

## Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



### “CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE UNA METALOPROTEASA DEL VENENO DE *Bothrops roedingeri* POR APROXIMACIÓN PROTEÓMICA”

Tesis Presentada por el Bachiller:

**Campos Gonzales, Juan Carlos**

Para optar el Título Profesional de:

**Ingeniero Biotecnólogo**

Asesores:

**Blgo. Paz Aliaga Iván**

**Ph.D. Ponce Soto Luis Alberto**

AREQUIPA – PERU

2018

**UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas**  
**y Biotecnológicas**  
**Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica**

Expediente N°. **16022971**  
N° Trámite en Fac. **292-2016**  
Fecha Recep. Fac. **02-06-2016**

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **CAMPOS GONZALES, Juan Carlos**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

**"CARACTERIZACION ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE UNA METALOPROTEASA DEL VENENO DE *Bothrops roedingeri* POR APROXIMACION PROTEOMICA"**

DICTAMINADORES: 1) **Dr. Fredy Zegarra Aragon** 2) **Mgter. Jaime Barreda del Carpio**

**DICTAMEN DE PLAN:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Titulos de la Facultad

Atentamente

FIRMAS:  **Jaime** (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA **28/06/2016**

ASESOR: **Blgo. Carlos Paz Aliaga**

**DICTAMEN ASESORÍA:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que se ha verificado el cumplimiento de los objetivos y redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes por lo cual considero que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Titulos de la Facultad

Atentamente

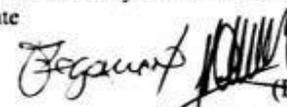
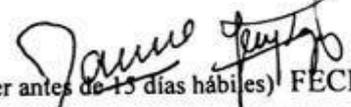
FIRMA  FECHA **14/11/2017**

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

1) **Dr. José Villanueva Salas** 2) **Dr. Fredy Zegarra Aragón** 3) **Mgter. Jaime Barreda del Carpio**

**DICTAMEN FINAL:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Titulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA   (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA **19/03/2018**

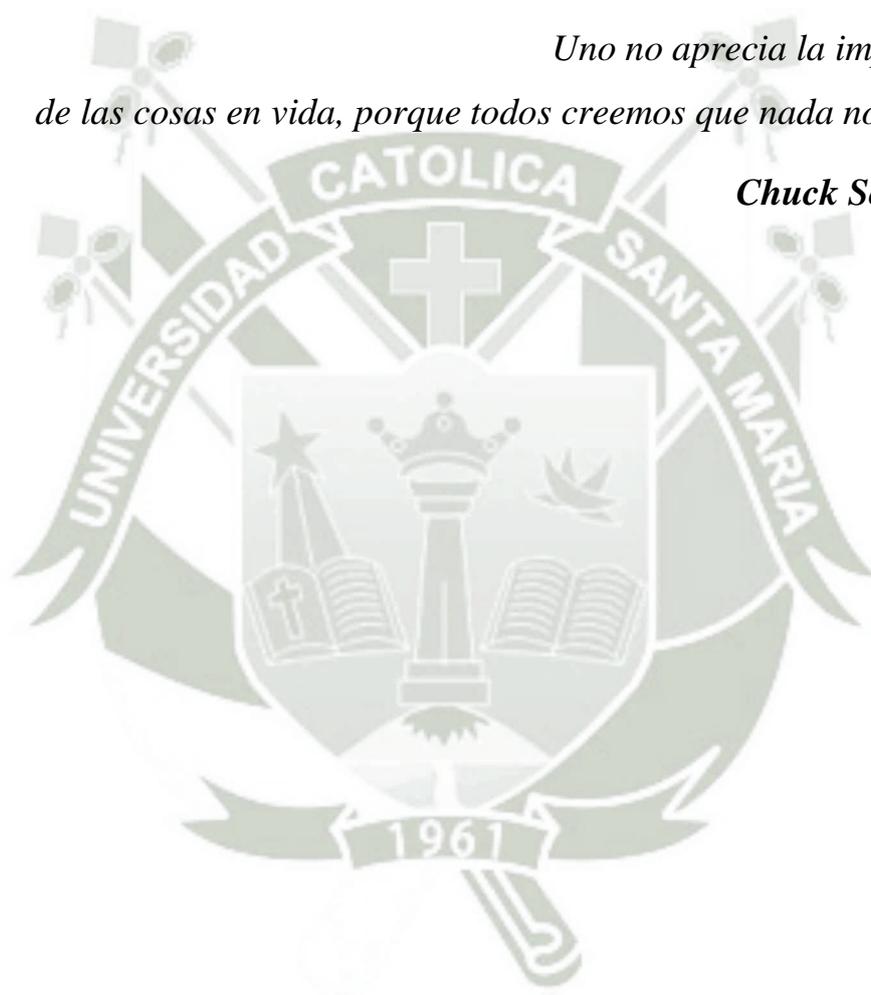
JURADOS: PRESIDENTE  
VOCAL  
SECRETARIO

