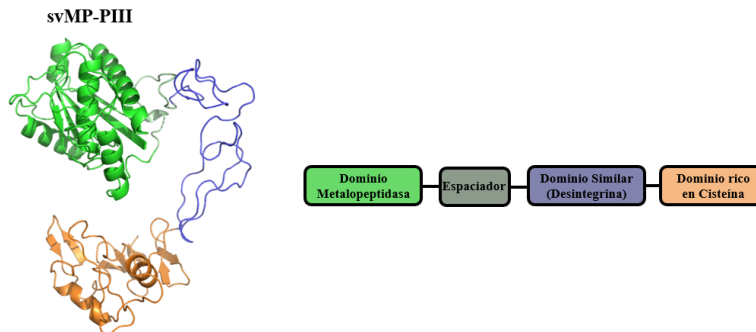
aesculapii. Adicionalmente, se evidenció que son el componente con un mayor número de isoformas en *B. sertaneja* con ≥ 7 isoformas en los tres individuos (Figura 3-5).

Por otro lado, en *E. aesculapii*, sólo el individuo 1 presentó más de 1 isoforma (3 isoformas) (Figura 6). En ninguno de los individuos analizados se reportaron contigs pertenecientes a las subclases SVMP-PI y SVMP-PII, coincidiendo con estudios anteriores, en los que se evidencia que estas toxinas son exclusivas de la familia Viperidae (Casewell et al., 2011; Mackessy et al., 2021). Por ende, la ausencia de SVMP-PI y SVMP-PII en *B. sertaneja* y *E. aesculapii* concuerda con la hipótesis para la aparición de esas toxinas en la familia Viperidae, que ocurrió posteriormente a la separación de este linaje a partir de un gen de SVMP-PIII, que sufrió una serie de deleciones de diferentes dominios hacia una estructura simplificada (Casewell et al., 2011; Moura-da-Silva et al., 1996).

Curiosamente, el patrón de evolución estructural propuesto para las svMMPs (**sección 5.3.1**), es similar al documentado para las SVMPs (Figura 12). En estas últimas, el gen endofisiológico ancestral ADAM-28 (Giorgianni et al., 2020; Sanz et al., 2012; Sanz y Calvete, 2016) dio origen a una forma simplificada en el veneno, conocida como precursor de SVMP-PIII (Figura 11), al perder regiones similares al Factor de Crecimiento Endotelial (Sanz y Calvete, 2016). Exclusivamente dentro de la familia Viperidae, se observa una duplicación de genes en tándem, seguida de la deleción de dominios C-terminal, que condujo a la aparición de las SVMP-PII. Finalmente, el mismo proceso provocó la aparición del precursor SVMP-PI, una forma más simplificada que conserva únicamente el dominio metalopeptidasa (Sanz et al., 2012; Brust et al., 2013) (Figura 12). En el genoma, esta secuencia de eventos, al igual que en las svMMPs, es asociada con deleciones de exones, resultando en un acortamiento de las proteínas (Brust et al., 2013; Giorgianni et al., 2020; Sanz et al., 2012; Sanz y Calvete, 2016).

Figura 11.

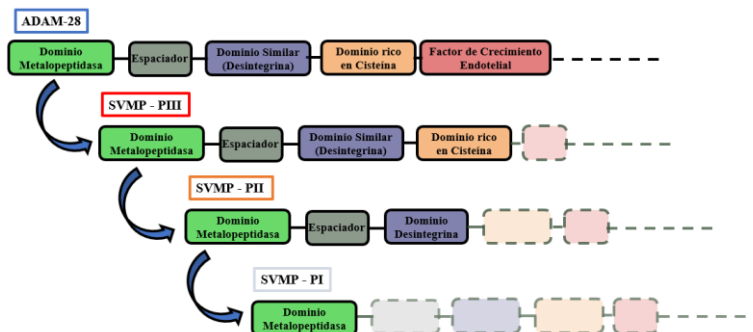
Estructura de las SVMP-PIII Reportadas en los Individuos de B. sertaneja y E. aesculapii



Nota. Representación estructural de la SVMP-PIII reportada en los individuos de *B. sertaneja* y *E. aesculapii*. En la parte izquierda, se puede observar la estructura modelada de las SVMP-PIII. En la parte derecha se puede observar la representación de los diferentes dominios pertenecientes a la proteína.

Figura 12.

Modelo Evolutivo de las SVMPs Propuesto a través de Pérdidas de Dominio



Nota. Representación del modelo evolutivo a través de la pérdida de dominios de las diferentes SVMPs obtenidas en *B. sertaneja* y *E. aesculapii*. Las regiones más oscuras y señaladas con el nombre representan los dominios pertenecientes a cada tipo de SVMPs; mientras que, las regiones más claras, representan los dominios que se han perdido en cada tipo de SVMP.

Finalmente, en el alineamiento realizado en la presente pasantía entre las SVMPs reportadas en *B. sertaneja* y SVMPs obtenidas de la familia Viperidae, se observó que las regiones del péptido señal y el pro-dominio se encuentran conservadas (Apéndice B), siendo estas las regiones encargadas de un correcto plegamiento y transporte de las toxinas (Eder y Fersht, 1995; Mackessy et al., 2021).

Sin embargo, las SVMPs reportadas en *B. sertaneja*, mostraron variaciones en algunas regiones de sus secuencias (Apéndice B), lo cual lleva a pensar, que la presión selectiva no es equitativa en todas las posiciones de los genes que en su proceso de traducción generan toxinas, ocasionando que algunas regiones de la proteína muten de una forma más libre (Casewell et al., 2011; Fry et al., 2010). Posiblemente, esto se deba a que algunas secciones de la proteína encargada de funciones importantes, se encuentran bajo una mayor presión selectiva (Casewell et al., 2011; Casewell et al., 2020; Giorgianni et al., 2020). Por otro lado, el dominio Metaloproteinasa presente en las SVMPs-PI, SVMPs-P II y SVMPs-P III posee una región de unión al zinc “**HEXXHXXGXXH**” en las diferentes secuencias alineadas (Apéndice B). Esto es debido a que la actividad proteolítica de las SVMPs se genera por la interacción de dicha región, con un ion Zn^{+2} (Chinnasamy et al., 2015; Gutiérrez et al., 2005).

Para esclarecer estos procesos, se necesitan realizar estudios más profundos de los diferentes grupos de SVMPs (PI, P II y P III) que se pueden reportar en las diferentes familias de serpientes y de estos patrones diferenciales de tasas de sustitución entre dominios de un mismo gen (Casewell et al., 2011).

5.3.3 Fosfolipasas A2 de tipo IIE (PLA₂-IIE) Reportados y su Clasificación

Dentro de los componentes principales reportados durante el desarrollo de la presente pasantía, se encuentran las PLA₂ del veneno de serpiente. Estas toxinas se encuentran entre las principales proteínas tóxicas del veneno de las familias Elapidae y Viperidae, desempeñando un papel importante en la captura de sus presas (Lomonte et al., 2009). Sin embargo, esta familia de toxinas tiene una enorme diversidad y se divide en varias subclases que varían funcional y estructuralmente (Mackessy et al., 2021). Dentro de las principales subclases reportadas en la glándula de Duvernoy en trabajos previos encontramos a las PLA₂-I y las PLA₂-II. Las primeras se pueden clasificar en dos subclases según la presencia de una región elapídica (subclase PLA₂-IA), presente en las toxinas principales del veneno de la familia Elapidae, o una región pancreática (subclase PLA₂-IB) presente en las PLA₂ de páncreas de mamíferos (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016; Mackessy et al., 2021).

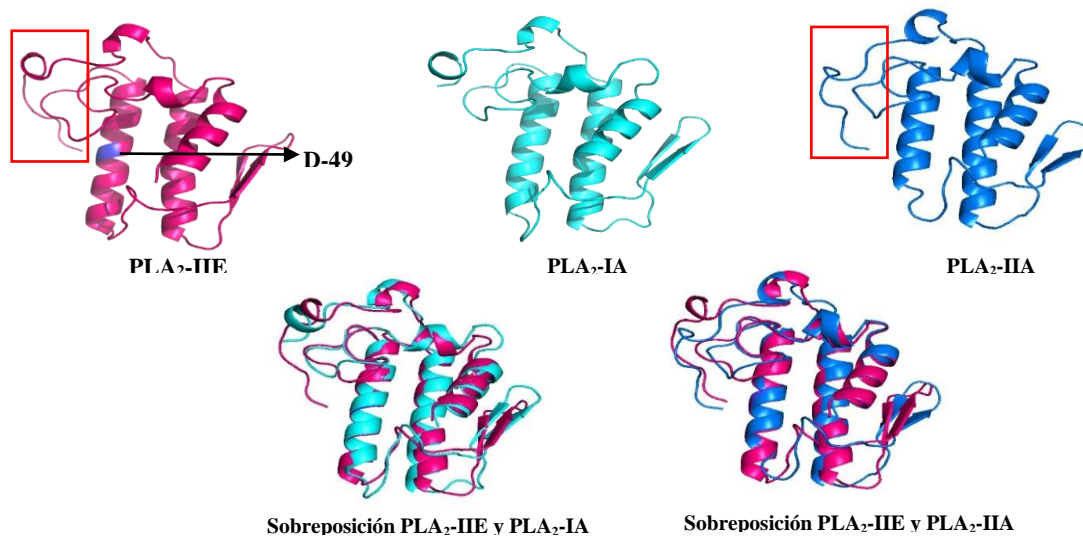
Por otro lado, las PLA₂-II son comúnmente encontradas en venenos de vipéridos y a diferencia de las PLA₂-I, poseen una extensión C-terminal adicional (Mackessy., 2021) (Figura 13; Apéndice C). Las PLA₂-II se dividen en dos grandes subclases de formas catalíticas y no catalíticas, en función del tipo de aminoácido presente en la posición 49 (Figura 13; Apéndice C). Cuando en dicha posición encontramos un aminoácido cargado negativamente (generalmente un aspartato) que favorece la unión de un cofactor de Ca⁺², otorgando una actividad catalítica a las PLA₂-II que contienen este aminoácido.

Sin embargo, si en esta posición se encuentra un aminoácido con carga positiva en su cadena lateral (generalmente una lisina) se impide la unión del Ca⁺², afectando su capacidad catalítica (Maraganore y Heinrikson, 1985) (Apéndice C). Estas dos clases de PLA₂-II, denominadas **Asp49** y **Lys49** respectivamente, poseen diferentes mecanismos de acción que

derivan en diferentes efectos en caso de un envenenamiento. Las Asp49, debido a su actividad catalítica, consiguen desestabilizar la membrana presináptica de la unión neuromuscular causando efectos neurotóxicos, mientras que las Lys49, consiguen interactuar de forma directa con el músculo esquelético desestabilizando su membrana causando en la permeabilización del tejido y la posterior necrosis del mismo (Mackessy et al., 2021).

Figura 13.

Dominios Estructurales de las PLA₂



Nota. Representación estructural de las PLA₂. En la parte (A) se representa la estructura de una PLA₂-IIE de *B. sertaneja* reportada en la pasantía, señalando el aminoácido aspartato en la posición 49 (D-49) y la región C-Terminal encerrada con un cuadro color rojo; En la parte (B) se representa la estructura de una PLA₂-IA de *Naja kaouthia*; En la parte (C) se representa la estructura de una PLA₂-IIA de *Bothriechis schlegelii*, también se señala la región c-terminal encerrada con un cuadro rojo; En la parte (D) se representa la sobreposición de las estructuras de las PLA₂-IIE y PLA₂-IA; Finalmente, en la parte (E) se representa la sobreposición de las estructuras de las PLA₂-IIE y PLA₂-IIA.

