

Educación Continua

Implementación de un Laboratorio de Análisis Proteómicos en el Instituto Clodomiro Picado (UCR): primeras experiencias en Costa Rica.

Bruno Lomonte¹ y Julián Fernández^{1,2}

1. Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

2. Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Padova, Italia

Correo electrónico: bruno.lomonte@ucr.ac.cr, jfu273@gmail.com

Introducción

Los crecientes avances en la comprensión de principios científicos fundamentales sobre la constitución de la materia han abierto el camino para el desarrollo de poderosas herramientas tecnológicas que benefician innumerables actividades humanas. Un ejemplo de ellas es la **espectrometría de masas** (abreviada en inglés como **MS**, *mass spectrometry*), una tecnología que en muy corto tiempo introdujo una verdadera revolución en el abordaje del análisis de péptidos y proteínas, entre muchas otras moléculas de interés biomédico. La relevancia de estas moléculas primordiales para la vida va ligada a su propio nombre, derivado del griego *proteios* (primero, principal), propuesto por el químico sueco Berzelius en 1838. Gracias al formidable desarrollo de las técnicas de MS, la capacidad de análisis de proteínas dio un salto exponencial, tanto en términos de velocidad como de volumen de trabajo, dando origen a la disciplina actualmente conocida como **proteómica**. El impacto causado por los métodos de ionización usados en estos análisis de proteínas y otras biomoléculas por medio de la MS, fue reconocido en el año 2002 con el otorgamiento del Premio Nobel de Química a John B. Fenn (EUA) y a Koichi Tanaka (Japón). El objetivo de esta revisión es describir muy brevemente algunos principios

generales en los cuales se basan los análisis proteómicos, y a la vez, divulgar sobre la disponibilidad de dichas técnicas en el Instituto Clodomiro Picado (ICP) de la Universidad de Costa Rica.

¿Qué es la proteómica?

En su definición más sencilla, la proteómica se puede describir como el análisis de la composición proteica global de un determinado material biológico, ya sea un fluido, una célula, un tejido, un organismo, etc. El conjunto total de las proteínas que componen tal material se denomina su proteoma.⁽¹⁾ El abordaje convencional, basado en las técnicas tradicionales de química de proteínas, enfoca el aislamiento y la caracterización de las proteínas individuales que forman parte de una muestra particular. En contraste, el abordaje proteómico plantea, ambiciosamente, el análisis integral del conjunto de componentes proteicos a través de la aplicación de una serie de herramientas analíticas de alto desempeño, fundamentalmente basadas en la MS. Cabe destacar que los volúmenes de información que se generan en esta clase de análisis hacen indispensable su integración con modernas herramientas de la bioinformática.

Espectrometría de masas (MS) y su aplicación en el análisis de proteínas

La MS es una técnica para la determinación de la masa molecular de un determinado compuesto, péptidos o proteínas en el caso de la presente revisión. Para poder analizar dicha masa, los instrumentos requieren que los compuestos se encuentren ionizados, con el fin de realizar una medición de su relación masa/carga (m/z). Esto equivale a decir que una molécula que no posea carga, no puede ser "vista" por los espectrómetros de masas. A lo largo de su desarrollo tecnológico, han surgido diversas estrategias metodológicas para lograr una adecuada ionización de biomoléculas, en este caso proteínas y péptidos, y en la actualidad predominan fundamentalmente dos: la ionización mediante electrospray (también traducida como electronebulización) y la ionización mediante láser asistida por matriz. Ambas son consideradas como técnicas "suaves" de ionización.

Ionización de la muestra

La estrategia abreviada como ESI (*electrospray ionization*) se basa en la utilización de una muestra en solución que fluye a través de un orificio capilar, de modo tal que genere un spray o aerosol. A la vez que esto sucede, se aplica a la muestra un alto voltaje, que imparte cargas eléctricas a las minúsculas gotitas que contienen las moléculas proteicas de la muestra. Estas gotitas experimentan la evaporación del solvente, disminuyendo rápidamente su tamaño, lo que ocasiona que las moléculas cargadas lleguen a acercarse cada vez más entre sí, a tal punto que la gota se seca y "explota", liberando moléculas proteicas ionizadas (Fig.1A). En tal estado, dichos iones van a ser atraídos hacia el orificio de ingreso del espectrómetro de masas, el cual, como se mencionó, determinará su relación m/z . Esta técnica se caracteriza por generar iones multicargados, es decir, series de una misma molécula que han adquirido un número variable de cargas (+1, +2, +3, +4, etc.). Cabe aclarar que los péptidos y proteínas se analizan comúnmente operando los instrumentos en "modo positivo", es decir, analizando aquellos iones que han capturado uno o más protones.