FECHA **17/04/18** HORA **19.00** LOCAL **C-402**

FIRMA DEL DECANO  FECHA **05/04/18**

*Uno no aprecia la importancia  
de las cosas en vida, porque todos creemos que nada nos pasara.*

**Chuck Schuldiner**



## Dedicatoria

*Quiero dedicar y agradecer este logro especialmente a mis dos Madres: María y Sonia por ser las personas que me apoyaron al 100% en buenas y malas, levantándome los ánimos y estar conmigo en los peores momentos, ayudándome a perseverar e insistir en salir adelante en esta etapa Universitaria y en mi formación de Profesional.*

### Agradecimientos

- *Quiero Agradecer especialmente a mis Abuelitos Juan y María por el apoyo a lo largo de mi vida y que puedan estar acompañándome en cada logro que consigo.*
- *A mi Madre por ser la única persona que insistió en que sea alguien hoy en día, al igual que Luis (Cholo) y mis dos hermanos Jherson y Samara por estar siempre conmigo en buenas y malas.*
- *A mis 3 tíos Huberth, Juan y Alfredo y sus respectivas familias, tías y primos por tener siempre consejos, palabras de aliento y por ser figuras paternas a lo largo de mi vida tanto a mi lado como a la distancia.*
- *A mis 4 amigos de toda la vida Ronny, Polar, Víctor, Jeanpierre por el apoyo y palabras que siempre compartimos en nuestras reuniones y los años que llevamos apoyándonos.*
- *A la Universidad Católica de Santa María especialmente la Facultad de Biotecnología por ser el lugar donde me forme profesionalmente y también por ser el lugar de muchas experiencias vividas, por conocer buenas amistades y buenos profesores.*
- *Al Dr. Luis Ponce por considerarme un amigo y aceptarme ser su tesista, investigador teórico-práctico desde el año 2015 hasta la actualidad y al Profesor Iván Paz por el apoyo teórico en esta investigación.*
- *A mis jurados al Dr. José Villanueva, Mgter Jaime Barreda y la Dra. Yenny López por los consejos, sugerencias y el tiempo que me brindaron.*
- *Una mención especial al Dr. Freddy Zegarra por ser el jurado inicial en el cual pude obtener más conocimientos, buenos consejos y enfocarme al 100% en el área.*
- *Agradecer a la Universidad Nacional de San Agustín (Arequipa) y a la Universidad Estadual "CAMPINAS" (Brasil), por el apoyo en esta investigación.*
- *A todas las personas que me brindaron confianza, apoyo y buenas vibras en este pequeño paso que doy, sin olvidar a las personas especiales XX que hoy ya no están conmigo y ese apoyo me lo dan a lo lejos... **Gracias***