Adicionalmente, se ha descrito una enorme diversidad estructural y funcional en las PLA₂-II, dividiéndolas en 6 grupos (IIA-IIF) independientemente de su capacidad catalítica (Six y Dennis, 2000). Las PLA₂-II presentes en especies de la familia Viperidae pertenecen a los grupos IIA y IIB, siendo las toxinas principales en varias especies de la familia (Mackessy et al., 2021). No obstante, en años recientes se ha reportado la aparición de transcritos que codifican para PLA₂-IIE en las glándulas del veneno de los colúbridos *Boiga irregularis*, *Dispholidus typus* y *Oxyrhopus guibei* (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016; Kamiguti et al., 2000; McGivern et al., 2014). Esta última especie pertenece a la Tribu Pseudoboini al igual que *B. sertaneja* por lo que era esperado encontrar transcritos de PLA₂-IIE en los 3 individuos estudiados en la presente pasantía (Fry et al., 2012; Hargreaves et al., 2014; Junqueira-de-Azevedo et al., 2016) (Figuras 3-5). Además, fueron uno de los principales componentes en la glándula de Duvernoy de esta especie, con una media de 14,44% y presentando un número variable de isoformas entre los tres individuos. El individuo 1 tuvo una mayor cantidad de isoformas (5), seguido del individuo 2 y 3 (2 y 1 isoformas respectivamente) (Figura 3-5).

En los resultados obtenidos por Junqueira-de-Azevedo et al. (2016), las PLA₂-IIE, se encuentran expresadas en *B. irregularis*, *D. typus* y *O. guibei* como componentes menores, a diferencia de los niveles elevados reportados para *B. sertaneja* en la presente pasantía. Sin embargo, es necesario realizar otros estudios que consideren más datos, para que las comparaciones realizadas de este tipo de fosfolipasas, sean estadísticamente significativas. Este grupo de PLA₂-IIE presenta una estructura muy similar a la del grupo IIA de vipéridos (Figura 13; Apéndice C), por lo que podría esperarse que presenten una capacidad tóxica similar. Además, todos los contigs encontrados en *B. sertaneja* presentaron un aspartato en su posición 49, indicando que son proteínas con actividad catalítica que pueden presentar neurotoxicidad

presináptica (Scott et al., 1990). Análisis funcionales realizados en especies cercanas ya han demostrado la presencia de actividad fosfolipasa A₂ en los venenos de la tribu Pseudoboini (Torres-Bonilla et al., 2018), soportando los hallazgos de PLA₂-IIE catalíticamente activas en *B. sertaneja* como una de sus toxinas principales.

Finalmente, en la presente pasantía se realizó un alineamiento entre las PLA₂ del vipérido *Bothriechis schlegelii*, el elápidido *Naja kaouthia* y el colubrido *B. sertaneja*, en el cual se pudo observar que las secuencias estaban parcialmente conservadas (Apéndice C). Adicionalmente, en las PLA₂-IIA de *B. schlegelii* y las PLA₂-IIE de *B. sertaneja* se pudo observar una extensión C-terminal característica de las PLA₂-II (Mackessy et al., 2021) (Figura 13; Apéndice C).

Por otro lado, se encontró en los alineamientos realizados un motivo conservado “CCXVHD/KCC” en *Bothriechis schlegelii* y *B. sertaneja*, dentro del cual se puede observar los residuos D49 y K49, siendo estos motivos característicos de las PLA₂-II catalíticamente activas e inactivas respectivamente (Mackessy et al., 2021). Sin embargo, aunque la secuencia de *N. kaouthia* utilizada en el alineamiento, siendo esta del subtipo PLA₂-IA, tenga un Aspartato en la posición 49 (D49), esta se involucra en la alteración de la hemostasis, compitiendo por la unión al Factor Xa (**FXa**) encargado de la coagulación sanguínea, resultando en la inhibición de la trombina (Osipov et al., 2010). Debido a esto se puede considerar una PLA₂-D49 catalíticamente inactiva (Mackessy et al., 2021).

En conclusión, realizar estudios más profundos a nivel composicional y funcional de los venenos presentes en la glándula de Duvernoy de colubridos, son necesarios para esclarecer la ocurrencia y función biológica de este nuevo grupo de fosfolipasas en los venenos de serpientes.

5.3.4 Lectinas Tipo C (CTL) Reportadas

Las lectinas de tipo C, comúnmente conocidas como CTLs, son componentes ubicuos del veneno en muchos grupos de serpientes, encontrándose abundantemente en los venenos de serpientes pertenecientes a la familia Colubridae (Campos et al., 2016; Ching et al., 2006). Estas proteínas se dividen en dos grupos; **1)** “*CTLs-Snaclecs*”, las cuales interactúan en los receptores de glicoproteínas plaquetarias (Mackessy et al., 2021); **2)** “*CTLs-Verdaderas*”, diferenciándose de las Snaclecs por su capacidad de unión a la galactosa/lactosa y su dependencia al calcio, además de poseer un motivo de reconocimiento a carbohidratos (CRD) (Arlinghaus et al., 2015; Drickamer, 1999).

Adicionalmente, Junqueira-de-Azevedo et al. (2016) realizaron una reconstrucción filogenética de CTLs presentes en diferentes especies de la familia Colubridae, reportando que las diferentes isoformas de CTLs observadas en esta familia, son *CTLs-Snaclecs*. Estos resultados concuerdan con las isoformas de las CTLs (posibles parálogos) reportadas en la presente pasantía en *B. sertanja* y *E. aesculapii* (Tabla 5). Sin embargo, en el alinamiento realizado para las CTLs (Apéndice D), se puede observar que las isoformas reportadas para *B. sertaneja* y *E. aesculapii* se asimilan también a las CTLs-Verdaderas observadas en especies de serpientes de relevancia médica (con un motivo EPN). Además, se puede observar que las CTLs alineadas de *Bothrops jararaca*, perteneciente a la familia Viperidae presentó un motivo QPD, no reportado en ninguna isoforma de las especies estudiadas en la presente pasantía, pero si observado en otros vipéridos (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016).

Finalmente, se encontró a las CTLs como uno de los componentes principales en *E. aesculapii* con una expresión que varió del 2,11% - 9,69%, clasificándose en este estudio como una de las toxinas más expresadas en su glándula de Duvernoy e indicando su importancia como

componente tóxico. Sin embargo, en *B. sertaneja* las CTLs tuvieron porcentajes de expresión menores, variando entre un 0,95% - 1,10% siendo una toxina de menor relevancia composicional, respecto a *E. aesculapii*. Además, las CTLs presentaron una gran cantidad de isoformas en los individuos 1, 2 y 3 de *B sertaneja* (12, 15 y 13 respectivamente) y en los 3 individuos de *E. aesculapii*, identificando 6 isoformas en el individuo 1 y 5 isoformas en los individuos 2 y 3 (Figura 3-8; Tabla 5).

La obtención de datos proteómicos y funcionales podría ayudar a entender de mejor manera el rol y la relevancia de estas toxinas en el veneno de estas especies de serpiente. Por ende, los datos obtenidos en la presente pasantía sugieren que su amplio número de isoformas pueden ser el resultado de múltiples eventos de duplicación.

Tabla 5.

Tipos de CTLs y Cantidad de Isoformas Encontradas en B. sertaneja y E. aesculapii

Especie	Número de Isoformas			
	Individuo 1	Individuo 2	Individuo 3	
<i>B. sertaneja</i>	CTL_1	CTL_1	CTL_1	SNACLECS
	CTL_2	CTL_2	CTL_2	SNACLECS
	CTL_3	CTL_3	CTL_3	SNACLECS
	CTL_4	CTL_4	CTL_4	SNACLECS
	CTL_5	CTL_5	CTL_5	SNACLECS
	CTL_6	CTL_6	CTL_6	SNACLECS
	CTL_7	CTL_7	CTL_7	SNACLECS
	CTL_8	CTL_8	CTL_8	SNACLECS
	CTL_9	CTL_9	CTL_9	SNACLECS
	CTL_10	CTL_10	CTL_10	SNACLECS
	CTL_11	CTL_11	CTL_11	SNACLECS
	CTL_12	CTL_12	CTL_12	SNACLECS
	-	CTL_13	CTL_13	SNACLECS
	-	CTL_14	-	SNACLECS
	-	CTL_15	-	SNACLECS
<i>E. aesculapii</i>	CTL_1	CTL_1	CTL_1	Verdaderas
	CTL_2	CTL_2	CTL_2	Verdaderas
	CTL_3	CTL_3	CTL_3	Verdaderas
	CTL_4	CTL_4	CTL_4	Verdaderas
	CTL_5	CTL_5	CTL_5	Verdaderas
	CTL_6	-	-	Verdaderas

Nota. Clasificación y cantidad de las diferentes isoformas de CTLs encontradas. Las CTLs-Snaclecs se representaron con un color más oscuro respecto a las CTLs-Verdaderas.

5.3.5 *Proteínas Secretoras Ricas en Cisteína (CRISP) Reportadas*

Las Proteínas Secretoras Ricas en Cisteína (CRISP), son una familia común en los venenos de serpientes de las familias Elapidae, Viperidae y Colubridae (Modahl y Mackessy, 2019). Aunque hoy en día el rol de esta toxina en los cuadros de envenenamiento no está del todo claro, se han encontrado algunos efectos miotóxicos (Peichoto et al., 2009), e incluso una interacción con los canales de potasio (Mackessy et al., 2021). Estas toxinas se han reportado ampliamente en los venenos de serpientes por todo el mundo (Yamazaki et al., 2003), existiendo la posibilidad de su reclutamiento temprano a la glándula de Duvernoy antes que la familia Viperidae divergiera de los demás integrantes de la superfamilia Colubroidea (Fry y Wüster, 2004). En la presente pasantía, se encontraron en la mayoría de individuos únicamente 1 isoforma de CRISP en el veneno de *B. sertaneja* y *E. aesculapii*, sin embargo, en el individuo 3 de *E. aesculapii* se reportaron 2 isoformas (Figura 8), concordando con la hipótesis en la cual las CRISP no sufrieron duplicaciones seriales en la evolución de los diferentes familias de serpientes, de tal modo, que normalmente se encuentra un solo parólogo expresado (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016). Los niveles de expresión de las CRISPs en *B. sertaneja* variaron entre el 1,90% - 2,70% (Figuras 3-5) y en *E. aesculapii* entre el 1,12% - 1,42% (Figuras 6-8), sin embargo, en esta última especie no se encontró expresión de CRISPs en el individuo 1. Esto podría estar influenciado, por diferentes variables, siendo la variación geográfica u ontogenética factores que influyen la composición del veneno (Chippaux et al., 1991).

En un alineamiento realizado de las CRISP de *B. sertaneja*, *E. aesculapii*, *B. jararaca* y *Austrelaps superbus*, se encontró una gran identidad en las diferentes secuencias, un dominio CAP, un dominio rico en cisteína y un patrón conservado de 16 residuos de cisteína, siendo esto anteriormente reportado (Mackessy et al., 2021) (Apéndice E). Sin embargo, en los 3 individuos

de *B. sertaneja*, se encontró un residuo de cisteína adicional en la posición 143, en la cual generalmente se observa un aminoácido de Histidina (H) o de Tirosina (Y) (Mackessy et al., 2021). Para un mayor entendimiento de la interacción de este residuo adicional de Cisteína en *B. sertaneja*, se requieren estudios adicionales para entender su función a nivel estructural y funcional.

Finalmente, aunque las funciones biológicas de las CRISP en los venenos de serpiente no están del todo claras, no se pueden descartar diversas funciones biológicas como se ha evidenciado en las PLA₂ y 3FTxs, teniendo estas proteínas un alto nivel de conservación estructural (Pla et al., 2018), al igual que en las CRISP.