Otra importante estrategia para generar iones se conoce con la abreviatura MALDI (*matrix-assisted laser desorption-ionization*; traducible como "ionización y desorción por láser asistida por matriz"). En esta forma

de ionización, las moléculas de interés se mezclan con una solución de un reactivo que va a actuar como matriz. La mezcla posteriormente se coloca en forma de una minúscula gota (0,5-1 μ l) sobre la superficie de una placa de acero perfectamente plana y se deja evaporar su solvente. De este modo, se forman pequeños cristales secos constituidos fundamentalmente por matriz, en donde una pequeña cantidad de las proteínas o péptidos se encuentran entremezclados. Posteriormente, la placa metálica con las muestras se introduce en el espectrómetro y se dispara un haz de luz láser sobre dichos cristales, en una serie de pulsos muy breves y repetitivos, con el fin de que la energía de dichos rayos sea absorbida principalmente por la matriz, y transferida colateralmente a las moléculas proteicas para que ionicen (Fig.1B). La ionización MALDI se caracteriza por su "suavidad", que genera iones monocargados (+1) en su gran mayoría. Además de causar la ionización, la energía del láser hace que se desprendan los iones de la superficie de la placa (por ello el nombre de la técnica incluye la palabra "desorción"). Dichos iones se liberan y pasan a ser analizados para determinar su relación m/z .

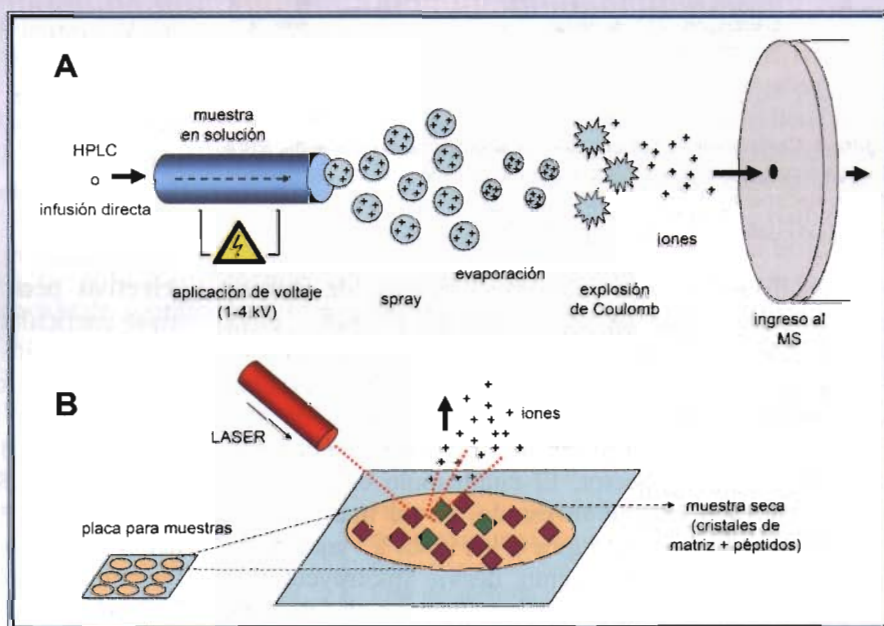


Figura 1. Métodos de ionización más utilizados para la espectrometría de masas de péptidos y proteínas. (A) ionización por electrospray (ESI). La muestra se encuentra en solución y puede provenir de un cromatógrafo (conectado en línea) o aplicarse mediante infusión directa. Al pasar por un capilar, se aplica un voltaje para cargar las gotitas del spray, las cuales se evaporan gradualmente hasta que la proximidad de las cargas ocasiona una "explosión de Coulomb", liberando iones que ingresan al espectrómetro de masas (MS). (B) ionización-desorción por láser asistida por matriz (MALDI). La muestra se mezcla con una solución de matriz y se aplica sobre una placa metálica para que co-cristalice al evaporarse el solvente. Los cristales se irradian con pulsos láser, que generan y liberan los iones para ser analizados por MS.

Instrumentación básica

Los espectrómetros de masas son instrumentos muy variados, que evolucionan muy rápidamente y se van perfeccionando para alcanzar una sensibilidad, velocidad, resolución y exactitud cada vez más impresionantes. En consecuencia, existe el riesgo de que los equipos se tornen obsoletos en plazos relativamente cortos, en comparación con otros instrumentos de laboratorio. En esencia, todo espectrómetro de masas posee tres componentes principales: una fuente de ionización, un analizador de masas, y un detector, este último acoplado a sistemas de amplificación de la señal e interfaz gráfica con el usuario (Fig.2). Los diversos tipos de fuentes de ionización, como los arriba mencionados y otros, pueden combinarse con distintos analizadores de masas, dando lugar a una amplia variedad de instrumentos. Entre los analizadores más utilizados se encuentran los basados en cuadrupolos (Q) y los basados en “tiempo de vuelo” (TOF, *time-of-flight*).