## Índice de Contenido

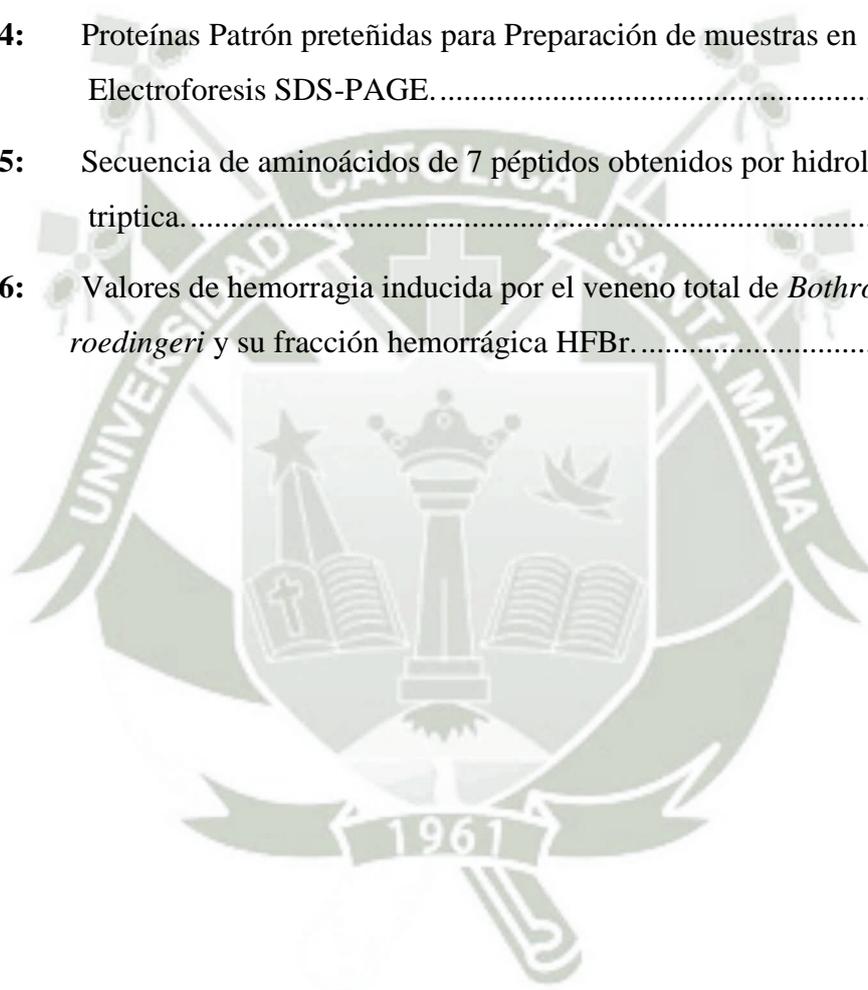
<b>Dedicatoria</b> .....	ii
<b>Agradecimientos</b> .....	iii
<b>Índice de Contenidos</b> .....	iv
<b>Índice de Tablas</b> .....	vii
<b>Índice de Figuras</b> .....	viii
<b>Glosario</b> .....	ix
<b>Introducción</b> .....	x
<b>Objetivos</b> .....	xii
○ Objetivo General.....	xii
○ Objetivos Específicos .....	xii
<b>Hipótesis</b> .....	xiii
<b>Resumen</b> .....	xiv
<b>Abstract</b> .....	xvi
<b>Capítulo I: Marco Teórico</b> .....	1
1.1 Características generales del veneno de serpiente .....	1
1.2 Efectos Tóxicos .....	2
1.3 Componentes Tóxicos .....	3
1.4 Metaloproteasas .....	5
1.5 Clasificación de las Metaloproteasas.....	5
1.6 Organización en Multidominios .....	7
1.7 Caracterización enzimática de las Metaloproteasas de veneno de Serpientes...10	
1.8 Principales Serpientes Venenosas del Perú .....	11
1.9 <i>Bothrops roedingeri</i> .....	13
1.9.1 Taxonomía.....	13
1.9.2 Ubicación Geográfica .....	14

1.9.3 Características.....	15
1.10 Usos del Veneno.....	16
1.11 Conocimientos de la Proteómica.....	16
1.12 Identificación y caracterización de Proteínas.....	16
1.13 Espectrometría de Masas.....	17
1.14 Estudio bioinformático en la era Post-Genómica.....	18
1.15 Software y Herramientas Bioinformáticas.....	18
1.15.1 Protein Pilot TM.....	19
1.15.2 4000 Series Explorer TM.....	19
1.15.3 DNASTar.....	19
• EditSeq.....	19
• MegAlign.....	19
• Protean.....	19
1.15.4 BLAST.....	20
• Blast NCBI.....	20
1.15.5 SWISS – MODEL.....	20
<b>Capítulo II: Materiales y Métodos.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Ubicación.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Materiales.....</b>	<b>22</b>
2.2.1 Materiales Biológicos.....	22
2.2.2 Materiales de Laboratorio.....	22
2.2.3 Equipos, Aparatos e Instrumentos.....	22
2.2.4 Reactivos.....	23
2.2.5 Materiales Varios.....	24
2.2.6 Software y Materiales Bioinformáticas.....	24
<b>2.3 Métodos.....</b>	<b>25</b>
2.3.1 Lugar de Ejecución y recolección de muestras.....	25