5.4 Grupos de Toxinas Menores

Otros componentes proteicos presentados generalmente en cantidades menores en los venenos de las familias Elapidae y Viperidae, también se han detectado en cantidades bajas en venenos de colúbridos, como es el caso de las especies estudiadas en la presente pasantía. Sin embargo, es discutible la contribución real de estas moléculas en el veneno, de tal modo, que algunos autores consideran estos compuestos como no tóxicos (Hargreaves et al., 2014). Entre las toxinas de grupos menores reportadas en la presente pasantía se encontraron ACES, WAP, KU-WAP, DIES, CYST, 5'NUCL, FactV y VEGF. Debido a sus bajos niveles de expresión reportados en los perfiles composicionales de cada individuo, se cree que son componentes no tóxicos y posiblemente correspondan a componentes endofisiológicos producidos en el entorno de la glándula de Duvernoy (Rokyta et al., 2012). Sin embargo, la contribución real de estas toxinas en el veneno sigue sin resolverse (Hargreaves et al., 2014). Por ende, realizar estudios a profundidad que incluyan ensayos funcionales y análisis proteómicos del veneno presente en la

glándula de Duvernoy de especies pertenecientes a la familia Colubridae, ayudaría a aclarar dudas acerca de los cuadros de envenenamiento y la función real de estas toxinas. Finalmente entre los grupos de toxinas menores encontrados en la presente pasantía, se reportaron familias que son de mayor abundancia en individuos de la familia Viperidae y Elapidae y que tienen una función importante a la hora de cazar sus presas.

Un común denominador en *B. sertaneja* y *E. aesculapii* fue la expresión de las Lipasas Ácidas de Veneno de Serpiente (SVLIPA), las cuales son similares a las lipasas ácidas lisosomales reportadas en mamíferos (Campos et al., 2016). Estas proteínas han sido reportadas en otros colúbridos tanto a nivel transcriptómico como proteómico y la evidencia sugiere que, aunque se encuentren en niveles bajos, pueden ser un nuevo tipo de componentes de veneno, y posiblemente una toxina recientemente reclutada en algunos grupos (Campos et al., 2016). En *B. sertaneja* únicamente se encontraron 2 isoformas y sus valores de expresión se incluyeron entre los porcentajes de otras toxinas en los perfiles composicionales de cada individuo (Figuras 3-8).

En *E. aesculapii*, se reportaron bajos niveles de 3FTxs, siendo uno de los principales componentes de los venenos en la familia Elapidae y poco reportados en la familia Colubridae. Además, en el individuo 3 de *E. aesculapii*, se reportaron 2 isoformas de 3FTxs y sus valores de expresión se encuentran dentro de los porcentajes de otras toxinas en los perfiles composicionales de cada individuo (Figuras 5-8). Sin embargo, Junqueira-de-Azevedo et al. (2016), recuperó secuencias de 3FTxs en el transcriptoma de la glándula de de Duvernoy de *Xenodon merremi* y observó una dominancia de estas en el transcriptoma de *Boiga irregularis*. Los niveles de expresión de estas toxinas encontrados en *E. aesculapii* son similares a los reportados en *E. miliaris*, la cual pertenece al mismo género (*Erythrolamprus*) y Tribu (Xenodontini) (Bayona-Serrano et al., 2020; Junqueira-de-Azevedo et al., 2016). Sin embargo, se

resalta la necesidad de realizar otros estudios que consideren más datos, para que estas comparaciones sean estadísticamente significativas.

Otro caso bastante interesante, es la presencia de Inhibidores de Fosfolipasas (PLA_{2i}) en *B. sertaneja*; ya que la presencia de estos inhibidores enzimáticos tiene la función principal de protegerlas de los ataques de otras serpientes. Los PLA_{2i} se producen principalmente en el hígado y son secretados en el plasma de serpientes venenosas y no venenosas (Okumura et al., 1999), pero en algunas ocasiones pueden producirse en las glándulas venenosas, como ya ha sido reportado en *B. jararaca* y en glándulas de Duvernoy de algunos colúbridos en niveles de expresión de bajos a medios (Junqueira-de-Acevedo et al., 2015, 2016). Posiblemente las PLA_{2i} pueden desempeñar funciones importantes en el mantenimiento del tejido glandular (Brillard-Bourdet et al., 1998; Okumura et al., 1999). Finalmente debido a que *B. sertaneja* es una especie ofiofaga, y su dieta se basa en hasta un 71% de otras serpientes (Alencar et al., 2013), hipotetizamos que la presencia de estos inhibidores en sus glándulas de veneno se debe a que esta especie presenta una expresión endógena elevada de estas proteínas a nivel constitutivo.

Otra toxina reportada en cantidades bajas para los individuos de las 2 especies estudiadas fueron la Fosfolipasas B (PLB). Esta enzima se ha reportado en varios venenos de animales, incluidas las serpientes (Coronado et al., 2018), pero su actividad biológica y mecanismo de acción en el veneno son poco conocidos. Sin embargo, en el veneno de *Pseudechis colletti*, se ha reportado que las PLB encontradas poseen una estructura dimérica con una masa molecular de aproximadamente 35 kDa y una actividad hemolítica in vitro probada en eritrocitos de conejo y humanos (Bernheimer et al., 1987).

Finalmente, aunque estos grupos de toxinas generalmente se han clasificado como componentes de menor ocurrencia en venenos de serpientes, debido a sus bajos niveles de

expresión (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016; Rokyta et al., 2012), para tener una noción más clara de su verdadero aporte biológico y funcional, es necesario realizar más estudios proteómicos y funcionales. Por ende, se sugiere realizar más estudios de esta índole con el fin de aclarar las funciones reales de los componentes tóxicos de baja abundancia reportados en la glándula de Duvernoy de *B. sertaneja* y *E. aesculapii*.

5.5 Variación en la Composición del Veneno de *B. sertaneja* y *E. aesculapii*

Diversos autores han reportado una alta variabilidad en la composición, actividad y efectos del veneno de serpiente en diferentes niveles. (Gibbs et al., 2011; Margres et al., 2016; Núñez et al., 2009) Factores geográficos, ontogenéticos, filogenéticos y ecológicos han sido reportados como posibles fuentes de variación inter e intraespecífica en varios grupos (Calvete et al., 2009; Chippaux et al., 1991; Pla et al., 2017). Esta variación ha sido confirmada por diversos estudios transcriptómicos y proteómicos (Corrêa-Netto et al., 2011; Herrera et al., 2012; Rodrigues et al., 2012). Con los datos analizados en este trabajo, fue posible detectar la ocurrencia de variación composicional a nivel transcriptómico entre individuos de *B. sertaneja* y *E. aesculapii*.

5.5.1 Variación Interespecífica entre *B. sertaneja* y *E. aesculapii*

El primer nivel de variación identificada entre *B. sertaneja* y *E. aesculapii* fue la ausencia y presencia de algunos tipos de toxinas. Aunque pertenecen a la misma subfamilia de colúbridos (Dipsadinae), las dos especies sólo compartieron 9 (SVMs, CRISP, CTLs, HYAL, CYST, WAP, SVLIPA, PLB y svMMPs) de las 20 familias de toxinas reportadas en el presente estudio (Figura 2).

Si se comparan los perfiles composicionales obtenidos de *B. sertaneja* y *E. aesculapii* en la presente pasantía, se podría identificar que, entre los componentes principales del veneno de serpiente y los componentes de menor ocurrencia del veneno de serpiente, hay una predominancia de SVMPs, CRISP y CTLs (Figura 2). Estas familias de toxinas también se han reportado en abundancia en individuos de la familia Viperidae y son componentes ubicuos en venenos de serpiente (Amazonas et al., 2018; Junqueira-de-Azevedo et al., 2016). En cuanto a las posibles nuevas toxinas del veneno de colúbridos, se reportaron tanto en *B. sertaneja* y *E. aesculapii* SVLIPA, PLB y MMPs (Figura 2) que ya habían sido reportadas en el transcriptoma de la glándula de Duvernoy de otras especies de la familia Colubridae (Ching et al., 2006; Junqueira-de-Azevedo et al., 2016).

Por otro lado, a pesar que en *B. sertaneja* y *E. aesculapii* se encontró presencia de toxinas del mismo tipo, los niveles de expresión variaron. Las SVMP-PIII fueron un componente principal en *B. sertaneja* (9,64% - 15,95%) (Figuras 3-5) mientras que en *E. aesculapii* representaron un porcentaje menor de las toxinas encontradas (0,36% - 2,95%) (Figuras 6-8). De forma similar los niveles de expresión de las CRISP en *B. sertaneja* fueron más altos (1,90% - 2,70%), respecto a los niveles de expresión reportados en *E. aesculapii* (1,12% - 1,42%) (Figuras 3-8). Sin embargo, en cuanto a las CTLs, en *B. sertaneja* los valores de expresión fueron más bajos (0,95% - 1,10%) respecto a los de *E. aesculapii* (2,11% - 9,69%). Finalmente, una novedad, y punto muy importante en esta pasantía, fue la presencia de las diferentes MMPs en las dos especies de estudio, reportándose en *B. sertaneja*, únicamente MMPs endógenas (seMMP-9) (1,25% - 1,41%) (Figuras 3-5; Apéndice A) y en *E. aesculapii*, svMMPs de tipo A y B (16,99% - 28,14%) (Figuras 6-8; Apéndice A), siendo estos resultados similares a los reportados en las Tribus Xenodontini y Pseudoboini por Bayona-Serrano et al. (2020).

Adicionalmente, se encontraron toxinas exclusivas de cada especie. Por un lado, en *B. sertaneja* se reportaron las PLA₂-IIE con porcentajes de expresión altos (12,76% - 16,28%); CNPs con porcentajes de expresión bajos (0,015% - 0,037%); VEGF con porcentajes de expresión bajos (0,012% - 0,032%); FactV con porcentajes de expresión bajos (0,004% - 0,01%) y PLA_{2i} con porcentajes de expresión bajos (0,0041% - 0,0047%). Además, de presentarse únicamente en el individuo 2 5'NUCL y KU-WAP con porcentajes de expresión bajos (0,0011% y 0,0001% respectivamente).

Por otro lado, en *E. aesculapii* se evidenció la presencia de 3FTxs con porcentajes de expresión bajos (0,035% - 0,079%) y DIES con porcentajes de expresión bajos (0,0051% - 0,010%). Además, de presentarse únicamente en el individuo 1 ACES con porcentajes de expresión bajos (0,0016%).

Estas diferencias cualitativas y cuantitativas han permitieron detectar tanto en *B. sertaneja* como en *E. aesculapii* una variación composicional a nivel transcriptómico en la glándula de Duvernoy. Esto es esperado en individuos pertenecientes a la familia Colubridae debido a su amplia ecología, aunque existen pocos trabajos explorando esta variación en la familia. Además, es un punto diferencial respecto al patrón de toxinas conservado que se evidencia en la familia Viperidae (Heyborne y Mackessy, 2013; Mackessy et al., 2021).

5.5.2 Variación Intraespecífica en *B. sertaneja*

En *B. sertaneja* se expresaron en gran abundancia CRISP, seMMP-9 y CTLs en la glándula de Duvernoy de los 3 individuos. Sin embargo, los niveles de expresión variaron en cada uno de ellos (Figuras 3-5). Adicionalmente, se mostró una predominancia de la familia de toxinas SVMP-PIII en los individuos 1 y 3, mientras en el individuo 2, la familia de toxinas

dominante fueron las PLA₂-IIE. Estas diferencias fueron pequeñas y la variación en los niveles de expresión de las SVMP-PIII y las PLA-IIE mostró un patrón de relativamente homogéneo en los 3 individuos (Figuras 3-5). Esta leve variación puede justificarse gracias a estudios que se han enfocado en examinar los cambios individuales en el veneno de los viperidos del nuevo mundo, la cual hereda genéticamente o se ve afectada ontogenéticamente por factores ambientales, variaciones estacionales o la dieta (Liu et al., 2011; Lomonte et al., 2008; McGivern et al., 2014; Pla et al., 2017; Valente et al., 2009). Esto puede deberse a que los tres individuos estudiados en esta pasantía fueron colectados en localidades diferentes. El individuo 1 fue recolectado en el estado de Paraíba – Brasil y los individuos 2 y 3 en el estado de Rio Grande do Norte – Brasil (Apendice F). Estas dos localidades están separadas por aproximadamente 166,79 Km en línea recta y pueden representar poblaciones diferentes de la especie. La distancia en línea recta entre localidades, fue calculada con el servidor “calculador de distancias”: <https://es.distance.to>. Debido a esto, resaltamos la necesidad de más estudios poblacionales para entender el efecto geográfico en la variación de las toxinas expresadas en esta especie. Otros factores que pudieron influenciar en la variación de la composición del veneno entre los 3 individuos pueden ser el estado de desarrollo y el sexo. Los efectos del desarrollo y el sexo de cada individuo en la composición del veneno ya han sido estudiados la familia Viperidae en diversos trabajos previos (Mackessy et al., 2021; Menezes et al., 2006; Pla et al., 2017). Aunque el sexo de los individuos 1 (M), 2 (F) y 3 (F) es conocido, la edad de los 3 individuos estudiados no se sabe con exactitud. Debido al bajo número de individuos de cada sexo y a la falta de datos ontogenéticos no es posible sugerir que las diferencias observadas se relacionan a factores ontogenéticos o caracteres sexuales. Por ende, los factores responsables de la variación

composicional en esta especie no puedan elucidarse del todo con los datos obtenidos en el presente trabajo.

