

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERIA AGRONÓMICA Y
DEL MEDIO NATURAL



Caracterización proteómica de venenos de serpientes de interés biomédico

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

CURSO 2015-2016

AUTOR: JOSE MUNUERA MORA

DIRECTOR: JUAN JOSÉ CALVETE CHORNET

TUTOR: MARÍA PILAR LÓPEZ GRESA

VALENCIA, JULIO 2016



Datos del trabajo

Título: Caracterización proteómica de venenos de serpientes de interés biomédico

Autor: Jose Munuera Mora

Localidad y fecha: Valencia, Julio de 2016

Director: Juan José Calvete Chornet

Tutor: María Pilar López Gresa

Tipo de licencia: Licencia Creative Commons. "Reconocimiento no Comercial Sin Obra Derivada".

Resumen

Actualmente las serpientes venenosas están extendidas por prácticamente todo el mundo provocando que los problemas derivados por las mordeduras de estas serpientes sean de gran importancia. No obstante, este problema se acentúa mayoritariamente en países subdesarrollados y zonas rurales con pocos recursos económicos, con lo que se convierte en un problema infravalorado en las zonas más desarrolladas y con mayor capacidad de investigación en este ámbito. Por ello es importante seguir investigando en este campo para desarrollar los únicos tratamientos eficaces contra las mordeduras de serpientes venenosas, los antivenenos.

En este trabajo se busca caracterizar venenos de serpientes del género *Naja*, la mayoría de ellas conocidas comúnmente como cobras, con el fin de conseguir una mayor información sobre las proteínas presentes y la abundancia relativa de estas, para permitir el desarrollo de antivenenos más específicos y, por tanto, más eficaces. Se analizan los venenos de serpientes de diferentes especies y de especies iguales pero encontradas en diversas zonas geográficas, con el objetivo de estudiar tanto la variación interespecífica, como la variación intraespecífica de carácter geográfico de los venenos, mediante la utilización de técnicas proteómicas.

Palabras clave: veneno de serpiente, proteómica, venómica, antiveneno, variación interespecífica, variación intraespecífica.

Abstract

Currently venomous snakes are spread all over the world making the problems caused by snake bites a very important issue. However, that problem affects mainly underdeveloped countries and rural zones with few economic resources, and consequently it becomes an underestimated in developed countries with greater economic resources which are more capable to research in this area. Due to that, it is important to keep researching in this field to develop more specific and efficient antivenoms to treat snake envenoming.

In this study the aim is to make a proteomic characterization of snakes' venoms of the *Naja* genus, commonly known as cobras, to get more information about the proteins of these venoms and their relative abundance. Venoms of different snake species were analyzed and also, venoms of same species but located on different countries, to determine the interspecific and intraspecific geographic variation through the use of proteomic techniques.

Key words: snake venom, proteimics, venomics, antivenom, interspecific variation, intraspecific variation.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Las serpientes.....	1
1.2. Veneno.....	4
1.3. Composición.....	6
1.4. Técnicas ómicas.....	9
2. Objetivos.....	12
3. Materiales y métodos.....	13
3.1. Cromatografía.....	14
3.2. Electroforesis.....	15
3.3. Digestión.....	16
3.4. Espectrometría de masas (MS).....	16
3.5. Cálculo de la abundancia relativa de las toxinas.....	18
4. Resultados y discusión.....	19
4.1. Análisis de los venenos.....	19
4.2. Comparación de los venenos.....	24
4.3. Variación interespecífica.....	26
4.4. Variación intraespecífica geográfica.....	28
5. Conclusiones.....	31
6. Referencias.....	32
7. Anexos.....	37

1. Introducción

1.1. Las Serpientes

Las serpientes son animales que se encuentran dentro de la clase Reptilia. A su vez, dentro de esta clase, pertenecen al orden de los Squamata y al suborden Serpentes. Existen alrededor de 3150 especies de serpientes de las cuales aproximadamente 600 son peligrosamente venenosas para los humanos (WHO, 2010). No obstante, existen algunas especies de las llamadas “non-front-fanged colubroid snakes” (colúbridos sin colmillos frontales) que habitualmente no se clasifican como venenosas para los humanos, aunque se ha demostrado que producen veneno que en ocasiones presenta efectos clínicos significantes para nuestra especie (Weinstein, 2013). Dentro del suborden Serpentes, el clade Colubroidea incluye a la mayor parte de las serpientes que existen actualmente, de entre las cuales, las venenosas pertenecen mayoritariamente a las familias Viperidae y Elapidae (Calvete, 2014). Esta última (Elapidae) está compuesta a su vez por dos subfamilias Elapinae e Hydrophiinae.

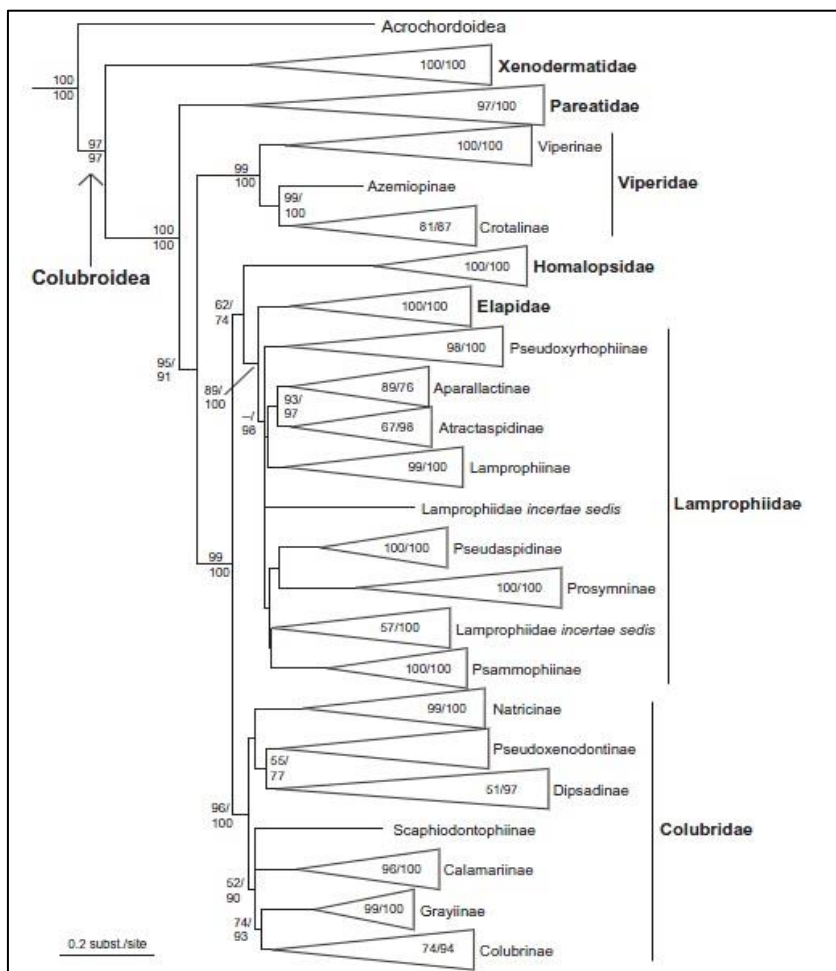


Figura 1. Resumen del árbol filogenético de las serpientes del clade Colubroidea. Imagen obtenida de (Pyron *et al.*, 2011)

Las serpientes que pertenecen a la familia Elapidae son venenosas y se encuentran en regiones tropicales y subtropicales de Asia, Australia, América y África. Además también existen elápidos (especies de la familia Elapidae) acuáticos que habitan en los océanos Pacífico e Índico pertenecientes a la subfamilia Hydrophiinae. De entre los elápidos, se distinguen 361 especies agrupadas en 55 géneros, las cuales son muy diversas en cuanto a su tamaño, que va desde los 18 cm en algunas especies del género *Drysdalia*, hasta 5,6 metros que puede llegar a medir la cobra real (*Ophiophagus hannah*).

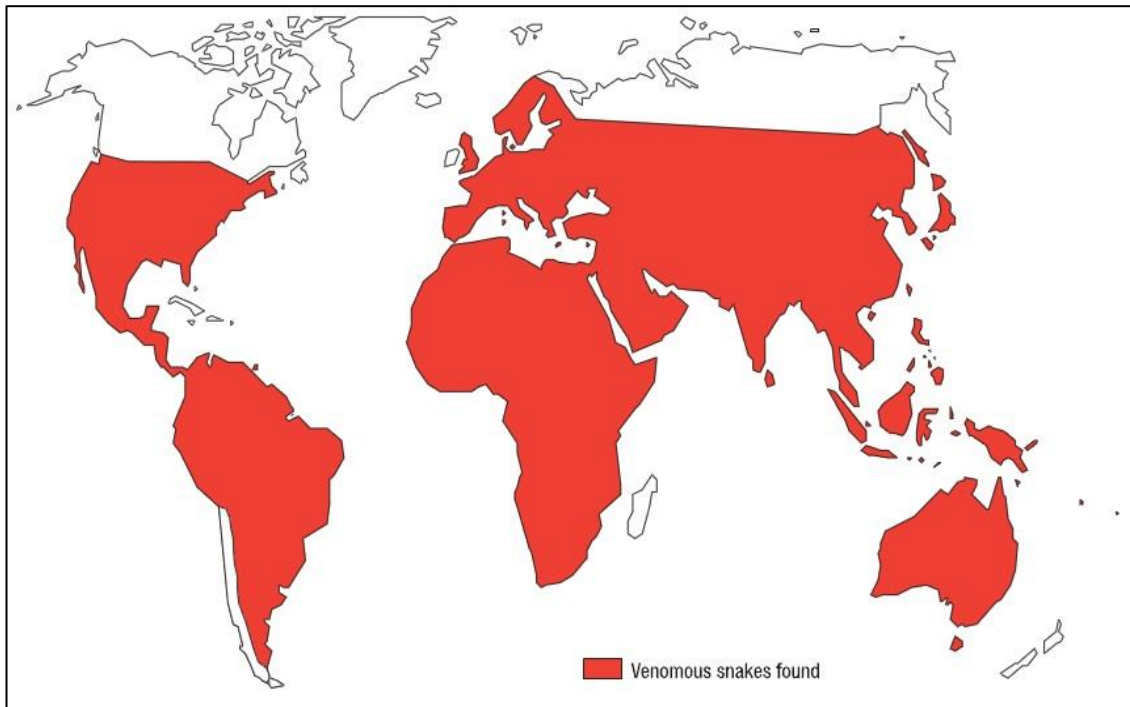


Figura 2. Distribución de las zonas donde se han encontrado serpientes venenosas. Imagen obtenida de (Kasturiratne *et al.*, 2008)

Las serpientes venenosas se encuentran repartidas por casi todo el mundo exceptuando climas muy fríos, algunas islas y en algunas zonas con altitudes elevadas (Figura 2).

Esta amplia distribución de serpientes venenosas provoca que el ataque por mordedura de serpiente sea un problema médico importante. Donde más se acentúa este problema es en zonas rurales de países en vías de desarrollo de África sub-Sahariana, Asia y América Latina, causando, en numerosas ocasiones, morbilidad y mortalidad en las víctimas (figura 3). Esto es debido principalmente a 2 causas:

- Mayor convivencia con las serpientes peligrosas a causa de la ocupación de los ecosistemas habitados por éstas, bien por los trabajos humanos realizados en zonas rurales o bien por la degradación e invasión de dichos ecosistemas. Además, los desechos producidos en regiones pobladas atraen a las ratas, que a su vez atraen a las serpientes que se alimentan de éstas.
- Menor acceso a servicios de sanidad, y los que tienen acceso, suelen ser de menor calidad y no lo suficientemente preparados para atender con eficacia episodios de envenenamiento. Otro problema añadido en estos centros médicos es la falta de antivenenos eficaces, los cuales son los únicos tratamientos específicos para tratar episodios de envenenamiento.

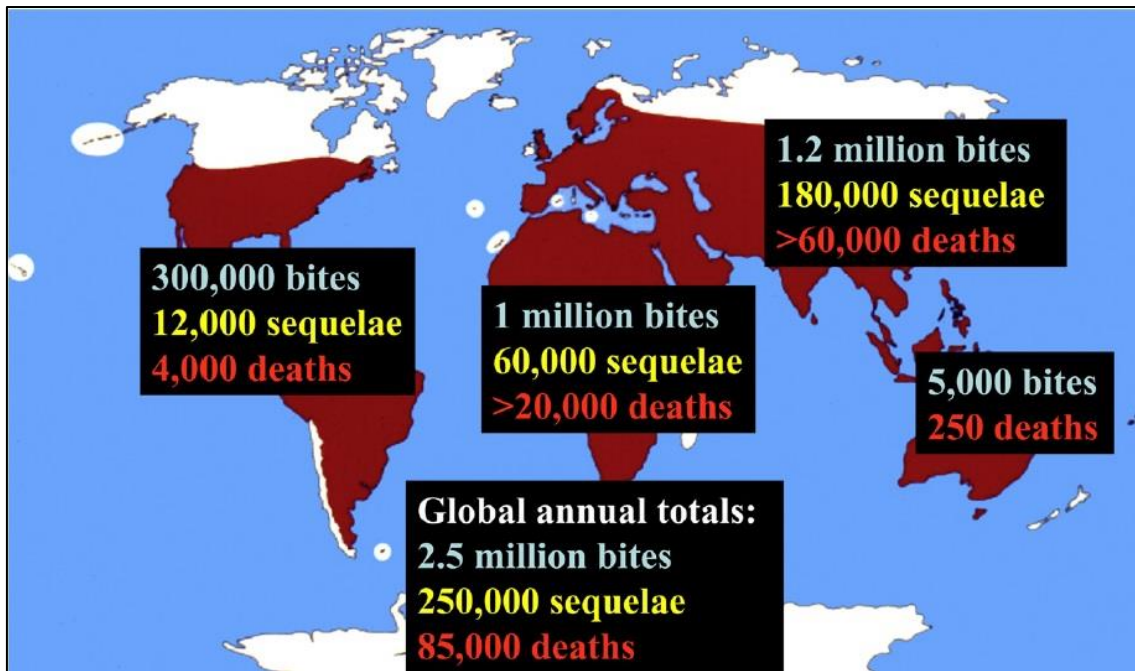


Figura 3. Figura explicativa de como afecta el problema de las mordeduras de serpientes alrededor del mundo. Figura obtenida de (Gutiérrez *et al.* 2010)

Los primeros estudios para conocer la incidencia global del problema de las mordeduras de serpientes se basaron en los datos obtenidos de los centros sanitarios. A partir de estos datos obtuvieron que la incidencia global de este problema era de unos 2.5 millones de episodios de mordedura de serpiente anuales que derivaban en 250.000 víctimas con secuelas tras el envenenamiento y 85.000 muertes (Chippaux *e. al.*, 1991).

No obstante, la incidencia real de episodios de envenenamiento por mordedura de serpiente y su impacto en las diferentes regiones se desconoce, ya que en muchas zonas rurales, las víctimas no acuden a hospitales y mueren cerca del lugar de la mordida o en casa, sin que el accidente quede registrado en los datos sanitarios oficiales. Esta es la causa por la cual la estimación real se situaba muy por encima de estos resultados.

Estudios más recientes han estimado que, anualmente, se producen entre 1.2 y 5.5 millones mordeduras de serpiente en todo el mundo y que terminan con la vida de entre 25.000 y 125.000 personas. Además, estos estudios estiman que alrededor de 400.000 víctimas más quedan con secuelas permanentes (Gutiérrez, 2015). En España, los accidentes de mordedura de serpiente no son muy comunes, situándose en aproximadamente 130 casos anuales. De todos los casos registrados entre 1997 y 2009, en todo el país, solamente un 1% de estos derivó en la muerte del paciente, aproximadamente 1 caso por año, aunque en diversos años no se registró ninguna víctima mortal (Saz-Parkinson *et al.*, 2012).

A pesar de la incidencia a nivel mundial, el problema de las mordeduras no recibe la suficiente atención por parte de las autoridades de la salud pública y la industria farmacéutica. De hecho, la OMS (Organización Mundial de la Salud) en Abril de 2009 incorporó los accidentes por mordedura de serpiente en la lista de condiciones descuidadas dentro del conjunto de enfermedades tropicales descuidadas (NTDs en inglés *Neglected Tropical Diseases*).

