

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA, FUNCIONAL E INMUNONEUTRALIZACIÓN  
DEL VENENO DE LA SERPIENTE *PORTHIDIUM PORRASI* DE COSTA RICA

Tesis sometida a consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado de  
Microbiología para optar al grado académico y título de Maestría Académica en  
Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología

REBECA MÉNDEZ ARGÜELLO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2019

## Dedicatoria

A mi mamá, que siempre ha sido y seguirá siendo mi apoyo incondicional en las buenas y en las no tan buenas. Me conoce mejor que yo misma y sabe escoger las palabras correctas para motivarme a superar cualquier miedo o inseguridad.

A papi, un ejemplo inigualable de determinación y disciplina, me ha enseñado el valor del trabajo, a identificar prioridades y a luchar por ellas.

A mi esposito. Nunca se conforma con nada a medias y me motiva a esforzarme aún cuando creo que ya no es posible. No todas tenemos a alguien junto a nosotras que nos hace crecer en todos los ámbitos posibles y que además le parece lógico.

A mis dos valientes. Las dueñas de esas sonrisas que pueden borrar cualquier dolor o amargura. Las que me cambian el día con su creatividad, su amor y hasta sus lágrimas. Dios las bendiga y les permita entender siempre lo valiosas que son.

Y a mis herman@s y sobrin@s: Ah pedazos!!!!!!!!!!!! Gracias por confiar en mí y por estar ahí cuando he necesitado que alguien me de un consejo, me escuche o solo que me abrace.

## Agradecimientos

Agradezco profundamente al Dr. Bruno Lomonte, por ser mucho más que un tutor; su acompañamiento, sus explicaciones, su paciencia y la tranquilidad que transmite fueron esenciales para que pudiera cumplir con esta meta

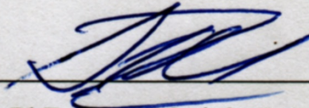
Al Dr. Mahmood Sasa por creer en mí y ayudarme a encontrar la forma de completar el reto personal de terminar la maestría.

Al Dr. Julián Fernández por su apoyo y observaciones acertadas en el desarrollo del proyecto, además del buen ánimo y positivismo que comparte en el laboratorio.

Muy especialmente al MSc. Fabián Bonilla por todo el apoyo emocional y logístico, por su acompañamiento, por la ayuda con la búsqueda y análisis de información, por aclararme las dudas y principalmente por su iniciativa en buscar la forma de ayudarme a completar esta tesis.

Finalmente, a todo el personal del Instituto Clodomiro Picado, por todas las facilidades brindadas en el proceso de investigación.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado y título de Maestría Académica en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología

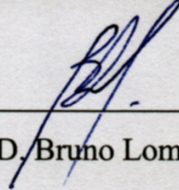


---

PhD. Steve Quirós Barrantes

**Representante del Decano**

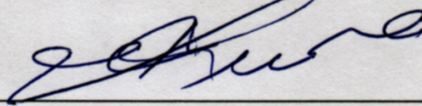
**Sistema de Estudios de Posgrado**



---

PhD. Bruno Lomonte Vigliotti

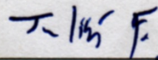
**Director de Tesis**



---

PhD. Mahmood Sasa Marín

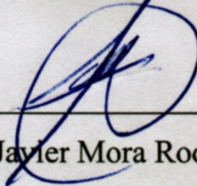
**Asesor**



---

PhD. Julián Fernández Ulate

**Asesor**

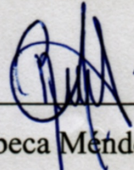


---

PhD. Javier Mora Rodríguez

**Representantes del Director**

**Programa de Posgrado en Microbiología**



---

Rebeca Méndez Argüello

**Candidata**

## Tabla de contenidos

Portada .....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos .....	iii
Hoja de aprobación .....	iv
Tabla de contenidos .....	v
Lista de Tablas.....	vii
Lista de figuras.....	viii
Lista de Abreviaturas .....	x
RESUMEN .....	xii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
<b>1.1 El accidente ofídico. Situación mundial .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 La situación del ofidismo en Costa Rica .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Familia Viperidae y el grupo <i>Porthidium</i>.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Antivenenos.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5 Venenos y estrategias para su análisis.....</b>	<b>14</b>
2 JUSTIFICACIÓN .....	18
3 HIPÓTESIS .....	18
4 OBJETIVOS .....	19
<b>4.1 Objetivo general .....</b>	<b>19</b>
<b>4.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>19</b>
5 ESTRATEGIA METODOLÓGICA.....	20
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
<b>6.1 Veneno .....</b>	<b>20</b>
<b>6.2 Animales.....</b>	<b>21</b>
<b>6.3 HPLC de fase reversa (RP-HPLC).....</b>	<b>21</b>
<b>6.4 Caracterización de las fracciones obtenidas por RP-HPLC .....</b>	<b>21</b>

<b>6.5</b>	<b>Pruebas <i>in vitro</i></b> .....	<b>22</b>
<b>6.6</b>	<b>Pruebas <i>in vivo</i></b> .....	<b>24</b>
<b>6.7</b>	<b>Análisis estadístico</b> .....	<b>26</b>
<b>7</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>27</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>44</b>
	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>45</b>

## Lista de Tablas

Tabla 1: Resumen de la identificación por MS/MS de las bandas obtenidas mediante SDS-PAGE de los picos cromatográficos de RP-HPLC del veneno de <i>Porthidium porrasi</i> .....	30
---	----

## Lista de figuras

Figura 1. Estimaciones del número de envenenamientos por mordedura de serpientes a nivel global en 2007.....	1
Figura 2. Pastores de ganado que trabajan descalzos, y por tanto son vulnerables a las mordeduras de serpientes.....	2
Figura 3. Distribución geográfica de la incidencia de mordeduras por serpientes en Costa Rica.....	5
Figura 4. <i>Porthidium porrasi</i> , mostrando el detalle del hocico elevado o "hognose" y Distribución geográfica de <i>P. porrasi</i> en Costa Rica.....	8
Figura 5. Distribución geográfica de la especie <i>Porthidium nasutum</i> en Costa Rica e Individuo de <i>P. nasutum</i> .....	9
Figura 6. A. Distribución geográfica de la especie <i>Porthidium ophryomegas</i> en Costa Rica e Individuo de <i>P. ophryomegas</i> .....	10
Figura 7. A. Distribución geográfica de la especie <i>Porthidium volcanicum</i> en Costa Rica e Individuo de <i>P. volcanicum</i> .....	11
Figura 8. A. Distribución geográfica de la especie <i>Porthidium porrasi</i> en Costa Rica e Individuo de <i>P. porrasi</i> .....	13
Figura 9. Separación de las proteínas del veneno de <i>Porthidium porrasi</i> mediante RP-HPLC, seguido de SDS-PAGE.....	28
Figura 10. Composición del veneno de <i>Porthidium porrasi</i> según familias de proteínas....	35
Figura 11. Actividad fosfolipasa A <sub>2</sub> del veneno de <i>Porthidium porrasi</i> sobre el sustrato ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzoico.....	36
Figura 12. (A) Actividad proteolítica del veneno de <i>Porthidium porrasi</i> sobre el sustrato de azocaseína. (B) Efecto del EDTA (quelante de cationes) sobre la actividad proteolítica del veneno de <i>P. porrasi</i> .....	37



Figura 12. (A) Actividad hemorrágica del veneno de <i>Porthidium porrasi</i> . (B) Actividad miotóxica del veneno de <i>P. porrasi</i> (C) Micrografía ( $\times 200$ ) de una sección del músculo esquelético después de la inyección de veneno de <i>P. porrasi</i> . .....	39
Figura 13. Evolución de la actividad inductora de edema del veneno de <i>Porthidium porrasi</i> en ratones. ....	40
Figura 14. Inmunoreconocimiento del veneno de <i>Porthidium porrasi</i> por el antiveneno polivalente equino ICP.....	41

## Lista de Abreviaturas

3FTx	Toxinas de tres dedos
4-NOBA	Ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzoico
ACN	Acetonitrilo
CICUA	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
CK	Creatina Kinasa
CRiSP	Proteínas secretoras ricas en cisteína
CTL	Lectinas tipo C
DIS	Disintegrinas
ED <sub>50</sub>	Dosis eficaz media
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FALC	Fosfatasa alcalina
GBD	Global Burden of Disease
ICP	Instituto Clodomiro Picado
KAZ	Proteínas tipo Kazal
KUN	Péptidos tipo-Kunitz
LAAO	L-aminoacido oxidasas
LD <sub>50</sub>	Dosis letal media
MALDI-TOF/TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz ( en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) acoplada a detector de iones por tiempo de vuelo (time of flight)
MP	Metaloproteinasas
MS	Espectrometría de masas
NGF	Factor de crecimiento de nervios
NP	Péptidos natriuréticos
NUCL	5'-Nucleotidasas
PDE	Fosfodiesterasas
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasas A <sub>2</sub>
PLB	Fosfolipasas B

RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SP	Serina proteasas
SVMP	Metaloproteinasas dependientes de zinc (en inglés snake venom metalloproteinases)
TCA	ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoroacético
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
W.H.O.	Organización Mundial de la Salud

## RESUMEN

Con el fin de generar conocimiento de base sobre los venenos de las serpientes que habitan Costa Rica, en este proyecto se realizó la caracterización proteómica, funcional e inmunoneutralización del veneno de la serpiente *Porthidium porrasi*, una especie de reciente descripción. Dicho conocimiento permite ampliar la comprensión sobre la composición de su veneno, así como las correlaciones entre composición, actividades tóxicas y propiedades inmunológicas. A su vez, esta información es de interés para la optimización de los antivenenos producidos actualmente. El abordaje metodológico para realizar esta caracterización integral del veneno se basó en una plataforma de análisis proteómico previamente desarrollada, que se ha utilizado en el estudio de una amplia variedad de venenos de serpiente en el país.

Las proteínas más abundantes del veneno fueron identificadas como metaloproteinasas (36.5%), seguidas por las proteínas que pertenecen a la familia de las disintegrinas (19,5%), fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)(10,7%), serina proteinasas (7,4%), lectinas tipo C (6,9%), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (2,1%), proteínas secretoras ricas en cisteína (1,2%), L-aminoácido oxidasas (1,1%), fosfolipasas B (PLB) (1,1%) y fosfodiesterasas (PDE) (0,6%).

El veneno de *P. porrasi* mostró una potencia letal relativamente débil en ratones (LD<sub>50</sub>=10 µg/g de peso corporal por vía intraperitoneal). Además, indujo una hemorragia y edema marcados y un débil efecto miotóxico. Estas actividades *in vivo*, así como las analizadas *in vitro* (actividades proteolítica y fosfolipasa A<sub>2</sub>) se correlacionaron con los datos de composición.

Dado que los venenos de algunas otras especies del género *Porthidium* se han caracterizado en trabajos anteriores, como es el caso de *P. nasutum* y *P. ophryomegas* de Costa Rica y *P. lansbergii lansbergii* de Colombia, se realizó además una comparación de sus composiciones proteicas con la del veneno de *P. porrasi*, encontrando que en general tienen una alta semejanza: la comparación de los cuatro venenos refleja conservación de las distribuciones de las familias de proteínas, con pequeñas variaciones. Los cuatro venenos están dominados por metaloproteinasas, disintegrinas y PLA<sub>2</sub>s, aunque se observaron variaciones en la presencia/ausencia de algunos de los componentes menos abundantes como las proteínas de la familia de VEGF, PLB, PDE y nucleotidasa, entre las cuatro especies.

Finalmente, se encontró que el efecto letal del veneno de *P. porrasi* en ratones fue neutralizado adecuadamente por el antiveneno polivalente producido en el Instituto Clodomiro Picado, respaldando así su uso en el tratamiento de eventuales envenenamientos por parte de esta especie.



**Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.**

Yo, Rebeca Méndez Argüello, con cédula de identidad 205660661,

en mi condición de autor del TFG titulado \_\_\_\_\_

CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA, FUNCIONAL E INMUNONEUTRALIZACIÓN DEL VENENO

DE LA SERPIENTE *PORTHIDIUM PORRASI* DE COSTA RICA

SI  NO  autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado.

Esta Trabajo Final de Graduación será publicada en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Garantizo que este Trabajo Final de Graduación es el original que sirvió para la obtención de mi título, y que no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El mismo cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y se cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

**INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:**

Nombre Completo: Rebeca Méndez Argüello

Número de Carné: A46161 Número de cédula: 205660661

Correo Electrónico: rebema23@gmail.com

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): PhD. Bruno Lomonte Vigliotti

Fecha: 25 setiembre 2019

**FIRMA:**

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 El accidente ofídico. Situación mundial

El envenenamiento por mordedura de serpiente es un problema de salud pública importante, no obstante el escaso conocimiento sobre su incidencia exacta a nivel global. Se han realizado varios estudios para estimar la magnitud de este problema, pero considerando que los envenenamientos ocurren mayoritariamente en países de regiones tropicales en donde los registros de hospitales y centros de salud no son idóneos, y además que no todas las víctimas asisten a los servicios hospitalarios, especialmente en las zonas rurales más empobrecidas del mundo, los datos deben ser considerados con cautela. En el año 2008 se publicó un meta-análisis de la literatura disponible a nivel global sobre los accidentes por mordeduras de serpientes y se estimó que cada año, alrededor del mundo, habría no menos de 421.000 envenenamientos y 20.000 muertes como consecuencia (Kasturiratne *et al.*, 2008).

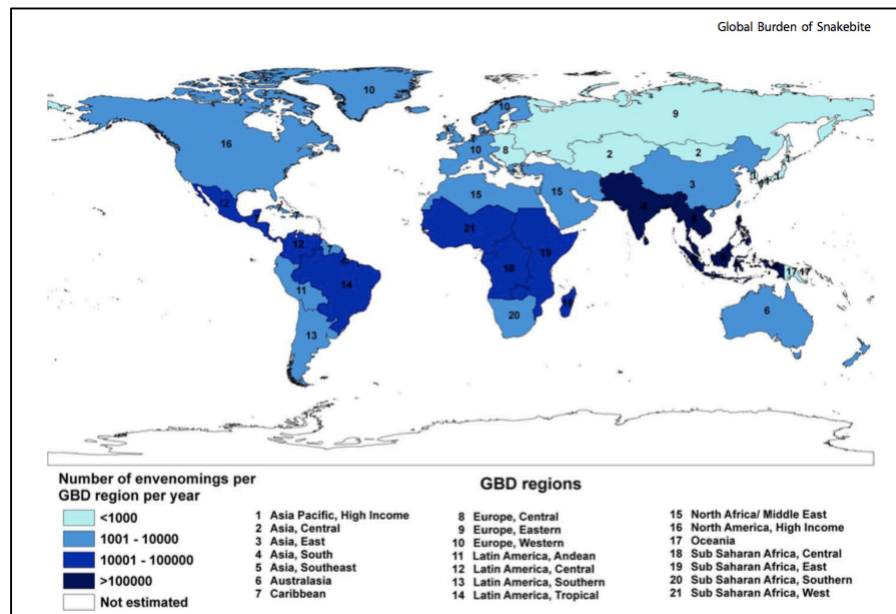


Figura 1. Estimaciones del número de envenenamientos por mordedura de serpientes a nivel global en 2007. Las regiones en color más oscuro representan la mayor incidencia de envenenamientos. GBD se refiere a "Global Burden of Disease" de regiones establecidas en 2005 y que fueron utilizadas en el estudio de

Kasturiratne *et al.*, 2008.

La Organización Mundial de la Salud (W.H.O.) ha clasificado el accidente ofídico como un problema de salud pública desatendido, que afecta principalmente a trabajadores agrícolas y a sus familias, en comunidades rurales, políticamente poco empoderadas y con bajos ingresos económicos, en países tropicales en vías de desarrollo del Sur y Sureste de Asia (con 231.000 envenenamientos), de África Sub-sahariana (90.000) y de América del Sur y Central (71.000) (Kasturiratne *et al.*, 2008; W.H.O., 2007).

Entre las principales problemáticas que hacen sensibles a las comunidades más afectadas por este flagelo están: (a) la condición de pobreza en que viven las personas, con casas de piso de tierra, en las que duermen sin ninguna protección ante las serpientes que buscan calor y refugio; (b) las inadecuadas condiciones de trabajo, sin equipos de protección, y sin condiciones de transporte para acceder rápidamente a una atención médica adecuada en caso de un envenenamiento; (c) la inapropiada atención en los centros médicos por la falta de conocimientos del personal; y (d) la escasez y los elevados costos de los antivenenos, con precios que pueden alcanzar los 400-700 dólares, lo que los hace inaccesibles para la población (Harrison & Gutiérrez, 2016; Silva, 2013 , Kasturiratne *et al.*, 2008).