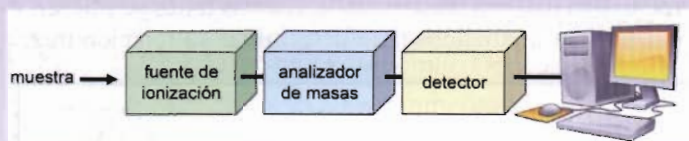


Figura 2. Componentes básicos de un espectrómetro de masas. Para el trabajo con péptidos y proteínas, las fuentes de ionización usuales utilizan electrospray (ESI) o MALDI. Los analizadores de masas pueden ser de tipo cuadrupolo o de tiempo de vuelo (TOF).

Los cuadrupolos son arreglos lineales de barras magnetizadas, usualmente cuatro en paralelo, cuya polaridad e intensidad del campo electromagnético es oscilante y controlable. Los iones generados por la fuente son atraídos a un cuadrupolo, en condiciones de alto vacío, y viajan a lo largo de una trayectoria helicoidal, hasta llegar a un detector. El cuadrupolo es capaz de variar muy rápidamente su estado, de tal manera, que en determinado momento guíe a los iones a viajar hacia el detector, o en otro momento, desvíe sus trayectorias hacia los costados (impidiéndoles alcanzar al detector), según la programación que indique el operador. De esta manera, un cuadrupolo es capaz de realizar un rápido “barrido” en todo un rango de valores m/z , que permite precisamente determinar dicha relación m/z de los iones presentes en una muestra. Además, es posible acoplar varios cuadrupolos en serie (tándem), con el fin de realizar análisis de fragmentación de las moléculas de interés, como se describe más adelante.

Otro tipo de analizadores de masas se basan en hacer “volar” a los iones a lo largo de un tubo al vacío, hasta llegar a un detector, midiendo el tiempo en que los iones alcanzan a éste (TOF). Los iones de menor masa llegarán primero que aquellos más pesados y, con base en este

principio, el instrumento es capaz de inferir la masa (o realmente la relación m/z) de los iones presentes en una muestra.

En síntesis, los espectrómetros pueden basarse en distintas combinaciones de fuentes de ionización y de analizadores de masas, dando lugar, por ejemplo, a instrumentos tipo ESI-cuadrupolo, ESI-TOF, MALDI-cuadrupolo, MALDI-TOF, etc. Otro grupo de componentes muy importantes de estos instrumentos son las denominadas “trampas de iones”, ya sea lineales u orbitales, cuya característica de capturar y acumular las pequeñas cantidades de iones de una muestra y liberarlas de manera controlada por el operador, ha permitido elevar los niveles de sensibilidad, desempeño, y capacidad de análisis en la MS.

Espectrometría de masas en tándem (MS/MS): el poder analítico de la fragmentación

La capacidad de determinar con alta exactitud la masa de una molécula desconocida es de gran utilidad para su identificación. Sin embargo, este único dato *per se* no garantiza la identificación, dado que obviamente pueden existir moléculas diferentes que tengan una masa idéntica, o sumamente cercana entre sí. Uno de los desarrollos más importantes dentro de la MS es el uso de analizadores de masas acoplados en tándem, es decir, colocados secuencialmente. La tarea del primer analizador es determinar las masas de los iones presentes en una muestra. Posterior al primer analizador, un filtro selectivo permite pasar solamente los iones de una masa particular - definida por el usuario - a un segundo compartimento denominado “celda de colisión” (Fig.3). En este segundo compartimento la molécula de interés se hace colisionar con un gas inerte (por ejemplo nitrógeno, o incluso aire) para que se rompan diversos enlaces covalentes y se generen fragmentos más pequeños. La molécula seleccionada para su fragmentación se denomina “ión precursor” o “ión padre”, mientras los fragmentos que genera son llamados “productos” o “iones hijos”. Este proceso de fragmentación se denomina “disociación inducida por colisión” (CID, *collision-induced dissociation*), y es el elemento clave que permite alcanzar identificaciones cada vez más certeras de un analito particular, aún dentro de una mezcla compleja de moléculas. En el caso de los péptidos, la fragmentación y posterior determinación de las masas de los fragmentos en un segundo analizador (sea un cuadrupolo o un TOF) constituye la piedra angular de la “revolución proteómica”, ya que permite deducir secuencias de aminoácidos en tiempos impresionantemente cortos. Para darse una idea, un secuenciador convencional de péptidos/proteínas basado en la degradación química de Edman, utiliza ciclos de reacción y análisis que tardan

alrededor de 40-50 minutos cada uno. Esto implica que la secuenciación tradicional de un péptido de 12 aminoácidos, por ejemplo, va a tardar como mínimo de 8 a 10 horas. En comparación, la secuencia del mismo péptido puede ser obtenida mediante MS en tándem (también abreviada como MS/MS) en apenas unos minutos.