En conclusión, se reportó una variación leve en las toxinas encontradas en la glándula de Duvernoy de los 3 individuos a nivel cualitativo y cuantitativo, relacionando dicha variación con diferentes factores que se desconocen en la presente pasantía, tales como su ecología dietaria, edad, frecuencia y tipo de alimentación etc. Debido a esto, es recomendable realizar estudios donde se contemplen un mayor número de individuos con los datos anteriormente nombrados, y así entender de una forma clara los efectos que pueden llegar a tener estas variables en el patrón de toxinas expresado en la glándula de Duvernoy de *B. sertaneja*.

5.5.3 Variación Intraespecífica en *E. aesculapii*

En *E. aesculapii* se expresaron en gran abundancia svMMPs, SVMP-PIII, y CTLs en la glándula de Duvernoy de los 3 individuos. Sin embargo, los niveles de expresión variaron en cada uno de ellos (Figuras 6-8). Esto se puede evidenciar en el individuo 2, que presentó una expresión de SVMP-PIII aproximadamente 7 veces menor (0,36%) respecto a los individuos 1 y 3 (2,95% y 2,19% respectivamente) (Figuras 6-8). Adicionalmente, en el individuo 1 no se expresaron CRISPs, siendo estas una de las toxinas con mayor porcentaje de expresión en los individuos 2 y 3 (Figuras 6-8). Finalmente, otra variación importante del individuo 1 respecto a los individuos 2 y 3, es el porcentaje de toxinas expresadas en la glándula de Duvernoy, siendo el individuo 1 el que menor cantidad de toxinas reportó con tan solo un 22,10%, respecto a los individuos 2 y 3, que reportaron un 35,33% y 41,39% respectivamente.

Es posible que estas variaciones hayan sido causadas por los diferentes factores geográficos a los que estaban sometidos los 3 individuos estudiados. El individuo 1 fue colectado

en el municipio de Itú, del estado de São Paulo – Brasil; mientras que los individuos 2 y 3, se encontraron en el municipio de Barueri, del estado São Paulo – Brasil (Apendice F). Estas dos localidades están separadas por aproximadamente 51,02 Km en línea recta. La distancia en línea recta entre localidades, fue calculada con el servidor “calculador de distancias”: <https://es.distance.to>. Por otro lado, otro factor que pudo influenciar en la variación de la composición del veneno entre los 3 individuos podría ser el estado de desarrollo. Los efectos del desarrollo en la composición del veneno han sido evidenciados en individuos adultos y juveniles de la familia Viperidae en diversos trabajos previos (Liu et al., 2011; Lomonte et al., 2008; Mackessy et al., 2021; Pla et al., 2017). Sin embargo, debido a que la edad de los 3 individuos estudiados no se sabe con exactitud, no es posible proponer que las diferencias observadas se relacionan a factores ontogenéticos, por ende, las causas reales responsables de la variación composicional en esta especie no pueden elucidarse del todo.

Al igual que en *B. sertaneja*, se recomienda realizar estudios donde se contemplen un mayor número de individuos con los datos anteriormente obtenidos, y así entender de una forma clara los efectos que pueden llegar a tener estas variables en el patrón de toxinas expresado en la glándula de Duvernoy de *E. aesculapii*.

5.6 Efectos

La función principal del veneno presente en las glándulas de las serpientes, es incapacitar a su presa para su posterior digestión y, en segundo lugar, ayudar en la defensa contra los depredadores (Mackessy et al., 2021). Las proteínas del veneno se direccionan y se encargan de inhibir muchos procesos fisiológicos, especialmente en los sistemas cardiovascular y nervioso de las presas o depredadores (Fry et al., 2015). Existen más de dos docenas de superfamilias de

proteínas reportadas en los venenos de serpiente, pero las superfamilias más abundantes son las 3FTxs, CRISP, CTLs, SVMPs, PLA₂, Serino Péptidasas y péptidos con un menor peso molecular como Péptidos Potenciadores de Bradiquinina y Péptidos Natriuréticos (Mackessy et al., 2021).

Respecto a los envenenamientos causados por la familia Colubridae, son menos recurrentes que los envenenamientos causados por especies pertenecientes a las familias Elapidae y Viperidae, debido principalmente a su baja capacidad de inocular dosis letales en humanos por su dentadura opistoglifa (Torres-Bonilla et al., 2018). Sin embargo, los casos reportados de envenenamiento en individuos de la familia Colubridae, generan algunos síntomas similares a los reportados en la familia Viperidae, tales como edemas, eritemas y hemorragias en el sitio de la mordedura (Díaz et al., 2004; Menegucci et al., 2019; Santos-Costa et al., 2000). Aunque los datos de posibles efectos de envenenamiento causados por *B. sertaneja* y *E. aesculapii* son escasos, utilizando la información obtenida en otras especies de serpiente, es posible realizar inferencias sobre el posible espectro de efectos causados por el veneno de las especies estudiadas en caso de un envenenamiento.

Los datos transcriptómicos obtenidos en la presente pasantía permitieron identificar un grupo de toxinas principales en las dos especies (SVMP-PIII, CTLs y CRISP) y algunas que ocurren de forma única (PLA₂-IIE y svMMPs). Cada una de estas puede contribuir de forma diferente a las actividades y efectos que el veneno de estas especies puede contener.

5.6.1 Efectos de SVMPs

La fisiopatología de un cuadro de envenenamiento en *B. sertaneja* y *E. aesculapii*, podría variar desde alteraciones locales a sistémicas, esto se debe a la presencia de SVMPs reportadas en el transcriptoma de la glándula de Duvernoy de esta especie. Estas toxinas proteolíticas

pueden producir hemorragia, mionecrosis, ampollas, coagulopatías y efectos plaquetarios, así, como presentar actividades pro-inflamatorias (Gutiérrez y Rucavado, 2000; Teixeira et al., 2005). Algo para resaltar en las SVMP-PIII reportadas en la presente pasantía, es que a diferencia de las SVMP-PI y SVMP-PII, su actividad hemorrágica es más potente (Bjarnason y Fox, 1994; Fox y Serrano, 2005). Esto se debe posiblemente a los dominios de tipo desintegrina y ricos en cisteína que presentan y pueden dirigir las SVMP-PIII a objetivos relevantes en la microvasculatura donde pueden causar el mayor daño (Jia et al., 1997; Serrano et al., 2006; Takeya et al., 1990). Además, las SVMP-PIII son menos susceptibles a la inhibición por la α 2-macroglobulina, un potente inhibidor de las proteínas plasmáticas (Mackessy et al., 2021). El mecanismo real de esta falta de inhibición no se conoce en la actualidad, pero es probable que los dominios tipo desintegrina y ricos en cisteína presentes en las SVMP-PIII produzcan limitaciones estructurales en la unión de la α 2 -macroglobulina sobre la enzima. Por ende, las SVMP-PIII pueden circular sistémicamente sin ser inhibidas por la α 2 -macroglobulina, convirtiéndose así en toxinas altamente peligrosas debido a su capacidad para inducir hemorragia sistémica siendo esta, una de las complicaciones más graves en las mordeduras reportadas por especies de la familia Viperidae (Anderson y Ownby, 1997; Escalante et al., 2003; Kamiguti et al., 1991; Otero et al., 2002).

En la presente pasantía, aunque las medias de expresión de SVMP-PIII obtenidas en las dos especies (12,91% en *B. sertaneja* y 1,83% en *E. aesculapii*), nos permiten inferir que la actividad proteolítica casuado por SVMPs en *B. sertaneja* debe ser mayor que en *E. aesculapii*. Sin embargo, no se puede desestimar el aporte de otras enzimas proteolíticas a la actividad proteolítica general en un cuadro de envenenamiento ocasionado por estas especies. Un estudio realizado en *Erythrolamprus bizona* (Tribu Xenodontini) y *Pseudoboa newwiedii* (Tribu

Pseudoboini) han demostrado que el veneno de *E. bizona* presenta una mayor actividad proteolítica que el veneno de *P. neuwiedii* (Torres-Bonilla et al., 2017). Estos resultados pueden servir de base para intuir una mayor actividad proteolítica en *E. aesculapii* (perteneciente a la Tribu Xenodontini) que en *B. sertaneja* (perteneciente a la Tribu Pseudoboini). Aunque es posible que esta actividad proteolítica sea ocasionada por otros componentes de mayor expresión en *E. aesculapii*, como lo son las svMMPs reportadas en mayor abundancia en la glándula de Duvernoy de esta especie.

5.6.2 Efectos de MMPs

Aunque las MMPs son predominantes en el perfil composicional de algunas especies, las funciones de éstas aún no han sido investigadas de forma eficaz (Bayona-Serrano et al., 2020). Esto se debe principalmente a que las serpientes con colmillos traseros producen veneno en menor cantidad que las especies de importancia médica y no producen mayor interés por la comunidad biomédica (Mackessy., 2021). En el presente trabajo se identificaron los dos tipos de MMPs que han sido reportados en colúbridos, las svMMPs y las seMMP-9. Sin embargo, los posibles efectos enzimáticos causados por estas MMPs han sido inferidos de los pocos ensayos bioquímicos realizados con muestras de veneno completo, evidenciando una fuerte acción proteolítica en diferentes ensayos realizados con sustratos (Bayona-Serrano et al., 2020; Torres-Bonilla et al., 2018). Adicionalmente, se ha demostrado que la actividad proteolítica observada en venenos ricos en MMPs fue equivalente a la observada en venenos en los que predominan las SVMPs, indicando que, sin importar cuál es el componente principal del veneno entre las MMPs o SVMPs, se mantiene el fenotipo proteolítico (Bayona-Serrano et al., 2020).

Algo para resaltar, es que las posibles funciones biológicas de las MMPs son especulativas actualmente, sin embargo, pueden inferirse teniendo en cuenta los efectos conocidos de los venenos completos experimentados *in vivo*. Los accidentes con especies que poseen MMPs han informado edema, dolor irradiado, lesiones equimóticas, temperatura local alta, salivación excesiva con sabor metálico, fuertes dolores de cabeza y efectos hemorrágicos y proteolíticos (Araújo et al., 2018; Puerto y França, 2009).

Los pocos informes de accidentes ofídicos en humanos por *E. aesculapii*, *E. poecilogyrus* y *E. miliaris* (tribu Xenodontini), siendo especies que tienen altas cantidades de svMMPs, son consistentes con síntomas de sangrado en la herida, edema y dolor local (Santos-Costa y Di-Bernardo, 2001). Estudios sobre el veneno de *E. aesculapii* han informado hemorragia local extensa en la piel y el músculo gastrocnemio de ratones como una posible consecuencia de la degradación de los componentes de la matriz extracelular (MEC) y la interferencia con la cascada de coágulos sanguíneos normales (Sánchez et al., 2019). Finalmente, se ha demostrado que el veneno de *E. bizona* induce a notables alteraciones morfológicas en las fibras musculares del biventer cervicis de pollo, asociándolo con una alta acción proteolítica (Torres-Bonilla et al., 2017).

En conclusión, realizar estudios funcionales, proteómicos y genómicos de estas toxinas, es de importancia para lograr identificar las funciones y efectos causados por los diferentes subtipos de MMPs reportados en *B. sertaneja* y *E. aesculapii* en posibles cuadros de envenenamiento.