1.2. Veneno

El veneno se define según la RAE como “sustancia que, incorporada a un ser vivo en pequeñas cantidades, es capaz de producir graves alteraciones funcionales, e incluso la muerte”. En términos más científicos, el veneno se puede definir como una secreción formada por compuestos bioactivos, producido en unas glándulas especializadas e inyectado mediante un aparato inoculador, que interfiere en procesos fisiológicos o bioquímicos normales de la presa. Dentro de este cóctel de compuestos que es el veneno, la mayor parte, alrededor de un 90%, está compuesto por unas pocas familias de proteínas y péptidos, mientras que el 10% restante se compone por diferentes compuestos tanto orgánicos como inorgánicos, como sal, azúcares, poliaminas y neurotransmisores. La capacidad de sintetizar veneno la aprovechan alrededor de 170.000 especies repartidas por casi todo el mundo. Tanto es así que a día de hoy es casi imposible encontrar un ecosistema donde no exista algún tipo de organismo venenoso (WHO, 2010, Fry, 1999, Utkin, 2015).

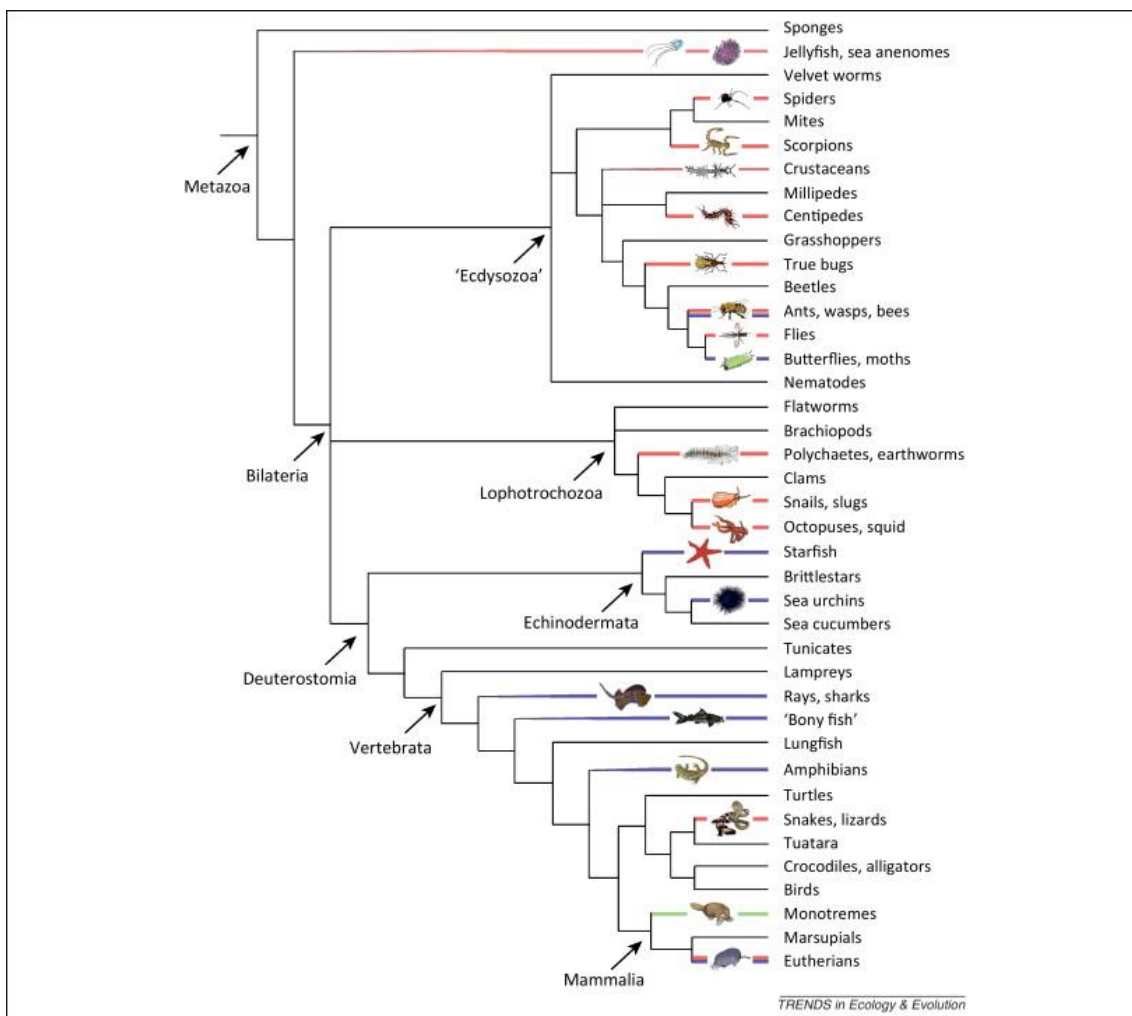


Figura 4. Árbol esquemático de las especies venenosas a lo largo del reino animal. El árbol demuestra la relación entre la evolución de los diferentes linajes y la presencia de organismos venenosos. Los colores destacan los linajes en los cuales se han encontrado organismos con sistemas venenosos. El color rojo indica que la función principal del veneno es la predatoria, el color azul la función defensiva y el color verde la función de arma de competición intraespecífica. Imagen obtenida de (Casewell *et al.*, 2013).

A lo largo de la evolución son numerosos los animales que han ido adquiriendo capacidades de producir veneno y la mayoría de los linajes de animales contienen actualmente especies con esta capacidad. Claro está, que el veneno supone grandes ventajas para el animal capaz de producirlo, no obstante los objetivos principales de los venenos no son los mismos en todos los linajes. Para algunos, la función principal es la predatoria (serpientes, arañas, escorpiones, etc.), para otros, es la función defensiva frente a depredadores (peces, algunos insectos, equinodermos, etc.) y otro grupo, utiliza el veneno principalmente como arma para una competición intraespecífica (el macho del ornitorrinco utiliza el veneno para hacer valer su dominio en épocas de apareamiento) (figura 4) (Casewell *et al.*, 2013).

Esta diversidad taxonómica destaca la importancia del veneno como una característica evolutiva en el reino animal. De hecho la capacidad de sintetizar veneno es una innovación clave en el clade Toxicofera, que engloba a las especies que pertenecen a los subórdenes Serpentes e Iguania. En este clade, la función venenosa se estima que apareció hace aproximadamente hace 170 millones de años y permitió a las especies venenosas pasar de un modo mecánico, como es la constricción, a un modo químico (veneno) para atrapar a las presas, reduciendo así los esfuerzos físicos y aumentando la eficacia de sus ataques.

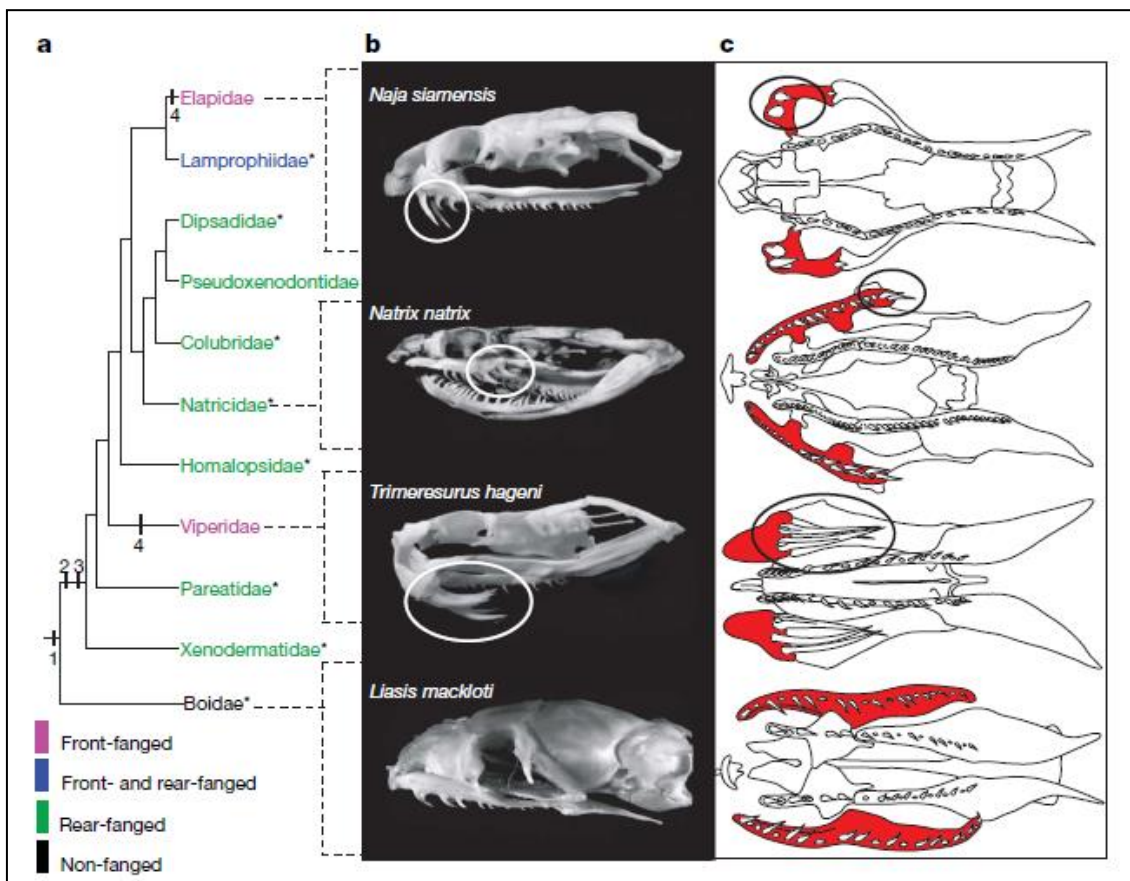


Figura 5. A) Árbol representativo de los tipos de colmillos presentes en las diferentes familias de serpientes. Los colores de los nombres de las familias indican el tipo de colmillos que tienen sus especies. El color rosa indica que presentan solamente colmillos frontales, el azul colmillos frontales y traseros, el verde solamente traseros y el negro no presentan colmillos. B) Visión lateral del cráneo de especies pertenecientes a las familias indicadas. C) Esquema del paladar con los maxilares superiores coloreados y los colmillos señalados en un círculo. Imagen obtenida de (Vonk *et al.* 2008)

En cuanto al veneno de serpientes, es uno de los más complejos de los que se encuentran en la naturaleza. Este veneno se sintetiza y se almacena en unas glándulas situadas detrás de la cavidad ocular, conectadas a unos colmillos huecos mediante un conducto

especializado. Las glándulas difieren en tamaño y forma entre los elápidos, vipéridos y especies de la familia Atractaspidinae. Estas diferencias evidencian la evolución independiente de las glándulas venenosas en los tres grupos, aunque hay indicios de que todas estas son homólogas de las glándulas de Duvernoy, que son glándulas salivares que modificaron para producir veneno. Se cree que éstas aparecieron primero en la evolución de los colúbridos y posteriormente se especializaron en las glándulas venenosas de los tres grupos anteriores. Estos indicios se basan en la similar posición de las glándulas venenosas y las de Duvernoy y en que ambas, no coinciden nunca en la misma serpiente (Jackson, 2007).

Por lo que respecta a los colmillos, dependiendo del tipo de serpiente, se ha visto que pueden ocupar diferentes zonas de la mandíbula superior y que están unidos siempre al hueso maxilar. Estructuralmente, se observa una diferencia significativa entre la dentadura de las serpientes de las familias Viperidae y Elapidae y el resto de las familias incluidas en la superfamilia Caenophidia, la cual engloba a la gran mayoría de serpientes venenosas. Dentro de esta superfamilia, un gran número de familias presentan colmillos traseros, mientras que solo las familias Viperidae y Elapidae presentan colmillos tubulares frontales en lugar de los traseros (figura 5) (Vonk *et al.*, 2008). Este cambio facilita tanto la mordedura a la presa por la localización de los colmillos como la introducción del veneno en ella gracias a la estructura tubular de estos, ya que los colmillos traseros pueden ser estriados pero no presentan nunca una estructura tubular. No obstante, la similitud entre los colmillos de las familias Viperidae y Elapidae no es total ya que se diferencian en muchos aspectos. Los colmillos de los elápidos, por ejemplo, son siempre fijos y en los vipéridos en ocasiones presentan movilidad e incluso algunos son retráctiles.

A pesar de la similitud estructural de la dentadura entre las familias Viperidae y Elapidae, éstas no se encuentran cercanas filogenéticamente, lo que indica que el desarrollo de los colmillos tubulares y la localización de éstos es un fenómeno de evolución convergente.

1.3. Composición

La evolución de las serpientes está estrechamente relacionada con la evolución de la composición del veneno. Varios estudios han demostrado que, evolutivamente, existía un conjunto de genes presentes en un ancestro común de las especies pertenecientes al clade Toxicosfera. Estos genes, que codificaban para proteínas generalmente con funciones clave en diversos procesos biológicamente importantes, fueron duplicados a lo largo de la evolución.

Posteriormente, una de estas copias creadas, pasó a ser expresada selectivamente en la glándula venenosa. Mediante el mecanismo “birth-and-death” de evolución proteica, se obtuvieron genes que codifican a proteínas con mutaciones respecto a su ancestro y que les permiten adquirir funciones venenosas. Este mecanismo consiste en la creación de una familia multigénica a partir de duplicaciones de un gen. Las copias génicas creadas son mutadas y, algunas de éstas, son conservadas en el genoma, mientras que otras son suprimidas o se convierten en genes no funcionales. (Fry *et al.*, 2006, Fry *et al.*, 2008, Nei y Rooney 2005)

Como se ha mencionado con anterioridad, las dos familias principales de serpientes venenosas son la familia Viperidae y Elapidae. Con respecto al veneno, el de la familia Viperidae se caracteriza por ser generalmente de tipo hemorrágico, produciendo fallos en la cascada de coagulación, el sistema homeostático y la reparación de los tejidos, además de hemorragia. Por otro lado, el veneno de las serpientes pertenecientes a la familia Elapidae es más de carácter neurotóxico, aunque muchas de éstas también contienen otro tipo de toxinas

(que no son neurotoxinas) presentes en su veneno, como es el caso de las *Najas*. El veneno de los elápidos está compuesto por toxinas que pertenecen, al igual que en la familia de los vipéridos, a un conjunto de familias proteicas restringido, aunque cada especie se diferencia de las demás en que conjuntos de estas familias proteicas expresa y en sus abundancias (Pahari *et al*, 2007). A continuación, se describen cuáles son las diferentes familias de proteínas presentes en mayor proporción en el veneno de las serpientes elápidas del género *Naja* que se estudian en este trabajo:

3FTXs (three finger toxins)

Se trata de una superfamilia de polipéptidos no enzimáticos que contienen alrededor de 60-74 aminoácidos y que son ricos en puentes disulfuro, de los cuales, cuatro están conservados en todos los tipos de 3FTx. Todas las proteínas de esta familia tienen una estructura conservada compuesta por tres bucles conteniendo los cuatro puentes disulfuro, provocando una estructura similar a tres dedos, de ahí su nombre “three finger toxin” (figura). Esta estructura permite el plegamiento de la proteína y la integridad de la cadena polipeptídica. A pesar de que todas las proteínas de esta familia comparten la estructura, existe una gran variedad de funciones diversas realizadas por estas proteínas. Gran parte de estos polipéptidos son neurotoxinas, aunque existen también cardiotoxinas y dendrotoxinas (Utkin, 2013, Kini, 2002, Kini y Doley, 2010)

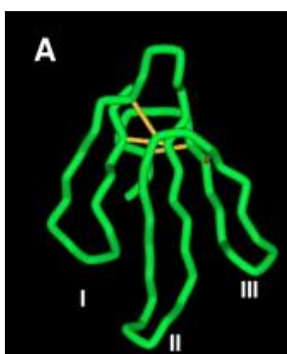


Figura 6. Estructura de una 3FTx donde se pueden ver los cuatro puentes disulfuro representados en amarillo y los tres “dedos” numerados con los números romanos I, II y III. Imagen obtenida de (Kini y Doley, 2010).

SVMP (snake venom metalloproteinase)

Son proteínas de entre 20 y 100 kDA, dependientes de Zn^{2+} y que están relacionadas con síntomas hemorrágicos mediante la degradación de componentes de la matriz extracelular de células endoteliales en los capilares provocando la salida de la sangre al exterior de éstos. Existen algunas SVMP que no poseen actividad hemorrágica, no obstante, actúan a través de diversos mecanismos como la inhibición de la agregación plaquetaria, apoptosis o inflamación, para producir un desequilibrio homeostático en la presa (Markland y Swenson, 2013). Estas proteínas son muy abundantes en los venenos de las serpientes de la familia Viperidae, tanto es así, que componen entre el 11% y el 65% de las proteínas totales presentes en las serpientes víperas. No obstante, estas proteínas también están se encuentran en el veneno de serpientes elápidas, aunque en menor cantidad (Takeda *et al.*, 2012, Escalante *et al.*, 2011).