2.3.2 Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.....	25
2.3.3 Actividad de la Metaloproteasa .....	26
2.3.4 Electroforesis en SDS-PAGE .....	27
• Montaje del sistema de electroforesis.....	27
• Preparación de las muestras.....	27
• Desarrollo de la Electroforesis .....	27
2.3.5 Caracterización de péptidos por Espectrometría de Masa (ESI) .....	28
2.3.6 Secuenciación “ <i>de novo</i> ” de péptidos tripticos por Espectrometría de Masa (MALDI TOF/TOF ABSciex 4800).....	29
2.3.7 Estudio Bioinformático de las enzimas .....	29
2.3.7 Actividad Hemorrágica.....	30
• Método en Piel.....	30
<b>2.4 Flujograma de Procesos .....</b>	<b>31</b>
<b>Capítulo III: Resultados y Discusión .....</b>	<b>32</b>
<b>Capítulo IV: Conclusiones y Recomendaciones .....</b>	<b>54</b>
• Conclusiones.....	54
• Recomendaciones .....	55
<b>Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>56</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>62</b>
Anexo 1: Tabla de componentes y contenidos para Montaje del sistema de Electroforesis .....	62
Anexo 2: Preparación de muestra y tampón de corrida.....	63
Anexo 3: Tampón de la Muestra y Tampón de Corrida .....	64
Anexo 4: Colorante y Descolorante de Azul de Coomasie .....	65
Anexo 5: Tutoriales del uso del DNA STAR (EditSeq y MegAlign) .....	66
Anexo 6: Árbol Filogenético .....	72
Anexo 7: Carta de Invitación de la Universidad Estadual Campinas.....	73

## Índice de Tablas

	<b>Pág.</b>
<b>TABLA 1:</b> Principales serpientes venenosas del Perú.....	12
<b>TABLA 2:</b> Características Diferenciales entre Serpientes Venenosas De dos Familias importantes en el Perú.....	13
<b>TABLA 3:</b> Clasificación Taxonómica y Nomenclatura Científica del <i>Bothrops roedingeri</i> .....	14
<b>TABLA 4:</b> Proteínas Patrón preteñidas para Preparación de muestras en Electroforesis SDS-PAGE.....	28
<b>TABLA 5:</b> Secuencia de aminoácidos de 7 péptidos obtenidos por hidrolisis tríptica.....	45
<b>TABLA 6:</b> Valores de hemorragia inducida por el veneno total de <i>Bothrops roedingeri</i> y su fracción hemorrágica HFBr.....	52



## Índice de Figuras

	<b>Pág.</b>
<b>FIGURA 1:</b> Proteínas encontradas en los venenos de serpientes.....	4
<b>FIGURA 2:</b> Familias de metaloproteasas dependientes de Zinc .....	7
<b>FIGURA 3:</b> Organización Multimodular de algunas Metaloproteasas .....	8
<b>FIGURA 4:</b> Ubicación Geográfica de la especie <i>Bothrops roedingeri</i> en la costa .....	14
<b>FIGURA 5:</b> Serpiente <i>Bothrops roedingeri</i> .....	15
<b>FIGURA 6:</b> Sustrato Cromogénico N-p-Tosyl-L-Arginina metil ester (TAME) .....	26
<b>FIGURA 7:</b> Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.....	34
<b>FIGURA 8:</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida .....	37
<b>FIGURA 9:</b> Muestras en contacto con sustrato cromogénico .....	39
<b>FIGURA 10:</b> Medida de la Actividad de la Metaloproteasa .....	40
<b>FIGURA 11:</b> Espectro de masa deconvolucionada de la fracción HFBr .....	42
<b>FIGURA 12:</b> Espectro de masa cruda de la fracción HFBr .....	43
<b>FIGURA 13:</b> Familia y Superfamilia de la Búsqueda en BLAST .....	47
<b>FIGURA 14:</b> Estudio comparativo de homología secuencial y alineamiento del factor hemorrágico HFBr.....	49
<b>FIGURA 15:</b> Dorsos depilados del ratón para las muestras intradérmicas .....	51
<b>FIGURA 16:</b> Diámetro de hemorragia producido por veneno total.....	51