5.6.3 Efectos de CRISP

Las CRISP de veneno de serpiente han demostrado una gran variedad de efectos biológicos, incluyendo el bloqueo de las corrientes de potasio en las neuronas, el bloqueo de las corrientes de calcio en las neuronas, la unión a los canales iónicos que son activados por nucleótidos cíclicos en células fotorreceptoras y neuronas olfativas, bloqueo de los canales de BKca, bloqueo de la liberación de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico del músculo cardíaco y esquelético, bloqueo de la contracción del músculo liso vascular, proteólisis específica, inducción de hipotermia en animales de presa, y finalmente la muerte (Mackessy et al., 2021).

En cuanto a los posibles efectos causados por las CRISPs de la familia Colubridae, se ha demostrado que las CRISP encontradas en *Philodryas patagoniensis* generan mionecrosis en el sitio de la mordedura (Peichoto et al., 2009), siendo posible que en *B. sertaneja* y *E. aesculapii* presenten efectos similares. Sin embargo, es necesario realizar estudios donde se evalúen funcionalmente las CRISP reportadas en el veneno de la glándula de Duvernoy en las especies de estudio y así, entender de una forma más específica su función. Además, podría generar un aporte valioso al desconocimiento que existe en la actualidad acerca de la función de las CRISP presentes en los venenos de serpiente (Jin et al., 2003; Osipov et al., 2005; Yamazaki et al., 2002).

5.6.4 Efectos de PLA₂

Las enzimas PLA₂ del veneno de serpiente que se encontraron en el veneno de *B. sertaneja*, pueden presentar una amplia variedad de efectos farmacológicos (Mackessy et al., 2021). La mayoría de las enzimas PLA₂ no poseen actividad hemolítica directa (Fletcher et al., 1982; Jiang et al., 1989), sin embargo, los productos derivados de la hidrólisis, lisofosfolípidos y

ácidos grasos libres generados por su actividad catalítica, pueden causar hemólisis de forma indirecta (Condrea et al., 1964).

Por otro lado, algunas PLA₂ también presentan efectos neurotóxicos presinápticos y postsinápticos, dependiendo de su sitio de acción. En la neurotoxicidad presináptica, las enzimas PLA₂ se dirigen a la terminal nerviosa, mientras que en la neurotoxicidad postsináptica actúan sobre el músculo (Mackessy et al., 2021). Adicionalmente se presenta mionecrosis local y efectos mielotóxicos sistémicos (Mackessy et al., 2021). En ambos casos, conducen a la fuga de CPK (Creatina Fosfocinasa) al plasma de la víctima (Gutiérrez y Ownby, 2003; Mukherjee y Maity, 2002) generando un daño agudo en las células musculares, hipercontracción y otras alteraciones celulares que conducen a la muerte celular (Gutiérrez y Lomonte, 1995).

Otro efecto conocido de estas proteínas es la inhibición de la coagulación sanguínea, inhibiendo el proceso de activación de protrombina a trombina a través de mecanismos no enzimáticos (Kerns et al., 1999; Kini y Evans, 1995; Stefansson et al., 1990). Además, se ha reportado que las enzimas PLA₂, tienen la capacidad de generar edema debido a la presencia del ácido araquidónico liberado en el proceso de hidrólisis de los fosfolípidos, que se convierte en prostaglandinas y leucotrienos. Estos compuestos generan permeabilidad vascular y la formación del edema en el lugar de la mordedura (Angulo et al., 1997; Ali et al., 1999).

Aunque estos cuadros de envenenamiento asociados a PLA₂ han sido reportados principalmente en venenos de individuos pertenecientes a la familia Viperidae (Escalante et al., 2011; Gutiérrez et al., 2005), estas proteínas se han encontrado como un componente principal en individuos de la familia Colubridae, como es el caso de *Oxyrhopus guibei* (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016), siendo esta especie perteneciente a la tribu Pseudoboini, al igual que *B. sertaneja*. Sin embargo, las PLA₂ reportadas tanto en *B. sertaneja* como en *O. guibei* son de tipo

PLA₂-IIE, una subclase de PLA₂ poco reportada en la literatura la glándula de Duvernoy de los colúbridos y teniendo un desconocimiento funcional en la actualidad. Adicionalmente, los datos obtenidos de *E. aesculapii* en la presente pasantía donde no se evidencia presencia de PLA₂-IIE, coinciden con lo reportado en *Erythrolamprus miliaris* en otros trabajos (Fry et al., 2008; Junqueira-de-Azevedo et al., 2016), donde no se reporta la presencia de este tipo de toxinas en esta especie.

Finalmente, aunque se desconoce la verdadera función de las PLA₂-IIE en los cuadros de envenenamiento ocasionados por serpientes pertenecientes a la familia Colubridae, efectos reportados de necrosis y edema de fibras musculares causadas por el veneno de *P. neuwiedii* en músculos de biventer cervicis de pollo *in vitro*, se atribuyen parcialmente a las PLA₂ (Torres-Bonilla et al., 2017). Debido a esto, podemos especular que el veneno de *B. sertaneja* posea efectos similares mediados por las PLA₂-IIE que son predominantes en el transcriptoma de su glándula de Duvernoy.

5.6.5 Efectos de CTLs

Las Lectinas de Tipo C (CTLs) reportadas en *B. sertaneja* y *E. aesculapii* son componentes en los venenos de serpientes que generalmente contribuyen a la interrupción de procesos de regulación hemostática. Además, estas toxinas suelen dirigirse a una amplia gama de componentes del plasma y células sanguíneas, activándolos o inhibiéndolos (Mackessy et al., 2021).

Como se mencionó en el inciso 5.3.4, las CTLs reportadas en los venenos de serpiente se dividen en 2 grupos. Por un lado, se encuentran las Lectinas de Serpiente Verdaderas (CTLs-Verdaderas), que son proteínas clásicas de unión a azúcares las cuales tienen la capacidad de

unirse a la galactosa/lactosa (Arlinghaus et al., 2015; Drickamer, 1999). Este tipo de CTLs verdaderas, no suelen ser altamente tóxicas y son dependientes de calcio, además, poseen un motivo encargado del reconocimiento de carbohidratos (CRD), permitiéndoles reunir eritrocitos (Arlinghaus et al., 2015; Drickamer, 1999).

Por otro lado, se encuentran las Lectinas de Tipo C de Serpiente, que son conocidas comúnmente como “CTLs-Snaclecs” (Clemetson et al., 2009). Estas actúan en los receptores de glicoproteínas plaquetarias, de tal modo que inhiben o promueven eventos hemostáticos. Estos tipos de CTLs, se encuentran principalmente en especies que presentan cuadros hemorrágicos (Mackessy et al., 2021).

Algunos trabajos han reportado la presencia de CTLs en algunas especies pertenecientes a la familia Colubridae (Ching et al., 2006; Junqueira-de-Azevedo et al., 2016; Modahl et al., 2015). Encontrando que las mayoría de isoformas de CTLs encontradas en las glándulas de esta familia se encuentran en el grupo de “CTLs-Snaclecs” (Junqueira-de-Azevedo et al., 2016), concordando con los resultados reportados en la presente pasantía de investigación en *B. sertaneja* y *E. aesculapii*. Aunque que no se han realizado estudios funcionales del veneno de *B. sertaneja* (Tribu Pseudoboini), en la especie *P. neuwiedii* (Tribu Pseudoboini) se reportan elevados efectos hemorrágicos (Torres-Bonilla et al., 2017, 2018). Esto sugiere que el veneno de *B. sertaneja* podría ocasionar efectos similares dirigidos por la presencia de CTLs encontradas en el presente estudio. Finalmente, en *E. aesculapii* ya han sido reportados efectos hemorrágicos (Sánchez et al., 2019), los cuales podrían estar relacionados por la acción de las CTLs presentes en su glándula de duvernoy.

6. Conclusiones

Debido a que el volumen de veneno secretado por las glándulas de Duvernoy en especies de serpientes pertenecientes a la familia Colubridae es poco, los análisis bioquímicos y estudios realizados acerca de la composición proteica del veneno se dificultan en muchas ocasiones. Sin embargo, hoy en día las técnicas de Secuenciación de Nueva Generación (NGS), tales como Illumina™, han facilitado este tipo de análisis y han proporcionado avances en el conocimiento de esta familia poco estudiada debido a su baja poca relevancia médica. De esta forma se han comenzado a caracterizar la plethora de componentes interesantes y que podrían ser de importancia en futuras nuevas investigaciones.

Utilizar durante el ensamblaje *de novo* diferentes tipos de software (enfoque híbrido), genera una mayor cantidad de contigs durante el proceso, permitiendo una mayor cobertura del transcriptoma. Por ende, si se realizan procesos de ensamblajes *de novo* con metodologías similares a la utilizada en la presente pasantía, se podrían obtener datos más robustos y fiables.

Gracias al análisis transcriptómico realizado en la presente pasantía, se lograron identificar Componentes Principales del Veneno de Serpiente; Componentes de Menor Ocurrencia del Veneno de Serpiente y Posibles Nuevas Toxinas del Veneno de Colúbridos presentes en la glándula de Duvernoy de cada uno de los individuos estudiados de *B. sertaneja* y *E. aesculapii*. Sin embargo, aunque muchas de las toxinas identificadas en la presente pasantía, tales como SVMPS, PLA₂ y CRISP han sido estudiadas a fondo por su presencia en especies de serpiente de relevancia médica, también algunas familias de toxinas novedosas reportadas en este estudio (svMMPs-A y svMMPs-B), han sido poco estudiadas hasta el día de hoy. Por ende,

acompañar este tipo de estudios con ensayos funcionales, podría generar una caracterización más completa y verídica de los venenos secretados por la glándula de Duvernoy de serpientes pertenecientes a la familia Colubridae.

Es recomendable utilizar softwares que permitan eliminar posibles contigs quiméricos, ya que generan más fiabilidad a la hora de obtener posibles mapeos de lectura y genera menos incertidumbre a la hora de realizar análisis de niveles de expresión génica en estudios transcriptómicos.

Finalmente, los posibles perfiles composicionales de la glándula de Duvernoy que fueron obtenidos para cada individuo estudiado, generan nuevo conocimiento y proporcionan un acercamiento transcriptómico importante en serpientes pertenecientes a la familia Colubridae. Incrementar el número de trabajos que caractericen las variaciones del veneno a nivel poblacional es necesario para entender mejor la diversidad de toxinas que aún está oculta en esa familia de serpientes.