Las SVMP se agrupan dentro de la familia M12 reprotolisinas de las metaloproteasas y se pueden clasificar en tres grupos según el tamaño y los dominios presentes en la proteína: P-I, las cuales solo presentan el dominio metaloproteínasa (M); P-II, presentan este dominio y además dominio disintegrina (D); y por último P-III, que presenta el dominio metaloproteínasa, disintegrina y el dominio rico en cisteína (C). Además este último grupo se divide a su vez en diferentes subgrupos según modificaciones post-traduccionales como homo-dimerización (P-

IIIc), proteólisis entre los dominios M y D (P-IIIb) y PIII-a en su forma natural, sin modificaciones. También existe otro grupo llamado P-III d en el que la SVMP contiene además un dominio “snake C-typelectinlike” (snaclec) formando un heterodímero (Pahari *et al.*, 2007, Takeda *et al.*, 2012). Las proteínas de esta familia encontradas en los venenos de las *Najas* estudiadas pertenecen al grupo de las P-III SVMP.

PLA₂ (phospholipase A₂)

Las fosfolipasas A₂ son proteínas con un papel importante en la transducción de señales en mamíferos, catalizando la hidrólisis de fosfolípidos, ya que algunos productos derivados de dicha hidrólisis, tienen función de segundos mensajeros, como el ácido araquidónico por ejemplo. Además, también tienen importantes funciones en el mantenimiento de las membranas celulares. No obstante, la acción de las fosfolipasas A₂, también tiene efectos neurotóxicos, miotóxicos y disminuye la activación plaquetaria, convirtiéndose así en una importante toxina presente en el veneno de serpientes (Six y Dennis, 2000).

La capacidad hidrolítica de las PLA₂ del veneno de serpiente depende del residuo existente en la posición 49, presente en el sitio de unión de Ca⁺². Es por ello, que las PLA₂ se diferencian entre ellas en varios tipos, dependiendo de este residuo, de los cuales, los más importantes en los venenos de las serpientes de la familia Elapidae son D49 PLA₂, K49 PLA₂ y S49 PLA₂ (Six y Dennis, 2000, Lynch, 2007).

Kunitz (Kunitz-type serine protease inhibitors)

Son toxinas inhibidoras de serina proteasas formados por 50-60 residuos. Su nombre proviene de la similitud con el dominio Kunitz, conservado en el inhibidor de tripsina pancreático bovino (BPT1). Funcionalmente, abarcan una gran variedad de efectos biológicos, como inhibición de varias serina proteasas, bloqueo de canales iónicos e interferencias en procesos de coagulación, fibrinólisis e inflamación (Mukherjee *et al.*, 2014).

A pesar de esta diversidad funcional, estructuralmente son similares entre ellas, presentando estructuras de hojas α/β ricas en puentes disulfuro, con un sitio activo conservado encargado de la unión a serina proteasas y que permite su inhibición.

CRISP (cysteine-rich secretory protein)

Son proteínas pequeñas (alrededor de 20 – 30 kDa). Estas proteínas están presentes en diversos organismos biológicos, de hecho, se caracterizaron en 1981 en ratas (Kierszaenbaum 1981). A pesar de ello, las funciones biológicas de estas proteínas siguen sin estar claras. Se cree que en los venenos de serpientes funcionan bloqueando canales de iones de calcio, potasio y receptores de ranodina, una molécula que, al unirse a su receptor, provoca la salida de calcio de las células causante de la contracción muscular. Su nombre viene dado por la presencia de 16 residuos de cisteína conservados, de los cuales diez se encuentran en el extremo C-terminal de la proteína (Yamazaki y Morita, 2004, Shikamoto *et al.*, 2005).

LAAO (L-amino acid oxidase)

Las L-amino acid oxidase (LAAO) son flavoenzimas, es decir, glicoproteínas unidas a flavinas (encargadas de otorgar el color amarillo al veneno). Normalmente, estas proteínas son homodiméricas y están unidas a FAD (flavin adenina dinucleótido) o FMN (flavina mononucleótido) (figura 7).

Catalizan la desaminación oxidativa de un amplio número de L-aminoácidos para formar α -cetoácidos, amonio y peróxido de hidrógeno. Funcionalmente, las LAAO presentes en los venenos de serpientes, tienen efectos en la agregación plaquetaria, apoptosis celular y en actividades antimicrobianas y anticoagulantes, provocados principalmente por el peróxido de hidrógeno derivado de su actividad catalítica. Estas funciones son el motivo por el cual las LAAO han sido protagonistas en varios estudios de carácter biomédico (Guo *et al.*, 2012).

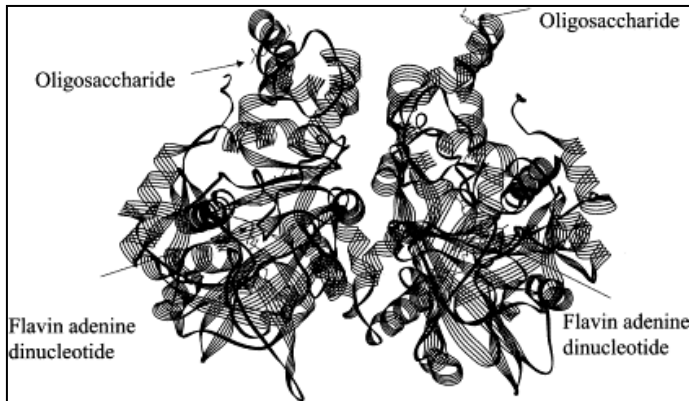


Figura 7. Representación estructural de una LAAO unida a FAD. Se observa el homodímero unido a dos FAD. Imagen obtenida de (Du y Clemetson, 2002).

Factores de crecimiento (por ejemplo NGF)

En el veneno de serpiente, principalmente de la familia Elapidae, también están presentes los factores de crecimiento, encontrados por primera vez en el veneno en 1956. Estos factores de crecimiento se han encontrado en venenos de muchos elápidos y vipéridos. Aunque no se saben las funciones que pueden tener en los venenos, se cree que pueden ser proapoptóticas en algunos tejidos. Esto se debe al hecho de que, en tejidos donde normalmente no se encuentran, los factores de crecimiento provocan apoptosis por la carencia de sus receptores TrkA, con lo que, introducidos en dichos tejidos, podrían producir apoptosis. Además, se sabe que los factores de crecimiento son potenciadores de la permeabilidad celular, lo que, en el contexto del envenenamiento, podría favorecer la difusión de otros componentes venenosos (Sunagar *et al.*, 2013).

1.4. Técnicas ómicas

Traité sur le Vénin de la Vipère, publicado en 1781 por Abbé Gasparo Ferdinando Felice Fontana, donde relata los experimentos llevados a cabo en el veneno de la víbora Europea (probablemente *Viperaberus* o *Viperaaspis*), se considera la primera publicación en el campo de la toxínología o estudio de las toxinas. Posteriormente, Charles-Lucien Bonaparte, zoólogo francés e hijo del hermano menor de Napoleón Bonaparte, fue el primero en descubrir la naturaleza proteica del veneno de serpiente en el año 1843. Su experimento se basó en el aislamiento de una sustancia de carácter proteico del veneno de víbora mediante una precipitación alcohólica. Con esa sustancia, fue capaz de reproducir todos los efectos del veneno completo, con lo que demostró que las funciones del veneno estaban producidas por las proteínas presentes en éste (Calvete, 2013).

Durante el siglo XX, la investigación de los venenos estuvo ligada y potenciada por la evolución de la tecnología, principalmente con la aparición de las llamadas técnicas “ómicas” a finales de siglo. Estas técnicas han permitido aumentar la capacidad del estudio, la precisión de éste y han favorecido la integración de dicha información en los sistemas biológicos. Como consecuencia, actualmente se pueden estudiar los venenos a nivel de genoma, transcriptoma y proteoma (el realizado en este trabajo), para evaluar la composición de éstos, apareciendo el concepto “venómica”, como la utilización de las técnicas “ómicas” en el estudio del veneno. Mediante la venómica, se puede obtener una caracterización proteica de los venenos de serpiente, que no sólo sirve como base para el desarrollo de antivenenos más eficaces, sino que además aporta información para investigación básica, diagnósticos clínicos y desarrollo de fármacos a partir de toxinas presentes en los venenos. También aporta datos importantes para entender la evolución de los proteomas en los diferentes taxones y revelar patrones evolutivos (Calvete *et al.*, 2007).

Proteómica

La proteómica, como su propio nombre indica, engloba a las técnicas “ómicas” mediante las cuales, se puede estudiar el proteoma de una muestra. En venómica se utiliza para la caracterización proteica de los venenos, es decir, la identificación de las proteínas presentes en éste y la abundancia relativa de cada uno de éstas. Para ello, se utilizan diferentes técnicas que se pueden agrupar en dos grupos diferentes según su función principal: técnicas de separación y técnicas de análisis.

El objetivo principal del primer grupo es separar las proteínas presentes en una mezcla compleja como lo es el veneno. Para esta función se utilizan principalmente técnicas cromatográficas y electroforéticas, aunque estas últimas también se pueden considerar en cierto modo técnicas analíticas. En primer lugar, la cromatografía es un método de separación físico basado en la retención selectiva que permite separar proteínas. En esta técnica existe una fase estacionaria, que está fijada durante la cromatografía y una fase móvil, que se mueve en una dirección definida y que puede ser un líquido, gas o fluido supercrítico, lo que determinará el tipo de cromatografía. Con la evolución de esta técnica, se han diseñado diferentes tipos de cromatografías, según si se realizan en una superficie plana o en una columna, según el estado físico de las fases o según el mecanismo de separación. De entre todos los tipos, el utilizado en este estudio es el llamado HPLC (High Performance Liquid Chromatography) de fase reversa. La cromatografía HPLC de fase reversa (RP-HPLC) es un tipo de cromatografía líquida de alta resolución que se realiza en una columna y que separa las proteínas de la muestra en función de su polaridad (Sociedad Española de Proteómica, 2014).

Por otro lado, la electroforesis es otra de las técnicas de separación utilizadas en la caracterización proteómica del veneno. Esta técnica consigue la separación de las moléculas sometiendo a la muestra a un campo eléctrico. Al igual que las técnicas cromatográficas, la evolución de la electroforesis ha llevado a que existan actualmente diversos métodos electroforéticos según el tipo y la orientación del soporte, y según el principio de separación. En este estudio se utiliza la técnica electroforética SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis o en español electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico). El SDS es un detergente que produce la desnaturalización de las proteínas y que aporta cargas negativas a todas éstas, provocando así que viajen en el campo eléctrico hacia el polo positivo independientemente de su carga. Con ello, se consigue una separación solo en función del peso molecular, gracias a los poros

existentes en el gel de poliacrilamida que deben atravesar las proteínas, siendo más fácil para las proteínas de menor peso molecular (Sociedad Española de Proteómica, 2014).

La combinación de estas dos técnicas permite una buena separación proteica, con la que posteriormente se pueden analizar los péptidos obtenidos mediante espectrometría de masas. En esta técnica se produce una fragmentación de las moléculas que conduce a la formación de iones, que se separarán en el espectrómetro de masas en función de su relación masa/carga. Gracias a esto, se pueden conocer las masas moleculares de los péptidos introducidos en el espectrómetro de masas. Acto seguido, se interpretan los espectros de masas, ya sea mediante búsquedas en bases de datos, en caso de que se encuentren fragmentos peptídicos similares a los obtenidos, o manualmente, mediante la técnica de secuenciación *de novo*. En esta técnica se interpreta el espectro de un determinado péptido, con el fin de secuenciarlo (identificar la secuencia de aminoácidos).

2. Objetivos

El objetivo de este estudio fue conseguir una caracterización proteómica de los venenos de las serpientes *Naja haje* (de Mali y de Marruecos), *Naja annulifera*, *Naja niglicollis nigricincta* y *Naja melanoleuca melanoleuca* (de Uganda). Esta caracterización tenía como fin:

- Conocer con la mayor exactitud posible la composición proteica de los venenos y la abundancia relativa de las toxinas presentes en estos, con el objetivo de aportar información para posteriores estudios y para el desarrollo de antivenenos más específicos y por tanto, más eficaces.
- Estudiar las diferencias en la composición del veneno y en la abundancia relativa de sus toxinas a nivel:
 - Interspecífico, es decir, entre diferentes especies de serpientes del género *Naja*.
 - Intraespecífico geográfico, es decir, entre serpientes de la misma especie pero que habitan en diferentes zonas geográficas. Este es el motivo por el cual con la especie *Naja haje* se analizaron sus venenos en serpientes encontradas en países diferentes (Mali y Marruecos).

3. Materiales y métodos

Gracias al avance de las técnicas proteómicas, el estudio de los venenos de serpiente ha evolucionado rápidamente, permitiendo una caracterización proteómica profunda de los venenos. Para la realización de este trabajo se siguieron los pasos explicados en el siguiente esquema (figura

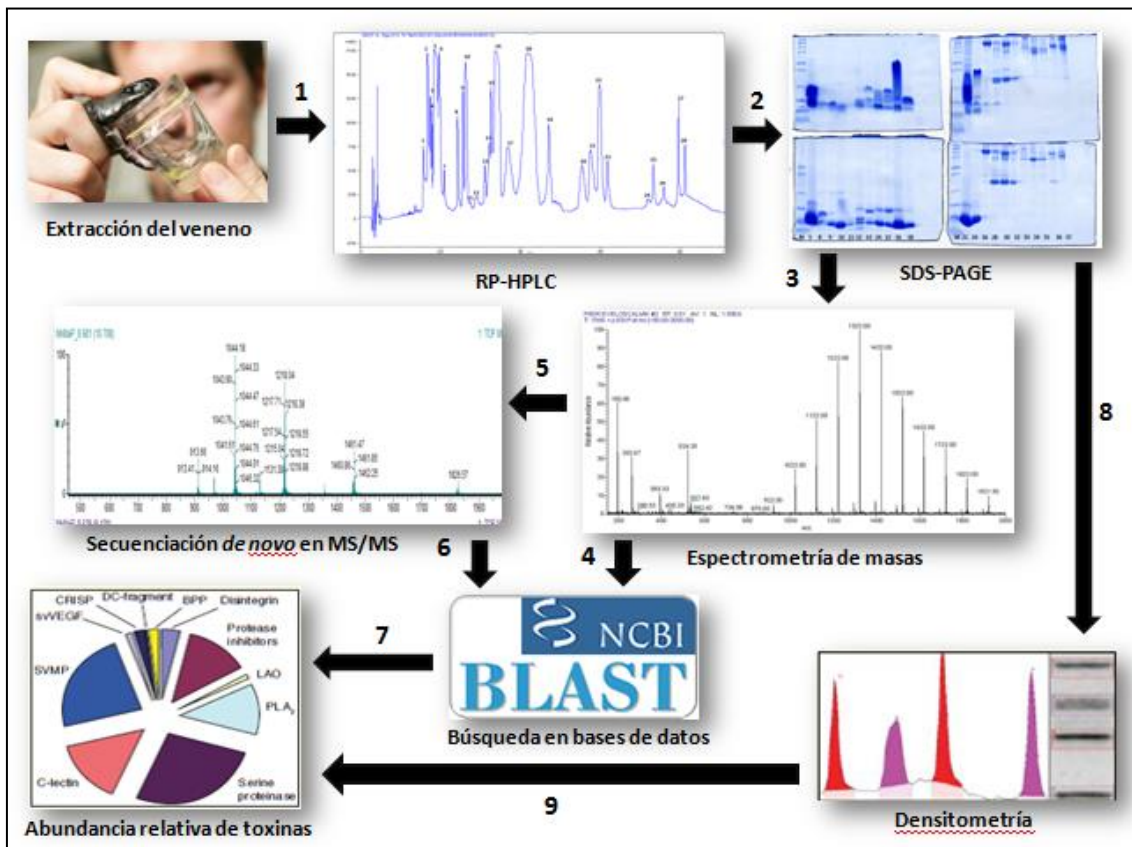


Figura 8. Esquema de los pasos seguidos para la caracterización proteómica de los venenos en este estudio.