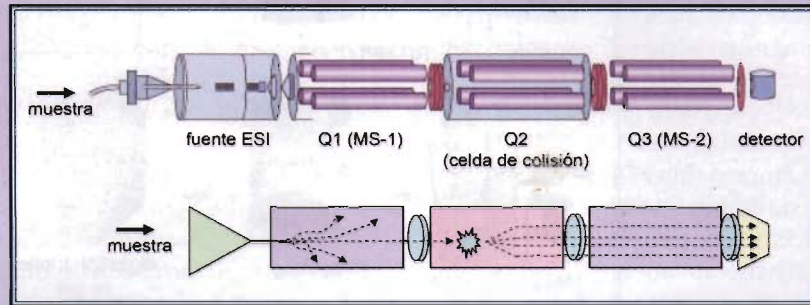


Figura 3. Análisis de fragmentación mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Arriba se esquematiza un instrumento ESI de triple cuadrupolo, y abajo se muestra el principio analítico. El primer cuadrupolo (Q1) realiza un barrido para determinar las masas de los iones presentes en la muestra (MS-1), de los cuales se puede seleccionar uno en particular (ion precursor o padre) para que pase a la celda de colisión, en Q2. Allí el ion sufre la fragmentación, y los iones hijos o productos pasan a ser analizados por el tercer cuadrupolo, Q3.

Interpretación de espectros de fragmentación

La colección de fragmentos que genera un péptido cuando se somete a CID, genera un espectro que permite la reconstrucción de su secuencia de aminoácidos, con base en los valores conocidos de sus masas y aplicando un conjunto de reglas relativamente sencillas para la interpretación, que escapan a los objetivos de esta revisión. El éxito de dicha reconstrucción de la secuencia radica en la obtención de un buen espectro de fragmentación, es decir, que genere una colección completa de iones que representen la ruptura de cada uno de los enlaces peptídicos de la molécula (ver un ejemplo en la Fig.4). Para ello, los espectrómetros pueden regular la energía de las colisiones entre el analito de interés y las moléculas de gas, y así obtener los fragmentos deseados (los iones resultantes más útiles son llamados serie “y” y serie “b”). La interpretación de los espectros de fragmentación de péptidos se puede realizar en forma manual, semi-manual (asistida por software), o completamente automatizada, en este último caso utilizando algoritmos de búsqueda en bases de datos de proteínas mediante software especializado. Uno de los motores de búsqueda más importantes para la identificación de péptidos basada en espectros de fragmentación MS/MS en la web es MASCOT (<http://www.matrixscience.com>), que posee una versión de uso gratuito y otra, más amplia, que se accesa a través del pago de una suscripción. Además, las distintas empresas que comercializan instrumentos de MS ofrecen sus propios softwares, adaptados a las características propias de sus instrumentos, y que se alimentan con bases de datos de dominio público de secuencias de proteínas, tales como UniProt/SwissProt u otras.