Figura 2. Pastores de ganado que trabajan descalzos, y por tanto son vulnerables a las mordeduras de serpientes. Tomado de <https://www.who.int/snakebites/epidemiology/en/>

La atención médica apropiada no solo es importante en el momento inmediato del accidente, sino también por las secuelas a largo plazo que el envenenamiento puede generar. Dichas secuelas pueden dejar a las personas con serias discapacidades físicas y psicológicas permanentes e incapacidad para trabajar, lo que a su vez empeora la condición de pobreza del individuo, su familia y su comunidad (Harrison & Gutiérrez, 2016). De hecho, la incidencia de estas secuelas es prácticamente desconocida, dado que los sobrevivientes dejan el hospital y no se les da seguimiento alguno (Gutiérrez, 2014).

Entre las secuelas permanentes de los envenenamientos se incluyen los efectos de la necrosis local (que podría requerir la amputación de dedos o extremidades), contracturas, daño a los tendones, artrodesis y úlceras con infecciones crónicas y osteomielitis que pueden causar una transformación maligna (carcinoma de células escamosas). También se puede producir insuficiencia renal crónica, insuficiencia hipofisaria crónica suprarrenal y secuelas neurológicas de accidentes cerebrovasculares hemorrágicos (W.H.O., 2007).

Los antivenenos juegan un papel esencial en el tratamiento de los pacientes que sufren un envenenamiento ofídico. Una tendencia actual que se ha propuesto para contrarrestar este problema es la generación de nuevos antídotos, optimizados mediante el diseño de mezclas de inmunización mejoradas, que lleven a que los antivenenos resultantes sean eficaces contra la mayoría de venenos de las especies de serpientes médicamente relevantes dentro del rango geográfico donde se pretende utilizarlos (Calvete, 2014).

## **1.2 La situación del ofidismo en Costa Rica**

Costa Rica es un país que destaca a nivel mundial por su gran diversidad biológica. Parte de esta diversidad incluye a las serpientes venenosas, animales que a pesar de sus importantes funciones dentro de los ecosistemas han sido sumamente estereotipados debido a los graves efectos que inducen en las personas que sufren de una mordedura. Afortunadamente, en nuestro país las serpientes han sido ampliamente estudiadas, e



igualmente se ha reconocido la importancia de su estudio como tema de salud humana y animal, situación que no ocurre en toda América Latina, ni mucho menos a nivel mundial.

Existen estudios acerca de la incidencia del envenenamiento por mordeduras de serpientes y de las muertes como consecuencias de ellas, en los que se ha consultado la información registrada por los centros médicos de Costa Rica desde 1953. Sin embargo, aunque dichos centros se consideran de buen nivel (Hansson *et al.*, 2013), sus registros anteriores a 1980 son muy fragmentarios debido a que las personas afectadas no siempre acudían a estos para ser atendidos (Rojas *et al.*, 1997). Diversos estudios han mostrado que Puntarenas y Limón son las provincias en las que se reporta un mayor número de casos, principalmente en trabajadores agrícolas jóvenes (Rojas *et al.*, 1997; Fernández & Gutiérrez, 2008; Chippaux, 2017). Los datos epidemiológicos más recientes abarcan el período 2005-2012, reportándose una incidencia anual promedio cercana a 700 accidentes por serpientes (15 por 100.000 habitantes) y cerca de 7 muertes (0,15 por 100.000 habitantes). El número anual de mordeduras fluctuó entre 500 y 1.000 durante dicho período, sin ningún patrón aparente, aunque la mayoría de casos se presentó durante la estación lluviosa (mayo a noviembre) (Chippaux, 2017).

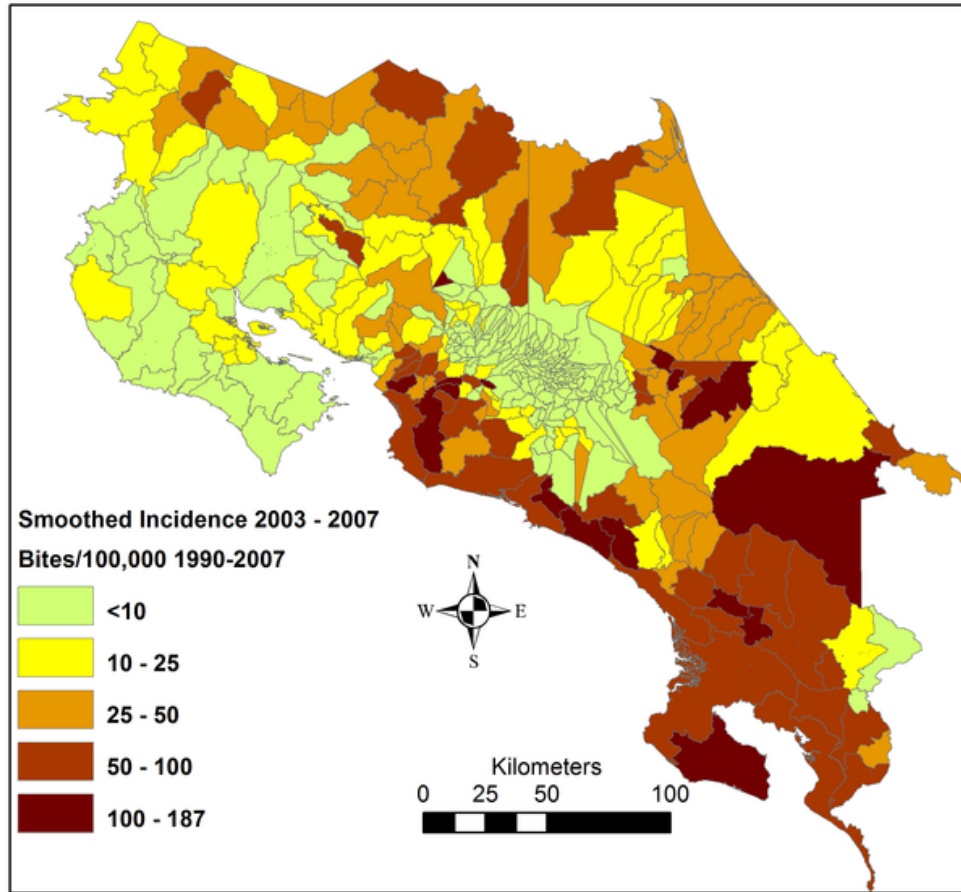


Figura 3. Distribución geográfica de la incidencia de mordeduras por serpientes en Costa Rica. Tomado de Hansson *et al.*, 2013. <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002009>

En Costa Rica, solo tres familias de serpientes incluyen especies venenosas que pueden afectar potencialmente a los seres humanos: la familia Colubridae, cuyas serpientes poseen glándulas especializadas (glándulas de Duvernoy) capaces de producir secreciones tóxicas con diferentes niveles de toxicidad que se manifiestan con edema, dolor, inflamación, entumecimiento muscular y efectos hemorrágicos. Debido a que estas serpientes poseen colmillos posteriores (opistoglifas), y a que sus venenos generalmente poseen una toxicidad relativamente baja, los colúbridos solo ocasionalmente causan cuadros clínicos graves (Hess & Squaiella-Baptistão, 2012). Sin embargo, las especies de las otras dos familias, Elapidae y Viperidae son capaces de producir envenenamientos más graves. Los elápidos poseen venenos esencialmente neurotóxicos, que interrumpen la transmisión neuromuscular ya sea a nivel pre-sináptico (afectando la liberación de acetilcolina), o a nivel post-sináptico

(bloqueando los receptores de este neurotransmisor en los músculos). Por otra parte, los vipéridos poseen venenos edematizantes, necrosantes y hemorrágicos que generan daño tisular muy severo en el sitio de la mordedura, así como importantes alteraciones sistémicas a nivel renal, cardiovascular, y de la hemostasia (Gutiérrez *et al.*, 2011). Dentro de esta familia destaca la especie responsable del mayor número de accidentes en Costa Rica, *Bothrops asper*, conocida como terciopelo (Hansson *et al.*, 2013).

### **1.3 Familia Viperidae y el grupo *Porthidium***

Los envenenamientos por serpientes generan emergencias médicas con patologías que involucran diferentes órganos y tejidos, dependiendo de las especies responsables. Los casos más graves resultan de la mordedura por especies de las familias Viperidae y Elapidae (W.H.O., 2007). En Costa Rica existen 17 especies de vipéridos (familia Viperidae, subfamilia Crotalinae), 5 especies de corales (familia Elapidae, subfamilia Elapinae) y 1 serpiente marina (familia Elapidae, subfamilia Hydrophiinae) (Sasa *et al.*, 2010).

Las serpientes de la familia Viperidae son consideradas depredadores muy eficientes, debido a su aparato inoculador de veneno y a las modificaciones que tienen en sus cráneos, que les permiten capturar, matar y engullir presas grandes. Las serpientes de esta familia se caracterizan por tener un hueso cuadrado, capaz de rotar, que sostiene dos tomas de colmillos y a la vez dos colmillos huecos y elongados. Cuando la boca de la serpiente está cerrada, los colmillos se mantienen doblados contra el cielo de esta; pero cuando la serpiente lanza una mordedura, los colmillos giran de 90 a 100° hacia delante, pudiendo clavarse en la presa e inyectar el veneno. Aunque este sistema evolucionó para la depredación, también puede ser usado para la defensa, y en todo caso hace que estos animales sean extremadamente peligrosos, capaces de causar serias patologías, e incluso la muerte, en humanos (Savage, 2002).

La mayoría de víboras tienen un cuerpo corto y fornido que les permite ingerir presas proporcionalmente grandes. Su cabeza es ancha y con forma de flecha, bastante distinta al cuello. La mayoría de especies son de tamaño pequeño a moderado, aunque algunas como las matabuey (*Lachesis* spp.) pueden alcanzar hasta 3,5 m de longitud. Muchas especies

poseen hábitos terrestres, aunque algunas son semiacuáticas y existe un número considerable de vipéridos arborícolas con colas prensiles (Savage, 2002).

Como se mencionó, los venenos de las serpientes de la familia Viperidae producen inflamación local, con aumento de la permeabilidad vascular y hemorragia, así como necrosis del tejido muscular y dermis, debido a la acción de diversas toxinas. Además, a nivel sistémico pueden inducir coagulopatía, disfunción plaquetaria y hemorragias espontáneas como efecto del daño microvascular, que sumados a la posibilidad de choque cardiovascular y fallo renal, se convierten en las causas potenciales de muerte (W.H.O., 2007).

Dentro de la familia Viperidae, el grupo conocido como Porthidium comprende tres géneros: *Atropoides*, *Cerrophidion* y *Porthidium*, que se originaron y evolucionaron en Mesoamérica (Lamar & Sasa, 2003). El género *Porthidium* incluye 9 especies de hábitos terrestres que en su mayoría miden menos de 1 m de longitud, muestran patrones de colores crípticos y un *canthus rostralis* afilado que es más alto que ancho. Su hocico es generalmente atenuado y se puede elevar moderada o grandemente. Popularmente se conoce a estas serpientes como 'víboras nariz de cerdo', o '*hognose vipers*' en la literatura en inglés (Fig. 4A). Son moderadamente fornidas y habitan bosques secos o de transición (Lamar & Sasa, 2003) de México, Centroamérica y el norte de Suramérica (Fig. 4B)

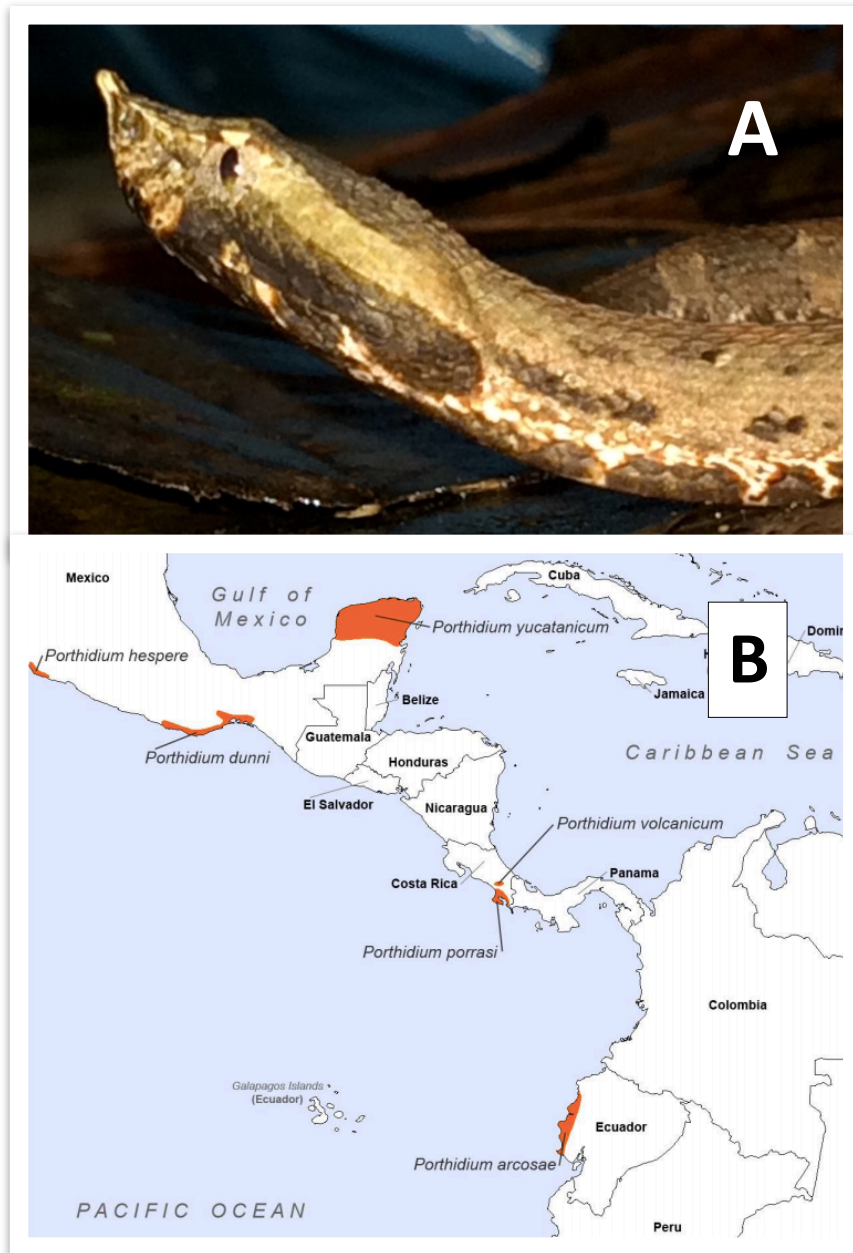
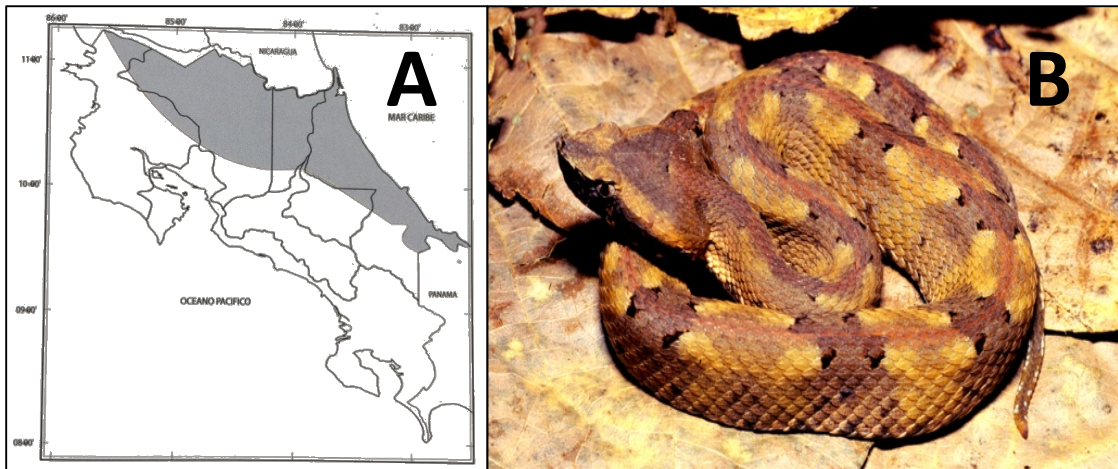


Figura 4. A. *Porthidium porراس*, mostrando el detalle del hocico elevado o "hog nose" (Foto cortesía de Alejandro Solórzano). B. Distribución geográfica de algunas especies de *Porthidium*, generada por la OMS en el 2008, basada en la información disponible. (Tomado de [http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/Images/SnakesDistribution/Large/map\\_Porthidium\\_spp.pdf](http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/Images/SnakesDistribution/Large/map_Porthidium_spp.pdf)).

En Costa Rica habitan 4 especies de este género: *Porthidium nasutum*, *P. ophryomegas*, *P. volcanicum* y la recientemente descrita *P. porrasi* (Lamar & Sasa, 2003).