## Glosario

- ACE** : Enzima convertora de angiotensina.
- Foseta Loreal:** Cavidad Termo receptora ubicada entre los ojos y el orificio del hocico de la serpiente.
- HFBr** : Fracción Hemorrágica de *Bothrops roedingeri*
- IPGs** : Gradiente de pH inmovilizado
- FtsH** : Gen mutante que cumple funciones de sensibilidad a la temperatura y tolerancia a la colicina debido a que los mutantes se exponen a una alta frecuencia de lisogenización.
- SVMP:** Metaloproteasas de veneno de serpiente
- ADAMTS:** Desintegrina y Metaloproteinasa con motivos de trombospondina
- ESI** : Ionización por Electro spray
- MALDI TOF/TOF:** MALDI= desorción/ionización láser asistida por matriz  
TOF = Tiempo de vuelo
- PMSF** : Fenil metil sulfonilo
- FACTOR V:** Proacelerina, (factor lábil) pegada a la membrana plaquetaria
- FACTOR VII:** Factor antihemofílico A, está pegado a la membrana plaquetaria
- FACTOR X:** Factor de Stuart-Prower, está pegado a la membrana plaquetaria.
- HIC** : Cromatografía de Interacción Hidrofóbica
- PMF** : Huella Peptídica

## INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista científico, los estudios de aproximación Proteómica, son sin duda los primeros a ser realizados en nuestro país y como tal reviste de enorme trascendencia desde la generación de conocimiento hasta su posible aplicación. Se puede decir que hubo tres causas para el desarrollo de la Proteómica:

- La secuenciación de genomas a gran escala y el desarrollo de bases de datos de proteínas.
- El desarrollo de técnicas de espectrometría de masas para analizar proteínas y péptidos.
- Los avances realizados en la separación de proteínas mediante electroforesis con la introducción de los gradientes de pH inmovilizados (IPGs).<sup>[1]</sup>

La muestra a caracterizar es el veneno de *Bothrops roedingeri*, por la utilidad y características propiamente dichas que posee, una característica es que presenta proteínas con acción proteolítica (proteasas) dando a entender que su función principal es la descomposición de proteínas para aminoácidos, estas proteínas son llamadas metaloproteasas; una característica específica es que necesita la presencia de un metal como el Zinc. Se tiene reportes que esta proteína está relacionada a los orígenes del cáncer debido a que su expresión está ubicada en altos niveles de tumores humanos y relacionados con la metástasis. Por eso se menciona que puede tomar esta proteasa como tratamientos de cáncer para poder inhibir su expresión.