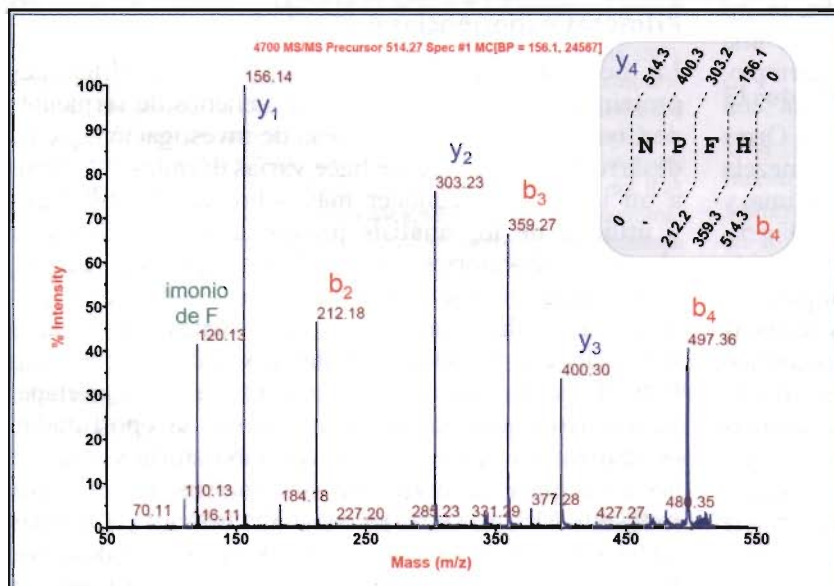


Figura 4. Espectro de fragmentación MALDI-TOF-TOF de un ion peptídico monocargado, $m/z = 514,3+1$, cuya secuencia puede ser deducida de *novo* como “NPFH”. Este tetrapéptido pertenece a la región C-terminal de una disintegrina presente en el veneno de la serpiente cascabel de Costa Rica, *Crotalus simus*.

A pesar de todas sus ventajas, la secuenciación de péptidos mediante MS/MS también posee una serie de limitaciones importantes. Algunas de las más conocidas son la imposibilidad para distinguir entre los aminoácidos leucina (Leu) e isoleucina (Ile), ya que poseen masas idénticas. Similarmente, dependiendo de la resolución de cada espectrómetro particular, es difícil la distinción entre lisina (Lys) y glutamina (Gln), debido a que la diferencia

de sus masas (monoisotópicas) es de apenas 0,04 daltons. Sumado a esto, ciertas combinaciones de aminoácidos pequeños suman masas que coinciden con las de algunos aminoácidos más grandes, lo que implica tomar una serie de precauciones a la hora de interpretar espectros de fragmentación y deducir de *novο* una secuencia particular de aminoácidos. Aún más, los aminoácidos pueden presentar una serie de complejas modificaciones post-traduccionales que deben considerarse en la interpretación. No obstante, las ventajas que ofrece la MS para el análisis e identificación de péptidos y proteínas son sobresalientes, y han convertido a esta tecnología en una de las herramientas más poderosas para el estudio de sistemas biológicos.

Estrategias de análisis para la identificación de proteínas

Debido a que la deducción de secuencias de aminoácidos mediante MS/MS es aplicable al análisis de péptidos pequeños, generalmente no mayores a los 3.000-3.500 daltons, las estrategias utilizadas en proteómica para identificar las distintas proteínas de una muestra involucran generalmente una etapa de digestión enzimática que sea capaz de generar fragmentos peptídicos de tamaños apropiados para su análisis. Para ello se utilizan diversas enzimas proteolíticas cuyas preferencias de sitios de hidrólisis sean conocidas. La enzima de mayor utilización es la tripsina bovina, cuya especificidad proteolítica es hacia enlaces peptídicos que se encuentren en el lado C-terminal de los aminoácidos básicos lisina y arginina. Algunos protocolos de análisis se basan en la digestión de toda una mezcla de proteínas con una enzima, para su posterior separación (por ejemplo, mediante cromatografía HPLC acoplada en línea con el espectrómetro de masas) e identificación. Otras estrategias se basan en la separación inicial de la mezcla de proteínas, previa a su digestión con una enzima y subsiguiente identificación en el espectrómetro (Fig.5). Las estrategias de análisis dependerán en buena medida de la plataforma instrumental disponible y de la complejidad inicial de la muestra, entre otros factores. Las técnicas de separación más utilizadas en el trabajo proteómico son la cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC; *high-performance liquid chromatography*) en columnas de fase reversa o de intercambiadores catiónicos fuertes, y las técnicas electroforéticas en geles de poliacrilamida, particularmente la electroforesis bidimensional, basada en la separación por isoelectroenfoque, seguido de SDS-PAGE.