La extracción del veneno se lleva a cabo en centros especializados y el veneno llega al laboratorio en forma liofilizada. Una vez en el laboratorio, el veneno fue resuspendido con 200µl de PBS (Phosphate Buffer Solution) y centrifugado para descartar los precipitados. Para obtener suficiente cantidad de proteína para analizar, pero sin saturar la columna cromatográfica, se decidió cargar 2mg totales de veneno. Con el objetivo de conocer la concentración que se tenía en la muestra, se utilizó espectrofotometría a 280nm (longitud de onda a la que absorbe el enlace peptídico) y se utilizó la ley de Lambert y Beer. Esta ley explica que hay una relación exponencial entre la transmisión de luz a través de una sustancia y la concentración de la sustancia, así como también entre la transmisión y la longitud del cuerpo que atraviesa la luz. La fórmula que representa esta ley es:

$$A = \varepsilon * c * l$$

Ecuación 1. Ecuación de Lambert y Beer. Donde: A es la absorbancia, ε el coeficiente de extinción molar y l la longitud de la celda.

Una vez conocida la concentración de la muestra, se calculó el volumen necesario para obtener los 2mg de proteína que se utilizaron en la separación cromatográfica y se añadió el volumen restante hasta llegar a los 300µl, con la solución de inicio del programa de cromatografía (5% acetonitrilo + 0.1% de ácido trifluoroacético en agua MilliQ).

3.1. Cromatografía

La cromatografía RP-HPLC se realizó utilizando una columna Teknokroma Europa Protein 300 con una matriz C18. Esta columna tiene unas dimensiones de 0.4cm de diámetro por 25cm de longitud, con un tamaño de partícula de 5µm y un tamaño de poro de 300Å.

La cromatografía fue llevada a cabo con un gradiente lineal de 0.1% TFA (ácido trifluoroacético) en agua MilliQ (solución A) y 0.1% de acetonitrilo también en agua MilliQ (solución B), aumentando progresivamente la solución B y disminuyendo la A de manera automatizada, siguiendo los siguientes pasos:

- Del minuto 0 al 5: condiciones isocráticas con un 5% de la solución B.
- Del minuto 5 al 15: aumento de la solución B desde el 5% hasta el 25%.
- Del minuto 15 al 75: del 25% al 45% progresivamente de solución B.
- Del minuto 75 al 85: del 45% hasta el 70% de B.

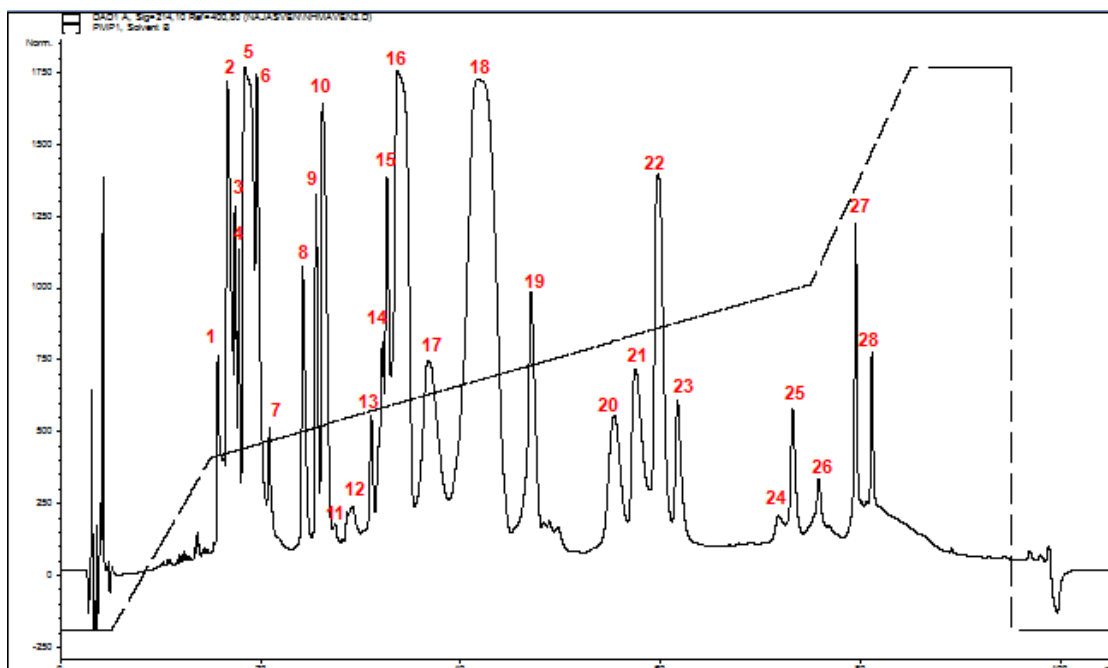


Figura 9. Cromatograma de *Naja haje* de Mali con el gradiente de la solución B.

Cada pico representa a un grupo de proteínas que, en función de su polaridad, fueron retenidas un tiempo determinado. Cada uno de estos picos, se recogió por separado para poder realizar posteriormente una separación más específica, utilizando electroforesis. El área bajo la curva de los picos depende de la cantidad de proteína detectada por el cromatógrafo.

Una vez terminada la cromatografía, las muestras recogidas se secaron utilizando una centrífuga de vacío (Savant), con el objetivo de eliminar el líquido presente en la muestra y así obtener solo las proteínas. Posteriormente, las muestras fueron resuspendidas con agua MilliQ para ser cargadas en el gel y que estuvieran todas igual de concentradas.

3.2. Electroforesis

Como se ha dicho anteriormente, el tipo de electroforesis usado fue el llamado SDS-PAGE donde se utilizaron geles de poliacrilamida con un porcentaje del 15%, realizados en el laboratorio manualmente, con los productos que se detallan en el anexo I. Se utilizó un gel con un porcentaje del 15% en acrilamida ya que se conocía que la mayoría de las proteínas presentes en los venenos eran pequeñas, y con un porcentaje alto se consigue una buena separación de las proteínas de menor tamaño. Los geles se diseñaron con una parte empaquetadora o stacking en la parte superior de éstos, realizando lo que se llama una electroforesis discontinua. En esta parte la resolución del gel es menor, ya que el porcentaje de acrilamida utilizado fue del 4% en este caso, lo que se traduce en un tamaño de poro mayor, que permite a las proteínas atravesarla más fácilmente. Con ello, se consigues un apilamiento justo al inicio de la parte separadora del gel, es decir, la de resolución mayor. El voltaje aplicado en la electroforesis fue de 80V en el gel empaquetador y de 120V en el separador. El voltaje usado en el empaquetador es menor para dar tiempo a que todas las proteínas se concentren en una banda discreta al inicio del gel separador, ya que al cargar, se usó un volumen alto y, sin gel stacking, se generarían bandas anchas.

Además de preparar los geles, se prepararon las mezclas de carga formadas por 10µl de cada muestra proteica recogida en la cromatografía, a las cuales se le añadieron 2µl de los tampones de carga que se describen en el anexo II. Estas mezclas se calentaron a 99°C durante 5 minutos provocar la desnaturalización de las proteínas antes de someterlas a la electroforesis.

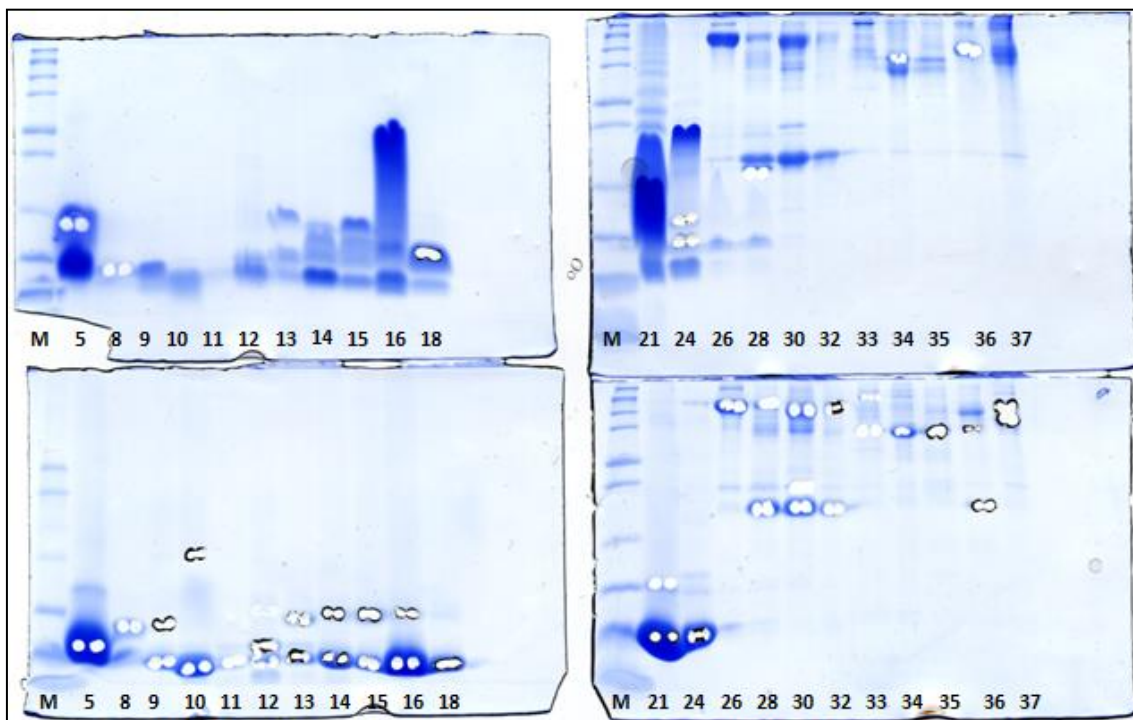


Figura 10. Geles de SDS-PAGE de *Naja haje* de Mali después de cortar las bandas.

En este caso, la electroforesis se realizó por duplicado, pero añadiendo β -mercaptoetanol en las mezclas de carga de uno de estos duplicados. Éste es un agente reductor que disocia los puentes disulfuro, rompiendo así enlaces disulfuro terciarios y cuaternarios y desplegando a las proteínas totalmente en su estructura primaria.

La SDS-PAGE se dejó correr controlando visualmente, hasta que el frente del tampón de carga recorriera todo el gel, para evitar que las proteínas se salieran. Una vez terminada la electroforesis, se recortaron las bandas presentes en el gel, como se puede ver en la figura 10, para posteriormente ser digeridas y llevadas al espectrómetro de masas.

3.3. Digestión

Una vez recortadas las bandas electroforéticas, se debe extraer la parte proteica presente en éstas. Para ello se realizó una *in-gel digestion* con el digestor automatizado ProGest Protein Digestion Workstation. Este digestor realiza primero una reducción de las proteínas con 10mM de ditiotreitól (DTT), seguida de una alquilación con 50mM de iodoacetamida y por último una digestión con tripsina durante toda la noche (25ng de tripsina por muestra).

Al día siguiente, se recogieron los péptidos resultantes de la digestión y se llevaron a la centrífuga de vacío Savant (la misma que se utilizó después de la cromatografía), para secar las muestras. Una vez secas, antes de llevarlas al espectrómetro de masas, se resuspendieron con un volumen determinado de 0.1% de ácido fórmico en MilliQ, en función de la cantidad de proteína que se observó en cada banda del gel, para intentar tener todas las muestras en la misma concentración.

3.4. Espectrometría de masas (MS)

Para el análisis de las masas totales y los digeridos trípticos, se utilizó un nano UPLC-ESI-QUAD-TOF (nano-Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography acoplado a un espectrómetro de masas SYNAPT G2 High Definition Mass Spectrometry System de Waters Corporation). La columna utilizada en la cromatografía fue una BEH130 de 100 μ m x 100mm y presenta un tamaño de partícula de 1.7 μ m, y se trabajó a un flujo de 0.6 μ l/min.

En primer lugar, se calcularon las masas totales de las proteínas a partir de las fracciones recogidas directamente del HPLC. Para ello se introdujeron dichas fracciones en el espectrómetro de masas, donde fueron ionizadas mediante electrospray (ESI) y posteriormente separadas en función de su relación masa-carga mediante la técnica cuadrupolo (QUAD). Una vez separadas las proteínas se utilizó la siguiente fórmula para calcular sus masas:

$$M_1 = M_2$$

Ecuación 2. Donde M es igual a:

$$M = (m/z) * z - z$$

Ecuación 2.1. Donde: (m/z) es la relación masa-carga del péptido y z la carga de éste.

Para calcular las masas es necesario saber la carga que presenta cada péptido y para ello, se asignó la carga n a uno de los iones y en orden ascendente hacia la derecha y descendente hacia la izquierda como se puede ver en la figura 11.

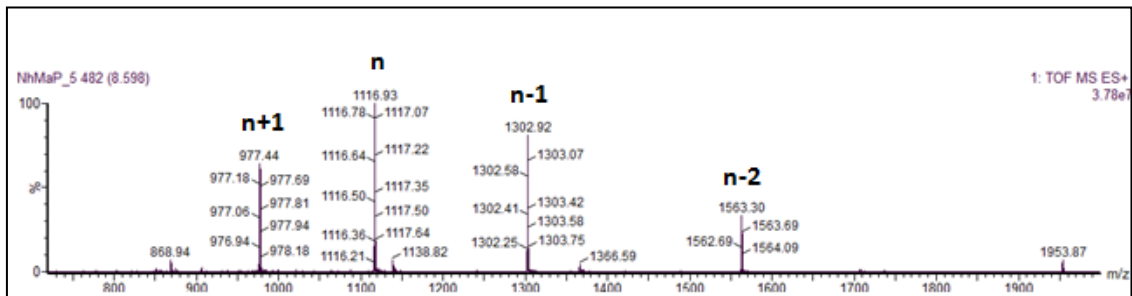


Figura 11. Espectro de *Naja haje* de Mali, con las cargas asociadas a los iones en modo de incógnita en función de n .

En este ejemplo el cálculo sería:

$$1116.93 * n - n = 977.44 * (n + 1) - (n + 1)$$

Ecuación 2.1. Desarrollada con los valores del ejemplo.

Despejando el resultado es que $n=7$, quedando por tanto las cargas de la siguiente manera:

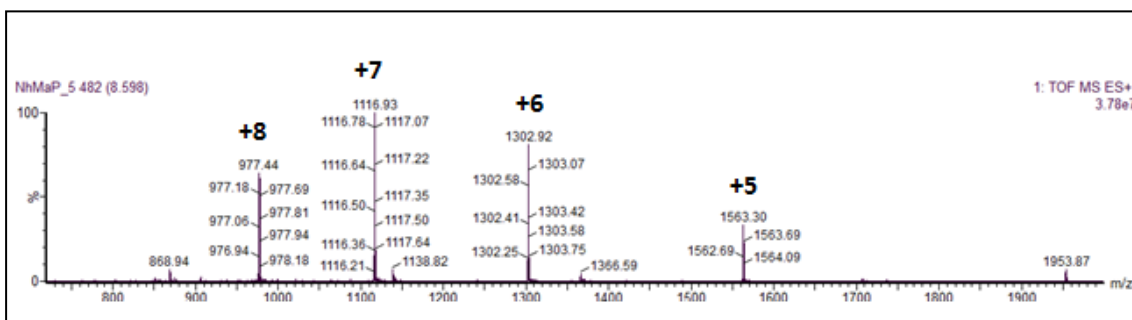


Figura 11.1. Espectro de la Figura 11 pero con las cargas conocidas.

Por último se calcula la masa de la proteína utilizando la ecuación con la ecuación 2, a partir de cualquiera de los péptidos, que en este caso sería:

$$M = 1116.93 * 7 - 7 = 7811.51 \text{ Da}$$

Ecuación 2. Desarrollada con los datos del ejemplo.

El otro análisis que se llevó a cabo fue la identificación de los fragmentos peptídicos derivados de las proteínas iniciales. Para ello, se utilizaron las muestras que fueron sometidas a todo el protocolo (HPLC, SDS-PAGE e in-gel digestión). Al igual que en el análisis anterior, antes de analizarlas en el espectrómetro, se realizó una UPLC para separar las proteínas presentes en las muestras. En este caso, se utilizó la llamada espectrometría de masas en tándem o MS/MS, en la que después de la ionización por ESI los iones cargados con 2, 3 y 4 cargas positivas fueron seleccionados en el cuadrupolo y pasaron a una celda de colisión inducida (CID), donde se fragmentaron en iones más pequeños. Una vez fragmentados se separaron mediante la técnica tiempo de vuelo (TOF), y se obtuvieron espectros que posteriormente sirvieron para la identificación proteica.

Estos espectros del MS/MS fueron interpretados usando el programa online MASCOT, para realizar la búsqueda en la base de datos del NCBI (<http://www.matrixscience.com>). En los casos en los que la búsqueda no dio resultados, se analizaron los espectros manualmente mediante secuenciación *de novo*, hallando la secuencia aminoacídica de los péptidos. En este segundo caso, las secuencias obtenidas fueron comparadas con las presentes en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLAST. El objetivo de ambas búsquedas (con MASCOT y BLAST) fue identificar las familias proteicas a las que pertenecen las proteínas analizadas en el espectrómetro de masas.