Referencias Bibliográficas

- Andrews, S. (2010). FastQC. A quality control tool for high throughput sequence data. *Babraham Bioinformatics*, 370. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Aird, S.D., Aggarwal, S., Villar-Briones, A., Tin, M.M.Y., Terada, K., y Mikheyev, A.S. (2015). Snake venoms are integrated systems, but abundant venom proteins evolve more rapidly. *BMC Genomics*, 16(1), 1-20. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1832-6>
- Aird, S.D., Watanabe, Y., Villar-Briones, A., Roy, M.C., Terada, K., y Mikheyev, A.S. (2013). Quantitative high-throughput profiling of snake venom gland transcriptomes and proteomes (*Ovophis okinavensis* and *Protobothrops flavoviridis*). *BMC Genomics*, 14(1), 790. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-790>
- Alencar, L.R. V., Gaiarsa, M.P., y Martins, M. (2013). The evolution of diet and microhabitat use in Pseudoboine Snakes. *South American Journal of Herpetology*, 8(1), 60-66. <https://doi.org/10.2994/sajh-d-13-00005.1>
- Ali, S.A., Alam, J.M., Stoeva, S., Schütz, J. Ürgen, Abbasi, A., Zaidi, Z.H., y Voelter, W. (1999). Sea snake *Hydrophis cyanocinctus* venom. I. Purification, characterization and N-terminal sequence of two Phospholipases A₂. *Toxicon*, 37(11), 1505-1520. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(99\)00091-4](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(99)00091-4)
- Almagro Armenteros, J.J., Tsirigos, K.D., Sønderby, C.K., Petersen, T.N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., y Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37(4), 420-423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., y Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)
- Anderson, S.G., y Ownby, C.L. (1997). Systemic hemorrhage induced by proteinase H from *Crotalus adamanteus* (eastern diamondback rattlesnake) venom. *Toxicon*, 35(8), 1301-1313. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(97\)00012-3](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(97)00012-3)
- Angulo, Y., Chaves, E., Alape, A., Rucavado, A., Gutiérrez, J.M., y Lomonte, B. (1997). Isolation and characterization of a myotoxic Phospholipase A₂ from the venom of the arboreal snake *Bothriechis (Bothrops) schlegelii* from Costa Rica. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339(2), 260-266. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.9865>
- Archer, J., Whiteley, G., Casewell, N.R., Harrison, R.A., y Wagstaff, S.C. (2014). VTBuilder: A tool for the assembly of multi isoform transcriptomes. *BMC Bioinformatics*, 15(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12859-014-0389-8>
- Barros, C.G. (2019). ToxinHunter, GitHub repository, <https://github.com/gebarros/ToxinHunter>.
- Bayona-Serrano, J.D., Viala, V.L., Rautsaw, R.M., Schramer, T.D., Barros-Carvalho, G.A., Nishiyama, M.Y., Freitas-De-Sousa, L.A., Moura-Da-Silva, A.M., Parkinson, C.L., Grazziotin, F.G., y Junqueira-de-Azevedo, I.L.M. (2020). Replacement and parallel simplification of nonhomologous proteinases maintain venom phenotypes in rear-fanged snakes. *Molecular Biology and Evolution*, 37(12), 3563-3575. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa192>
- Bernheimer, A.W., Linder, R., Weinstein, S.A., y Kim, K.S. (1987). Isolation and characterization of a Phospholipase B from venom of collett's snake, *Pseudechis colletti*. *Toxicon*, 25(5), 547-554. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90290-x](https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90290-x)

- Bikandi, J., Millán, R.S., Rementeria, A., y Garaizar, J. (2004). *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics*, 20(5), 798-799. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg491>
- Bjarnason, J.B., y Fox, J.W. (1994). Hemorrhagic Metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacology and Therapeutics*, 62(3), 325-372. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(94\)90049-3](https://doi.org/10.1016/0163-7258(94)90049-3)
- Brahma, R.K., McCleary, R.J. R., Kini, R.M., y Doley, R. (2015). Venom gland transcriptomics for identifying, cataloging, and characterizing venom proteins in snakes. *Toxicon*, 93, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.022>
- Brillard-Bourdet, M., Nguyễn, V., Ferrer-Di Martino, M., Gauthier, F., y Moreau, T. (1998). Purification and characterization of a new cystatin inhibitor from Taiwan cobra (*Naja naja atra*) venom. *Biochemical Journal*, 331(1), 239–244. <https://doi.org/10.1042/bj3310239>
- Brust, A., Sunagar, K., Undheim, E.A.B., Vetter, I., Yang, D.C., Casewell, N.R., Jackson, T.N.W., Koludarov, I., Alewood, P.F., Hodgson, W.C., Lewis, R.J., King, G.F., Antunes, A., Hendrikx, I., y Fry, B.G. (2013). Differential evolution and neofunctionalization of snake venom metalloprotease domains. *Molecular and Cellular Proteomics*, 12(3), 651-663. <https://doi.org/10.1074/mcp.m112.023135>
- Burrage, P.S., y Brinckerhoff, C.E. (2007). Molecular targets in osteoarthritis: Metalloproteinases and their inhibitors. *Current drug targets*, 8(2), 293-303. <https://doi.org/10.2174/138945007779940098>
- Bushmanova, E., Antipov, D., Lapidus, A., y Prjibelski, A.D. (2018). RnaSPAdes: A *de novo* transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data. *GigaScience*, 8(9). <https://doi.org/10.1101/420208>

- 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., Borges, A., Segura, Á., Flores-Díaz, M., Alape-Girón, A., Gutiérrez, J.M., Diez, N., De Sousa, L., Kiriakos, D., Sánchez, E., Faks, J.G., Escolano, J., y Sanz, L. (2009). Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. *Journal of Proteomics*, 72(2), 227–240. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.005>
- Calvete, J.J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., y Gutiérrez, J.M. (2009). Venoms, venomomics, antivenomics. *FEBS Letters*, 583(11), 1736-1743. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.029>
- Campos, P.F., Andrade-Silva, D., Zelanis, A., Leme, A.F.P., Rocha, M.M.T., Menezes, M.C., Serrano, S.M.T., y Junqueira-de-Azevedo, I.L.M. (2016). Trends in the evolution of snake toxins underscored by an integrative omics approach to profile the venom of the Colubrid *Phalotris mertensi*. *Genome Biology and Evolution*, 8(8), 2266-2287. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw149>
- Casewell, N.R., Harrison, R.A., Wüster, W., y Wagstaff, S.C. (2009). Comparative venom gland transcriptome surveys of the saw-scaled vipers (Viperidae: *Echis*) reveal substantial intra-family gene diversity and novel venom transcripts. *BMC Genomics*, 10(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-564>
- Casewell, N.R., Jackson, T.N.W., Laustsen, A.H., y Sunagar, K. (2020). Causes and consequences of snake venom variation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(8), 570–581. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.05.006>

- Casewell, N.R., Wagstaff, S.C., Harrison, R.A., Renjifo, C., y Wüster, W. (2011). Domain loss facilitates accelerated evolution and neofunctionalization of duplicate snake venom metalloproteinase toxin genes. *Molecular Biology and Evolution*, 28(9), 2637-2649. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr091>
- Casewell, N.R., Wagstaff, S.C., Wüster, W., Cook, D.A.N., Bolton, F.M.S., King, S.I., Pla, D., Sanz, L., Calvete, J.J., y Harrison, R.A. (2014). Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(25), 9205-9210. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405484111>
- Chandna, R., Tae, H.S., Seymour, V.A.L., Chathrath, S., Adams, D.J., y Kini, R.M. (2019). Drysdalin, an antagonist of nicotinic acetylcholine receptors highlights the importance of functional rather than structural conservation of amino acid residues. *FASEB BioAdvances*, 1(2), 115-131. <https://doi.org/10.1096/fba.1027>
- Chapeaurouge, A., Reza, M.A., Mackessy, S.P., Carvalho, P.C., Valente, R.H., Teixeira-Ferreira, A., Perales, J., Lin, Q., y Kini, R.M. (2015). Interrogating the venom of the viperid snake *Sistrurus catenatus edwardsii* by a combined approach of electrospray and MALDI mass spectrometry. *PLOS ONE*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092091>
- Ching, T.C., Rocha, M.T., Paes, A.F., Pimenta, D.C., Furtado, M.F., Serrano, M.T., Ho, P.L., y Junqueira-de-Azevedo, I.L.M. (2006). Some aspects of the venom proteome of the Colubridae snake *Philodryas olfersii* revealed from a Duvernoy's (venom) gland transcriptome. *FEBS Letters*, 580(18), 4417-4422. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.010>

- Chinnasamy, S., Nagamani, S., y Muthusamy, K. (2015). Zn²⁺ ion of the snake venom metalloproteinase (SVMP) plays a critical role in ligand binding: a molecular dynamics simulation study. *RSC Advances*, 5(86), 70566–70576. <https://doi.org/10.1039/c5ra14693c>
- Chippaux, J.P., Williams, V., y White, J. (1991). Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 29(11), 1279-1303. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90116-9](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90116-9)
- Clemetson, K.J., Morita, T., y Manjunatha Kini, R. (2009). Scientific and standardization committee communications: Classification and nomenclature of snake venom C-type lectins and related proteins. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(2), 360. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03233.x>
- Condrea, E., Mammon, Z., Aloof, S., y de Vries, A. (1964). Susceptibility of erythrocytes of various animal species to the hemolytic and phospholipid splitting action of snake venom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Lipids and Related Subjects*, 84(4), 365-375. [https://doi.org/10.1016/0926-6542\(64\)90001-0](https://doi.org/10.1016/0926-6542(64)90001-0)
- Coronado, M.A., da Silva Olivier, D., Eberle, R.J., do Amaral, M.S., y Arni, R.K. (2018). Modeling and molecular dynamics indicate that snake venom phospholipase B-like enzymes are Ntn-hydrolases. *Toxicon*, 153, 106-113. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.08.014>
- Corrêa-Netto, C., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Silva, D.A., Ho, P.L., Leitão-de-Araújo, M., Alves, M.L.M., Sanz, L., Foguel, D., Zingali, R.B., y Calvete, J.J. (2011). Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. *Journal of Proteomics*, 74(9), 1795-1809. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.04.003>

- de Araújo, P.F., da Silva, W.M., de França, R.C., y França, F.G.R. (2018). A case of envenomation by neotropical Opisthoglyphous snake *Thamnodynastes pallidus* (Linnaeus, 1758) (Colubridae: Dipsadinae: Tachymenini) in Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 60. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201860038>
- Doley, R., Pahari, S., Reza, M.A., Mackessy, S.P., y Kini, R.M. (2010). The gene structure and evolution of Ku-Wap-Fusin (Kunitz Waprin Fusion Protein), a novel evolutionary intermediate of the kunitz serine protease inhibitors and waprins from *Sistrurus catenatus* (Massasauga Rattlesnake) venom glands. *The Open Evolution Journal*, 4, 31-41. <https://doi.org/10.2174/1874404401004010031>
- Du, X.Y., Clemetson, J.M., Navdaev, A., Magnenat, E.M., Wells, T.N.C., y Clemetson, K.J. (2002). ophioluxin, a convulxin-like C-type lectin from *Ophiophagus hannah* (King Cobra) is a powerful platelet activator via glycoprotein VI. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 35124-35132. <https://doi.org/10.1074/jbc.m204372200>
- Ducancel, F., Durban, J., y Verdenaud, M. (2014). Transcriptomics and venomics: implications for medicinal chemistry. *Future Medicinal Chemistry*, 6(15), 1629-1643. <https://doi.org/10.4155/fmc.14.95>
- Durban, J., Juárez, P., Angulo, Y., Lomonte, B., Flores-Diaz, M., Alape-Girón, A., Sasa, M., Sanz, L., Gutiérrez, J.M., Dopazo, J., Conesa, A., y Calvete, J.J. (2011). Profiling the venom gland transcriptomes of Costa Rican snakes by 454 pyrosequencing. *BMC Genomics*, 12, 259. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-259>
- Escalante, T., Núñez, J., Moura Da Silva, A.M., Rucavado, A., Theakston, R.D.G., y Gutiérrez, J.M. (2003). Pulmonary hemorrhage induced by jararhagin, a metalloproteinase from

- Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 193(1), 17-28.
[https://doi.org/10.1016/s0041-008x\(03\)00337-5](https://doi.org/10.1016/s0041-008x(03)00337-5)
- Facente, J., McGivern, J.J., Seavy, M., Wray, K.P., y Rokyta, D.R. (2015). Contrasting modes and tempos of venom expression evolution in two snake species. *Genetics*, 199(1), 165-176.
<https://doi.org/10.1534/genetics.114.172437>
- Fanjul-Fernández, M., Folgueras, A.R., Cabrera, S., y López-Otín, C. (2010). Matrix Metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(1), 3-19.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.07.004>
- Fletcher, J.E., Yang, C.C., y Rosenberg, P. (1982). Basic phospholipase A₂ from *Naja nigricollis* snake venom: Phospholipid hydrolysis and effects of electrical and contractile activity of the rat heart. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 66(1), 39-54.
[https://doi.org/10.1016/0041-008x\(82\)90059-x](https://doi.org/10.1016/0041-008x(82)90059-x)
- Fox, J.W., y Serrano, S.M.T. (2005). Structural considerations of the Snake Venom Metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of Metalloproteinases. *Toxicon*, 45(8), 969-985. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.012>
- Fry, B.G. (2005). From genome to “venome”: Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Research*, 15(3), 403-420. <https://doi.org/10.1101/gr.3228405>
- Fry, B.G., Roelants, K., Winter, K., Hodgson, W.C., Griesman, L., Kwok, H.F., Scanlon, D., Karas, J., Shaw, C., Wong, L., y Norman, J.A. (2010). Novel venom proteins produced by differential domain-expression strategies in Beaded Lizards and Gila Monsters (genus