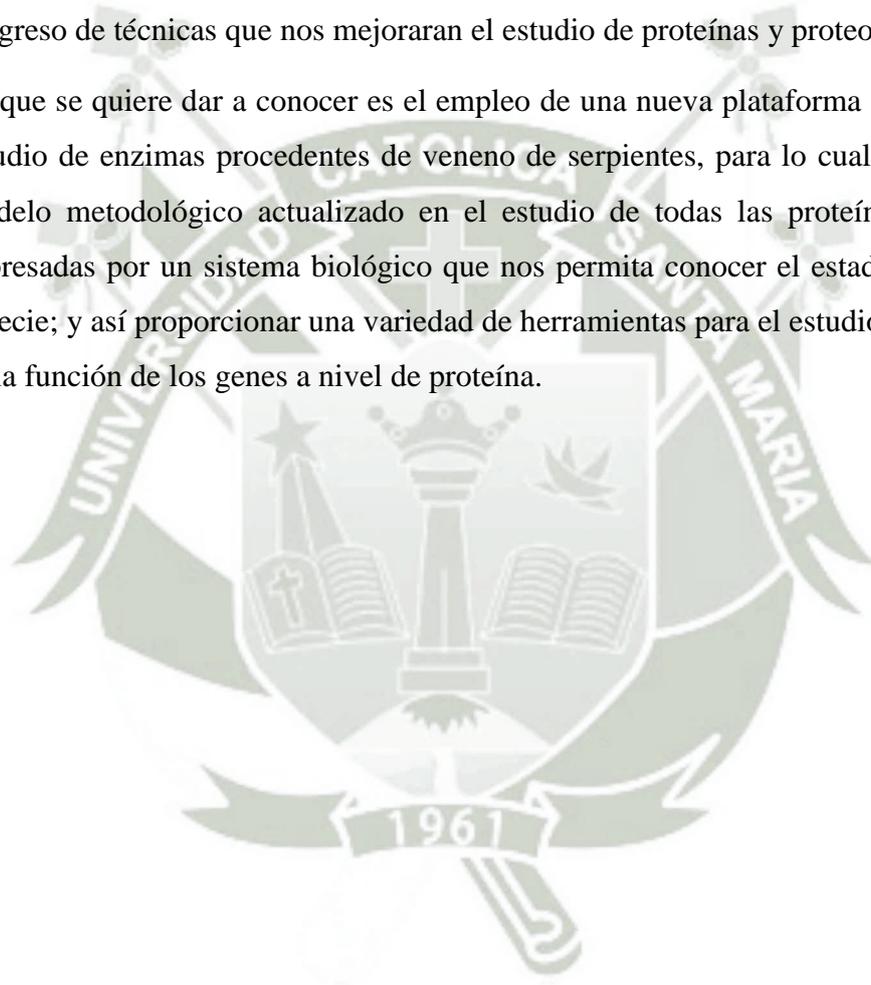
El veneno de serpiente perteneciente a la familia *viperidae* presenta alto porcentaje de metaloproteasas por ende tiene gran relevancia epidemiológica porque representan accidentes ofídicos de mayor incidencia en el Sur de América, pudiendo ocasionar frecuentemente disturbios funcionales permanentes e incluso la pérdida del miembro afectado.<sup>[2]</sup>

El conocimiento de la presencia de metaloproteasas presentes en el veneno de serpientes, es común, sin embargo la presencia de esta familia de proteínas en el veneno de serpiente de *Bothrops roedingeri*, no es conocido, a pesar de algunos estudios previos, nos muestran su presencia pero para eso es necesario purificarla sin pérdida de la actividad biológica, con el fin de estudiarla de su perspectiva estructural-

función, y comprender no sólo algunos mecanismos de la patogénia, sino desde el punto de vista estructural pueda brindarnos información sobre el desarrollo futuro de un posible agente terapéutico.

El estudio realizado por espectrometría de masas está induciendo la reaparición de aproximaciones bioquímicas para el estudio de la función de las proteínas, como se mencionó para el análisis de un proteoma específico se basará en electroforesis y cromatografías; para estos dos casos se continuará con espectrometría de masas como una cadena de metodologías debido a que existe una gran utilidad en la mejora y en el progreso de técnicas que nos mejoraran el estudio de proteínas y proteomas.

Lo que se quiere dar a conocer es el empleo de una nueva plataforma moderna en el estudio de enzimas procedentes de veneno de serpientes, para lo cual se sugiere un modelo metodológico actualizado en el estudio de todas las proteínas o enzimas expresadas por un sistema biológico que nos permita conocer el estado actual de la especie; y así proporcionar una variedad de herramientas para el estudio a gran escala de la función de los genes a nivel de proteína.