3.5. Cálculo de la abundancia relativa de las toxinas

Una vez identificadas las familias proteicas de las toxinas, se estimaron sus abundancias relativas en cada veneno estudiado. Para ello se sumaron las áreas de los picos cromatográficos pertenecientes a la misma familia proteica para obtener el 100% y después se calculó el porcentaje que representaba cada pico. No obstante, debido a que la mayoría de picos estaban representados por más de una banda en la SDS-PAGE, se realizó una densitometría de los geles utilizando el programa Meta Imaging Series 7.1, con el que se asignó la proporción de cada banda respecto al porcentaje total del pico.

En algunas de las bandas de la electroforesis, al realizar la búsqueda en bases de datos, se encontraron resultados de diferentes familias proteicas dentro de la misma banda. Para resolver este problema, la abundancia relativa de cada familia proteica presente en la banda fue estimada basándose en la intensidad relativa de los tres iones más abundantes en el análisis de espectrometría de MS/MS, es decir, se observaron estos tres iones, a que familia proteica pertenecían, se sumaron sus intensidades y se realizó el promedio de la intensidad de cada ion respecto a la intensidad total. En base a dicho promedio, se asignó la parte porcentual correspondiente a cada familia proteica presente en la banda de la SDS-PAGE.

4. Resultados y discusión

Se realizó todo el proceso experimental detallado anteriormente para los venenos de las serpientes *Naja haje* (de Marruecos y de Mali), *Naja annulifera*, *Naja nigricollis nigricincta* y *Naja melanoleuca melanoleuca* (de Uganda) y se obtuvieron las caracterizaciones proteómicas de éstos venenos. En dichas caracterizaciones proteicas, no sólo se identificaron las proteínas, sino que además se determinaron las masas moleculares de las proteínas identificadas y se realizaron tablas informativas (anexo III) donde se describen el pico donde se ha encontrado la proteína, el porcentaje del total de proteínas del veneno que representa, la masa molecular además de la relación masa carga de la proteína con la que identificó, su carga, la secuencia con lo que se encontró similitud, el score y la especie en la que se encontró. Con estas tablas se pretendió dar el máximo de información tanto para este estudio como para la realización de posteriores estudios. Para la nomenclatura de las diferentes familias proteicas en la construcción de los gráficos se utilizaron las abreviaturas que se detallan en el anexo IV.

4.1. Análisis de los venenos

Naja haje (Marruecos)

En los cromatogramas de los venenos se pueden diferenciar principalmente 2 grupos: proteínas más polares y más apolares. El primer grupo está compuesto en este caso principalmente por las 3FTx, Kunitz, vNGF y PLA₂, y ocuparan desde el pico 1 al 17 en este caso, mientras que el segundo destacan las SVMP y las CRISP (más apolares) y serían el resto de picos. Visualmente se puede observar como predominan las proteínas del primer grupo, de hecho, el porcentaje de las áreas de los picos 1-17 es del 86.23%. De este porcentaje el 68.08% corresponde a 3FTx y es que del pico 1 al 9, la totalidad de las proteínas identificadas pertenecen a esta familia y además, son las más destacadas en los picos 14 y 15 (los que más área representan).

Por otro lado, los picos 18,19 y 20 representan la totalidad de las CRISP, además de cierto porcentaje de las metaloproteinasas (PIII-SVMP) encontradas, mientras que los últimos tres picos son identifican prácticamente en su totalidad con el resto de las metaloproteinasas y el 0.6% correspondiente a las LAAO.

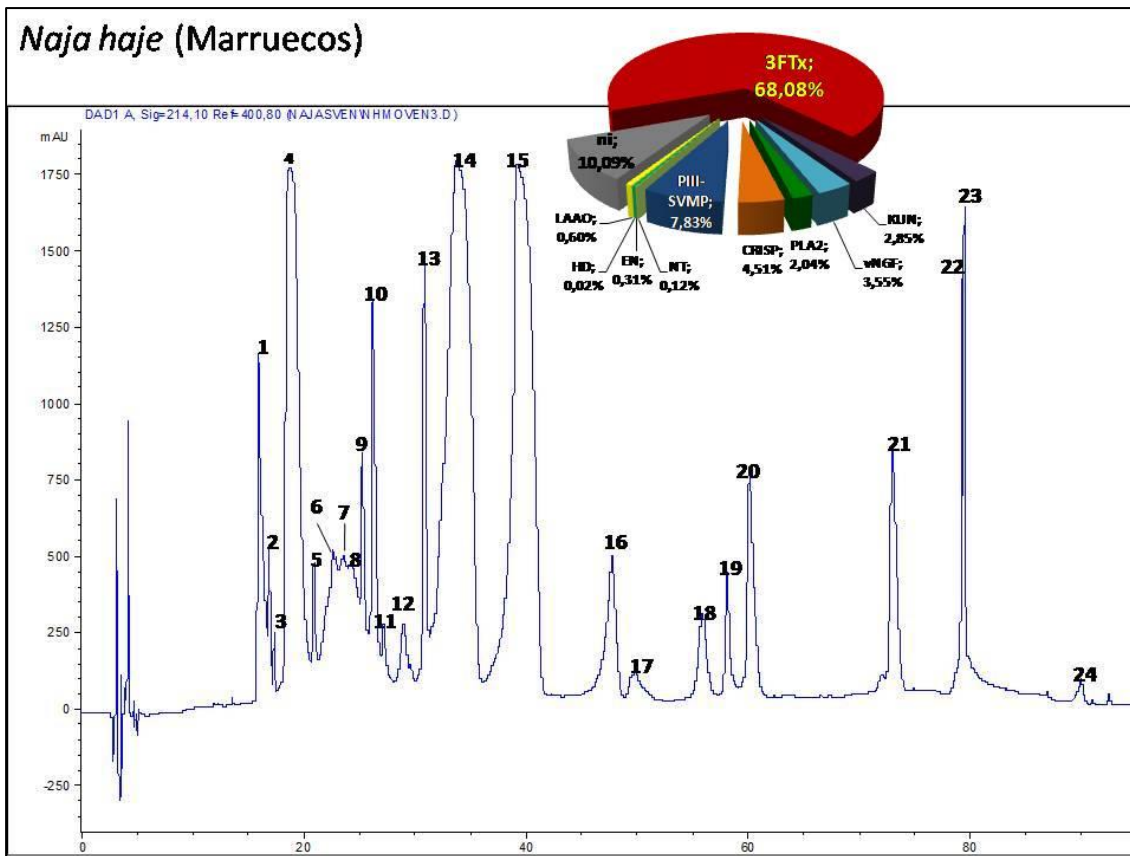


Figura 12. Cromatograma del veneno de *Naja haje* de Marruecos con los picos numerados. Además, se muestra el gráfico de las familias proteicas identificadas y el porcentaje respecto al total de proteínas que representa cada familia.

Naja haje (Mali)

En este veneno, los 7 primeros picos, excepto el 5 fueron recogidos pero no se realizó el resto del proceso experimental por problemas técnicos. No obstante, a la vista de los resultados obtenidos a partir de los otros venenos y del pico 5 de este veneno, se espera que el porcentaje correspondiente a dichos picos (el 12.10% asignado a proteínas no identificadas), esté compuesto por toxinas de la familia 3FTx, ya que son las más polares y por tanto, con un tiempo de retención menor. No obstante, para la continuación de este estudio se correrá de nuevo el veneno y se identificarán las proteínas presentes en estos picos.

En cuanto a las proteínas sí identificadas, se puede ver la división de los dos grupos de familias proteicas, mencionados en el anterior veneno, a los 50 minutos aproximadamente (entre el pico 19 y 20). En el primer grupo son muy predominantes las toxinas de la familia *three finger toxins*, ya que los porcentajes de las otras familias mayoritarias de este grupo, como son vNGF, PLA₂ y Kunitz, fueron inferiores al 2% e incluso no se llegó a identificar ninguna Kunitz.

Naja haje (Mali)

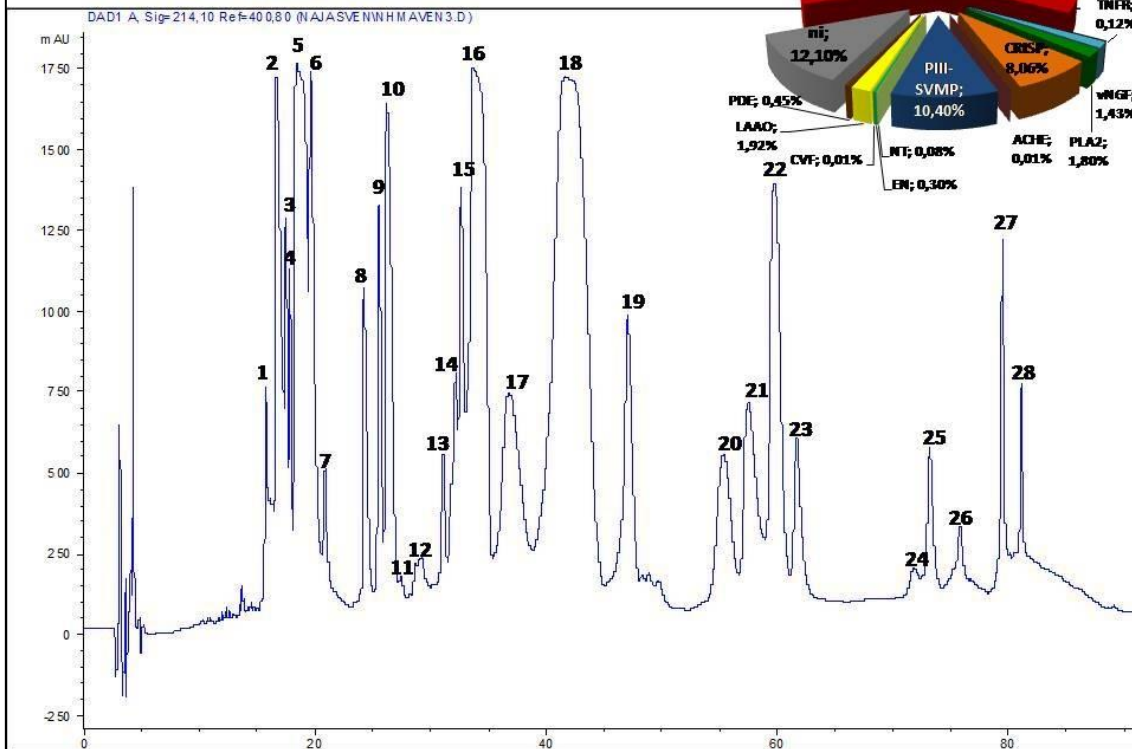


Figura 13. Cromatograma numerado y gráfico de la abundancia relativa de las proteínas del veneno de *Naja haje* de Marruecos

Por otro lado, a partir de los 50 minutos, en el pico 20 solo se identificaron SVMP, mientras que los picos 21, 22 y 23 están compuestos por una combinación de toxinas de las familias CRISP y SVMP. El último grupo de picos (del 24 al 28) está compuesto en gran medida por el resto de metaloproteinasas y el casi 2% de proteínas totales que se asocia a las LAO.

Naja annulifera

En primer lugar se puede observar que en el primer grupo de proteínas se identificaron prácticamente solo proteínas de las familias 3FTx ya que, el porcentaje del resto (vNGF y PLA₂) fue muy bajo y las Kunitz no fueron ni siquiera identificadas. Este predominio de las 3FTx llega hasta el pico 18, es por ello, que su porcentaje de abundancia relativa llega hasta casi el 80%, ya que ocupa gran parte del cromatograma, incluyendo los picos más intensos, y que por tanto, se asocian con mayor cantidad de proteína detectada.

En el pico 19 se identificaron las primeras proteínas de la familia CRISP, mientras que en los picos 20, 21 y 22 se identificaron el resto de éstas y aproximadamente la mitad de las PIII-SVMP encontradas. En el último grupo se identificaron el otro 6% restante de las metaloproteinasas, junto con las proteínas apolares minoritarias que componen este veneno como son las LAO, endonucleasas, etc. Como se ha visto, las PIII-SVMP representan una parte importante del total de toxinas presentes en el veneno, con lo que en este caso, el veneno podría tener unos efectos hemorrágicos más acentuados que en el resto de los venenos estudiados.

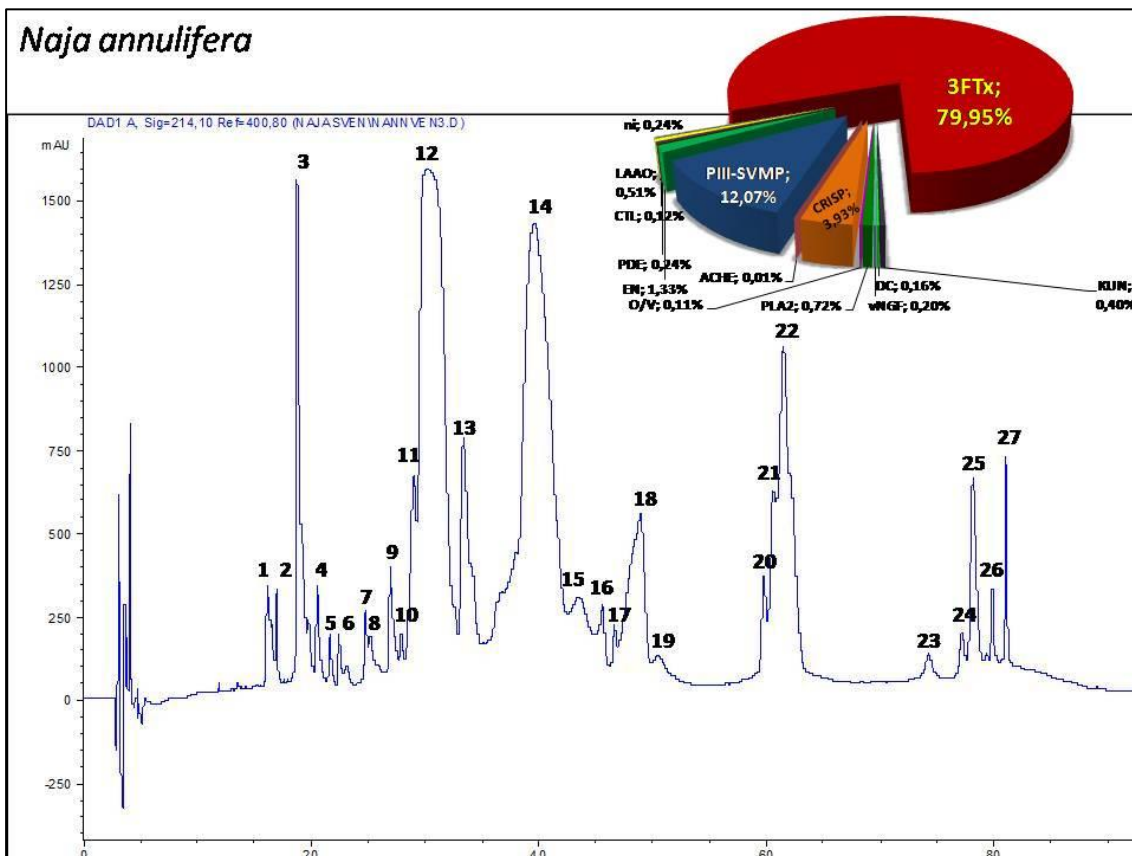


Figura 14. Cromatograma numerado y gráfico de la abundancia relativa de las familias proteicas del veneno de la *Naja annulifera*.

Naja melanoleuca melanoleuca (Uganda)

Este veneno presenta un porcentaje menor de 3FTx, aunque, al igual que en los venenos anteriores, el porcentaje del grupo de proteínas más polares sigue abarcando alrededor del 75-80% de las proteínas identificadas. En este veneno, cobra más importancia la presencia de las PLA₂ que representa el casi una cuarta parte del total de las proteínas. Las primeras toxinas en ser detectadas son las 3FTx, ocupando todos los nueve primeros picos. A partir del pico 10 se observa una combinación de 3FTx con PLA₂ y, en menor proporción, Kunitz y VNGF. Cabe destacar que el pico 12, que es el más intenso del cromatograma, está compuesto mayoritariamente por PLA₂, identificando con casi el 20% del 24% asignado a las proteínas de ésta familia.