- Heloderma*). *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), 395–407.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msp251>
- Fry, B.G., Scheib, H., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Silva, D.A., y Casewell, N.R. (2012). Novel transcripts in the maxillary venom glands of advanced snakes. *Toxicon*, 59(7–8), 696–708. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.005>
- Fry, B.G., Scheib, H., van der Weerd, L., Young, B., McNaughtan, J., Ryan Ramjan, S.F., Vidal, N., Poelmann, R.E., y Norman, J.A. (2008). Evolution of an arsenal: Structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). *Molecular and Cellular Proteomics*, 7(2), 215–246. <https://doi.org/10.1074/mcp.m700094-mcp200>
- Fry, B.G., Wüster, W., Kini, R.M., Brusica, V., Khan, A., Venkataraman, D., y Rooney, A.P. (2003). Molecular evolution and phylogeny of Elapid snake venom Three-Finger Toxins. *Journal of Molecular Evolution* 2003, 57(1), 110-129. <https://doi.org/10.1007/s00239-003-2461-2>
- Fry, B.G., y Wüster, W. (2004). Assembling an arsenal: Origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 21(5), 870-883. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh091>
- Fry, B.G. (2015). *Venomous reptiles and their toxins: Evolution, Pathophysiology and Biodiscovery*. Oxford University Press.
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., y Li, W. (2012). CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28(23), 3150-3152.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>

- Gibbs, H.L., Sanz, L., Chiucchi, J.E., Farrell, T.M., y Calvete, J.J. (2011). Proteomic analysis of ontogenetic and diet-related changes in venom composition of juvenile and adult Dusky Pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*). *Journal of Proteomics*, 74(10), 2169-2179. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.06.013>
- Gibbs, H.L., y Mackessy, S.P. (2009). Functional basis of a molecular adaptation: Prey-specific toxic effects of venom from *Sistrurus* rattlesnakes. *Toxicon*, 53(6), 672-679. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.034>
- Gilles, N., y Servent, D. (2014). The European FP7 venomics project. *Future Medicinal Chemistry*, 6(15), 1611-1612. <https://doi.org/10.4155/fmc.14.85>
- Giorgianni, M.W., Dowell, N.L., Griffin, S., Kassner, V.A., Selegue, J.E., y Carroll, S.B. (2020). The origin and diversification of a novel protein family in venomous snakes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(20), 10911-10920. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920011117>
- Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Di Palma, F., Birren, B.W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K y Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644-652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., y Díaz, C. (2005). Hemorrhage induced by Snake Venom Metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*, 45(8), 997-1011. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.029>

- Gutiérrez, J.M., y Ownby, C.L. (2003). Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, 42(8), 915-931. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.005>
- Gutiérrez, J.M., y Rucavado, A. (2000). Snake Venom Metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*, 82(9–10), 841-850. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(00\)01163-9](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(00)01163-9)
- Gutiérrez, J., y Lomonte, B. (1995). Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*, 33(11), 1405-1424. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00085-z](https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00085-z)
- Hargreaves, A.D., Swain, M.T., Logan, D.W., y Mulley, J.F. (2014). Testing the Toxicofera: Comparative transcriptomics casts doubt on the single, early evolution of the reptile venom system. *Toxicon*, 92, 140-156. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.004>
- Hassan-Puttaswamy, V., Adams, D.J., y Kini, R.M. (2015). A distinct functional site in ω -neurotoxins: Novel antagonists of nicotinic acetylcholine receptors from snake venom. *ACS Chemical Biology*, 10(12), 2805-2815. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00492>
- Herrera, M., Fernández, J., Vargas, M., Villalta, M., Segura, Á., León, G., Angulo, Y., Paiva, O., Ma-tainaho, T., Jensen, S.D., Winkel, K.D., Calvete, J.J., Williams, D.J., y Gutiérrez, J.M. (2012). Comparative proteomic analysis of the venom of the taipan snake, *Oxyuranus scutellatus*, from Papua New Guinea and Australia: Role of neurotoxic and procoagulant effects in venom toxicity. *Journal of Proteomics*, 75(7), 2128–2140. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.01.006>
- Heyborne, W.H., y Mackessy, S.P. (2013). Identification and characterization of a taxon-specific three-finger toxin from the venom of the green vinesnake (*Oxybelis fulgidus*; family Colubridae). *Biochimie*, 95(10), 1923-1932. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.025>

- Holding, M.L., Margres, M.J., Mason, A.J., Parkinson, C.L., y Rokyta, D.R. (2018). Evaluating the performance of *de novo* assembly methods for venom gland transcriptomics. *Toxins*, 10(6), 249. <https://doi.org/10.3390/toxins10060249>
- Jia, L.G., Shimokawa, K.I., Bjarnason, J.B., y Fox, J.W. (1996). Snake Venom Metalloproteinases: Structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Toxicon*, 34(11-12), 1269-1276. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(96\)00108-0](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(96)00108-0)
- Jia, L.G., Wang, X.M., Shannon, J.D., Bjarnason, J.B., y Fox, J.W. (1997). Function of Disintegrin-like/Cysteine-rich Domains of Atrolisin a: inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. *Journal of Biological Chemistry*, 272(20), 13094-13102. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.20.13094>
- Jiang, M.S., Fletcher, J.E., y Smith, L.A. (1989). Effects of divalent cations on snake venom cardiotoxin induced hemolysis and 3H-deoxyglucose-6-phosphate release from human red blood cells. *Toxicon*, 27(12), 1297-1305. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(89\)90061-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(89)90061-5)
- Jin, Y., Lu, Q., Zhou, X., Zhu, S., Li, R., Wang, W., y Xiong, Y. (2003). Purification and cloning of Cysteine-rich proteins from *Trimeresurus jerdonii* and *Naja atra* venoms. *Toxicon*, 42(5), 539-547. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(03\)00234-4](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(03)00234-4)
- Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Bastos, C.M.V., Ho, P.L., Luna, M.S., Yamanouye, N., y Casewell, N.R. (2015). Venom-related transcripts from *Bothrops jararaca* tissues provide novel molecular insights into the production and evolution of snake venom. *Molecular Biology and Evolution*, 32(3), 754-766. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu337>
- Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Campos, P.F., Ching, A.T.C., y Mackessy, S.P. (2016). Colubrid venom composition: An omics perspective. *Toxins*, 8(8), 230. <https://doi.org/10.3390/toxins8080230>

- Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Ching, A.T.C., Carvalho, E., Faria, F., Nishiyama, M.Y., Ho, P.L., y Diniz, M.R.V. (2006). *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of cobra (Elapidae) venoms: implications for snake toxin repertoire evolution. *Genetics*, 173(2), 877-889. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.056515>
- Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Poliselli Farsky, S.H., Oliveira, M.L.S., y Ho, P.L. (2001). Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper: A new member of the VEGF family of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 39836–39842. <https://doi.org/10.1074/jbc.m106531200>
- Kamiguti, A.S., Theakston, R.D.G., Desmond, H., y Hutton, R.A. (1991). Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, 29(9), 1097-1105. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90207-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90207-8)
- Kamiguti, A.S., Theakston, R.D.G., Sherman, N., y Fox, J. W. (2000). Mass spectrophotometric evidence for P-III/P-IV Metalloproteinases in the venom of the Boomslang (*Dispholidus typus*). *Toxicon*, 38(11), 1613–1620. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(00\)00089-1](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(00)00089-1)
- Kerkvliet, J., de Fouchier, A., van Wijk, M., y Groot, A.T. (2019). The Bellerophon pipeline, improving *de novo* transcriptomes and removing chimeras. *Ecology and Evolution*, 9(18), 10513-10521. <https://doi.org/10.1002/ece3.5571>
- Kerns, R.T., Kini, R.M., Stefansson, S., y Evans, H.J. (1999). Targeting of venom phospholipases: the strongly anticoagulant phospholipase A₂ from *Naja nigricollis* venom binds to coagulation factor Xa to inhibit the prothrombinase complex. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 369(1), 107-113. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1345>

- Kini, R.M., y Evans, H.J. (1995). The role of enzymatic activity in inhibition of the extrinsic tenase complex by phospholipase A₂ isoenzymes from *Naja nigricollis* venom. *Toxicon*, 33(12), 1585-1590. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00103-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00103-4)
- Krueger, F. (2015). Trim galore. A wrapper tool around Cutadapt and FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQC files. *516*, 517.
- Langmead, B., y Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357-359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Li, B., y Dewey, C.N. (2011). RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
- Liu, S., Yang, F., Zhang, Q., Sun, M.Z., Gao, Y., y Shao, S. (2011). “Anatomical” view of the protein composition and protein characteristics for *Gloydius shedaoensis* snake venom via proteomics approach. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 294(2), 273-282. <https://doi.org/10.1002/ar.21322>
- Lomonte, B., Angulo, Y., Sasa, M., y Gutierrez, J.M. (2009). The Phospholipase A₂ homologues of snake venoms: Biological activities and their possible adaptive roles. *Protein and Peptide Letters*, 16(8), 860–876. <https://doi.org/10.2174/092986609788923356>
- Lomonte, B., Escolano, J., Fernández, J., Sanz, L., Angulo, Y., Gutiérrez, J.M., y Calvete, J.J. (2008). Snake venomomics and antivenomics of the arboreal neotropical pitvipers *Bothriechis lateralis* and *Bothriechis schlegelii*. *Journal of Proteome Research*, 7(6), 2445-2457. <https://doi.org/10.1021/pr8000139>
- Mackessy, S.P. (2021). Handbook of venoms and toxins of reptiles. *CRC press*.

- Makarova, Y.V., Kryukova, E.V., Shelukhina, I.V., Lebedev, D.S., Andreeva, T.V., Ryazantsev, D.Y., Balandin, S.V., Ovchinnikova, T.V., Tsetlin, V.I., y Utkin, Y.N. (2018). The first recombinant viper three-finger toxins: inhibition of muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 479(1), 127-130. <https://doi.org/10.1134/s1607672918020205>
- Manni, M., Berkeley, M.R., Seppey, M., Simão, F.A., y Zdobnov⁺, E.M. (2021). BUSCO update: novel and streamlined workflows along with broader and deeper phylogenetic coverage for scoring of eukaryotic, prokaryotic, and viral genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 38(10), 4647-4654. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab199>
- Mapleson, D., Accinelli, G.G., Kettleborough, G., Wright, J., y Clavijo, B.J. (2017). KAT: A K-mer Analysis Toolkit to quality control NGS datasets and genome assemblies. *Bioinformatics*, 33(4), 574-576. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw663>
- Maraganore, J.M., y Heinrikson, R.L. (1985). The role of lysyl residues of phospholipases A₂ in the formation of the catalytic complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 131(1), 129-138. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(85\)91780-2](https://doi.org/10.1016/0006-291x(85)91780-2)
- Marçais, G., y Kingsford, C. (2011). A fast, lock-free approach for efficient parallel counting of occurrences of k-mers. *Bioinformatics*, 27(6), 764-770. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr011>
- Margres, M.J., Walls, R., Suntravat, M., Lucena, S., Sánchez, E.E., y Rokyta, D.R. (2016). Functional characterizations of venom phenotypes in the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) and evidence for expression-driven divergence in toxic activities among populations. *Toxicon*, 119, 28-38. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.05.005>