*Porthidium nasutum* o 'tamagá común' es una serpiente con una longitud promedio de 50 cm en adultos. Las hembras son más largas y robustas que los machos. La cabeza es grande, ancha y bien definida. El hocico es puntiagudo y la cola corta. La escama rostral, en la punta del hocico, es notablemente alta, lo que le confiere un aspecto de cuerno o proboscis. Esta es la característica diagnóstica de la especie en Costa Rica. Las escamas dorsales son quilladas y el color de fondo muy variable: desde gris, rojizo hasta café oscuro y casi negro. Esta es la característica diagnóstica de la especie en Costa Rica. Las escamas dorsales son quilladas y el color de fondo muy variable: desde gris, rojizo hasta café oscuro y casi negro. Presenta, además, una serie de marcas rectangulares oscuras a lo largo del cuerpo, separadas por una línea vertebral angosta. Presenta 8-11 supralabiales, 9-13 infralabiales, 4-7 interoculares, 22-25 hileras de escamas dorsales a la mitad del cuerpo, 128-144 ventrales, escama anal entera y 23-41 subcaudales enteras. La tamagá es una especie terrestre común en la hojarasca del bosque, donde es activa tanto de día como de noche. Caza principalmente ranas y lagartijas de hojarasca. Se expande desde México hasta el noroeste de Ecuador. En Costa Rica se le encuentra en bosques lluviosos tropicales y subtropicales de la vertiente Caribe, desde el nivel del mar a los 1 500 m de elevación (Solórzano, 2004).

Figura 5. A. Distribución geográfica de la especie *Porthidium nasutum* en Costa Rica (Tomado de Solórzano,



2004). B. Individuo de *P. nasutum* donde se observa las características de escama rostral elevada, marcas rectangulares oscuras y la línea vertebral angosta (Tomada de: <http://www.icp.ucr.ac.cr/es/informacion-y-materiales/serpientes-venenosas-de-costa-rica/porthidium-nasutum>)

*Porthidium ophryomegas* o 'toboba chinga' es más bien de tamaño pequeño a mediano, con una longitud máxima de 80 cm. Su cuerpo es relativamente delgado, con cabeza bien diferenciada, y en contraste con las demás *Porthidium* en el país, tiene el hocico aplastado y la cola corta. Las escamas dorsales están quilladas y presentan un color de fondo café o gris claro con un patrón de 21 a 24 diseños casi negros a los lados de una línea vertebral angosta más clara. Esta especie presenta 8-11 supralabiales, 9-13 infralabiales, 4-7 interoculares, 23-28 hileras de escamas dorsales a la mitad del cuerpo, 157-176 ventrales, escama anal entera y 23-42 subcaudales enteras. Es una especie relativamente común, que se encuentra en llanuras de bosque seco y en ambientes marginales de bosques caducifolios: vegetación costera, bosques primarios y secundarios, áreas perturbadas y zonas rocosas en el Pacífico. Se distribuye desde Guatemala hasta Costa Rica, donde se le encuentra en el bosque seco tropical del Pacífico noroeste y en sectores húmedos de transición en las estribaciones de las cordilleras de Tilarán y Guanacaste, desde el nivel del mar hasta 1000 m de elevación (Solórzano, 2004).

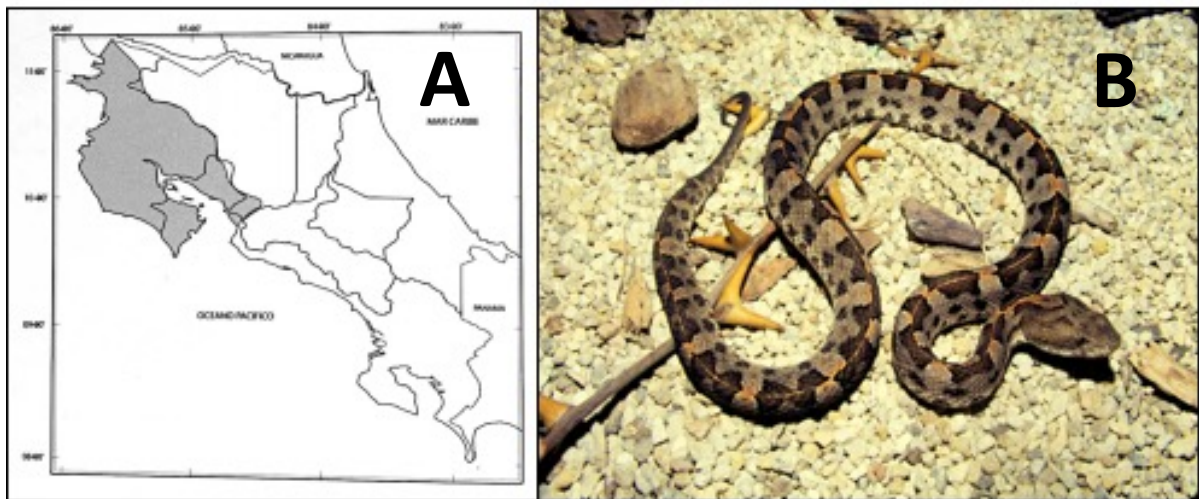


Figura 6. A. Distribución geográfica de la especie *Porthidium ophryomegas* en Costa Rica (Tomado de Solórzano, 2004). B. Individuo de *P. ophryomegas* donde se observa el patrón de 21 a 24 diseños casi negros a los lados de una línea vertebral angosta más clara (Tomada de: <http://www.icp.ucr.ac.cr/es/informacion-y-materiales/serpientes-venenosas-de-costa-rica/porthidium-ophryomegas>)

La *Porthidium volcanicum* o 'toboba costarricense' es también una serpiente pequeña con una longitud máxima conocida de 60 cm. Su cuerpo es delgado a medianamente robusto, con la cabeza grande y ancha, bien diferenciada del cuello. Presenta un par de escamas internasales alargadas y la escama rostral tiene una discreta elevación. El dorso de la cabeza combina colores claros y oscuros y se observan claramente dos franjas blancas que cubren desde la escama rostral hasta la región postocular. Su color dorsal es café grisáceo a café oscuro con un patrón de 43 a 50 diseños de forma cuadrangular o rectangular a ambos lados de la franja vertebral. Presenta 9-11 supralabiales, 11-13 infralabiales, 6-8 interoculares, 25-27 hileras de escamas dorsales a la mitad del cuerpo, 156-165 ventrales, escama anal entera y 25-35 subcaudales enteras. Es una especie terrestre y de actividad aparentemente nocturna. Sus hábitos de alimentación, en su mayoría, se desconocen. Probablemente consume roedores, lagartijas y ranas al igual que las demás especies del género. Su reproducción es vivípara y su abundancia es poco común. Es una especie endémica de Costa Rica, que parece tener una distribución restringida, ya que solo se conoce de elevaciones bajas (400 - 600 m) del bosque lluvioso tropical en los sectores de Ujarrás y volcán de Buenos Aires (Valle del General), en el suroeste de la provincia de Puntarenas(Solórzano, 2004).

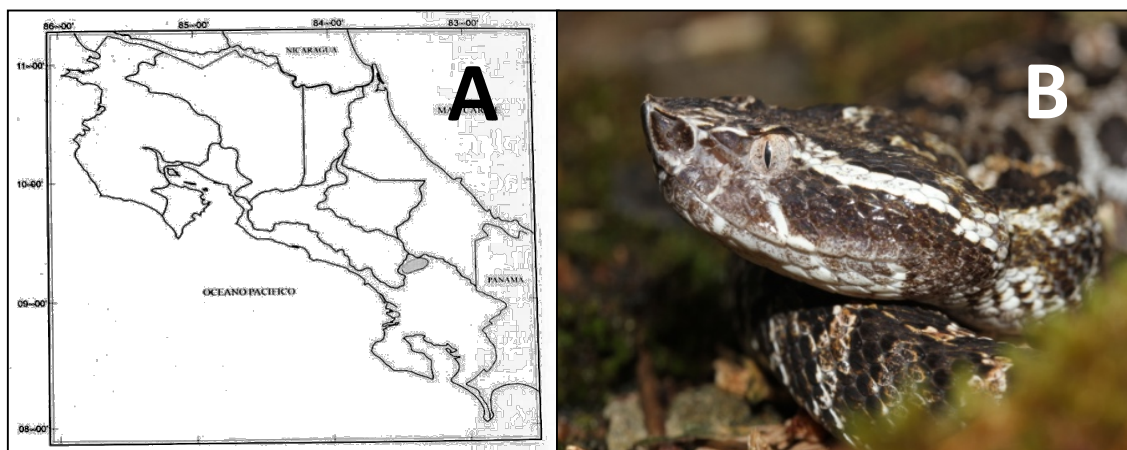


Figura 7. A. Distribución geográfica de la especie *Porthidium volcanicum* en Costa Rica (Tomado de Solórzano, 2004). B. Individuo de *P. volcanicum* donde se observa el dorso de la cabeza que combina colores claros y oscuros y las dos franjas blancas que cubren desde la escama rostral hasta la región postocular (Tomada de: <http://www.icp.ucr.ac.cr/es/informacion-y-materiales/serpientes-venenosas-de-costa-rica/porthidium->



volcanicum )

*Porthidium porrasi*, también conocida como 'tamagá de cola blanca', es una serpiente de menos de 1 metro de longitud, que se caracteriza por un patrón de bandas, persistencia del color pálido de la cola de los juveniles en adultos (Fig.8B), y un alto número de escamas dorsales. Esta especie se distribuye en las tierras bajas del bosque húmedo del Pacífico, al suroeste de Costa Rica, incluyendo la Península de Osa y las tierras circundantes al Golfo Dulce (Fig.8A). Se encuentra a menos de 1.000 m sobre el nivel del mar (Lamar & Sasa, 2003).

Cuando se encuentra una serpiente de esta especie en Costa Rica, se distingue de las otras *Porthidium* del país porque no es simpátrica con ninguna de ellas, pero además se diferencia de *P. ophryomegas* por la presencia de solamente una escama cantal por lado, de *P. volcanicum* por su hocico elevado, patrón de bandas, punta de la cola de color blanco y un número de ventrales más bajo ( menos de 155) y de *P. nasutum* porque posee de 25 a 27 filas de escamas dorsales (versus 23), la punta de la cola blanca en adultos y un patrón de bandas en lugar de manchas yuxtapuestas (Lamar & Sasa, 2003).

Al ser *P. porrasi* una especie de serpiente descrita hace poco, su veneno no ha sido estudiado, y no forma parte de las mezclas utilizadas en la inmunización de caballos para la elaboración de antivenenos. Por esto se hace necesario su estudio composicional, de toxicidad, y de inmunoneutralización. Es relevante determinar si el veneno de *P. porrasi* es neutralizado por el antiveneno polivalente producido en Costa Rica, con el fin de poder tratar adecuadamente a eventuales pacientes afectados por esta especie. Igualmente la determinación de la composición del veneno puede ser usada como una herramienta más para aclarar la filogenia del grupo *Porthidium* que ha sufrido mucha variación y aún no está resuelta claramente, de hecho antes de su descripción en el 2003 (Lamar & Sasa) a *P.porrasi* se le consideraba como *P. nasutum* pues poseen características morfológicas similares, sin embargo en estudios moleculares más recientes se le relacionó con el grupo de especies sudamericanas que incluyen a *P. lansbergii*, *P. arcose* y *P. nasutum* Ecuatoriana (Castoe et al 2005).

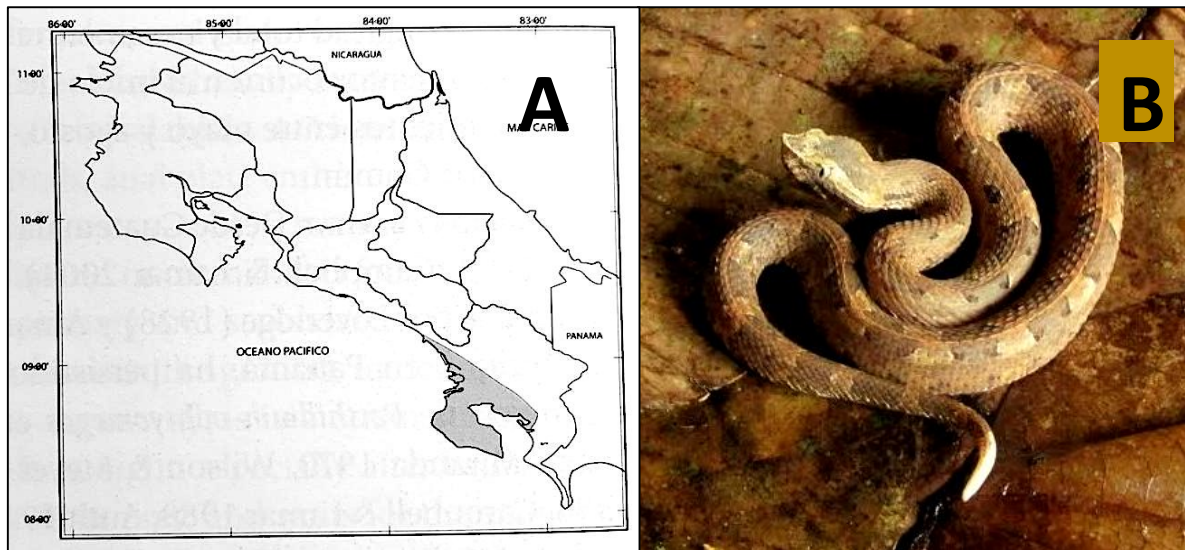


Figura 8. A. Distribución geográfica de la especie *Porthidium porrasi* en Costa Rica (Tomado de Solórzano, 2004). B. Individuo de *P. porrasi* donde se observa la permanencia del color blanco en la cola (Cortesía de Alejandro Solórzano)

#### 1.4 Antivenenos

Los sueros antiofídicos o antivenenos son el único tratamiento que hasta hoy ha probado ser eficaz para tratar el envenenamiento por mordedura de serpiente. Sin embargo debe recalarse que estos antídotos son escasos o aún inexistentes en los centros de salud de muchas de las poblaciones más pobres y susceptibles de países tropicales y subtropicales. Una de las razones por las cuales los antivenenos son escasos es la falta de incentivos comerciales, lo que ha forzado a los fabricantes a dejar ciertos mercados o a bajar la producción y subir el precio, llevando a una disminución en la disponibilidad y accesibilidad para las personas pobres y con mayor riesgo. Otro factor por el cual los antivenenos son escasos es porque algunos laboratorios productores de instituciones públicas han sufrido la falta de inversión y renovación de sus plataformas tecnológicas, junto con un entrenamiento deficiente de su personal, afectando así la calidad y cantidad de antiveneno disponible (Calvete *et al.*, 2014).

Para aliviar la escasez de antivenenos una estrategia clave es optimizar el uso de los antivenenos actuales y generar nuevos antivenenos poliespecíficos con amplio espectro de cobertura. Para este fin, la información que proveen las técnicas de venómica y antivenómica es de gran utilidad para evaluar nuevas preparaciones de antivenenos y predecir la neutralización paraespecífica al nivel de toxinas particulares de cada especie (Calvete *et al.*, 2014).

Para optimizar el uso de los antivenenos actuales es importante comprobar su calidad y eficacia ante los diferentes venenos de serpientes. Para este fin, existen herramientas bioquímicas e inmunológicas que permiten su evaluación preclínica. Entre estas pruebas, la neutralización de la letalidad en modelos murinos es el principal estándar. En esta prueba se establece una "dosis de reto" de 3 a 5 dosis letales medias ( $LD_{50}$ ) del veneno, que se mezcla con distintas diluciones del antiveneno, se incuban (usualmente por 30 min a  $37^{\circ}C$ ) y se inyectan por la vía intraperitoneal o intravenosa en ratones de un peso definido; después de un tiempo determinado (24 a 48 h) se determina el número de muertes ocurridas y se calcula la dosis eficaz media ( $ED_{50}$ ), que es la relación antiveneno/veneno en la cual 50% de los animales inyectados sobreviven. Además de esta evaluación primordial, se puede realizar pruebas de neutralización de actividades específicas de los venenos, tales como la hemorrágica, miotóxica, dermonecrótica, coagulante, desfibrinogenante, y otras, para obtener una caracterización más comprensiva de la capacidad de un determinado antiveneno, y respaldar su utilización con base en evidencia preclínica (Calvete, 2014, Gutiérrez *et al.*, 2017).