Por otro lado, se puede observar un aumento del porcentaje de las CRISP a la vez que disminuye el de las SVMP en comparación con los otros venenos. Visualmente se observa como la zona de alrededor de los 60 minutos es menos significativa en este cromatograma que en el de la *Naja annulifera* por ejemplo. De hecho, el único pico más intenso en esta zona se corresponde con prácticamente la totalidad de las CRISP detectadas (5.29% del 5.93% total). Por último, los picos 25, 26 y 27 se identificaron como PIII-SVMP junto con algunas LAAO y otras proteínas minoritarias.

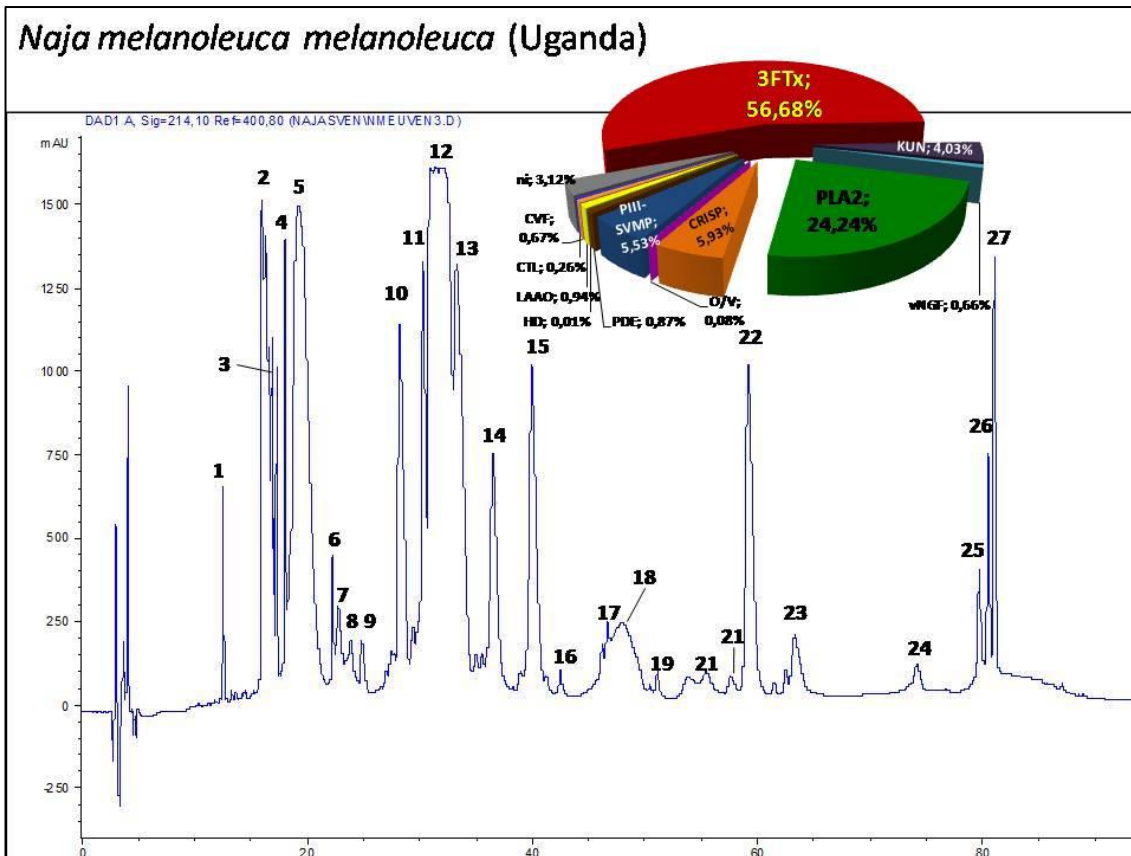


Figura 15. Cromatograma numerado del veneno de la *Naja melanoleuca melanoleuca* de Uganda junto con el grafico de la abundancia relativa de las familias proteicas.

Naja nigricollis nigricincta

En este caso, lo primero que se puede observar es la mayor predominancia del primer grupo de proteínas. La intensidad de los picos de los primeros 55 minutos es mucho mayor respecto a la última parte del cromatograma. Porcentualmente se observa una menor cantidad de metaloproteinasas (3.60%) y CRISP (tan solo un 0.04%). Es por ello que las proteínas de las familias 3FTx y PLA₂ se corresponden con más del 90% del total de las proteínas presentes en el veneno. Como en el resto de cromatogramas, las proteínas detectadas hasta el minuto 30 aproximadamente (pico 10) fueron todas de la familia 3FTx. A partir de ahí, en los picos más intensos, que en este caso son el 13 y 14, se asocian a 3FTx y PLA₂ con alrededor del 20% de las proteínas totales para cada familia. El pico 19, otro de los más intensos y que se corresponde con el 10% del total de las proteínas, se asocia prácticamente en su totalidad a cardiotoxinas de la familia 3FTx.

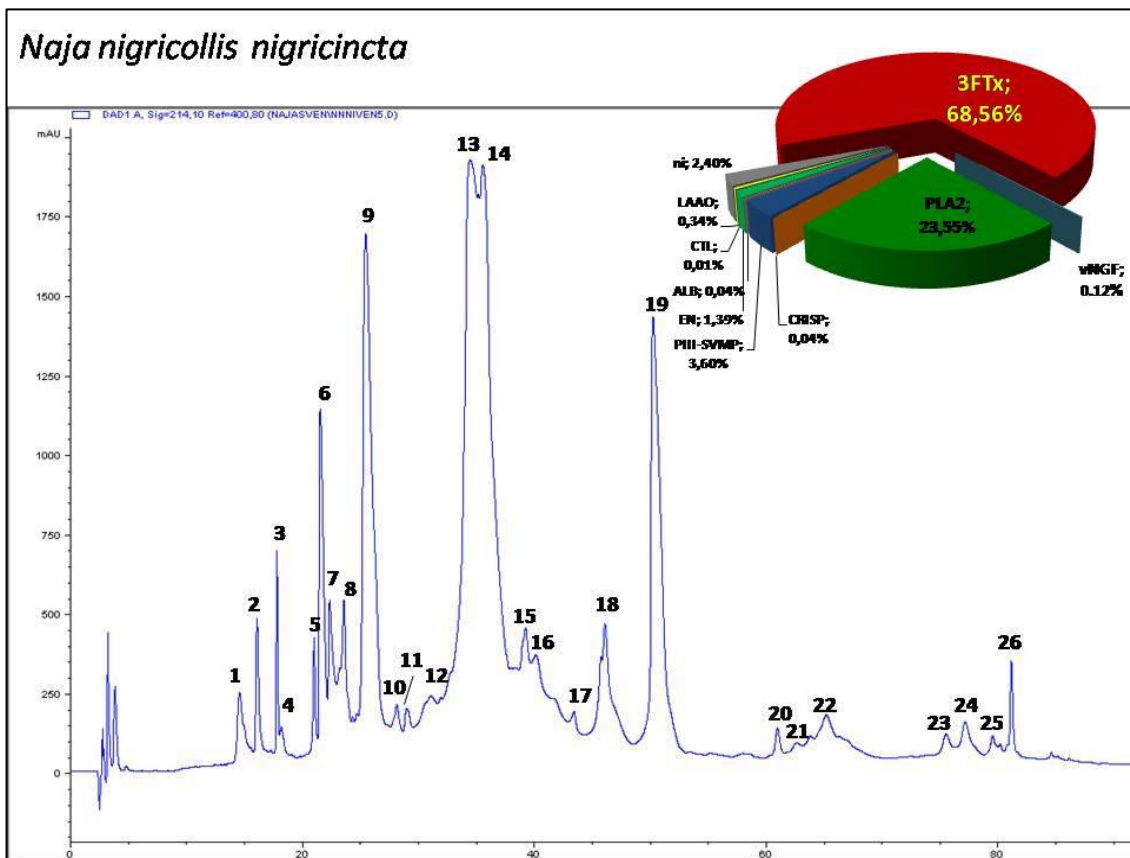


Figura 16. Cromatograma numerado y gráfico de la abundancia relativa de las familias proteicas del veneno de la *Naja nigricollis nigricincta*.

Otro dato a destacar, es que a pesar de la predominancia del primer grupo de familias proteicas en este veneno, no se identificó ninguna Kunitz.

4.2. Comparaciones de los venenos

Los diferentes venenos se pueden comparar basándose en sus composiciones proteicas. Los resultados de las caracterizaciones proteómicas se muestran en la tabla 1.

En todos los venenos, aunque en diferentes porcentajes, se encontraron bandas proteicas de los geles que no pudieron ser identificadas. Esto se debe a que se han perdido las proteínas en el proceso de resuspender las muestras, problemas con la digestión o que las proteínas no se parecen a ninguna de las presentes en la base de datos. Para disminuir el número de proteínas no identificadas, se repitió el proceso experimental en algunas de las bandas no identificadas. En el tiempo en el que se realizó el estudio, se pudieron reducir los porcentajes de no identificadas hasta los valores que se muestran, aunque después de este estudio se seguirán intentando identificar más proteínas.

En cuanto a las proteínas sí identificadas, a simple vista se observan diversos datos característicos:

- Aunque varían los valores de la abundancia de toxinas de la familia 3FTx, éstas son siempre las predominantes en todos los venenos. Como se ha explicado en la introducción, las 3FTx son mayormente neurotoxinas, con lo que a la vista de los resultados se reafirma el carácter neurotóxico del veneno de las *Najas*.
- No todos los venenos comparten las mismas familias proteicas, no obstante, las familias mayoritarias como 3FTx, PLA₂, CRISP y PIII-SVMP se identificaron en todos los venenos, aunque en diferente abundancia relativa.
- Solo existen de 2 a 4 familias de proteínas que tienen porcentajes mayores del 5% del total de las proteínas.

	Naja haje (Mali)	Naja haje (Marruecos)	Naja annulifera	Naja n. nigricincta	Naja m. melanoleuca (Uganda)
3FTx	63.23	68.08	79.95	68.56	56.68
LAO	1.92	0.60	0.51	0.34	0.94
EN	0.30	0.31	1.33	1.39	-
NT	0.08	0.12	-	-	-
PIII-SVMP	10.40	7.83	12.07	3.60	5.53
CRISP	8.06	4.51	3.93	0.04	5.93
PLA₂	1.80	2.04	0.72	23.55	24.24
vNGF	1.43	3.55	0.20	0.12	0.66
KUN	-	2.85	0.40	-	4.03
TNFR	0.12	-	-	-	-
ACHE	0.01	-	0.01	-	-
CVF	0.01	-	-	-	0.67
PDE	0.45	-	0.24	-	0.87
DC	-	-	0.16	-	-
O/V	-	-	0.11	-	0.08
CTL	-	-	0.12	0.01	0.26
ALB	-	-	-	0.04	-
HD	-	0.02	-	-	0.01
ni	12.10	10.09	0.24	2.40	3.12

Tabla 1. Valores porcentuales de las abundancias de las diferentes familias de proteínas respecto a las proteínas totales en los venenos estudiados. Las nomenclaturas de las familias proteicas se detallan en el anexo IV.

No obstante, para profundizar, en este estudio se observan las diferencias entre la abundancia relativa de las diferentes familias en los venenos, tanto a nivel interespecífico como a nivel intraespecífico geográfico.

4.3. Variación interespecífica

En este apartado se busca profundizar en las variaciones de abundancias relativas de las diferentes familias proteicas en los venenos de especies diferentes. En la figura 17 se pueden observar gráficamente los porcentajes de las familias proteicas. Para esta comparación, de los dos venenos estudiados de las *Naja haje* (de Mali i de Marruecos), se usa el de la serpiente de Marruecos por el menor valor de proteínas no identificadas en su caracterización proteica.

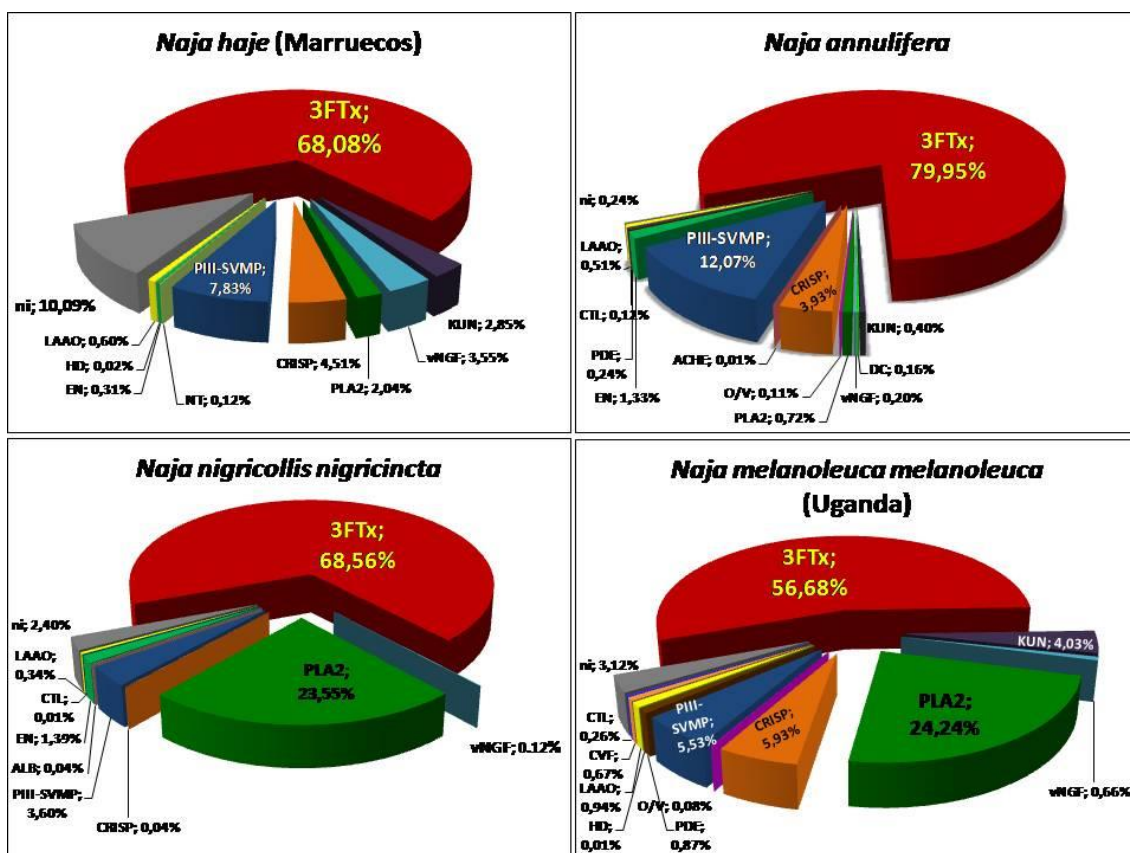


Figura 17. Gráficos de las abundancias relativas de las familias de proteínas de los venenos estudiados en diferentes especies de *Najas*

Gráficamente se pueden observar numerosas diferencias:

En primer lugar, las diferencias entre la abundancia de las 3FTx son casi inexistentes entre *Naja haje* y *Naja n. nigricincta*, mientras que en *Naja annulifera* el porcentaje es significativamente mayor, llegando a casi el 80% de las proteínas identificadas y en la *Naja m. melanoleuca* representa poco más de la mitad. No obstante, es importante destacar que en este estudio se miden las abundancias relativas, no la cantidad, con lo que un mayor porcentaje no implica una mayor cantidad, sino que puede deberse a la menor proporción del resto de las familias proteicas. Por ejemplo, se puede observar que en la *Naja m. melanoleuca*, dónde la abundancia relativa de las 3FTx es menor, la proporción de las PLA₂ es del 24.24%, mucho mayor que el 0.72% identificado en el veneno de la *Naja annulifera*.

Como se ha mencionado, otra de las diferencias significativas entre los venenos es la gran diferencia porcentual de las proteínas de la familia PLA₂ en los venenos de *Naja n. nigricincta* y *N. m. melanoleuca* respecto a las otras dos especies, siendo incluso inferior al 1%, el valor de su abundancia relativa en la *N. annulifera*.

Por otro lado, otro resultado significativo es la presencia de metaloproteinasas (SVMP) en los venenos estudiados. Las SVMP son características de los vipéridos debido a su importante efecto hemorrágico y por ello se encuentran en un mayor porcentaje. No obstante, como se puede ver en la figura 17, son familias de toxinas relativamente abundantes en las *Najas* estudiadas. De hecho, en los venenos de la *N. annulifera* y la *N. haje* llega a ser el segundo grupo más abundante después de las 3FTx representando alrededor del 12% y el 8% del total de las proteínas. Estos resultados demuestran que a pesar del carácter neurotóxico del veneno de las cobras, también existe un importante efecto hemorrágico que aumenta los problemas derivados de los envenenamientos.