- Massova, I., Kotra, L.P., Fridman, R., y Mobashery, S. (1998). Matrix Metalloproteinases: Structures, evolution, and diversification. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 12(12), 1075–1095. <https://doi.org/10.1096/fasebj.12.12.1075>
- McGinn, O.J., English, W.R., Roberts, S., Ager, A., Newham, P., y Murphy, G. (2011). Modulation of integrin $\alpha 4\beta 1$ by ADAM28 promotes lymphocyte adhesion and transendothelial migration. *Cell Biology International*, 35(10), 1043-1053. <https://doi.org/10.1042/cbi20100885>
- McGivern, J.J., Wray, K.P., Margres, M.J., Couch, M.E., Mackessy, S.P., y Rokyta, D.R. (2014). RNA-seq and high-definition mass spectrometry reveal the complex and divergent venoms of two rear-fanged colubrid snakes. *BMC Genomics*, 15(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1061>
- Menezes, M.C., Furtado, M.F., Travaglia-Cardoso, S.R., Camargo, A.C.M., y 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>
- Mochca-Morales, J., Martin, B.M., y Possani, L.D. (1990). Isolation and characterization of Helothermine, a novel toxin from *Heloderma horridum horridum* (Mexican beaded lizard) venom. *Toxicon*, 28(3), 299-309. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90065-f](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90065-f)
- Modahl, C.M., Mrinalini, Fietze, S., y Mackessy, S.P. (2018). Adaptive evolution of distinct prey-specific toxin genes in rear-fanged snake venom. *Proceedings of the Royal Society B*, 285(1884). <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1003>

- Modahl, C., Saviola, A.J., y Mackessy, S.P. (2015). Proteomic and genomic approaches to the study of rear-fanged (“colubrid”) snake venoms. *Handbooks of Toxinology. Venom Genomics and Proteomics*, 23.
- Moura-da-Silva, A.M., Theakston, R.D.G., y Crampton, J.M. (1996). Evolution of Disintegrin Cysteine-rich and Mammalian Matrix-degrading Metalloproteinases: Gene duplication and divergence of a common ancestor rather than convergent evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 43(3), 263-269. <https://doi.org/10.1007/bf02338834>
- Mukherjee, A.K., y Maity, C.R. (2002). Biochemical composition, lethality and pathophysiology of venom from two cobras — *Naja naja* and *N. kaouthia*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 131(2), 125-132. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(01\)00473-0](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(01)00473-0)
- Nachtigall, P.G., Rautsaw, R.M., Ellsworth, S.A., Mason, A.J., Rokyta, D.R., Parkinson, C.L., y Junqueira-de-Azevedo, I.L.M. (2021). ToxCodAn: a new toxin annotator and guide to venom gland transcriptomics. *Briefings in Bioinformatics*, 22(5). <https://doi.org/10.1093/bib/bbab095>
- Nagase, H., Visse, R., y Murphy, G. (2006). Structure and function of Matrix Metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research*, 69(3), 562-573. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.002>
- Neale, V., Sotillo, J., Seymour, J.E., y Wilson, D. (2017). The venom of the spine-bellied sea snake (*Hydrophis curtus*): Proteome, toxin diversity and intraspecific variation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2695. <https://doi.org/10.3390/ijms18122695>

- Neves-Ferreira, A.G.C., Perales, J., Fox, J.W., Shannon, J.D., Makino, D.L., Garratt, R.C., y Domont, G.B. (2002). Structural and functional analyses of DM43, a snake venom metalloproteinase inhibitor from *Didelphis marsupialis* serum. *Journal of Biological Chemistry*, 277(15), 13129-13137. <https://doi.org/10.1074/jbc.m200589200>
- Nishimura, O., Hara, Y., y Kuraku, S. (2017). gVolante for standardizing completeness assessment of genome and transcriptome assemblies. *Bioinformatics*, 33(22), 3635-3637. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx445>
- Nobile, M., Magnelli, V., Lagostena, L., Mochca-Morales, J., Possani, L.D., y Prestipino, G. (1994). The toxin helothermine affects potassium currents in newborn rat cerebellar granule cells. *The Journal of Membrane Biology*, 139(1), 49-55. <https://doi.org/10.1007/bf00232674>
- Nobile, Mario, Noceti, F., Prestipino, G., y Possani, L.D. (1996). Helothermine, a lizard venom toxin, inhibits calcium current in cerebellar granules. *Experimental Brain Research*, 110(1), 15-20. <https://doi.org/10.1007/bf00241369>
- Núñez, V., Cid, P., Sanz, L., De La Torre, P., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., y Calvete, J.J. (2009). Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards pedomorphism. *Journal of Proteomics*, 73(1), 57-78. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.07.013>
- Okumura, K., Masui, K., Inoue, S., Ikeda, K., y Hayashi, K. (1999). Purification, characterization and cDNA cloning of a phospholipase A₂ inhibitor from the serum of the non-venomous snake *Elaphe quadrivirgata*. *Biochemical Journal*, 341(1), 165-171. <https://doi.org/10.1042/bj3410165>

- Osipov, A.V., Levashov, M.Y., Tsetlin, V.I., y Utkin, Y.N. (2005). Cobra venom contains a pool of Cysteine-rich secretory proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328(1), 177-182. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.154>
- Otero, R., Gutiérrez, J., Beatriz Mesa, M., Duque, E., Rodríguez, O., Luis Arango, J., Gómez, F., Toro, A., Cano, F., María Rodríguez, L., Caro, E., Martínez, J., Cornejo, W., Mariano Gómez, L., Luis Uribe, F., Cárdenas, S., Núñez, V., y Díaz, A. (2002). Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon*, 40(8), 1107-1114. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(02\)00104-6](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(02)00104-6)
- Pahari, S., Mackessy, S.P., y Kini, R.M. (2007). The venom gland transcriptome of the desert massasauga rattlesnake (*Sistrurus catenatus edwardsii*): towards an understanding of venom composition among advanced snakes (Superfamily Colubroidea). *BMC Molecular Biology*, 8(1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-115>
- Peichoto, M.E., Mackessy, S.P., Teibler, P., Tavares, F.L., Burckhardt, P.L., Breno, M.C., Acosta, O., y Santoro, M. L. (2009). Purification and characterization of a Cysteine-rich secretory protein from *Philodryas patagoniensis* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 150(1), 79-84. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.03.002>
- Pla, D., Sanz, L., Sasa, M., Acevedo, M.E., Dwyer, Q., Durban, J., Pérez, A., Rodriguez, Y., Lomonte, B., y Calvete, J.J. (2017). Proteomic analysis of venom variability and ontogeny across the arboreal palm-pitvipers (genus *Bothriechis*). *Journal of Proteomics*, 152, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.10.006>

- Rodrigues, R.S., Boldrini-França, J., Fonseca, F.P.P., de la Torre, P., Henrique-Silva, F., Sanz, L., Calvete, J.J., y Rodrigues, V.M. (2012). Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. *Journal of Proteomics*, 75(9), 2707–2720. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.028>
- Rokyta, D.R., Lemmon, A.R., Margres, M.J., y Aronow, K. (2012). The venom-gland transcriptome of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *BMC Genomics*, 13(1), 312. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-312>
- Sánchez, M.N., Teibler, G.P., Sciani, J.M., Casafús, M.G., Maruñak, S.L., Mackessy, S.P., y Peichoto, M.E. (2019). Unveiling toxicological aspects of venom from the Aesculapian false coral snake *Erythrolamprus aesculapii*. *Toxicon*, 164, 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.04.007>
- Santos-Costa, M.C., y Di Bernardo, M. (2001). Human envenomation by an aglyphous colubrid snake, *Liophis miliaris* (Linnaeus, 1758). *Cuadernos de Herpetología*, 14(2). <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/6342>
- Sanz, L., Harrison, R.A., y Calvete, J.J. (2012). First draft of the genomic organization of a PIII-SVMP gene. *Toxicon*, 60(4), 455-469. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.04.331>
- Sanz, L., y Calvete, J.J. (2016). Insights into the evolution of a snake venom multi-gene family from the genomic organization of *Echis ocellatus* SVMP genes. *Toxins*, 8(7), 216. <https://doi.org/10.3390/toxins8070216>
- Scott, D.L., White, S.P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M.H., y Sigler, P.B. (1990). Interfacial catalysis: The mechanism of Phospholipase A2. *Science*, 250(4987), 1541–1546. <https://doi.org/10.1126/science.2274785>

- Serrano, S.M. T., Kim, J., Wang, D., Dragulev, B., Shannon, J.D., Mann, H.H., Veit, G., Wagener, R., Koch, M., y Fox, J.W. (2006). The Cysteine-rich domain of Snake Venom Metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: Role in substrate targeting. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 39746-39756. <https://doi.org/10.1074/jbc.m604855200>
- Shibata, H., Chijiwa, T., Oda-Ueda, N., Nakamura, H., Yamaguchi, K., Hattori, S., y Ogawa, T. (2018). The habu genome reveals accelerated evolution of venom protein genes. *Scientific reports*, 8(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28749-4>
- Six, D.A., y Dennis, E.A. (2000). The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(1-2), 1-19. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(00\)00105-0](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00105-0)
- Stefansson, S., Kini, R.M., y Evans, H.J. (2002). The basic phospholipase A₂ from *Naja nigricollis* venom inhibits the prothrombinase complex by a novel nonenzymic mechanism. *Biochemistry*, 29(33), 7742-7746. <https://doi.org/10.1021/bi00485A024>
- Takahashi, H., Hattori, S., Iwamatsu, A., Takizawa, H., y Shibuya, M. (2004). A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF Receptor-1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 46304-46314. <https://doi.org/10.1074/jbc.m403687200>
- Takeya, H., Onikura, A., Nikai, T., Sugihara, H., y Iwanaga, S. (1990). Primary Structure of a Hemorrhagic Metalloproteinase, HT-2, Isolated from the Venom of *Crotalus ruber ruber*. *The Journal of Biochemistry*, 108(5), 711-719. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123270>

- Teixeira, C.D.F.P., Fernandes, C.M., Zuliani, J.P., y Zamuner, S.F. (2005). Inflammatory effects of Snake Venom Metalloproteinases. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(1), 181-184. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762005000900031>
- Torres-Bonilla, K.A., Andrade-Silva, D., Serrano, S.M.T., y Hyslop, S. (2018). Biochemical characterization of venom from *Pseudoboa neuwiedii* (Neuwied's false boa; Xenodontinae; Pseudoboini). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 213, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.06.003>
- Torres-Bonilla, K.A., Floriano, R.S., Schezaro-Ramos, R., Rodrigues-Simioni, L., y da Cruz-Höfling, M.A. (2017). A survey on some biochemical and pharmacological activities of venom from two Colombian colubrid snakes, *Erythrolamprus bizona* (Double-banded coral snake mimic) and *Pseudoboa neuwiedii* (Neuwied's false boa). *Toxicon*, 131, 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.02.030>
- Uetz P et al. (2021). A quarter century of reptile and amphibian databases. *Herpetological Review* 52(2), 246-255.
- Utkin, Y.N. (2013). Three-finger toxins, a deadly weapon of elapid venom – milestones of discovery. *Toxicon*, 62, 50-55. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.007>
- Valente, R.H., Guimarães, P.R., Junqueira, M., Neves-Ferreira, A.G.C., Soares, M.R., Chapeaurouge, A., Trugilho, M.R.O., León, I.R., Rocha, S.L.G., Oliveira-Carvalho, A.L., Wermelinger, L.S., Dutra, D.L.S., Leão, L.I., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Ho, P.L., Zingali, R.B., Perales, J., y Domont, G.B. (2009). *Bothrops insularis* venomomics: A proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. *Journal of Proteomics*, 72(2), 241-255. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.001>

- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., De Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., y Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(1), 296-303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Yamazaki, Y., Brown, R.L., y Morita, T. (2002). Purification and cloning of toxins from Elapid venoms that target cyclic nucleotide-gated ion channels. *Biochemistry*, 41(38), 11331-11337. <https://doi.org/10.1021/bi026132h>
- Yamazaki, Y., Hyodo, F., y Morita, T. (2003). Wide distribution of Cysteine-rich secretory proteins in snake venoms: Isolation and cloning of novel Snake Venom Cysteine-rich secretory proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 412(1), 133-141. [https://doi.org/10.1016/s0003-9861\(03\)00028-6](https://doi.org/10.1016/s0003-9861(03)00028-6)
- Zha, H.G., Lee, W.H., y Zhang, Y. (2001). Cloning of cDNAs encoding C-type lectins from Elapidae snakes *Bungarus fasciatus* and *Bungarus multicinctus*. *Toxicon*, 39(12), 1887-1892. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(01\)00172-6](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00172-6)
- Zhang J, Kobert K, Flouri T, Stamatakis A. (2014). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*, 30, 614–620. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>