## **1.5 Venenos y estrategias para su análisis**

El desarrollo de las técnicas venómicas y antivenómicas, en los años recientes, ha expandido dramáticamente el conocimiento acerca de la composición de los venenos de las serpientes, gracias al creciente desarrollo de técnicas analíticas rápidas y sensibles para la separación de proteínas y su análisis (Calvete *et al.*, 2009). De manera general, las técnicas de análisis proteómico aplicadas al estudio de los venenos de serpiente, han permitido avanzar en tres principales aspectos del conocimiento sobre estas secreciones tóxicas:

a) la composición proteica general, determinada a través de diferentes estrategias, entre las cuales se encuentra la denominada "snake venomics" o "venómica". En esta se genera un perfil proteico global de los venenos utilizando una combinación de dos técnicas de separación, RP-HPLC y SDS-PAGE, seguida de identificación por espectrometría de masas (MS), permitiendo principalmente catalogar la composición a nivel de familias proteicas y, además, estimar la abundancia relativa de cada componente.

b) la "antivenómica", en la cual los análisis proteómicos se combinan con técnicas inmunológicas que permiten generar un perfil del inmunoreconocimiento de los antígenos del veneno por parte de un antiveneno. Por ejemplo, es posible determinar cuáles proteínas de un veneno se reconocen fuertemente, pobremente, o no se reconocen, por los anticuerpos presentes en el antiveneno. La información generada puede correlacionarse e integrarse con pruebas funcionales de neutralización de actividades específicas de los venenos, obteniéndose un panorama general de sus propiedades inmunológicas.

c) la "toxicovenómica", que basándose en el perfil proteico generado por RP-HPLC de un veneno, se enfoca en identificar las actividades tóxicas de sus principales componentes. Este aspecto agrega información de valor biológico y médico a los análisis venómicos. Se ha propuesto que la combinación de estas distintas estrategias provee una visión o conocimiento más integral de un veneno y su antiveneno (Lomonte & Calvete, 2017).

Alrededor del mundo se han estudiado a nivel proteómico los venenos de no menos de 127 especies de serpientes entre elápidos (42 especies) y vipéridos (85 especies), y estos números continúan creciendo. Basados en la abundancia composicional y en su ubicuidad, las proteínas identificadas en los venenos de las serpientes, en estudios realizados en los últimos 10 años, se han clasificado en 59 familias de proteínas, las cuales a su vez se han agrupado en categorías que incluyen (Tasoulis & Isbister, 2017):

- Cuatro familias dominantes; las fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), las metaloproteinasas (MP), las serina proteasas (SP) y las toxinas de tres dedos (3FTx).

- Seis familias secundarias que incluyen: proteínas secretoras ricas en cisteína (CRiSP), L-aminoacido oxidasas (LAAO), péptidos tipo-Kunitz (KUN), lectinas tipo C (CTL), disintegrinas (DIS), y péptidos natriuréticos (NP).
- Nueve familias menores
- Treinta y seis familias de proteínas raras (poco frecuentes)
- Cuatro familias de proteínas únicas para ciertos géneros individuales

En general se conoce que los venenos de vipéridos están compuestos mayormente de fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s), metaloproteinasas dependientes de zinc (MPs) y serina proteasas (SPs). Además usualmente poseen L-aminoacido oxidasas (LAAOs), aunque en menor proporción que las anteriores, y también representantes de otras familias de proteínas en cantidades pequeñas, o solo en algunas especies, como: factor de crecimiento de nervios (NGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), lectinas tipo C (CTL), 5'-Nucleotidasas (NUCL), fosfodiesterasas (PDE), proteínas tipo Kazal (KAZ), toxinas de tres dedos (3FTxs), proteínas secretoras ricas en cisteína (CRiSPs) y disintegrinas (DIS) (Calvete *et al.*, 2009).

Dentro de los venenos de serpientes la presencia y abundancia de cada una de las familias de proteínas varía considerablemente. Las técnicas venómicas han confirmado y expandido el conocimiento acerca de las variaciones ontogénicas, geográficas e individuales en la composición del veneno de las serpientes de la familia Viperidae (Lomonte *et al.*, 2014a), tal es el caso de la especie *B. asper* cuyos perfiles generados mediante RP-HPLC han sido utilizados para determinar las variaciones individuales, con lo cual se pudo determinar que estas no ocurren debido solamente al medio o la edad, sino que debían estar controladas a nivel genético (Alape-Girón *et al.*, 2008).

Específicamente dentro de las serpientes del género *Porthidium*, hasta la fecha se ha estudiado la composición proteómica de los venenos de *P. nasutum* y *P. ophryomegas* de Costa Rica (Lomonte *et al.*, 2014a) y de *P. lansbergii lansbergii* de Colombia (Jiménez-Charris *et al.*, 2015). La mayoría de proteínas de sus venenos se ubican dentro de las familias de las MP, SP, y PLA<sub>2</sub>.

Entre los efectos que se producen en el envenenamiento por serpientes de este género, se ha determinado, por ejemplo, para la especie *P. lansbergii lansbergii* que la miotoxicidad se relaciona con la presencia de PLA<sub>2</sub>S, la hemorragia con la presencia de MPs, la inhibición de la agregación de plaquetas con las disintegrinas, y que el incremento en la permeabilidad microvascular en el sitio de inyección y edema se relacionan con la presencia de VEGF (Jiménez-Charris *et al.*, 2015). Para *P. nasutum* y *P. ophryomegas* se observó principalmente que su débil actividad miotóxica podría estar relacionada con la abundancia de SVMP hemorrágicas, que podrían afectar indirectamente al tejido muscular al producir isquemia (Lomonte *et al.*, 2012; Gutiérrez *et al.*, 2013). Por su parte el veneno de *P. porrasi* aún no ha sido estudiado, por tratarse de una especie recién descrita y porque hay muy escasa disponibilidad de animales en cautiverio.

*P. porrasi* es morfológicamente muy similar a *P. nasutum*, como se indicó previamente. Sin embargo, se demostró mediante análisis de ADN mitocondrial que hay un alto nivel de variación molecular entre especies de taxones que se presentan en lados opuestos de la cordillera volcánica central, como ocurre con estas serpientes (Sasa *et al.*, 2010; Lamar & Sasa, 2003). Igualmente mediante análisis de ADN mitocondrial se ha relacionado filogenéticamente a *P. porrasi* en un clado monofilético con los linajes Sudamericanos (*P. lansbergii*, *P. nasutum*, *P. arcosea*) (Bryson, 2008). Las similitudes en morfología con la especie costarricense podrían sugerir que sus venenos tengan las mismas características pero las variaciones moleculares y su similitud con especies Sudamericanas (más que costarricenses) sugieren que también pueden existir variaciones.

La neutralización de dos de las especies costarricenses (*P. nasutum* y *P. ophryomegas*) ya fue analizada en estudios previos (Lomonte *et al.*, 2014a). Ambas mostraron ser susceptibles a la neutralización por parte del antiveneno polivalente del ICP, por lo que sería factible esperar que el veneno de *P. porrasi* pueda también ser neutralizado.

## 2 JUSTIFICACIÓN

Dentro de las acciones para contrarrestar el problema del ofidismo se recomienda enfocar esfuerzos en mejorar la producción de antivenenos eficaces y seguros, a través de estrategias dirigidas a reforzar la capacidad tecnológica de los laboratorios productores de antivenenos (Gutiérrez *et al.*, 2010). Entre las estrategias se recomienda la evaluación preclínica y el control de calidad de los antivenenos. Esto es relevante para evitar la distribución de antídotos que no han mostrado ser eficaces para la neutralización de los venenos en una región particular. El estándar principal de tales evaluaciones es la neutralización de la letalidad inducida por el veneno. Pero además, dependiendo del perfil patofisiológico de los diferentes venenos de serpiente, cobra relevancia el estudio de la neutralización de otras actividades tóxicas (Gutiérrez *et al.*, 2017).

La información generada sobre el veneno de *P. porrasi* en cuanto a su composición proteómica, actividades tóxicas, y neutralización por el antiveneno de uso terapéutico en Costa Rica, contribuye con el establecimiento de los perfiles proteómicos de los venenos, así como el inmunoreconocimiento detallado de sus proteínas o péptidos individuales por parte de antivenenos terapéuticos o experimentales, información relevante para los laboratorios productores de antivenenos.

## 3 HIPÓTESIS

La composición proteica, los efectos tóxicos, del veneno de la serpiente *Porthidium porrasi* y la capacidad de neutralización por parte del antiveneno polivalente del ICP sobre este veneno son similares a las de otras especies del género *Porthidium* estudiadas anteriormente (*P. nasutum* y *P. ophryomegas* de Costa Rica y de *P. lansbergii lansbergii* de Colombia)

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Caracterizar el veneno de la serpiente *Porthidium porrasi* en cuanto a su proteoma, toxicidad, y neutralización por un antiveneno de uso terapéutico

### 4.2 Objetivos específicos

4.2.1. Determinar la composición proteica global del veneno de *P. porrasi* mediante una estrategia de análisis proteómico.

4.2.2. Evaluar los principales efectos tóxicos del veneno de *P. porrasi* en un modelo murino.

4.2.3. Determinar actividades *in vitro* del veneno de *P. porrasi*.

4.2.4 Establecer la capacidad del antiveneno polivalente producido en el Instituto Clodomiro Picado para neutralizar la toxicidad del veneno de *P. porrasi*.



## 5 ESTRATEGIA METODOLÓGICA

Primero se determinó la composición proteica del veneno de *Porthidium porrasi*, para lo cual se realizó cromatografía de fase reversa HPLC y una posterior separación de las fracciones mediante SDS-PAGE. Se identificaron o asignaron a familias las proteínas obtenidas utilizando MALDI-TOF/TOF. Se realizaron diversas pruebas *in vitro* e *in vivo* para determinar las actividades del veneno y correlacionarlas con sus diversas proteínas. Además, se evaluó la capacidad de reconocimiento del antiveneno hacia este veneno, así como su neutralización.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Veneno

Para la obtención del veneno de *Porthidium porrasi* se utilizó tres individuos adultos, dos de San Juan de Osa (8°43'16.27"N, 83 ° 29'58.63"W) y uno de Nicuesa Rainforest (8°39'41.66"N , 83°16'48.60"W), ambas ubicaciones en lados opuestos del Golfo Dulce, suroeste de Costa Rica. Las serpientes se mantuvieron en el Parque Reptilandia en Platanillo de Pérez Zeledón (Provincia de San José) y en las instalaciones del Instituto Clodomiro Picado (Universidad de Costa Rica). Después de coleccionar las muestras de veneno se centrifugaron inmediatamente para eliminar detritos, se liofilizaron, se mezclaron y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

## **6.2 Animales**

Se emplearon ratones CD1 de ambos sexos, con un peso de 16-18 g (para ensayos de letalidad) y de 18-20 g (para ensayos de hemorragia, formación de edema y miotoxicidad), según protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUA) de la Universidad de Costa Rica (permiso CICUA-082-17).

## **6.3 HPLC de fase reversa (RP-HPLC)**

El veneno liofilizado se disolvió en agua con 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) (solución A), a una concentración final de 10 mg/ml. Dicha solución se centrifugó y se tomó 200  $\mu$ l del sobrenadante (2 mg veneno) para cargar en una columna C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, partícula de 5  $\mu$ m de diámetro; Phenomenex) en un cromatógrafo Agilent modelo 1220. La elución se desarrolló a una velocidad de flujo de 1 ml/min aplicando un gradiente de acetonitrilo con 0,1% TFA(solución B), por un tiempo de 94 min, de la siguiente manera: 0% B por 5 min, 0-15% B en 10 min, 15-45% B en 60 min, 45-70% B en 10 min, y 70% B por 9 min. La absorbancia fue monitoreada a 215 nm y las fracciones del cromatograma fueron colectadas manualmente, para posteriormente ser secadas en una centrífuga al vacío (Vacufuge, Eppendorf) y almacenadas a -20°C.

## **6.4 Caracterización de las fracciones obtenidas por RP-HPLC**

La abundancia relativa (% del total de proteínas en el veneno) de cada pico cromatográfico se estimó por integración de las áreas de la señal a 215 nm, usando el programa ChemStation B.04.01 (Agilent). Cada fracción obtenida mediante RP-HPLC fue separada adicionalmente mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras usando geles al 12%. Cuando un pico del HPLC contenía dos o más bandas en SDS-PAGE, su distribución relativa se estimó mediante densitometría, usando el programa ImageLab (Bio-Rad).

Las bandas de proteína visualizadas mediante tinción con azul de Coomassie se escindieron de los geles para su análisis mediante espectrometría de masas (MS). El colorante se eliminó usando una mezcla de 50% acetonitrilo y 50% de bicarbonato de amonio 50 mM por 20 min. Luego se colocaron las muestras de gel en la bandeja de digestión y dicha bandeja en el digestor DigestPro MSi (Intavis), donde se realizó un proceso automatizado que transcurrió durante la noche e incluyó una reducción de las muestras con ditioneitol (10mM), alquilación con iodoacetamida (50mM), digestión con tripsina de grado secuenciación (en bicarbonato de amonio 25mM, 10% ACN), y extracción de los péptidos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los péptidos resultantes de la digestión se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF en un instrumento de Applied Biosystems 4800-Plus. Se colocó 1 µl de una mezcla 1:1 de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico saturado (en 50% ACN, 0,1% TFA) y cada muestra peptídica en una placa Opti-TOF 384, se secó a temperatura ambiente y se analizó en modo reflector positivo. Los espectros fueron adquiridos utilizando una intensidad láser de 3000 y 1500 disparos/espectro, utilizando como estándar de calibración externa CalMix-5 (ABSciex) colocado en la misma placa. Se seleccionaron hasta 10 precursores de cada espectro de MS para la adquisición automática de espectros MS/MS de disociación inducida por colisión a 2 kV, en modo positivo reflector (500 disparos/espectro, intensidad láser 3900).

Los espectros de fragmentación resultantes fueron enfrentados a la base de datos de proteínas de Uniprot para el grupo taxonómico Serpentes, utilizando el programa ProteinPilot v.4 y el algoritmo Paragon, con un nivel de confianza de 95% o superior, para la asignación a familias proteicas. Alternativamente, los espectros de calidad adecuada fueron interpretados manualmente para obtener secuencias *de novo*.

## **6.5 Pruebas *in vitro***

### 6.5.1 Efecto procoagulante sobre plasma humano

El efecto coagulante del veneno se probó agregando 20  $\mu\text{g}$  (en 50  $\mu\text{l}$  de PBS) del veneno a 200  $\mu\text{l}$  de plasma humano citratado, previamente incubado a 37°C. La prueba se realizó por triplicado y se anotó el tiempo de coagulación. Cuando después de 30 minutos de incubación no se presentaban señales de la misma, se consideró que no había actividad coagulante.

#### 6.5.2 Efecto anticoagulante sobre plasma humano

El efecto anticoagulante del veneno se probó agregando 20  $\mu\text{g}$  (en 50  $\mu\text{l}$  de PBS) del veneno a 100  $\mu\text{l}$  de plasma humano citratado con 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  50mM, previamente incubado a 37°C. La prueba se realizó por triplicado y se anotó el tiempo de coagulación.

#### 6.5.3 Actividad fosfolipasa $A_2$

Para evaluar la actividad fosfolipasa  $A_2$  del veneno se utilizó como sustrato el sustituto de fosfolípidos sintético ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzoico (4-NOBA), disuelto en acetonitrilo a 1 mg/ml. Se colocó en una placa de 96 pocillos el veneno (en diluciones seriadas, preparadas en Tris 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  10 mM, NaCl 0.1 M, pH 8.0) y NOBA. La placa se incubó a 37°C por 60 minutos y luego de la incubación, se midió la absorbancia a 450 nm en un lector Multiskan FC (Thermo Scientific). La prueba se realizó con 3 réplicas por cada concentración de veneno y se expresó la actividad como el cambio de absorbancia en 60 min.

#### 6.5.4 Actividad proteolítica

Para medir la actividad proteolítica del veneno se usaron diferentes concentraciones del mismo y se evaluó su efecto sobre azocaseína (10 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.15 M,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, pH 8.0) incubando a 37°C por 90 minutos. Para detener la reacción se usó ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Toda la mezcla anterior se centrifugó y se tomó 150  $\mu\text{l}$  del sobrenadante, que posteriormente se mezclaron con 150  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.5 M. La medición

en esta prueba se realizó con 3 réplicas por cada concentración de veneno y se midió la absorbancia a 450 nm.

#### 6.5.5 Reconocimiento del veneno de *P. porrasi* por el suero polivalente del ICP

Se realizó una prueba de ELISA. Para tal fin se recubrió una placa con una solución de veneno a una concentración de 1 µg/100 µl PBS en cada pocillo. Se utilizó el veneno de *P. porrasi* y se comparó con *P. nasutum* por ser una especie cercana y con información disponible, así como con *B. asper* por ser parte del veneno que se usa en la inmunización de los caballos para preparar el suero polivalente. Se colocaron las muestras de suero (lote 5880417, cuya composición incluye inmunoglobulinas equinas c.s.p. que cada mililitro neutralice no menos de 3 mg de veneno de *Bothrops asper*, 2 mg de *Crotalus simus* y 3 mg de *Lachesis stenophrys* más excipientes c.s.p. 10 ml.) en ocho diluciones seriadas desde 1/500 hasta 1/64000, se incubó por una hora, lavó, y se usó un conjugado de anticuerpos anti-IgG de caballo con fosfatasa alcalina (FALC) (1/2000 PBS + BAS 0,2%), también se incubó por una hora y finalmente se colocó el paranitrofenil fosfato para que se desarrollara el color, después de 10 minutos se leyó a 405 nm. Todas las muestras se corrieron por triplicado y como control negativo se utilizó suero normal de caballo, corrido en idénticas condiciones.