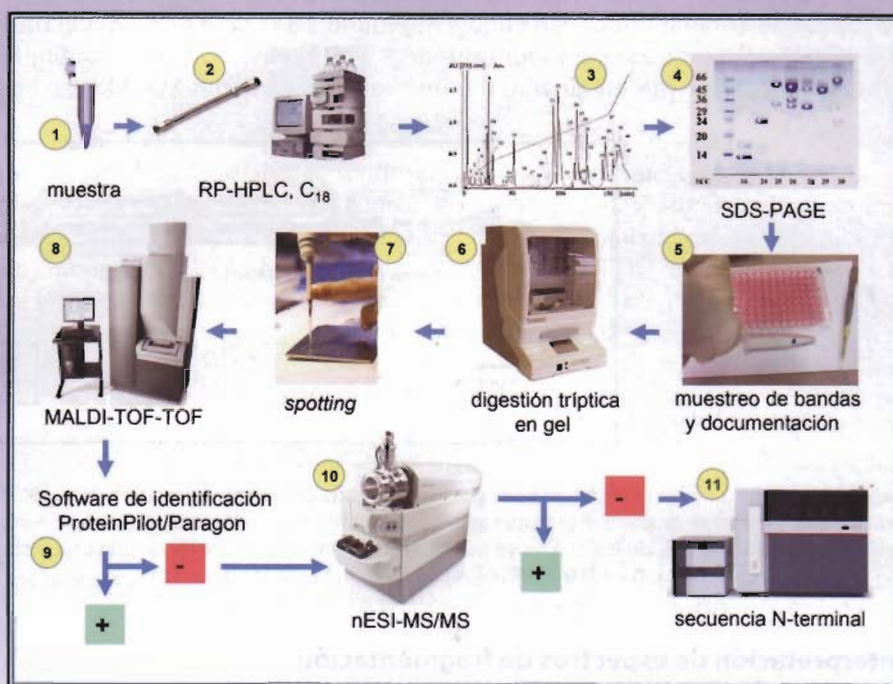


Figura 5. Estrategia de análisis proteómico de venenos de serpiente desarrollada por Calvete y colaboradores ⁽²⁻⁵⁾ y adaptada a las condiciones de instrumentación del ICP-UCR. La muestra es separada primeramente mediante HPLC en fase reversa ⁽¹⁻³⁾, y seguidamente cada fracción es separada mediante SDS-PAGE ⁽⁴⁾. Una pequeña porción de gel de cada banda proteica ⁽⁵⁾ se somete a digestión con tripsina ⁽⁶⁾ para generar péptidos, los cuales se analizan mediante MALDI-TOF-TOF ⁽⁷⁻⁸⁾. Los resultados se procesan mediante el algoritmo Paragon® del programa ProteinPilot® ⁽⁹⁾ para obtener identificaciones, y las muestras negativas se someten a un análisis manual mediante nano-ESI-MS/MS ⁽¹⁰⁾ para completar sus identificaciones. La secuenciación N-terminal ⁽¹¹⁾ se utiliza para aquellas muestras intactas que aún han permanecido negativas en su identificación por ambos procesos de MS, o para complementar la información, según las circunstancias particulares.

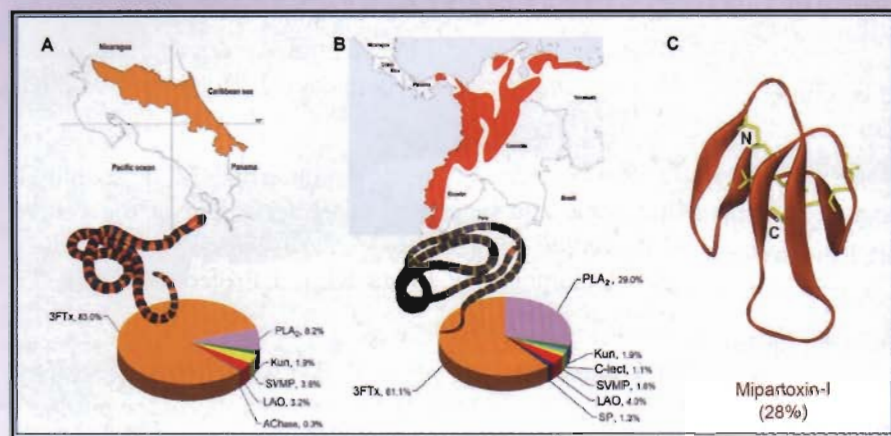
Primeras experiencias en Costa Rica

La necesidad de analizar y caracterizar diferentes proteínas tóxicas presentes en los venenos de serpientes de Costa Rica, uno de los temas de investigación que ha desarrollado el ICP desde hace varias décadas, ⁽⁶⁻⁸⁾ llevó a un interés por conocer más sobre las posibilidades y utilidad de los análisis proteómicos, y a contactar algunos laboratorios consolidados en este campo. Entre estos, se pudo establecer una colaboración con el Instituto de Biomedicina de Valencia, España, a través del coordinador del Laboratorio de Proteómica Estructural, Dr. Juan José Calvete. En una primera etapa, varios investigadores del ICP tuvimos la oportunidad de realizar intercambios en dicho laboratorio y conocer los principios generales de los análisis proteómicos mediante MS, a la vez que se analizaron los proteomas de los venenos de varias especies de serpientes de Costa Rica, entre ellos, las “mano de piedra”, *Atropoides*