## Objetivos

### Objetivo General

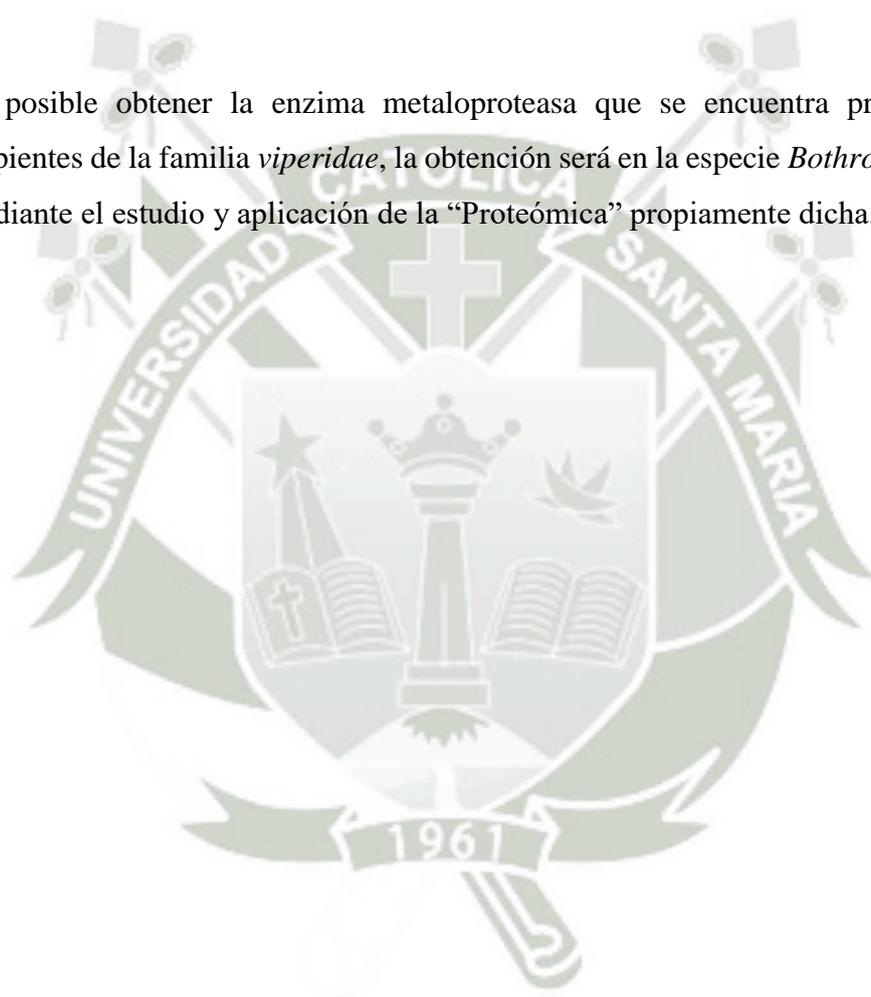
- Caracterizar Estructural y Funcionalmente las metaloproteasas a partir del veneno total de *Bothrops roedingeri*, desde una perspectiva Proteómica.

### Objetivos Específicos

- 1) Purificar una metaloproteasa a partir del veneno total de *Bothrops roedingeri* a través de cromatografía líquida de interacción hidrofóbica y una Electroforesis en SDS PAGE.
- 2) Determinación de la actividad proteolítica de la metaloproteasa.
- 3) Determinación de la masa intacta del veneno por la técnica de Espectrometría de masas (ESI) y Caracterización de la estructura primaria de “*novo*” por Espectrometría de masas (MALDI/TOF).
- 4) Realizar un Estudio Bioinformático para el estudio y la caracterización funcional de la proteína.
- 5) Caracterizar la metaloproteasa procedente del veneno de *Bothrops roedingeri*, a través de la actividad hemorrágica.

## HIPÓTESIS

Es posible obtener la enzima metaloproteasa que se encuentra presente en las serpientes de la familia *viperidae*, la obtención será en la especie *Bothrops roedingeri*, mediante el estudio y aplicación de la “Proteómica” propiamente dicha.



## Resumen

Las especies pertenecientes al género *Bothrops* son muy importantes en el campo de la investigación por poseer enzimas proteolíticas, la cual tiene como características principales tener una variada acción biológica y contribuir con desórdenes en coagulación, necrosis y formación de hemorragias por ende se necesita una plataforma moderna en el estudio de estas enzimas para así poder sugerir un modelo metodológico actualizado en el estudio de todas las proteínas expresadas por un sistema biológico que nos permita conocer el estado actual de la especie, así como utilizar esta información en la construcción biotecnológica de informaciones con posibles fines terapéuticos futuros.