## **6.6 Pruebas *in vivo***

### 6.6.1 Miotoxicidad en ratón

Para la actividad miotóxica se inyectó 50 µg de veneno en el gastrocnemio de ratones CD-1 con un peso de 18-20 g, y después de 3 h, se colectó una muestra de sangre para medir la actividad en plasma de la enzima Creatina Kinasa (CK) que se libera de las fibras musculares dañadas a la circulación. Para ello se utilizó un kit de reactivos comercial (CK-Biocon). Se utilizó 4 animales por grupo y como control negativo se inyectó un grupo de ratones con PBS.

### 6.6.2 Hemorragia en piel

La actividad hemorrágica se determinó inyectando 1,5 o 3  $\mu\text{g}$  del veneno de forma intradérmica, en la región abdominal de ratones CD-1 con un peso entre 18-20 g. Después de 2 h se sacrificaron los animales y se les removió la piel abdominal. El área de la lesión hemorrágica, en la parte interna de la piel, se dibujó en una película transparente y se midió su tamaño en  $\text{mm}^2$ . Se utilizó 4 animales por grupo y como control negativo se inyectó un grupo de ratones con PBS.

### 6.6.3 Letalidad

La letalidad se probó inyectando el veneno por vía intraperitoneal, en ratones CD-1 con un peso entre 16-18 g. Los ratones se observaron a las 24 y 48 horas, y se anotó el número de las muertes. La dosis letal Media ( $\text{LD}_{50}$ ) se calculó mediante Probits, utilizando el programa BioStat.

### 6.6.4 Edema

Se inyectó 3  $\mu\text{g}$  de veneno en 30  $\mu\text{l}$  de PBS, en la almohadilla de la pata de ratones CD1, con un peso de 18-20 g. Se midió el aumento en el volumen de la almohadilla inyectada usando un cáliper de baja presión, en diferentes intervalos de tiempo. Se utilizó 4 animales por grupo y como control negativo se inyectó un grupo de ratones con PBS.

### 6.6.5 Neutralización de la letalidad del veneno de *P. porras* por el suero polivalente del ICP

Una vez determinada la  $\text{LD}_{50}$ , se seleccionó una dosis reto ( $3 \times \text{LD}_{50}$ ). Dada la escasez de veneno de esta especie se probó una única relación de veneno/antiveneno de 2 mg de veneno/ml de antiveneno. Se mezcló el veneno con el antiveneno polivalente y se incubó por 30 min a  $37^\circ\text{C}$ . Esta mezcla fue inyectada igual que en la prueba de letalidad mediante

inyección intraperitoneal en ratones CD-1 con un peso entre 16-18 g. Los ratones se observaron a las 24 y 48 horas y se anotó el número de muertes.

## **6.7 Análisis estadístico**

Para la determinación de la dosis letal Media ( $LD_{50}$ ) se usó Probits. Para el resto de las pruebas estadísticas se utilizó las funciones estadísticas integradas en el programa Excel (Microsoft). Las mismas incluyen el cálculo de la media, varianza y desviación estándar para cada parámetro. Se analizó la significancia estadística de las diferencias entre valores promedios mediante la prueba t de Student, cuando se trató de dos grupos, o bien mediante ANOVA, seguido por prueba de Tukey, cuando se trató de más de dos grupos. En todos los casos se utilizó un valor de  $p < 0,05$  como valor de corte para significancia.

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de su importancia para la salud a nivel mundial, aún existen venenos de serpientes sin estudiar. Por ejemplo dentro de las serpientes venenosas de las familias Viperidae y Elapidae, todavía hay numerosas especies cuyos venenos no han sido estudiados. Dentro del género *Porthidium* por ejemplo, el escaso conocimiento sobre los venenos de sus especies incluye solamente a cuatro de las especies: *P. nasutum*, *P. ophryomegas* (ambas de Costa Rica), *P. lansbergii* (de la región Caribe de Colombia) y *P. hyoprora* (posteriormente reclasificada como *Bothrocophias hyoprora*). Los venenos de las otras seis especies: *P. hespere*, *P. dunnii*, *P. arcosae*, *P. yucatanicum*, *P. volcanicum*, y *P. porrasi*, han permanecido completamente inexplorados hasta ahora. Las dos últimas especies son endémicas del sudoeste de Costa Rica, y recientemente se logró recolectar una pequeña muestra de veneno de *P. porrasi*, lo cual permitió, en este estudio, determinar sus características compositivas y funcionales, así como su neutralización por antiveneno.

El veneno de *P. porrasi* inicialmente se separó por RP-HPLC, que produjo 39 picos y por SDS-PAGE unidimensional de las fracciones, que generó un total de 70 bandas de proteínas (Fig. 9)



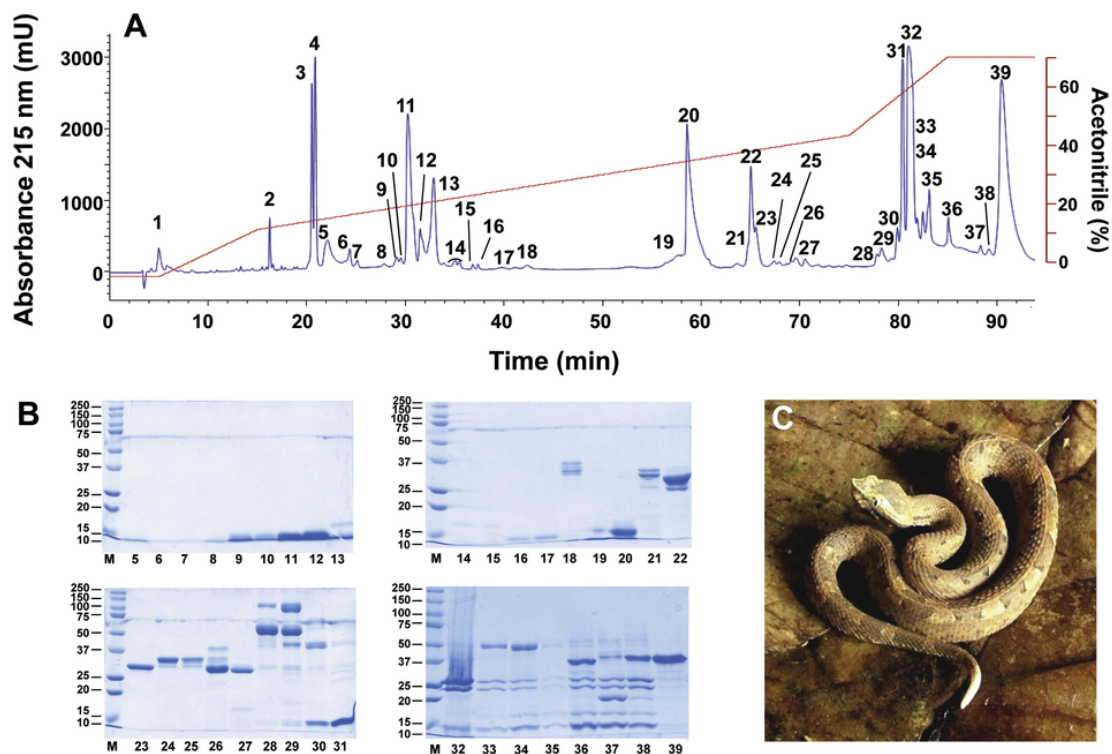


Figura 9. Separación de las proteínas del veneno de *Porthidium porrasi* mediante RP-HPLC, seguido de SDS-PAGE. Dos mg de veneno fueron fraccionados en una columna C18 (A) y eluidos con un gradiente de acetonitrilo (línea roja), como se describe en materiales y métodos. Las fracciones se colectaron para separarlas por SDS-PAGE en condiciones reductoras (B). Los marcadores de peso molecular se indican en kDa. Las bandas teñidas con Coomassie fueron escindidas, digeridas en gel con tripsina y sometidas al análisis MALDI-TOF/TOF para la asignación de las familias de proteínas. Se muestra la fotografía de uno de los especímenes en estudio (C)

Tras la digestión triptica en gel y el análisis MALDI-TOF/TOF, 48 de las bandas, pudieron asignarse a familias de proteínas conocidas en venenos de serpientes (Tabla 1)



Tabla 1: Resumen de la identificación por MS/MS de las bandas obtenidas mediante SDS-PAGE de los picos cromatográficos de RP-HPLC del veneno de *Porthidium porrasi*.

Peak	MW (kDa)	Area (%)	m/z	z	Matching peptide sequence *	Conf **	Score	Best UniProtKB match	Protein family
5	10.0	2.92	1769.7	1	SGSQCGHGDCCEQCK	99	15	T1E6U1; <i>C.v.helleri</i> CohPH-3	Disintegrin
			2279.0	1	RAMGDD <sup>cm</sup> PGDRCTGQSADCPR	99	10	P0C6E3; <i>A. bilineatus</i> bilitoxin	Disintegrin
			2150.1	1	ARGDNPDDRCTGQSADCPR	59,7	7		
6	10.0	0.84	-	-	-	-	-	unknown	
7	10.0	0.61	-	-	-	-	-	unknown	
8	10.0	0.51	-	-	-	-	-	unknown	
9	10.0	0.73	1918.7	1	GDDM <sup>ox</sup> DDYCNGISAGCPR	99	14	Q9PVK9; MP-Dis <i>G.brevicaudus</i>	Disintegrin
			2129.9	1	ARGDDMDDYCNGISAGCPR	99	15		
			1952.8	1	GDWNDDTCN <sup>da</sup> GIS <sup>cm</sup> AGCPR	99	14	Q9Y119; MP-Dis <i>G.brevicaudus</i>	Disintegrin
10	10.0	0.67	-	-	-	-	-	unknown	
11	10.0	8.25	1952.8	1	GDWNDDTCN <sup>da</sup> GIS <sup>cm</sup> AGCPR	99	15	Q9Y119; MP-Dis <i>G.brevicaudus</i>	Disintegrin
			2129.8	1	ARGDDMDDYCNGISAGCPR	99	13	Q9PVK9; MP-Dis <i>G.brevicaudus</i>	Disintegrin
			1938.8	1	GDWNDDCTGQSADCPR	98,2	12		
12	10.0	2.17	1952.8	1	GDWNDDTCN <sup>da</sup> GIS <sup>cm</sup> AGCPR	99	13	Q9Y119; MP-Dis <i>G.brevicaudus</i>	Disintegrin
13	10.0	5.03	1902.7	1	GDDMDDYCNGISAGCPR	99	13	Q9PVK9; MP-Dis <i>G.brevicaudus</i>	Disintegrin
			2129.9	1	ARGDDMDDYCNGISAGCPR	99	11		
14	-	0.86	-	-	-	-	-	unknown	
15	-	0.38	-	-	-	-	-	unknown	
16	11.3	0.40	-	-	-	-	-	unknown	
17	11.5	0.43	1952.8	1	GDWNDDTCN <sup>da</sup> GIS <sup>cm</sup> AGCPR	99	15	Q9Y119; MP-Dis <i>G.brevicaudus</i>	Disintegrin
18a	49.0	0.16	1310.7	1	LYCFPNSPGKK	99	11	A0A194APN1; type III <i>A. piscivorus</i>	Metalloproteinase
			1182.6	1	LYCFPNSPGK	99	11		
			2959.2	1	AAKDDCDLPESCTGQSAECP <sup>py</sup> TDSFQR	99	15	R4G7J1; SVMP-Hop-13 <i>H.bungaroides</i>	Metalloproteinase
18b	45.4	0.45	1310.7	1	LYCFPNSPGKK	99	9	A0A194APN1; type III <i>A. piscivorus</i>	Metalloproteinase
			1182.6	1	LYCFPNSPGK	99	13		

			2959.2	1	AAKDDCDLPESCTGQSAECP <sup>py</sup> TDSFQR	99	16	R4G7J1; SVMP-Hop-13 <i>H.bungaroides</i>	Metalloproteinase
19	17.5	2.11	3150.4	1	ETLVSILEEH <sup>ox</sup> PDEVSHIFRSPCVTALR	83,6	7	Q90X24; svVEGF-F <i>Bothrops insularis</i>	Vascular endothelial growth factor
20	20.4	10.74	1471.5	1	CCIVHDCCYGK	99	9	POCAS3; basic PLA <sub>2</sub> Cdr-12 <i>C.d.ruruima</i>	Phospholipase A <sub>2</sub>
			2505.9	1	(519.6)FBNDXDITYDYD(1908.3)	<i>de novo</i>	-	COHJC1; acidic BlatPLA <sub>2</sub> <i>B.lateralis</i>	Phospholipase A <sub>2</sub>
21a	45.5	0.18	-	-	-	-	-	-	unknown
			1379.6	1	AAYPEFGLPATSR	99	9	T1E6T7; kallikrein-CohID <i>C.o.helleri</i>	Serine proteinase
			1069.6	1	FLVALYTSR	72.9	4		
21b	43.3	0.44	2159.1	1	W <sup>do</sup> T <sup>dh</sup> DIIHIWHDEYKNFK	99	14	Q8JI40; ablomin <i>Gloydus blomhoffii</i>	Cys-rich secretory protein
			1769.9	1	W <sup>do</sup> T <sup>dh</sup> DIIHIWHDEYK	99	16		
			1537.7	1	MEWYPEAAAANAER	99	15		
			3100.5	1	SVDFDSESPRKPEIQN <sup>da</sup> KIVDLH <sup>ox</sup> NFLR	99	10	T1D6R8; CRISP <i>Crotalus horridus</i>	Cys-rich secretory protein
			1981.0	1	KPEIQN <sup>da</sup> KIVDLH <sup>ox</sup> NFLR	99	11		
22a	41.0	3.13	1379.7	1	AAYPEFGLPATSR	99	12	T1E6T7; kallikrein-CohID <i>C.o.helleri</i>	Serine proteinase
22b	37.9	0.76	1769.9	1	W <sup>do</sup> T <sup>dh</sup> DIIHIWHDEYK	99	15	Q8JI40; ablomin <i>Gloydus blomhoffii</i>	Cys-rich secretory protein
			2159.1	1	W <sup>do</sup> T <sup>dh</sup> DIIHIWHDEYKNFK	99	16		
			1537.7	1	MEWYPEAAAANAER	99	21		
			3329.1	1	IGCAAAYCPSSEYSYFYVCQYCPAGNIR	99	9	F2Q6F6; Pg-CRP <i>Cerrophidion godmani</i>	Cys-rich secretory protein
			1981.0	1	KPEIQN <sup>da</sup> KIVDLH <sup>ox</sup> NFLR	99	9	T1D6R8; CRISP <i>Crotalus horridus</i>	Cys-rich secretory protein
			3100.5	1	SVDFDSESPRKPEIQN <sup>da</sup> KIVDLH <sup>ox</sup> NFLR	99	10		
23	29.1	1.72	1379.7	1	AAYPEFGLPATSR	99	13	J3RY98; Cadam10_SVSP-3 <i>C.adamanteus</i>	Serine proteinase
24a	32.4	0.52	2172.2	1	SAHIAPISLPSNPPIVGSVCR	99	22	Q9W7S1; acubin <i>Deinagkistrodon acutus</i>	Serine proteinase
24b	29.8	0.07	1379.7	1	AAYPEFGLPATSR	99	12	T1E6T7; kallikrein-CohID <i>C.o.helleri</i>	Serine proteinase
25a	32.8	0.38	2172.2	1	SAHIAPISLPSNPPIVGSVCR	99	21	Q9W7S1; acubin <i>Deinagkistrodon acutus</i>	Serine proteinase
			2559.3	1	TLHCGGTLIN <sup>da</sup> QEW <sup>hk</sup> VLSAAHCDR	99	8	A0A077LD42; SP <i>Protobothrops flavoviridis</i>	Serine proteinase
25b	29.9	0.11	-	-	-	-	-	-	unknown
26a	38.7	0.07	1639.7	1	CANINLLDYEVCR	99	10	B0VXU2; isoform 10 <i>Sistrurus catenatus</i>	Serine proteinase
26b	33.2	0.06	-	-	-	-	-	-	unknown
26c	38.7	0.82	3362.5	1	SSCDGDSGGPLICNGEIQIVSWGGDICAQPR	99	9	B0VXT7; isoform 5 <i>S.catenatus edwardsii</i>	Serine proteinase
27	27.6	0.66	1355.7	1	LNEDEQIRNPK	99	14	Q71QH7; SP PA <i>Trimeresurus stejnegeri</i>	Serine proteinase
			1544.8	1	NNEVLDKDIMLIK	99	13		
28a	112.4	0.11	2311.1	1	NPAWWGGQPIWHTATYQGLK	99	10	U3TBJ5; phosphodiesterase <i>O. okinavensis</i>	Phosphodiesterase