nummifer y *Atropoides picadoi* ⁽⁹⁾, las serpientes arborícolas “lora” *Bothriechis lateralis*, y “bocaracá” *Bothriechis schlegelii* ⁽¹⁰⁾, la cascabel muda *Lachesis stenophrys*, ⁽¹¹⁾ y la especie de mayor importancia médica en nuestro país, la “terciopelo” *Bothrops asper* ⁽¹²⁾. Posteriormente, y gracias a una valiosa donación para equipamiento otorgada por la Vicerrectoría de Investigación (UCR) y CONARE, se obtuvo un núcleo de instrumentación básica para implementar un laboratorio dedicado al análisis de proteínas. Este núcleo de equipo (Fig.5) incluye un espectrómetro de masas tipo ESI/triple cuadrupolo, un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF, un secuenciador Edman, dos cromatógrafos HPLC y uno FPLC, un digestor automatizado de proteínas en gel, y una centrífuga para secado en vacío. Este equipo se sumó a algunas otros instrumentos básicos de laboratorio

descifrar un proteoma completo en el nuevo laboratorio. Es así como se logró el análisis de dos venenos más, que representan los primeros proteomas realizados localmente: el de la serpiente arborícola *Bothriechis nigroviridis* ⁽¹³⁾ y el de la serpiente coral *Micrurus nigrocinctus*. ⁽¹⁴⁾

En una segunda etapa de este proyecto, se implementó un sistema para poner a disposición de la comunidad de investigadores del país las técnicas de análisis proteómicos, a modo de un servicio abierto. A través de este proyecto de servicios se ha iniciado la expansión hacia el análisis de proteínas de muy diversa índole, aparte de los venenos de serpiente, tales como proteínas bacterianas, de artrópodos, del plasma humano, o de la matriz extracelular de tejidos animales, por ejemplo. Paralelamente, se ha continuado el trabajo con venenos para definir los proteomas de todas las especies de serpientes de Costa Rica, ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ meta que está muy próxima a cumplirse, y que ahora ubica a estas interesantes muestras biológicas en las listas de los venenos mayormente caracterizados en cuanto a su composición, a nivel internacional. Interesantemente, también el laboratorio ha atraído la atención de algunos investigadores de otros países para realizar análisis proteómicos de sus venenos, por ejemplo de Colombia ^(15,18) (Fig.6), México, Papua Nueva Guinea ⁽¹⁹⁾ y Brasil.



que se habían obtenido algunos años atrás, a través de una generosa donación de la Embajada de Japón.

Figura 6. Comparación de la composición proteómica de los venenos de las serpientes *Micrurus mipartitus* de Costa Rica (A) y Colombia (B). Los venenos están compuestos mayoritariamente por toxinas “de tres dedos” (3FTx) y fosfolipasas A2 (PLA2), junto con componentes menos abundantes que incluyen metaloproteinasas (SVMP), L-aminoácido-oxidasas (LAO), inhibidor tipo-Kunitz (Kun), serina proteinasas (SP), lectinas tipo-C (C-lect) y acetilcolinesterasas (AChase). La neurotoxina principal del veneno de Colombia (mipartoxin-I) constituye un 28% del total de proteínas, y posee una potencia letal de 0,06 mg/g de peso corporal en ratones. Su secuencia completa de aminoácidos (60 residuos) fue determinada en el Laboratorio de Análisis Proteómicos del ICP, mediante una combinación de degradación de Edman y espectrometría de masas en tándem, y su estructura tridimensional fue modelada como se muestra en (C).

El laboratorio fue oficialmente inaugurado en abril del 2010, en concordancia con la celebración del cuadragésimo aniversario de la fundación del ICP (13 de abril de 1970). Una primera etapa se centró en la capacitación sobre la instrumentación, métodos de análisis e interpretación (en estrecha colaboración con el laboratorio del Dr. Calvete y su grupo de investigación), así como en adquirir las experiencias iniciales para

Un objetivo de la presente revisión es divulgar sobre estas nuevas posibilidades analíticas existentes en el país para la caracterización de proteínas. La información sobre los servicios disponibles puede consultarse a través de la página web del ICP (<http://icp.ucr.ac.cr>; ver “Productos y servicios”).

El reto de la sostenibilidad

Una de las mayores dificultades que enfrenta en nuestro país un proyecto como el aquí descrito, es su sostenibilidad. El alto costo de la instrumentación y su mantenimiento preventivo y correctivo, así como el grado de especialización del personal capacitado para realizar dichos mantenimientos, plantean nuevos retos, tanto administrativos como financieros. El tema de los altos costos de operación se ha abordado a través del establecimiento de tarifas congruentes y a la vez razonables para los análisis, que son competitivas en relación con las establecidas en laboratorios de servicios en países desarrollados. En nuestra opinión, la iniciativa someramente descrita aquí, constituye un paso importante para el crecimiento de la capacidad investigativa del país

en el ámbito de las disciplinas médicas y biológicas, y de este modo contribuir a la reducción de la brecha con respecto a los países de mayor desarrollo científico.