En el caso de las CRISP, resulta interesante el hecho de que mantienen un valor de abundancia relativa relativamente similar en todas las especies estudiadas menos en la *N. n. nigricincta*, donde es prácticamente inexistente. Con las Kunitz ocurre un algo similar, aunque en este caso llega incluso a no ser identificada en esta especie. Cabe destacar que, aunque aparece también en el veneno la *N. annulifera* compone solo el 0.4% del total de proteínas en de éste, muy lejos del 4% en el veneno de la *N. m. melanoleuca*.

Además, con la interpretación de los cromatogramas realizada con anterioridad, se pueden identificar las diferencias de abundancias relativas entre venenos en los cromatogramas.

En primer lugar se deben identificar los dos grandes grupos de familias proteicas mencionados durante este apartado, que se sitúan entre el minuto 10 y el 50-55 aproximadamente, el primer grupo y del 50-55 hasta el final el segundo. En este segundo grupo, el de las proteínas más apolares, se puede además hacer una subdivisión en dos grupos más, ya que alrededor del minuto 60 se observa siempre una zona con unos 3 o 4 picos y a partir de los 70-75 minutos se observa otra zona de picos. En el grupo de proteínas retenidas 60 minutos las dos familias más abundantes son las PIII-SVMP y las CRISP, aunque normalmente predominan las CRISP ya que son más polares que las metaloproteinasas. Se puede observar como la intensidad de los picos en esa zona está relacionada con la cantidad de toxinas de la familia CRISP presentes en los venenos. De hecho en la *N. n. nigricincta* los picos son muy pequeños y el porcentaje de CRISP es de tan solo 0.04% de las proteínas totales, mientras que en el resto de venenos estudiados, la intensidad de los picos en esa zona es mayor, y se traduce en un mayor porcentaje de toxinas de esta familia.

Por otro lado, en el grupo de las proteínas más polares y que, por tanto, son detectadas más pronto (en los 25 primeros minutos aproximadamente), siempre pertenecen a la familia de las 3FTx. No obstante, hasta el minuto 50-55 no dejan de identificarse estas toxinas, aunque a partir de esos 25 minutos se combinan con otras, principalmente PLA₂ y algunas vNGF y Kunitz. De estas otras tres familias, la PLA₂ representa una parte importante del veneno en las *N. n. nigricincta* y *N. m. melanoleuca*. En el cromatograma, estas proteínas se asocian prácticamente en su totalidad con los picos de alta intensidad que se detectaron alrededor de los 35 minutos, como son el pico 14 en la *N. n. nigricincta* y el 12 en la *N. m. melanoleuca*. No obstante, observando los cromatogramas, en los otros dos venenos también se observan picos intensos en esa zona que después no se traducen en un alto porcentaje de PLA₂. Esto se debe a que estas toxinas se encuentran normalmente en esos picos, pero no

implica que sean las únicas, ya que en esa zona también se detectan muchas toxinas de la familia 3FTx.

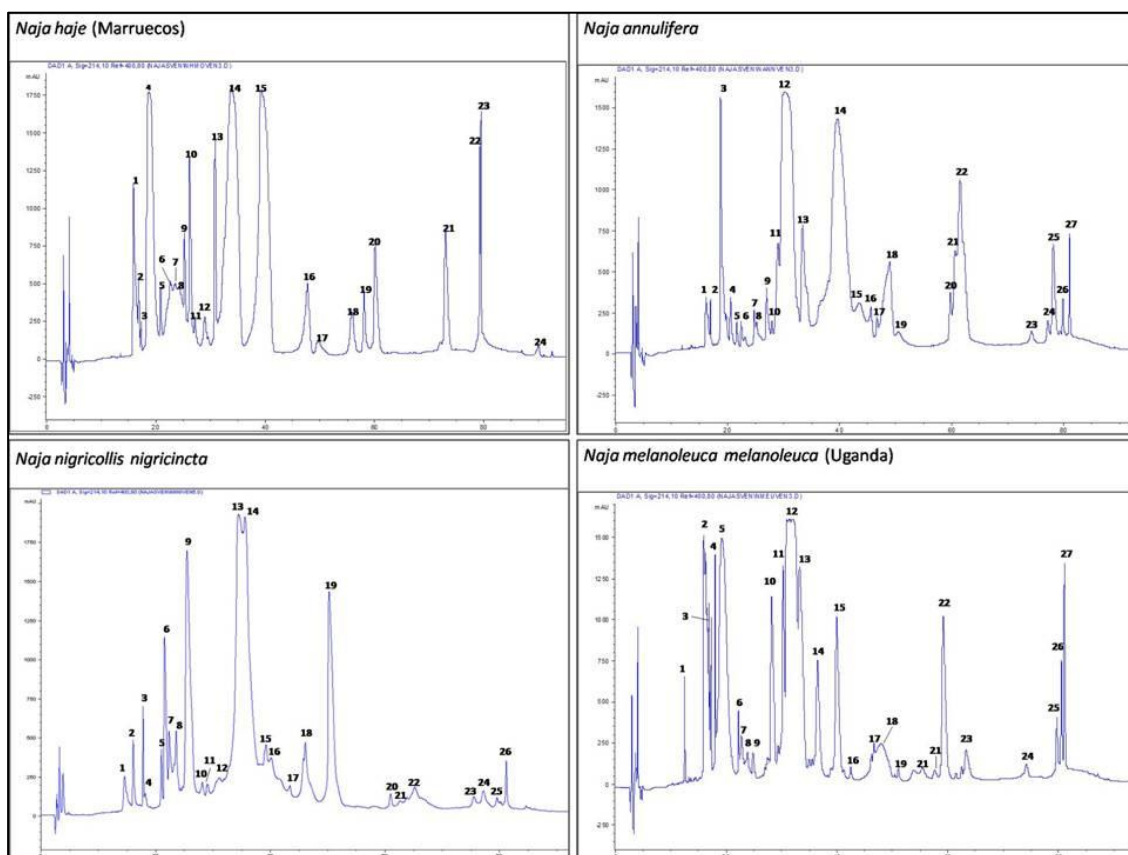


Figura 18. Cromatogramas numerados de los venenos de las especies a comparar

4.4. Variación intraespecífica geográfica

En este estudio, se analizaron los venenos de dos *Naja haje* de países diferentes con el objetivo de estudiar posibles diferencias en la composición proteica de estos venenos asociadas a sus localizaciones geográficas. La *Naja haje* o cobra egipcia fue muy importante en la mitología egipcia, siendo el símbolo de soberanía para los faraones, quien las incorporaban en sus diademas.

Por lo que respecta a su hábitat, se pueden encontrar tanto en estepas como en sabanas o regiones semidesérticas con algo de agua y vegetación y además, son terrestres y nocturnas. Habitan en numerosos lugares del norte de África y África occidental principalmente, aunque también se encuentran en Sudán y Sudán del sur y algunos puntos del África Oriental (figura 19). En este trabajo los venenos estudiados fueron de *Najas haje* de Marruecos y de Mali.

Después de realizar la caracterización de ambos venenos se pueden observar algunas diferencias. No obstante, estas diferencias son obviamente menores que las diferencias encontradas al comparar venenos de diferentes especies (figura 20).

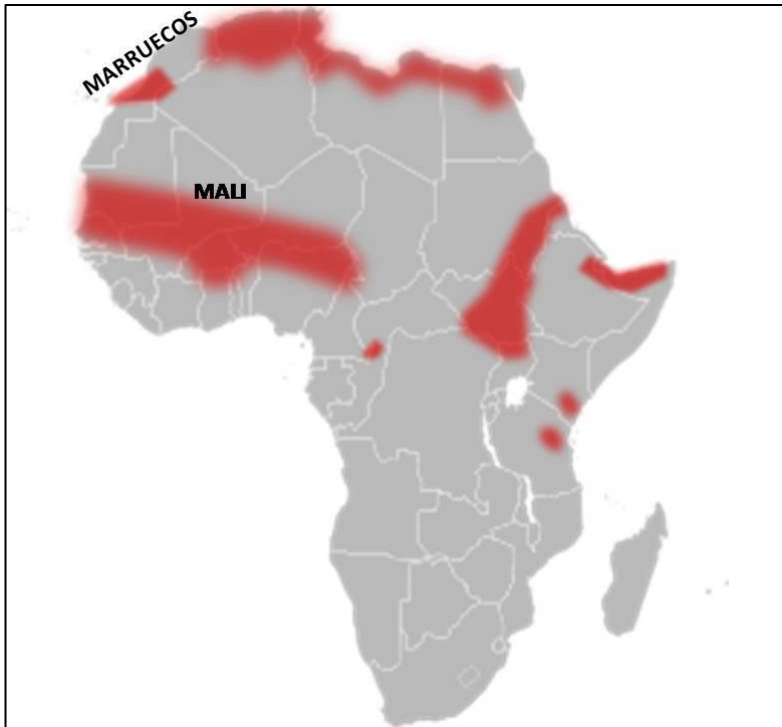


Figura 19. Identificación de las zonas del continente africano donde se han encontrado serpientes de la familia *Naja haje*. Se resaltan los dos países de los cuales provienen las dos serpientes es esta especie estudiadas en este trabajo.

El valor de las 3FTx en el veneno de la serpiente de Mali es menor que en la de Marruecos, aunque como se ha mencionado con anterioridad, en los primeros picos de este veneno no se pudieron identificar sus proteínas, con lo que se espera que el valor porcentual de ambos venenos para la familia de las 3FTx sea más similar.

Otro dato interesante, es la mayor abundancia de las proteínas más polares en el veneno de la serpiente de Marruecos, mientras que en Mali, abundan más las proteínas con carácter más apolar. En el primer caso se observa que, aunque no de manera significativa, el valor de PLA₂ en el veneno de la *N. haje* de Marruecos es mayor que en el de la de Mali, y sucede lo mismo con las proteínas de la familia vNGF. El dato que sí presenta mayor importancia, es la ausencia de proteínas de la familia Kunitz en el veneno de Mali, mientras que en el de Marruecos representa casi el 3% del total de proteínas.

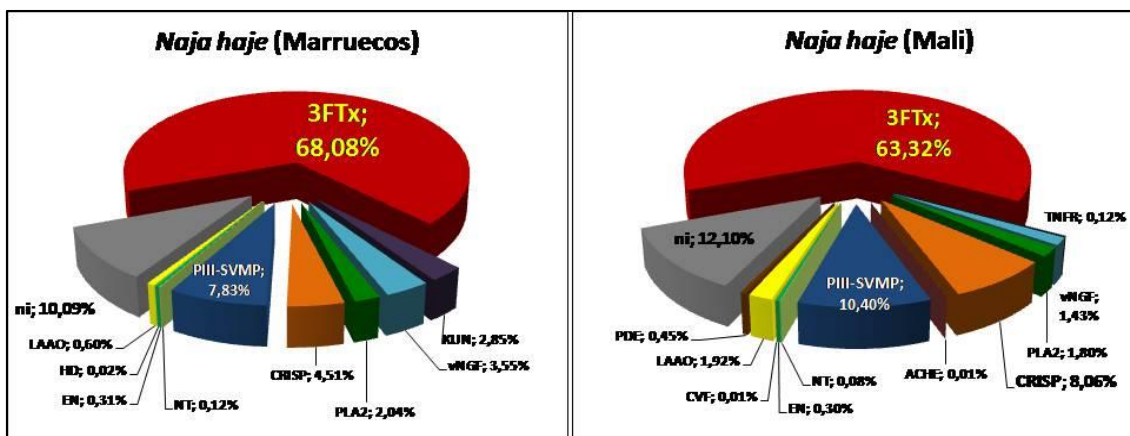


Figura 20. Gráficos de las abundancias relativas de las proteínas de los venenos de las dos *Naja haje* estudiadas.

En cuanto al grupo de proteínas más apolares, las tres mayoritarias (PIII-SVMP, CRISP y LAAO) son más abundantes en el veneno estudiado de la cobra de Mali. Esto se traduciría en más efectos de carácter hemorrágico en la víctima con el envenenamiento de ésta *Naja haje*.

Estas diferencias de composición del veneno se deben principalmente a las diferencias en las condiciones geográficas entre ambos países. Mientras que en Mali predominan las zonas desérticas y de sabana y con poca vegetación, en Marruecos existen cuatro cordilleras montañosas. Por otro lado, también existen diferencias climáticas, ya que Marruecos presenta un clima Mediterráneo mientras que en Mali el clima es subtropical, con muy pocas precipitaciones y frecuentes periodos de sequía. Además, a causa de estas diferencias los ecosistemas no son los mismos, y las especies que los habitan tampoco, con lo que las presas que sirven de alimento para estas cobras podrían variar en mayor o menor medida.

No obstante, se debe seguir investigando en esta línea para identificar patrones geográficos que puedan influir en la composición final del veneno de las *Naja haje* y de hecho, actualmente este estudio se está ampliando.

5. Conclusiones

- Se ha comprobado que los venenos de las *Najas* estudiadas presentan un predominante carácter neurotóxico, aunque también están compuestos por proteínas que producen efectos hemorrágicos.
- Las proteínas más abundantes en todos los venenos estudiados son de la familia 3FTx, destacando así su importancia en los venenos de las cobras.
- Existen numerosas diferencias interespecíficas en las abundancias relativas de las familias proteicas en los venenos de las especies *Naja haje*, *Naja annulifera*, *Naja melanoleuca melanoleuca* y *Naja nigricollis nigricincta*.
- Se encontraron diferencias intraespecíficas de carácter geográfico entre los venenos de las *Naja haje* de Marruecos y de Mali.

6. Referencias

Angeletti, R. H. (1970). Nerve growth factor from cobra venom. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 65(3), 668-674.

Argentina, P. D. L. A. T. (2006). Acta Toxicológica Argentina. *Buenos Aires*.15(09), 2013.

Arlinghaus, F. T., Eble, J. A. (2012). C-type lectin-like proteins from snake venoms. *Toxicon*, 60(4), 512-519.

Brown, N. I. (2012). Consequences of neglect: analysis of the sub-Saharan African snake antivenom market and the global context. *PLoS Negl Trop Dis*,6(6), e1670.

Calvete J. (2014). Next-generation snake venomomics: protein-locus resolution through venom proteome decomplexation. *Expert Reviews, Proteomics* 11(3): 315-329.

Calvete, J. J. (2010). Antivenomics and venom phenotyping: a marriage of convenience to address the performance and range of clinical use of antivenoms. *Toxicon*, 56(7), 1284-1291.

Calvete, J. J. (2014). Next-generation snake venomomics: protein-locus resolution through venom proteome decomplexation. *Expert review of proteomics*, 11(3), 315-329.

Calvete, J. J. (2013). Snake venomomics: from the inventory of toxins to biology. *Toxicon*, 75, 44-62.

Calvete, J. J., Juárez, P., Sanz, L. (2007). Snake venomomics. Strategy and applications. *Journal of Mass Spectrometry*, 42(11), 1405-1414.

Calvete, J. J., Escolano, J., Sanz, L. (2007). Snake venomomics of Bitis species reveals large intragenus venom toxin composition variation: application to taxonomy of congeneric taxa. *Journal of proteome research*, 6(7), 2732-2745.

Calvete, J. J., Marcinkiewicz, C., Monleón, D., Esteve, V., Celda, B., Juárez, P., Sanz, L. (2005). Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon*, 45(8), 1063-1074.

Calvete, J. J., Sanz, L., Pla, D., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M. (2014). Omics meets biology: application to the design and preclinical assessment of antivenoms. *Toxins*, 6(12), 3388-3405.

Calvete, J. J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M. (2009). Venoms, venomomics, antivenomics. *FEBS letters*, 583(11), 1736-1743.

Casewell, N. R., Wüster, W., Vonk, F. J., Harrison, R. A., Fry, B. G. (2013). Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends in ecology & evolution*, 28(4), 219-229.

Chippaux, J. P. (2011). Estimate of the burden of snakebites in sub-Saharan Africa: a meta-analytic approach. *Toxicon*, 57(4), 586-599.

Chippaux, J. P. (1998). Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bulletin of the World Health organization*, 76(5), 515.