28b	51.9	0.54	2135.0	1	SAGQLYEESLGKVVVEELKR	99	7	T2HQ57; amine oxidase <i>Ovophis okinavensis</i>	L-amino acid oxidase	
			2462.1	1	FGLKLNFEVQETENGWYFIK	99	7			
29a	95.2	0.45	1532.8	1	LWNYFHHTTLIPK	99	9	T2HRT4; phosphodiesterase <i>P. flavoviridis</i>	Phosphodiesterase	
			2405.2	1	TESEAHNLPGYGRPQVLQNHSK	99	7			
			2354.1	1	E <sup>ca</sup> RPDFYTLYIEEPDITGHK	99	17			
			2311.1	1	NPAWWGGQPIWHTATYQGLK	99	20			
29b	51.0	0.56	1946.0	1	IDKVNLMVDQQWMAVR	91.3	5			
			1651.7	1	NDEEGWYANLGPMR	99	11	Q6WP39; TSV-LAO <i>T. stejnegeri</i>	L-amino acid oxidase	
			2119.0	1	NDEEGWYANLGPMRLPEK	91.6	7			
			3112.7	1	VVIVGAGMSGLSAAAYVLGAGHQVTVLEASER	99	10	A0A024BTN9; Bs29 <i>B. schlegelii</i>	L-amino acid oxidase	
29c	41.5	0.11	3002.4	1	D <sup>ca</sup> DRNPLEQCFRETDYEEFLEIAR	99	13	P0C2D2; Casca LAO <i>C. d. cascavella</i>	L-amino acid oxidase	
			1560.8	1	YNNYKEDPYAKR	99	11	T2HQ75; PLB-like <i>Ovophis okinavensis</i>	Phospholipase B	
			1460.8	1	KVVPESLFAWER	99	17			
			2222.1	1	HQGLPESYNFDFVMTMKPVL	99	27			
			2706.4	1	VLPGYENIYFAHSSWFTYAATLR	99	13			
			1406.7	1	FTAYAINGPPVEK	99	18			
			1332.7	1	VVPESLFAWER	99	19			
			1704.9	1	SLEDGTLYIIEQVPK	99	19	T2HP68; phospholipase B-like <i>P. flavoviridis</i>	Phospholipase B	
30a	65.0	0.32	1480.6	1	YGLDF <sup>do</sup> SYEMAPR	99	16	F8J2D3; PLB-81 <i>Drysdalia coronoides</i>	Phospholipase B	
			2959.5	1	AAKDDCDMADLCT <sup>dh</sup> GQSAECTDDFQR	99	10	A0A194APN1; MP PIII 7 <i>A. piscivorus</i>	Metalloproteinase	
30b	40.0	0.55	1310.8	1	LYCFPNSPGKK	98,5	6			
			1704.8	1	SLEDGTLYIIEQVPK	99	9	T2HP68; phospholipase B-like <i>P. flavoviridis</i>	Phospholipase B	
			2045.0	1	SLEDGTLYIIEQVPKLVK	99	12			
			2222.0	1	HQGLPESYNFDFVMTMKPVL	99	7			
30c	12.1	0.49	-	-	-	-	-		unknown	
			-	-	-	-	-	-		unknown
31b	12.8	4.80	1704.8	1	SLEDGTLYIIEQVPK	99	9	T2HP68; phospholipase B-like <i>P. flavoviridis</i>	Phospholipase B	
			2045.0	1	SLEDGTLYIIEQVPKLVK	99	12			
			2222.0	1	HQGLPESYNFDFVMTMKPVL	99	7			
			1406.7	1	FTAYAINGPPVEK	99	10			
31a	65.3	0.96	-	-	-	-	-		unknown	
			-	-	-	-	-	-		unknown
			-	-	-	-	-	-		unknown
			-	-	-	-	-	-		unknown
31b	12.8	4.80	2541.3	1	GGHLVSVESAGEADFVAQLVAENIK	99	21	T1DK00; C-type lectin 4 <i>Crotalus horridus</i>	C-type lectin	
			2603.1	1	DCPSDWSSYEGHCYKPFNEPK	99	16	I2GAE4; anticoagulant $\beta$ -subunit <i>D. acutus</i>	C-type lectin	
			1928.8	1	DCPSDWSPYEGHCYR	99	14	Q9PS06; factor IX/X-binding $\beta$ -subunit <i>B. jararaca</i>	C-type lectin	
			1317.7	1	TTKYDVW <sup>hk</sup> IGLR	98,6	12	A0A194APN2; C-type lectin 8a <i>A. piscivorus</i>	C-type lectin	

32a	26.6	6.91	3542.7	1	KSHDNAQLLTAID <sup>ck</sup> FN <sup>da</sup> GPTIGIAYVASMCDPKR	99	20	E3UJL0; MP_PIII 1 <i>Bothrops neuwiedi</i>	Metalloproteinase
			3414.6	1	SHDNAQLLTAID <sup>ck</sup> FN <sup>da</sup> GPTIGIAYVASMCDPKR	99	19		
			1136.6	1	TLDLFGWR	99	12	A0A023J5I1; GP-II <i>Crotalus s. scutulatus</i>	Metalloproteinase
32b	23.9	4.87	1745.0	1	YIKLVIVVDHSMVTK	99	6	E9JG93; metalloproteinase <i>Echis coloratus</i>	Metalloproteinase
32c	12.9	1.75	1679.8	1	GPTIGLAYVGTMCDPK	99	10	A0A194AME3; type II 2 <i>Agkistrodon piscivorus</i>	Metalloproteinase
33a	49.0	0.68	-	-	-	-	-	-	unknown
33b	27.0	0.45	-	-	-	-	-	-	unknown
33c	23.9	0.33	-	-	-	-	-	-	unknown
33d	12.7	0.26	-	-	-	-	-	-	unknown
34a	47.6	0.98	2512.2	1	NPCNIYYSPNDEDKGMVLPGTK	99	10	A0A194APE3; type III 9a <i>Agkistrodon piscivorus</i>	Metalloproteinase
			1712.7	1	AAKDECDMADLCTGR	99	11		
			2512.2	1	NPCNIYYSPNDEDKGMVLPGTK	99	18		
			1183.6	1	Q <sup>ps</sup> SNLTPEQQR	99	11		
34b	27.4	0.29	1136.6	1	TLDLFGWR	99	9	E9JGB0; metalloproteinase <i>Echis coloratus</i>	Metalloproteinase
34c	24.3	0.24	1340.8	1	LVIVVDHSMVTK	99	8	E9JG93; metalloproteinase <i>Echis coloratus</i>	Metalloproteinase
34d	13.5	0.54	1918.6	1	DCPSDWSSYEGHCYR	95,8	6	T1E3Z4; C-type lectin 11 <i>Crotalus horridus</i>	C-type lectin
35	-	2.55	-	-	-	-	-	-	unknown
36a	37.3	1.10	2133.8	1	ARGDNPDDRCTGQSGDCPR	<i>de novo</i>	-	BAN89392; P-II metalloprotease <i>P. flavoviridis</i>	Metalloproteinase
			1987.7	1	LTTGSQCAEGLCCDQCK	99	8	J3SDW3; PII 2b <i>Crotalus adamanteus</i>	Metalloproteinase
36b	28.0	0.37	-	-	-	-	-	-	unknown
33c	24.6	0.33	-	-	-	-	-	-	unknown
36d	17.1	0.20	1918.6	1	DCPSDWSSYEGHCYR	99	10	T1E3Z4; C-type lectin 11 <i>Crotalus horridus</i>	C-type lectin
36e	14.4	1.04	2602.9	1	DCPSDWSSYEGHCYKPFNEPK	99	7	I2GAE4; anticoagulant $\beta$ -subunit <i>D. acutus</i>	C-type lectin
			1918.6	1	DCPSDWSSYEGHCYR	97,7	6	T1E3Z4; C-type lectin 11 <i>Crotalus horridus</i>	C-type lectin
37a	40.7	0.13	1704.9	1	SLEDGTLYIIEQVPK	99	11	T2HP68; phospholipase B-like <i>P. flavoviridis</i>	Phospholipase B
37b	27.9	0.17	-	-	-	-	-	-	unknown
37c	24.7	0.16	-	-	-	-	-	-	unknown
37d	20.3	0.29	2341.2	1	DIHYATVYWLEAEKSFQIK	99	19	A0A077L7E7; phospholipase B-like <i>P. elegans</i>	Phospholipase B
			2911.5	1	DIHYATVYWLEAEKSFQIKDVLDK	99	22		
			1710.8	1	VKDFMQKQDEWTR	99	19		
			1688.8	1	QQIKNNKDDPFWR	99	12		

					2312.1	1	NAGYVIAQLDGLYMGNVEWAK	99	33		
					1191.6	1	NNKDDPFWR	99	14		
					1737.8	1	DLHYATVYWLEAEK	99	22	A0A098LYE7; phospholipase B-like <i>O.aestivus</i>	Phospholipase B
37e	17.1	0.09	-	-	-	-	-	-	-		unknown
37f	14.9	0.41	-	-	-	-	-	-	-		unknown
38a	39.9	0.46	-	-	-	-	-	-	-		unknown
38b	27.7	0.28	-	-	-	-	-	-	-		unknown
38c	24.6	0.19	-	-	-	-	-	-	-		unknown
38d	20.6	0.04	-	-	-	-	-	-	-		unknown
38e	17.1	0.07	-	-	-	-	-	-	-		unknown
38f	15.0	0.30	1918.6	1	DCPSDWSPYEGHCYR		<i>de novo</i>	-	T1E3Z4; C-type lectin 11 <i>Crotalus horridus</i>		C-type lectin
39	38.7	19.45	1474.5	1	HDDEYCNCYAK		<i>de novo</i>	-	P30403; rhodostoxin <i>C. rhodostoma</i>		Metalloproteinase

▼: Masa aparente de SDS-PAGE en condiciones reductoras, en kDa.

\* Los residuos de cisteína son carbamidometilados. Posibles, aunque no confirmadas/ ambiguas las modificaciones de aminoácidos sugeridas por el software de identificación automatizada se muestran con superíndices, con las siguientes abreviaturas: <sup>cm</sup>: carboxamidometilo; <sup>ox</sup>: oxidación; <sup>do</sup>: dioxidación; <sup>dh</sup>: deshidratado; <sup>da</sup>: desamidado; <sup>py</sup>: piroglutámico; <sup>hk</sup>: hidroxiquinurena; <sup>ca</sup>: carbamilo; <sup>ck</sup>: catK<sup>+</sup>

\*\* Los valores de Confianza (Conf) y Score se calculan mediante el algoritmo Paragon™ de ProteinPilot™ v.4.0. Pocas coincidencias con valores Conf <95%, pero verificados manualmente, se indican en cursiva. Las secuencias obtenidas de espectros que se resolvieron manualmente se indican con "de novo".

La abundancia de las familias de proteínas en el veneno de *P. porrasi* expresadas como porcentaje del contenido total de proteínas, se presenta en la figura 10.

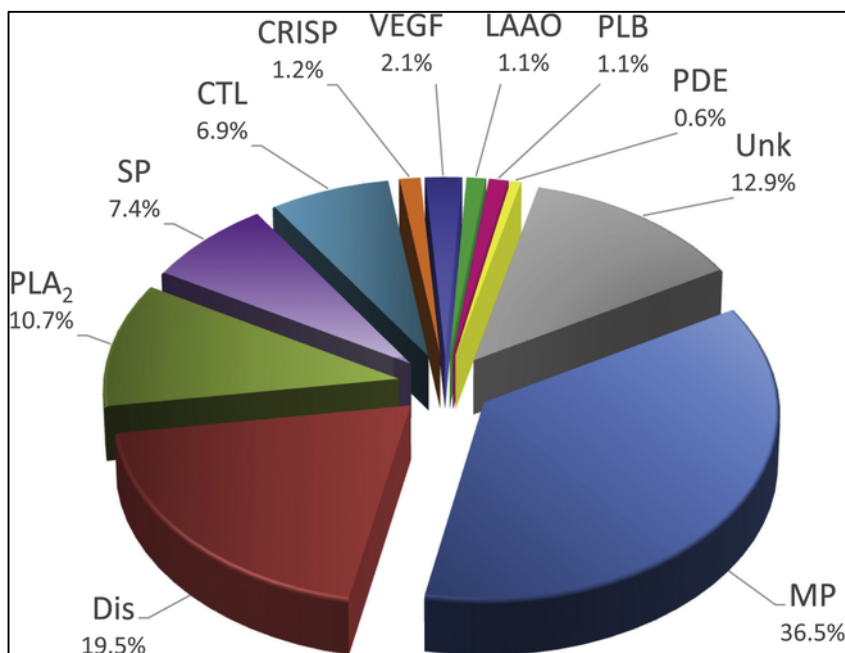


Figura 10. Composición del veneno de *Porthidium porrasi* según familias de proteínas. La abundancia relativa de cada familia de proteínas se expresa como porcentaje del contenido total de proteínas, estimado a partir de la integración de las áreas de los picos cromatográficos (215 nm) y la densitometría de las bandas de SDS-PAGE, como se describe en materiales y métodos. MP: metaloproteinasas; Dis: desintegrinas; PLA<sub>2</sub>: fosfolipasa A<sub>2</sub>; SP: serina proteinasas; CTL: lectina tipo C / lectina; CRISP: proteína secretora rica en cisteína; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; LAAO: L-aminoácido oxidasa; PLB: fosfolipasa B; PDE: fosfodiesterasa; Unk: desconocido / no identificado.

El veneno está dominado por las metaloproteinasas (36,5%) y las desintegrinas (19,5%). Las fosfolipasas A<sub>2</sub> (10,7%), las serina proteinasas (7,4%) y las lectinas tipo C (6,9%) también son componentes abundantes de este veneno, mientras que en menor proporción también se identificaron proteínas que pertenecen a las familias de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proteínas secretorias ricas en cisteína (CRiSPs), L-aminoácido oxidasas (LAAOs), fosfolipasa B (PLB) y fosfodiesterasa (PDE). Todos juntos, una serie de componentes no identificados, cada uno presente en pequeñas cantidades (Tabla 1) suman un 12,9% del veneno (Fig.10), que basados en estudios anteriores, varios de ellos podrían representar pequeños fragmentos de proteinasas (especialmente metaloproteinasas), los



cuales resultan en bandas débiles después de la separación de SDS-PAGE, haciendo difícil el subsecuente análisis por MALDI-TOF-TOF.

Posteriormente se investigaron las relaciones de la composición proteica del veneno con sus actividades funcionales. En concordancia con la presencia de la PLA<sub>2</sub> en la que se identificó el residuo del aminoácido Asp49 (distintivo de las isoformas catalíticamente activas) (Tabla 1) el veneno presenta actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> (Fig. 11)

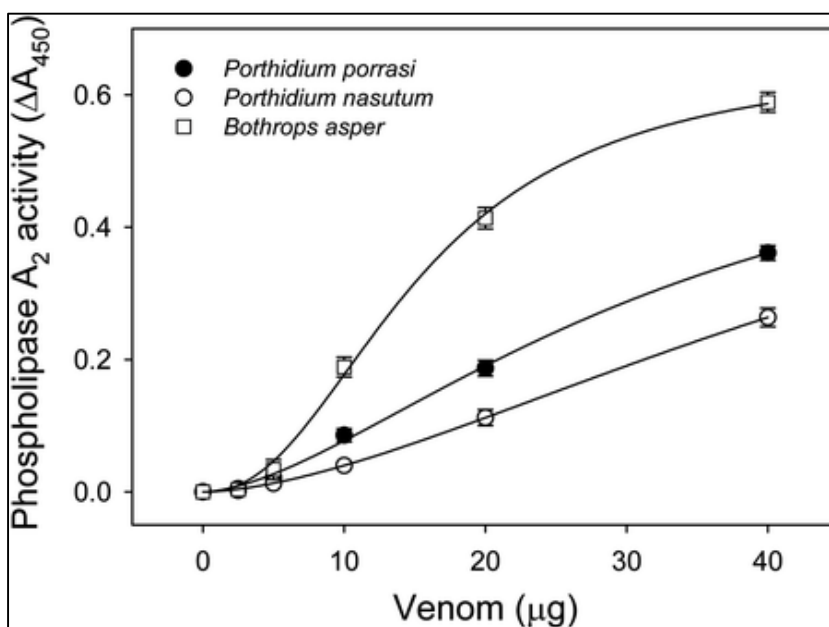


Figura 11. Actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> del veneno de *Porthidium porrasi* sobre el sustrato ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzoico. Se evaluó en paralelo los venenos de *P. nasutum* y *Bothrops asper*, para comparación. Cada punto representala media ± la desviación estándar de los triplicados.