Referencias

1. Wilkins MR, Appel RD. Ten years of the proteome. En: Proteome Research: Concepts, Technology and Application (Wilkins MR, Appel RD, Williams KL, Hochstrasser DF, Eds.), Springer, Berlin, 2007. pp.1-13.
2. Calvete JJ, Juárez P, Sanz L. Snake venomomics: strategies and applications. *J Mass Spectrometry* 2007; 42: 1405-1414.
3. Calvete JJ. Venomomics: digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology. *J Proteomics* 2009; 72: 121-126.
4. Calvete JJ, Sanz L, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM. Venom, venomomics, antivenomics. *FEBS Lett* 2009; 583: 1736-1743.
5. Calvete JJ. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert Reviews in Proteomics* 2011; 8: 739-758.
6. Gutiérrez JM. Los orígenes del Instituto Clodomiro Picado. San José, Master Print, 2010; 60 pp.
7. Lomonte B. Investigación científica y tecnológica en el Instituto Clodomiro Picado: una perspectiva bibliométrica de cuatro décadas (1970-2010) *Interciencia* 2012; (en prensa).
8. Lomonte B. Venenos de serpiente: de la investigación al tratamiento. *Acta Médica Costarricense* 2012; 54: 86-96.
9. Angulo Y, Escolano J, Lomonte B, Gutiérrez JM, Sanz L, Calvete JJ. Snake venomomics of Central American pitvipers. Clues for rationalizing the distinct envenomation profiles of *Atropoides nummifer* and *Atropoides picadoi*. *J Proteome Res* 2008; 7: 708-719.
10. Lomonte B, Escolano J, Fernández J, Sanz L, Angulo Y, Gutiérrez JM, Calvete JJ. Snake venomomics and antivenomics of the arboreal neotropical pitvipers *Bothriechis lateralis* and *Bothriechis schlegelii*. *J Proteome Res* 2008; 7: 2445-2457.
11. Sanz L, Escolano J, Ferretti M, Biscoglio MJ, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM, Calvete JJ. Snake venomomics of the South and Central American bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. *J Proteomics* 2008; 71: 46-60.
12. Alape-Girón A, Sanz L, Escolano J, Flores-Díaz M, Madrigal M, Sasa M, Calvete JJ. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*. Geographic, individual and ontogenetic variations. *J Proteome Res* 2008; 7: 3556-3571.
13. Fernández J, Lomonte B, Sanz L, Angulo Y, Gutiérrez JM, Calvete JJ. Snake venomomics of *Bothriechis nigroviridis* reveals extreme variability among palm viper venoms: different evolutionary solutions for the same trophic purpose. *J Proteome Res* 2010; 9: 4234-4241.
14. Fernández J, Alape-Girón A, Angulo Y, Sanz L, Gutiérrez JM, Calvete JJ, Lomonte B. Venomic and antivenomic analyses of the Central American coral snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae). *J Proteome Res* 2011; 10: 1816-1827.
15. Rey-Suárez P, Núñez V, Gutiérrez JM, Lomonte B. Proteomic and biological characterization of the venom of the redtail coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. *J Proteomics* 2011; 75: 655-667.
16. Lomonte B, Rey-Suárez P, Tsai WC, Angulo Y, Sasa M, Gutiérrez JM, Calvete JJ. Snake venomomics of the pitvipers *Porthidium nasutum*, *Porthidium ophryomegas*, and *Cerrophidion godmani* from Costa Rica: toxicological and taxonomical insights. *J Proteomics* 2012; 75: 1675-1689.
17. Lomonte B, Tsai WC, Bonilla F, Solórzano A, Solano G, Angulo Y, Gutiérrez JM, Calvete JJ. Snake venomomics and toxicological profiling of the arboreal pitviper *Bothriechis supraciliaris* from Costa Rica. *Toxicon* 2012; 59: 592-599.
18. Rey-Suárez P, Stuaní-Floriano R, Rostelato-Ferreira S, Saldarriaga M, Núñez V, Rodrigues-Simioni L, Lomonte B. Mipartoxin-I, a novel three-finger toxin, is the major neurotoxic component in the venom of the redtail coral snake *Micrurus mipartitus* (Elapidae). *Toxicon* 2012; (en prensa).
19. Herrera M, Fernández J, Vargas M, Villalta M, Segura Á, León G, Angulo Y, Paiva O, Matainaho T, Jensen SD, Winkel KD, Calvete JJ, Williams DJ, Gutiérrez JM. 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. *J Proteomics*. 2012; 75:2128-2140. 4