- Chippaux, J. P., Williams, V., White, J.** (1991). Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 29(11), 1279-1303.
- Clemetson, K. J., Lu, Q., Clemetson, J. M.** (2006). Snake C-type lectin-like proteins and platelet receptors. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*, 34(4-5), 150-155.
- Clemetson, K. J.** (2010). Snaclecs (snake C-type lectins) that inhibit or activate platelets by binding to receptors. *Toxicon*, 56(7), 1236-1246.
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R.** (1956). A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 42(9), 571-574.
- Du, X. Y., Clemetson, K. J.** (2002). Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon*, 40(6), 659-665.
- Durban i Sanchez, J.** (2015). Aplicacions de Next Generation Sequencing en organismes no model: caracterització dels transcriptomes de verins de serps.
- Eichberg, S., Sanz, L., Calvete, J. J., Pla, D.** (2015). Constructing comprehensive venom proteome reference maps for integrative venomomics. *Expert Review of Proteomics*, 12(5), 557-573.
- Escalante, T., Rucavado, A., Fox, J. W., Gutiérrez, J. M.** (2011). Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Journal of proteomics*, 74(9), 1781-1794.
- Escoubas, P., Quinton, L., Nicholson, G. M.** (2008). Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, 43(3), 279-295.
- Fry, B. G.** (1999). Structure–function properties of venom components from Australian elapids. *Toxicon*, 37(1), 11-32.
- Fry, B. G., Casewell, N. R., Wüster, W., Vidal, N., Young, B., Jackson, T. N.** (2012). The structural and functional diversification of the Toxicofera reptile venom system. *Toxicon*, 60(4), 434-448.
- Fry, B. G., Roelants, K., Champagne, D. E., Scheib, H., Tyndall, J. D., King, G. F., Nevalainen, T. J., Norman, J. A., Lewis, R. J., Norton, R. S., Renjifo, C., Rodríguez de la Vega, R. C.** (2009). The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annual review of genomics and human genetics*, 10, 483-511.
- Fry, B. G., Scheib, H., van der Weerd, L., Young, B., McNaughtan, J., Ramjan, S. R., Vidal, N., Poelmann, R. E., Norman, J. A.** (2008). Evolution of an arsenal structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(2), 215-246.
- Fry, B. G., Vidal, N., Norman, J. A., Vonk, F. J., Scheib, H., Ramjan, S. R., Kuruppu, S., Fung, K., Blair Hedges, S., Richardson, M. K., Hodgson, W. C., Ignjatovic, V., Summerhayes, R., Kochva, E.** (2006). Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature*, 439(7076), 584-588.
- Fry, B. G., Wüster, W., Kini, R. M., Brusich, V., Khan, A., Venkataraman, D., Rooney, A. P.** (2003). Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. *Journal of molecular evolution*, 57(1), 110-129.

- Gutiérrez, J. M., Burnouf, T., Harrison, R. A., Calvete, J. J., Brown, N., Jensen, S. D., Warrell, D. A., Williams, D. J. Global Snakebite Initiative.** (2015). A Call for Incorporating Social Research in the Global Struggle against Snakebite. *PLOS Neglected Tropical Diseases*,9(9), e0003960.
- Gutiérrez, J. M., León, G.** (2009). Snake antivenoms. Technological, clinical and public health issues. *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*, 393-421.
- Gutiérrez, J. M., León, G., Burnouf, T.** (2011). Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead. *Biologicals*, 39(3), 129-142.
- Guo, C., Liu, S., Yao, Y., Zhang, Q., Sun, M. Z.** (2012). Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. *Toxicon*, 60(3), 302-311.
- Gutiérrez, J. M., Williams, D., Fan, H. W., Warrell, D. A.** (2010). Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*, 56(7), 1223-1235.
- Gutiérrez, J. M., Williams, D., Fan, H. W., Warrell, D. A.** (2010). Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*, 56(7), 1223-1235.
- Harrison, R. A., Hargreaves, A., Wagstaff, S. C., Faragher, B., Laloo, D. G.** (2009). Snake envenoming: a disease of poverty. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(12), e569.
- Hsiang, A. Y., Field, D. J., Webster, T. H., Behlke, A. D., Davis, M. B., Racicot, R. A., Gauthier, J. A.** (2015). The origin of snakes: revealing the ecology, behavior, and evolutionary history of early snakes using genomics, phenomics, and the fossil record. *BMC evolutionary biology*, 15(1), 1.
- Isabel, T. F., Costa, G. N. M., Pacheco, I. B., Barbosa, L. G., Santos-Junior, C. D., Fonseca, F. P., França, J. B., Henrique-Silva, F., Yoneyama, K. A., Rodrigues, R. S., de Melo Rodrigues, V.** (2016). Expression and partial biochemical characterization of a recombinant serine protease from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon*, 115, 49-54.
- Jackson, K.** (2007). The evolution of venom-conducting fangs: insights from developmental biology. *Toxicon*, 49(7), 975-981.
- Juárez, P., Comas, I., González-Candelas, F., Calvete, J. J.** (2008). Evolution of snake venom disintegrins by positive Darwinian selection. *Molecular biology and evolution*, 25(11), 2391-2407.
- Kasturiratne A., Wickremasinghe A. R., de Silva N., Gunawardena N. K., Pathmeswaran A., Premaratna R., Savioli L., Laloo D. G., and de Silva H. J.** (2008). *PLoS Medicine*, Volume 5, Issue 11, e 218.
- Kierszenbaum, A. L., Lea, O., Petrusz, P., French, F. S., Tres, L. L.** (1981). Isolation, culture, and immunocytochemical characterization of epididymal epithelial cells from pubertal and adult rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(3), 1675-1679.
- Kini, R. M.** (2002). Molecular moulds with multiple missions: Functional sites in three-finger toxins. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*,29(9), 815-822.
- Kini, R. M., Doley, R.** (2010). Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. *Toxicon*, 56(6), 855-867.

- Kostiza, T., Meier, J.** (1996). Nerve growth factors from snake venoms: chemical properties, mode of action and biological significance. *Toxicon*, 34(7), 787-806.
- Lynch, V. J.** (2007). Inventing an arsenal: adaptive evolution and neofunctionalization of snake venom phospholipase A 2 genes. *BMC evolutionary biology*, 7(1), 1.
- Markland, F. S.** (1998). Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, 36(12), 1749-1800.
- Markland, F. S., Swenson, S.** (2013). Snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, 62, 3-18.
- Mukherjee, A. K., Mackessy, S. P., Dutta, S.** (2014). Characterization of a Kunitz-type protease inhibitor peptide (Rusvikunin) purified from *Daboia russelii russelii* venom. *International journal of biological macromolecules*, 67, 154-162.
- Nei, M., Rooney, A. P.** (2005). Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annual review of genetics*, 39, 121.
- Pahari, S., Mackessy, S. P., 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.
- Pla, D., Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J.** (2012). Second generation snake antivenomics: comparing immunoaffinity and immunodepletion protocols. *Toxicon*, 60(4), 688-699.
- Pyron R. A., Burbrink F. T., Colli G. R., Montes de Oca A. N., Vitt L. J., Kuczynski C. A., Wiens J. J.** (2011). The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and comparison of support methods for likelihood trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 58: 329-342.
- Saz-Parkinson, Z., del Pino Luengo, M., López-Cuadrado, T., Andújar, D., Carmona-Alfárez, R., Flores, R. M., Amate, J. M.** (2012). Approach to the epidemiology of venomous bites in Spain. *Toxicon*, 60(4), 706-711.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J., Olsen, J. V., Mann, M.** (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*, 1(6), 2856-2860.
- Shikamoto, Y., Suto, K., Yamazaki, Y., Morita, T., Mizuno, H.** (2005). Crystal structure of a CRISP family Ca²⁺-channel blocker derived from snake venom. *Journal of molecular biology*, 350(4), 735-743.
- Six, D. A., Dennis, E. A.** (2000). The expanding superfamily of phospholipase A 2 enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(1), 1-19.
- Sociedad Española de Proteómica.** (2014). Manual de Proteómica.
- Stock, R. P., Massougbdji, A., Alagón, A., Chippaux, J. P.** (2007). Bringing antivenoms to sub-Saharan Africa. *Nature biotechnology*, 25(2), 173-177.
- Sunagar, K., Fry, B. G., Jackson, T. N., Casewell, N. R., Undheim, E. A., Vidal, N., Ali, S. A., King, G. F., Vasudevan, K., Vasconcelos, V. Antunes, A.** (2013). Molecular Evolution of

Vertebrate Neurotrophins: Co-Option of the Highly Conserved Nerve Growth Factor Gene into the Advanced Snake Venom Arsenal. *PLoS one*, 8(12), 10-1371.

Takeda, S., Takeya, H., Iwanaga, S. (2012). Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1824(1), 164-176.

Utkin, Y. N. (2015). Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World journal of biological chemistry*, 6(2), 28.

Utkin, Y. N. (2013). Three-finger toxins, a deadly weapon of elapid venom—Milestones of discovery. *Toxicon*, 62, 50-55.

Vonk, F. J., Admiraal, J. F., Jackson, K., Reshef, R., de Bakker, M. A., Vanderschoot, K., van den Berge, I., van Atten, M., Burgerhout, E., Beck, A., Mirtschin, P. J., Kochva, E., Witte, F., Fry, B. G., Woods, A. E., Richardson, M. K. (2008). Evolutionary origin and development of snake fangs. *Nature*, 454(7204), 630-633.

Vonk, F. J., Casewell, N. R., Henkel, C. V., Heimberg, A. M., Jansen, H. J., McCleary, R. J., Kerkkamp, H. M., Vos, R. A., Guerreiro, I., Calvete, J. J., Wüster, W., Woods, A. E., Logan, J. M., Harrison, R. A., Castoe, T. A., Jason de Koning, A. P., Pollock, D. D., Yandell, M., Calderon, D., Renjifo, C., Currier, R. B., Salgado, D., Pla, D., Sanz, L., Hyder, A. S., Ribeiro, J., M., Arntzen, J. W., van den Thillart, G. E., Boetzer, M., Pirovano, W., Dirks, R.P., Spaink, H. P., Duboule, D., McGlenn, E., Kini, R. M., Richardson, K. (2013). The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(51), 20651-20656.

Warrell, D. A. (2010). Snake bite. *The Lancet*, 375(9708), 77-88.

Weinstein, S. A., Keyler, D. E., White, J. (2012). Replies to Fry et al. (*Toxicon* 2012, 60/4, 434–448). Part A. Analyses of squamate reptile oral glands and their products: A call for caution in formal assignment of terminology designating biological function. *Toxicon*, 60(5), 954-963.

Weinstein S. A. , White J., Keyler D. E., Warrell D. A. (2013). Non-front-fanged colubroid snakes: A current evidence-based analysis of medical significance. *Toxicon*, 69: 103-113.

World Health Organization. (2007). *Rabies and envenomings: a neglected public health issue*. World Health Organization.

World Health Organization. WHO Guidelines for the Prevention and Clinical Management of Snakebite in Africa [http://www.afro.who.int/en/clusters-a-programmes/hss/essential-medicines/edm-publications/2731-guidelines-for-the-prevention-and-clinical-management-of-snakebite-in-africa.html]

Yamazaki, Y., Morita, T. (2004). Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon*, 44(3), 227-231.

Página web especializada

Reptile Database. [http://www.reptile-database.org/]

7. Anexos

Anexo I

Productos y concentraciones para la fabricación de los geles de electroforesis:

*las concentraciones detalladas a continuación son para 2 geles de 0.75mm

Productos	Resolución del 15%
Acrilamida 40%	3.38 ml
1.5 Tris pH= 8.8	2.24 ml
H ₂ O	3.31 ml
SDS 10%	90 µl
APS 10%	45 µl
TEMED	13 µl

Productos	Resolución del 15%
Acrilamida 40%	400 µl
0.5 Tris pH= 6.8	1.58 ml
H ₂ O	1.7 ml
SDS 10%	41 µl
APS 10%	20 µl
TEMED	10 µl

Anexo II

Tampones de carga añadidos a las muestras para la SDS-PAGE:

*las concentraciones detalladas a continuación son para realizar el tampón de carga para las muestras que se corrieron en la SDS-PAGE en condiciones no reductoras. El tampón de carga para las condiciones reducidas está compuesto por 950µl del tampón de carga normal y 50µl de β-mercaptoetanol.

Productos	Tampón de carga para proteínas 6X
0.5 M TRIS pH= 6.8	2.5 ml
Glicerol	5 ml
SDS	2 ml
Azul de bromofenol al 1%	0.4 ml

Aexo III

Ejemplo de las tablas diseñadas con los resultados de las identificaciones proteicas:

Spot ID	%	MW (kDa)	MS-ESI(ave)	m/z	z	Peptide sequence	Score	Best NCBI match	Protein family			
1	1,040	14 ▼	6833.5/6659.2	615,8	2	TCPGETNCYK	165	<i>N. annulifera</i> P68417	3FTx			
				849,8	2	GIEINCCTTDKCNN						
				609,9	3	KGIEINCCTTDKCNN						
2	0,104	14 ▼	6833.5	615,2	2	TCPGETNCYK	152	<i>N. annulifera</i> P68417	3FTx			
				655,8	2	GIEINCCTTDK						
				585,6	3	LECHNQSSQPPTTK						
				609,6	3	KGIEINCCTTDKCNN						
				0,242	11 ▼	6833.5				615,2	2	TCPGETNCYK
			655,8	2	GIEINCCTTDK							
			585,6	3	LECHNQSSQPPTTK							
3	3,967	8 ■	6833.5	634,8	2	EIVECCSTDR	108	<i>N. annulifera</i> P01399	3FTx			
				429,9	3	GCAATCPVAKFR						
				655,8	2	GIEINCCTTDK				106	<i>N. annulifera</i> P01421	3FTx
				788,9	2	SLQFPITTVCPGEK						
4	0,781	6 ▼	6833.5	537,7	2	LECYQMoxSK	120	<i>N. annulifera</i> P25678	3FTx			
				843,4	3	VVTCKPEETFCYSDVFMoxPFR						
				655,8	2	GIEINCCTTDK				106	<i>N. annulifera</i> P01421	3FTx
				788,9	2	SLQFPITTVCPGEK						
5	0,344	7 ■	6833.5/7746.0	460,7	2	YVYCCR	<i>de novo</i>	~ <i>B. multicornis</i> Q9W727	3FTx			
				419,8	2	LVPFVWK	<i>de novo</i>	~ <i>N. annulifera</i> P01455	3FTx			
6	0,216	24 ▼	7746.0	613,8	2	DVIECCSTDK	<i>de novo</i>	~ <i>N. kaouthia</i> P82942	3FTx			
				505,6	3	(442.2)VSTSTVPVKR	<i>de novo</i>	~ <i>N. annulifera</i> P01453	3FTx			
				0,031	18 ▼	505,6	3	MoxFMoxVSTSTVPVKR	200	<i>N. annulifera</i> P01453	3FTx	
				0,062	13 ▼	474,7	2	GCIDVCPK	161	<i>N. annulifera</i> P01453	3FTx	
						505,6	3	MoxFMoxVSTSTVPVKR				
7	0,063	8 ▼	1.1/7284.3/73	561,6	3	(317.2)ASCPEFESHFR	<i>de novo</i>	~ <i>N. h. hoje</i> P01415	3FTx			
				422,7	2	YLLCCR	<i>de novo</i>	~ <i>N. h. hoje</i> P01415	3FTx			
				0,360	5 ▼	7.1/6445.1/63	465,7	2	TIDECHR	196	<i>N. nivea</i> P00986	Kunitz-type inhibitor
						713,3	2	FCELPAETGLCK				
			551,3	3	FCELPAETGLCKAR							
			696,0	3	AAQQCLEFIYGGCGGNANR							

Spot ID: número del pico en el cromatograma.

%: porcentaje asociado a cada banda electroforética.

MW (kDa): peso molecular observado en el gel.

MS-ESI (ave): peso molecular real.

m/z: relación masa-carga del péptido.

z: carga del péptido.

Peptide sequence: secuencia aminoacídica con la que se encontró similitud en la base de datos.

Score: score de la similitud.

Best NCBI match: mejor resultado de similitud encontrado en la base de datos.

Protein family: familia proteica a la que pertenece la proteína.

Anexo IV

Tabla de relación entre las abreviaturas de las familias proteicas y sus nombres.

Abreviatura	Familia proteica
3FTx	Three finger toxin
LAAO	L-aminoacid oxidase
EN	Endonucleasa
NT	Nucleotidasa
PIII-SVMP	Metaloproteinasas del grupo PIII
CRISP	Cysteine-rich secretory protein
PLA ₂	Fosfolipasa tipo A ₂
vNGF	Venom nerve growth factor
KUN	Kunitz-type serine protease
TNRF	Tumor necrosis factor
ACHE	Acetilcolinesterasa
CVF	Cobra venom factor
PDE	Fosfodiesterasa
O/V	Ohanin/Vesprin
CTL	C-type lectin-like protein
ALB	Albúmina
HD	Hialuronidasa
DC	Dominio DC (PIII)
ni	No identificada