Esta actividad es comparable con la de *P. nasutum*, que tiene una proporción similar de PLA<sub>2</sub> (11,6%; Lomonte *et al.*, 2012) pero la actividad fue considerablemente más baja que la del veneno de *B. asper* que según fue reportado previamente contiene 9,1% de PLA<sub>2</sub>s Asp49 (Alape-Girón *et al.*, 2008). A pesar de la abundancia relativamente similar a la de *B. asper*, la diferencia con la actividad podría explicarse por la eficacia catalítica de las enzimas, ya que se han documentado variaciones significativas entre las isoformas, por ejemplo entre PLA<sub>2</sub>s Asp49 acídicas y básicas (Fernández *et al.*, 2010a).

También en concordancia con la presencia de una gran cantidad de proteinasas en el veneno de *P. porrasi*, este mostró actividad proteolítica sobre la azocaseína, que fue ligeramente más alta que la de los venenos de *P. nasutum* y *B. asper* (Fig. 12A). Se encontró que esta actividad dependía principalmente de la presencia de metaloproteinasas, en lugar de serina proteinasas como lo demuestra la abrogación casi completa de la proteólisis cuando el veneno de *P. porrasi* se incubó junto con EDTA (Fig. 12B).

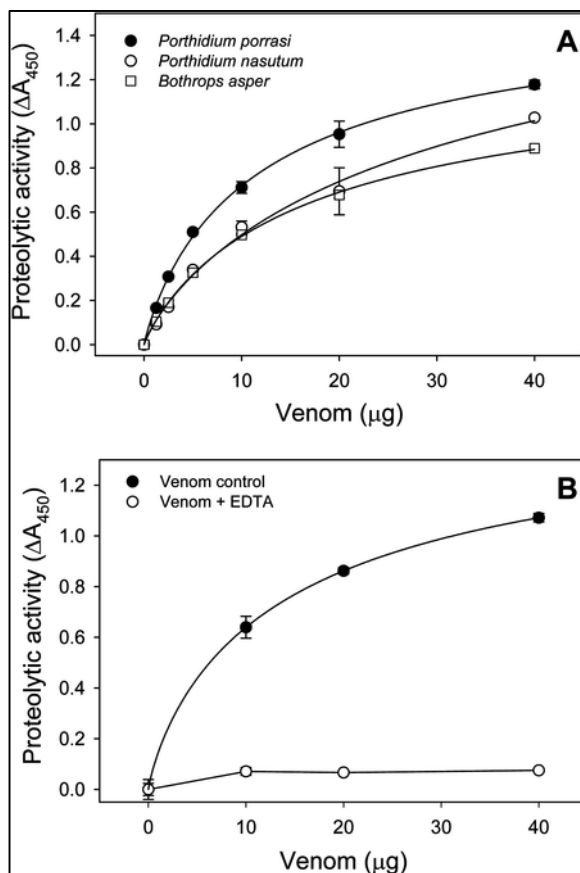


Figura 12. (A) Actividad proteolítica del veneno de *Porthidium porrasi* sobre el sustrato de azocaseína. Los venenos de *P. nasutum* y *B. asper* se analizaron en paralelo, para comparación. (B) Efecto del EDTA (quelante de cationes) sobre la actividad proteolítica del veneno de *P. porrasi*. Cada punto representa la media  $\pm$  desviación estándar de los triplicados.

Por otro lado, este veneno (hasta 20  $\mu\text{g}$ ) no presentó actividad procoagulante en plasma humano, similar a los resultados previos obtenidos con los venenos de *P. nasutum* (Lomonte *et al.*, 2012) y *P. l. lansbergii* (Jiménez-Charris *et al.* 2015), pero mostró actividad anticoagulante *in vitro*, retrasando la coagulación del plasma humano a  $24 \pm 5$  min, en comparación con el plasma control ( $120 \pm 10$ s).

Las actividades enzimáticas analizadas *in vitro* permitieron corroborar sus relaciones con acciones tóxicas, ya que muchas metaloproteinasas dependen de su actividad catalítica para inducir hemorragias (Baldo *et al.*, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2005), mientras que muchas PLA<sub>2</sub>s, principalmente del tipo básico, hidrolizan fosfolípidos del músculo esquelético para inducir mionecrosis (Lomonte y Gutiérrez, 2011; Fernández *et al.*, 2013).

El veneno de *P. porrasi* mostró un marcado efecto hemorrágico en el ensayo de la piel del ratón (Fig. 13A), pero solo indujo una mionecrosis débil, según el ligero aumento en la actividad de creatina quinasa plasmática observada (Fig. 13B) y la evaluación histológica (Fig. 13C). Estos resultados se parecen a los reportados previamente para los venenos de *P. nasutum*, *P. ophryomegas* y *P. l. lansbergii*, que muestran ser fuertemente hemorrágicos pero débilmente miotóxicos (Lomonte *et al.*, 2012; Jiménez-Charris *et al.*, 2015). Dos PLA<sub>2</sub>s miotóxicas, ambas del tipo básico, se han aislado recientemente de los venenos de *P. l. lansbergii* (Jiménez-Charris *et al.*, 2016) y *P. ophryomegas* (Vindas *et al.*, 2018), respectivamente, pero su baja abundancia explicaría la débil mionecrosis inducida por sus venenos correspondientes. Por otro lado, ninguna de las dos PLA<sub>2</sub>s de tipo ácido aisladas de los venenos de *P. l. lansbergii* (Jiménez-Charris *et al.*, 2016) y de *P. nasutum* (Vargas *et al.*, 2012), respectivamente, muestran actividad miotóxica. En conjunto estas observaciones y los resultados actuales sugieren que el efecto miotóxico débil inducido por el veneno de *P. porrasi* podría atribuirse a la presencia de una PLA<sub>2</sub> miotóxica básica de baja abundancia.

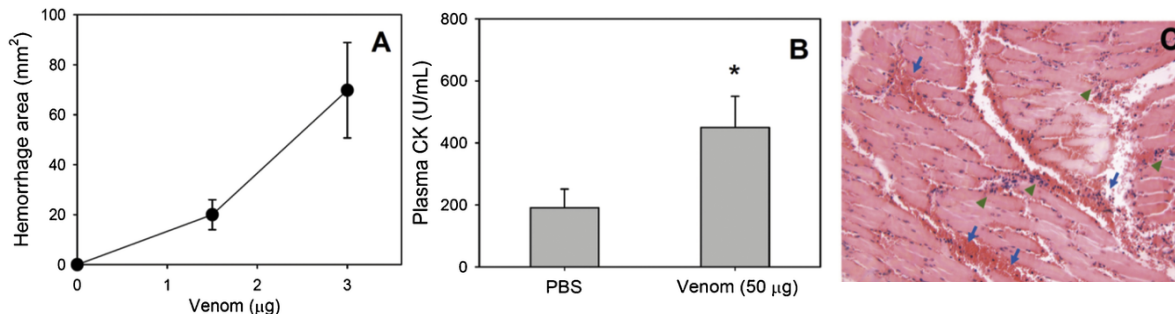


Figura 12. (A) Actividad hemorrágica del veneno de *Porthidium porrasii* (1.5 o 3 µg), 2 h después de la inyección intradérmica en ratones. Cada punto representa la media  $\pm$  desviación estándar de cuatro ratones. (B) Actividad miotóxica del veneno de *P. porrasii* 3h después de la inyección intramuscular en ratones. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de cuatro ratones. La significancia estadística de la diferencia ( $p < 0,05$ ) se determinó mediante la prueba t de Student y se indicó con un asterisco. (C) Micrografía ( $\times 200$ ) de una sección del músculo esquelético (gastrocnemio) teñida con hematoxilina / eosina, 3 h después de la inyección de veneno de *P. porrasii* (50 µg). Se observa abundante extravasación de eritrocitos (flechas) e infiltración moderada de leucocitos (puntas de flecha) entre las fibras musculares, en su mayoría normales separadas por edema.

Como es típico de los venenos de vipéridos, el de *P. porrasii* indujo un edema fuerte e inmediato en el ensayo de la almohadilla de la pata del ratón (Fig. 13). La inflamación del tejido fue máxima durante las primeras 6 horas y luego disminuyó gradualmente a las 24h. El efecto inflamatorio de los venenos de vipéridos no se atribuye a un solo tipo de toxina, sino es probable que sea multifactorial, con la posible participación de PLA<sub>2</sub>, proteinasas, esterasas, lectinas o VEGF, entre otras (Lomonte, 1994). Jiménez-Charris *et al.* (2015) encontraron que el VEGF aislado del veneno de *P. l. lansbergii* indujo de forma potente el edema de la almohadilla en ratones. La presencia del VEGF también se identificó en el veneno de *P. porrasii* (Tabla 1), y este componente podría tener, junto con las PLA<sub>2</sub>s, un papel importante en el aumento de la permeabilidad vascular y la formación de edema. Este efecto es de relevancia clínica, ya que al causar compresión del tejido, puede dar lugar a condiciones isquémicas locales que contribuyen al desarrollo del daño tisular. Además, un edema de una magnitud considerable contribuirá a los efectos hipovolémicos e hipotensores del veneno que pueden conducir a un shock cardiovascular.

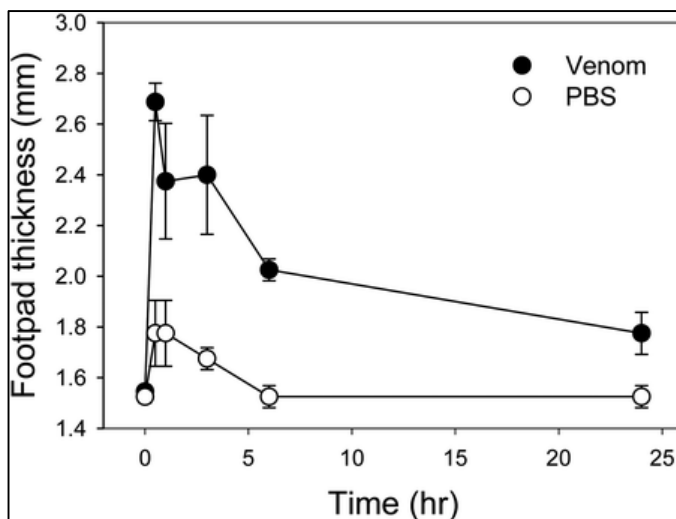


Figura 13. Evolución de la actividad inductora de edema del veneno de *Porthidium porrasii* en ratones. Los ratones recibieron una inyección subcutánea que contenía 3  $\mu\text{g}$  de veneno en 30  $\mu\text{l}$  de PBS, en la almohadilla derecha. Como control, la pata izquierda recibió el mismo volumen de PBS. El grosor de la almohadilla del pie se midió en diferentes momentos, como se describe en Métodos. Cada punto representa la media  $\pm$  desviación estándar de cuatro ratones. Las diferencias entre el veneno y el PBS son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en todos los tiempos medidos.

El veneno de *P. porrasii* fue letal por inyección intraperitoneal en ratones, con un  $\text{LD}_{50}$  estimado de 173  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  (con un intervalo de confianza del 95%: 121–294  $\mu\text{g}$ ; o 10  $\mu\text{g}/\text{g}$  de peso corporal), un valor muy similar al reportado para *P. nasutum* (178  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ ; 149–290  $\mu\text{g}$ ; Gutiérrez *et al.*, 2013). Esta potencia letal se puede considerar débil a moderada en comparación con la de los venenos de algunas especies de vipéridos que se encuentran en Costa Rica, que muestran una actividad letal 2 a 3 veces mayor en las mismas condiciones de ensayo (Bolaños, 1972).

La completa falta de información sobre casos clínicos de envenenamiento por *P. porrasii* impide establecer correlaciones con los datos de toxicidad experimental que se presentan aquí, pero los resultados permiten predecir los posibles signos y síntomas en accidentes eventuales de esta especie. Dado que el antiveneno polivalente utilizado para el tratamiento de las mordeduras de vipéridos en Costa Rica (y otros países de América Central) se prepara con una mezcla de venenos (*B. asper*, *C. simus* y *L. stenophrys*) que no incluyen ninguna especie de *Porthidium*, fue necesario evaluar el reconocimiento cruzado y la neutralización del veneno de *P. porrasii*. Se evaluó mediante titulación por ELISA el reconocimiento

cruzado del antiveneno polivalente con el veneno de *P. porrasi* y se evidenció un reconocimiento significativo, muy similar al de *P. nasutum*, pero, como se esperaba, más bajo que el del veneno de *B. asper* (Fig. 14). Este reconocimiento cruzado se tradujo en una potencia adecuada para la neutralización de la letalidad en ratones, en la que el antiveneno protegió a todos los animales en la proporción de 2 mg/ml de veneno/antiveneno. Así, sumado a los resultados preclínicos publicados anteriormente para *P. nasutum* y *P. ophryomegas* (Gutiérrez *et al.*, 2013), la neutralización paraespecífica por el antiveneno polivalente ICP apoya su uso en el tratamiento de envenenamientos por especies de *Porthidium*.

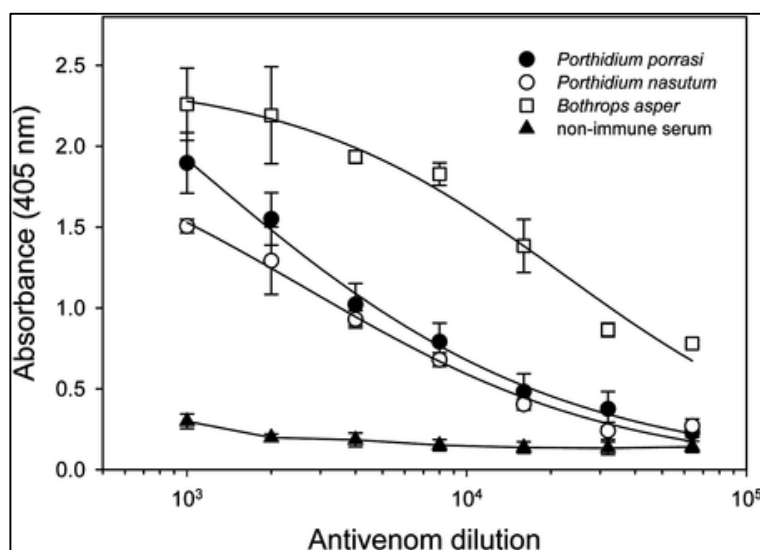


Figura 14. Inmunoreconocimiento del veneno de *Porthidium porrasi* por el antiveneno polivalente equino ICP. Se analizaron en paralelo los venenos de *P. nasutum* y *Bothrops asper* para comparación. Los pocillos de la microplaca se recubrieron con cada veneno y la unión de los anticuerpos equinos se determinó mediante la titulación del ELISA, como se describe en métodos. Un suero equino no inmune (antiveneno simulado) fue utilizado como control negativo (contra los pocillos recubiertos con veneno de *P. porrasi*). Cada punto representa la media  $\pm$  desviación estándar de los pozos por triplicado.

En general, las características compositivas y funcionales del veneno de *P. porrasi* tienen una gran semejanza con las de los otros tres venenos de *Porthidium* estudiados a la fecha. A nivel de composición de proteínas, la comparación de los cuatro venenos (Fig. 15) refleja una conservación general de las distribuciones de las familias de proteínas, con pequeñas variaciones.

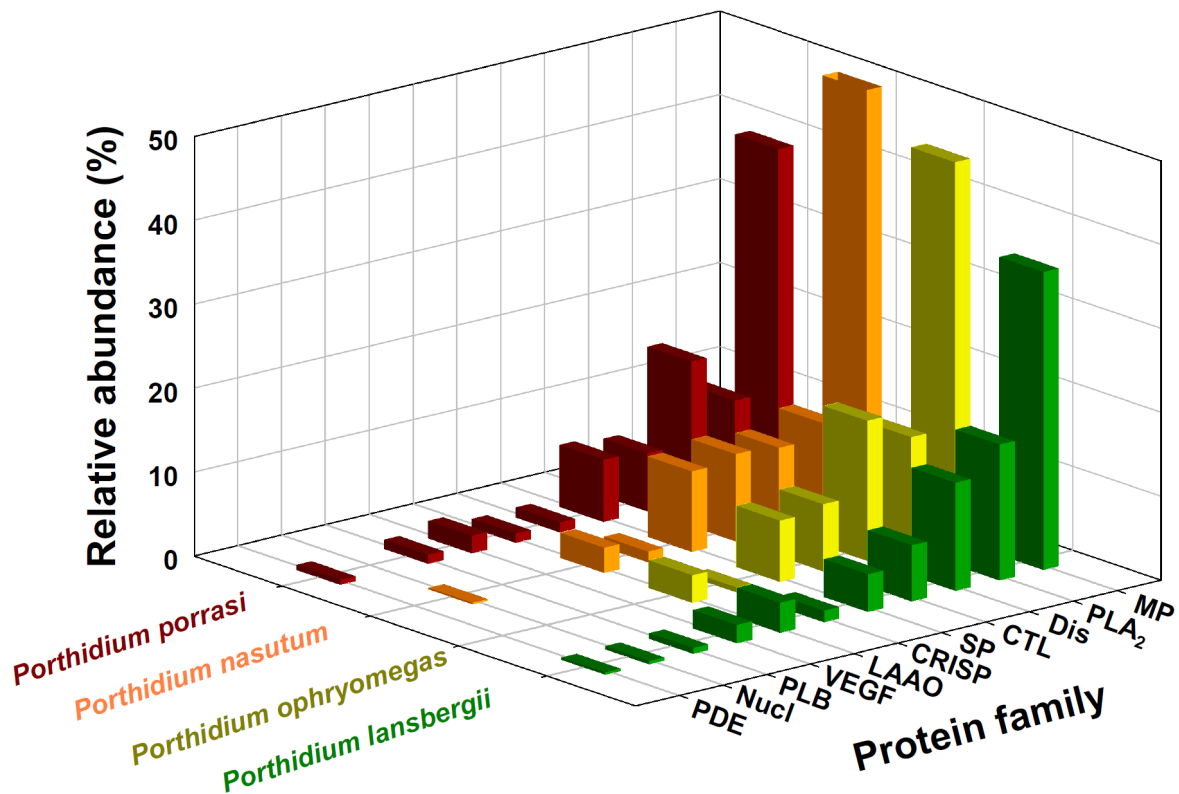


Figura 15. Comparación de las familias de proteínas de veneno de *Porthidium porrasi* con los venenos de otras especies de este género: *P. nasutum* y *P. ophryomegas* de Costa Rica (Lomonte et al., 2012) y *P. lansbergii lansbergii* de Colombia (Jiménez-Charris et al., 2015).

Los cuatro venenos están dominados por metaloproteinasas y muestran una abundancia relativa de disintegrinas que es poco usual en comparación con los venenos de vipéridos de la región (Lomonte *et al.*, 2014a). Las PLA<sub>2</sub>s están presentes dentro del rango de 10 a 16% del proteoma, a diferencia de otros géneros como *Agkistrodon* (Lomonte *et al.*, 2014b), en el que estas enzimas representan sus proteínas más abundantes. Finalmente, se observaron variaciones en la presencia/ausencia de algunos de los componentes menos abundantes como las proteínas VEGF, PLB, PDE y nucleotidasa, entre las cuatro especies (Fig. 15). Una pregunta difícil de responder es por qué los venenos de algunas especies congéneras tienden a conservarse generalmente, como es el caso actual de *Porthidium* o *Agkistrodon* (Lomonte *et al.*, 2014b), mientras que otros presentan una sorprendente variabilidad intragenérica, por ejemplo aquellos del género *Bothriechis* (Fernández *et al.*, 2010b; Pla *et al.*, 2017) o *Crotalus* (Boldrini-França *et al.*, 2010; Mackessy, 2010; Rokyta *et al.*, 2015; Strickland *et al.*, 2018).

Un factor que podría influenciar la conservación que se observa sea la dieta pues las serpientes del género *Porthidium* se alimentan de lagartijas, ranas y pequeños roedores (Solórzano, 2014) por lo que es de suponerse que la dieta no sea un factor evolutivo a nivel intraespecífico, sin embargo sí podría serlo entre juveniles y adultos de una misma especie, pues según se ha visto los juveniles se alimentan de algunas invertebrados y pequeñas lagartijas y ranas pero no de roedores. Sería interesante caracterizar en futuros estudios los venenos de las cinco especies adicionales de *Porthidium* para las cuales no existe información y poder determinar el papel real de la dieta y otros factores en la composición del veneno.



## 8 CONCLUSIONES

El proteoma del veneno de *Porthidium porrasi* está compuesto por al menos 10 familias de proteínas.

Las familias de proteínas identificadas mediante la estrategia de análisis utilizada corresponden a: las metaloproteinasas (36,5%), las disintegrinas (19,5%), las fosfolipasas A<sub>2</sub> (10,7%), las serina proteinasas (7,4%), las lectinas tipo C (6,9%), el factor de crecimiento endotelial vascular (2,1%), proteínas secretorias ricas en cisteína (1,2%), L-aminoacido oxidasas (1,1%), fosfolipasa B (1,1%) y fosfodiesterasa (0,6%).

En un modelo murino el veneno de *P. porrasi* presenta una potencia letal moderada, actividades hemorrágicas e inflamatorias altas, y baja miotoxicidad.

Las pruebas realizadas *in vitro* también corroboraron la actividad proteolítica y fosfolipasa de las proteínas identificadas dentro de la composición del veneno.

En el veneno de *P. porrasi*, su composición y actividades tóxicas, siguen una tendencia similar a las de otras especies de *Porthidium* estudiadas hasta la fecha, dominadas por las metaloproteinasas, las disintegrinas y las PLA<sub>2</sub>s.

La letalidad del veneno de *P. porrasi*, en un modelo murino, fue neutralizada adecuadamente por el antiveneno polivalente del ICP, lo cual indica que este podría ser usado en eventuales envenenamientos humanos.

## REFERENCIAS

- Alape-Girón, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M. & Calvete, J. (2008). Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. *J. Proteome Res.*, 7(8), 3556–3571. doi: 10.1021/pr800332p.
- Baldo, C., Jamora, C., Yamanouye, N., Zorn, T.M., & Moura-da-Silva, A.M. (2010). Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and *in situ* hydrolysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 4(6), e727. doi: 10.1371/journal.pntd.0000727.
- Bolaños, R. (1972). Toxicity of Costa Rican snake venoms for the white mouse. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 21(3), 360-363.
- Boldrini-França, J., Corrêa-Netto, C., Silva, M.M., Rodrigues, R.S., De La Torre, P., Pérez, A., Soares, A.M., Zingali, R.B., Nogueira, R.A., Rodrigues, V.M., Sanz, L., & Calvete, J.J. (2010). Snake venomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *J. Proteomic*, 73(9), 1758-1776. doi: 10.1016/j.jprot.2010.06.001.
- Bryson, R., Nieto-Montes de Oca, A., & Reyes Velasco, J. (2008). Phylogenetic position of *Porthidium hespere* (Viperidae: Crotalinae) and phylogeography of arid-adapted hognosed pitvipers based on mitochondrial DNA. *Copeia*, (1), 172-178.
- Calvete, J.J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., & Gutiérrez, J.M. (2009). Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Letters*, 583, 1736-1743. doi: 10.1016/j.febslet.2009.03.029.

- 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. doi: 10.3390/toxins6123388.
- Castoe, T.A., Sasa, M., & Parkinson, C. (2005). Modeling nucleotide evolution at the mesoscale. The phylogeny of the Neotropical pitvipers of the *Porthidium* group (Viperidae: Crotalinae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 37(3), 881-898.
- Chippaux, J.P. (2017). Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 11(6), 1-39. doi: 10.1371/journal.pntd.0005662.
- Fernández, J., Gutiérrez, J.M., Angulo, Y., Sanz, L., Juárez, P., Calvete, J.J., & Lomonte, B. (2010a). Isolation of an acidic phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: biochemical and toxicological characterization. *Biochimie*, 92(3), 273-283. doi: 10.1016/j.biochi.2009.12.006.
- Fernández, J., Lomonte, B., Sanz, L., Angulo, Y., Gutiérrez, J.M., & Calvete, J.J. (2010b). Snake venomomics of *Bothriechis nigroviridis* reveals extreme variability among palm viper venoms: different evolutionary solutions for the same trophic purpose. *J. Proteome Res.*, 9 (8), 4234-4241. doi: 10.1021/pr100545d.
- Fernández, J., Caccin, P., Koster, G., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Montecucco, C., & Postle, A.D. (2013). Muscle phospholipid hydrolysis by *Bothrops asper* Asp49 and Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins - distinct mechanisms of action. *FEBS J.*, 280 (16), 3878-3886. doi: 10.1111/febs.12386.
- Fernández, P. & Gutiérrez, J.M. (2008). Mortality due to snakebite envenomation in Costa Rica (1993-2006). *Toxicon*, 52(3), 530-533. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.06.018.

- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., & Díaz, C. (2005). Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*, 45(8), 997-1011.
- Gutiérrez, J.M., Wan-Chih, T., Pla, D., Solano, G., Lomonte, B., Sanz, L., Angulo, Y., & Calvete, J.J. (2013). Preclinical assessment of a polyspecific antivenom against the venoms of *Cerrophidion sasai*, *Porthidium nasutum* and *Porthidium ophryomegas*: Insights from combined antivenomics and neutralization assays. *Toxicon*, 64, 60-69. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.12.024.
- 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. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.11.020.
- Gutiérrez, J.M. (2014). Current challenges for confronting the public health problem of snakebite envenoming in Central America. *J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 20 (1), 7. doi: 10.1186/1678-9199-20-7.
- Gutiérrez, J.M. (2014). Reducing the impact of snakebite envenoming in Latin America and the Caribbean: achievements and challenges ahead. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.*, 108 (9), 530-537. doi: 10.1093/trstmh/tru102.
- Gutiérrez, J.M., Solano, G., Pla, D., Herrera, M., Segura, A., Vargas, M., Villalta, M., Sánchez, A., Sanz, L., Lomonte, B., León, G. & Calvete, J.J. (2017). Preclinical Evaluation of the Efficacy of Antivenoms for Snakebite Envenoming: State-of-the-Art and Challenges Ahead. *Toxins*, 9(5), 163. doi: 10.3390/toxins9050163.
- Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Rucavado, A., Chaves, F. (2011). Venenos de serpientes de la familia Viperidae en América: bioquímica y fisiopatología. En: G. D'Suze, G. Corzo-Burguete & J.F. Paniagua-Solís (Eds.), *Emergencias Médicas por Animales Ponoñosos en las Américas* (pp. 461-487). México: Dicresa.

- Hansson, E., Sasa, M., Mattisson, K., Robles, A., & Gutiérrez, J.M. (2013). Using geographical information systems to identify populations in need of improved accessibility to antivenom treatment for snakebite envenoming in Costa Rica. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 7(1), e2009. doi: 10.1371/journal.pntd.0002009.
- Harrison, R.A., & Gutiérrez, J.M. (2016). Priority actions and progress to substantially and sustainably reduce the mortality, morbidity and socioeconomic burden of tropical snakebite. *Toxins (Basel)*, 8(12), 351. doi: 10.3390/toxins8120351.
- Hess, P.L., Squaiella-Baptistão, C.C. Toxinas animais: Serpentes da família Colubridae e seus venenos. *Estud. Biol.* 34(83), 135-142. doi: 10.7213/estud.biol.7326
- Jiménez-Charris, E., Montealegre-Sánchez, L., Solano-Redondo, L., Mora-Obando, D., Camacho, E., Castro-Herrera, F., Fierro-Pérez, L., & Lomonte, B. (2015). Proteomic and functional analyses of the venom of *Phortidium lansbergii lansbergii* (Lansberg's hognose viper) from the Atlantic Department of Colombia. *J. Proteomics*, 114, 287-299. doi: 10.1016/j.jprot.2014.11.016.
- Jiménez-Charris, E., Montealegre-Sánchez, L., Solano-Redondo, L., Castro-Herrera, F., Fierro-Pérez, L., & Lomonte, B. (2016). Divergent functional profiles of acidic and basic phospholipases A<sub>2</sub> in the venom of the snake *Porthidium lansbergii lansbergii*. *Toxicon*, 119, 289-298. doi: 10.1016/j.toxicon.2016.07.006.
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A.R., de Silva, N., Gunawardena, N.K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lalloo, D.G., & de Silva, H.J. (2008). The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med.*, 5(11), e218. doi: 10.1371/journal.pmed.0050218.

- Lamar, W.W., & Sasa, M. (2003). A new species of hognose pitviper genus *Porthidium* from the southwestern Pacific of Costa Rica (Serpentes: Viperidae). *Rev. Biol. Trop.*, *51*(3-4), 797-804.
- Lomonte, B. (1994). *Tissue damage and inflammation induced by snake venoms*. Ph.D. Dissertation, Göteborgs Universitet, Sweden. ISBN 91-628-1162-2.
- Lomonte, B., & Gutiérrez, J.M. (2011). Phospholipases A<sub>2</sub> from Viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle damage? *Acta Chim. Slov.*, *58*(4), 647-659.
- Lomonte, B., Rey-Suárez, P., Wan-Chih, T., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J.M., & Calvete, J.J. (2012). Snake venomomics of the pit vipers *Porthidium nasutum*, *Porthidium ophryomegas*, and *Cerrophidion godmani* from Costa Rica: Toxicological and taxonomical insights. *J. Proteomics.*, *75*(5), 1675-1689. doi: 10.1016/j.jprot.2011.12.016.
- Lomonte, B., & Calvete, J.J. (2017). Strategies in 'snake venomomics' aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* *23*, 26. doi: 10.1186/s40409-017-0117-8.
- Lomonte, B., Fernández, J., Sanz, L., Angulo, Y., Sasa, M., Gutiérrez, J.M., & Calvete, J.J. (2014a). Venomous snakes of Costa Rica: Biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomomics. *J. Proteomics*, *105*, 323-339. doi: 10.1016/j.jprot.2014.02.020.
- Lomonte, B., Tsai, W.C., Ureña-Díaz, J.M., Sanz, L., Mora-Obando, D., Sánchez, E.E., Fry, B.G., Gutiérrez, J.M., Gibbs, H.L., & Calvete, J.J. (2014b). Venomomics of new world pit vipers: genus-wide comparisons of venom proteomes across *Agkistrodon*. *J. Proteomics* *96*, 103-116. doi: 10.1016/j.jprot.2013.10.036.

- Mackessy, S.P. (2010). Evolutionary trends in venom composition in the Western Rattlesnakes (*Crotalus viridis sensu lato*): toxicity vs. tenderizers. *Toxicon*, 55(8), 1463-1474. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.02.028.
- Pla, D., Sanz, L., Sasa, M., Acevedo, M.E., Dwyer, Q., Pérez, A., Rodríguez, Y., Lomonte, B., & Calvete, J.J. (2017). Proteomic analysis of venom variability and ontogeny across the arboreal palm-pitvipers (genus *Bothriechis*). *J. Proteomics*, 152, 1-12.
- Rokyta, D.R., Wray, K.P., McGivern, J.J., & Margres, M.J. (2015). The transcriptomic and proteomic basis for the evolution of a novel venom phenotype within the Timber Rattlesnake (*Crotalus horridus*). *Toxicon*, 98, 34-48. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.02.015.
- Rojas, G., Bogarín, G., & Gutiérrez J.M. (1997). Snakebite mortality in Costa Rica. *Toxicon*, 35(11):1639-1643.
- Sasa, M., Chaves, G., & Porras, L. (2010). The Costa Rican Herpetofauna: Conservation Status and Future Perspectives. En: LD Wilson, JH Twonsend & JD Johnson (Eds), *Conservation of Mesoamerican Amphibians and Reptiles*. (pp. 510-603). Utah, EEUU: Eagle Mountain Publishing, LC.
- Savage, J. (2002). *The amphibians and reptiles of Costa Rica: a herpetofauna between two continents, between two seas*. Chicago, EEUU: The University of Chicago Press.
- Silva, H.J., Kasturiratne, A., Pathmeswaran, A., & Lalloo, D.G. (2013). Snakebite: the true disease burden has yet to be determined. *Ceylon Med. J.*, 58 (3), 93-95. doi: 10.4038/cmj.v58i3.6101.
- Solórzano, A. (2004). *Serpientes de Costa Rica: Distribución, taxonomía e historia natural*. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: Editorial INBio,

- Strickland, J.L., Mason, A.J., Rokyta, D.R., & Parkinson, C.L. (2018). Phenotypic variation in Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus*) venom is driven by four toxin families. *Toxins (Basel)*, *10*(4), e135. doi: 10.3390/toxins10040135.
- Tasoulis, T., & Isbister, G.K. (2017). A review and database of snake venom proteomes. *Toxins (Basel)*, *9*(9):290. doi: 10.3390/toxins9090290.
- Vargas, L.J., Londoño, M., Quintana, J.C., Rua, C., Segura, C., Lomonte, B., & Núñez, V. (2012). An acidic phospholipase A<sub>2</sub> with antibacterial activity from *Porthidium nasutum* snake venom. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, *161* (4), 341-347. doi: 10.1016/j.cbpb.2011.12.010.
- Vindas, J., Carrera, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., Sanz, L. & Fernández, J. (2018). A novel pentameric phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin (PophPLA<sub>2</sub>) from the venom of the pit viper *Porthidium ophryomegas*. *Int. J. Biol. Macromol.* *118*, 1-8.
- World Health Organization. 2007. *Rabies and envenoming: A Neglected Public Health Issue*. World Health Organization. Geneva, Switzerland. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/?term=Rabies%20and%20envenoming%3A%20A%20Neglected%20Public%20Health%20Issue>