El primer objetivo trazado es purificar y caracterizar una de las enzimas proteolíticas presentes en el veneno de la serpiente peruana *Bothrops roedingeri* como es la metaloproteasa para lo cual se trabajó inicialmente mediante cromatografía de Interacción Hidrofóbica con columnas del sistema HITrap en la cual nos dio como resultado la presencia de 6 picos, siendo el pico 2 aquel que mostró actividad hemorrágica siendo denominada HFBr, con esta fracción obtenida se realizó una electroforesis SDS PAGE en condición reductora con uso de DTT que evidenció una masa molecular de 23 kDa y en condición no reductora una masa de ~27 kDa. , para la determinación de la masa intacta del veneno recurrimos al método de Espectrometría de Masas obteniendo nuestros resultados crudos e intactos por Electrospray (ESI)

dando un resultado de 27342.6641 Da. Se realizó una caracterización de la estructura primaria de “*novo*” por hidrolisis trípica (MALDI/TOF) obteniendo 6 secuencias de aminoácidos para posteriormente realizar un análisis Bioinformático a través de la Base de datos SWISS-PROT para luego realizar un análisis de homología secuencial con uso del Software DNASTar especificando que la proteína estudiada es una Metaloproteasa de la familia de las Hemorraginas. Finalmente se hizo pruebas para su caracterización biológica para determinar la actividad hemorrágica con un método de inoculación intradérmica en ratones obteniendo los valores de hemorragia inducida de *Bothrops roedingeri* correspondiendo a  $9.5 \text{ mm} \pm 0.15 \text{ mm}$  para el veneno total y de  $8 \pm 0.12 \text{ mm}$  para la fracción HFBr, respectivamente. El procedimiento realizado como es la “Proteómica” nos sirvió para la obtención y caracterización de metaloproteasas procedentes de la especie *Bothrops* para un futuro fin científico, tecnológico y terapéutico.

**Palabras clave:** *HITrap, Cromatografía, SDS PAGE, Espectrometría de Masas, ESI, MALDI/TOF, Hidrolisis, Actividad hemorrágica, Proteómica.*



### Abstract

The species belonging to the genus *Bothrops* are very important in the field of research for possessing proteolytic enzymes, which has as main characteristics to have a varied biological action and contribute to disorders in coagulation, necrosis and hemorrhage formation therefore a modern platform is needed in the study of these enzymes to be able to suggest an updated methodological model in the study of all the proteins expressed by a biological system that allows us to know the current status of the species, as well as to use this information in the biotechnological construction of information with possible future therapeutic purposes. The first objective is to purify and characterize one of the proteolytic enzymes present in the venom of the Peruvian snake *Bothrops roedingeri* as it is the metalloprotease for which it was initially worked with Hydrophobic Interaction chromatography with columns of the HITrap system in which it resulted the presence of 6 peaks, peak 2 being the one that showed hemorrhagic activity being called HFBr, with this fraction obtained an SDS PAGE electrophoresis was performed in reducing condition with DTT use that showed a molecular mass of 23 kDa and in a non-reducing condition a mass of ~ 27 kDa. , for the determination of the intact mass of the poison we resorted to the method of Mass Spectrometry obtaining our raw and intact results by Electrospray (ESI) giving a result of 27342.6641 Da. A characterization of the primary structure of "novo" was carried out by tryptic hydrolysis (MALDI / TOF), obtaining 6 amino acid sequences to

subsequently carry out a Bioinformatic analysis through the SWISS-PROT database to then carry out a sequential homology analysis with Use of the DNASTar Software specifying that the protein studied is a Metalloprotease of the Bleeding family. Finally, tests were done for their biological characterization to determine the hemorrhagic activity with a method of intradermal inoculation in mice obtaining the values of induced bleeding of *Bothrops roedingeri* corresponding to  $9.5 \text{ mm} \pm 0.15 \text{ mm}$  for the total venom and  $8 \pm 0.12 \text{ mm}$  for the fraction HFBr, respectively. The procedure carried out such as "Proteomics" was useful for obtaining and characterizing metalloproteases from the *Bothrops* species for a future scientific, technological and therapeutic purpose.

**Keywords:** *HITrap, Chromatography, SDS PAGE, Mass Spectrometry, ESI, MALDI / TOF, Hydrolysis, Hemorrhagic activity, Proteomics.*



## CAPÍTULO I

### CONSIDERACIONES TEÓRICAS

#### 1.1 Características generales del veneno de serpiente

Hoy en día se tiene conocimiento de la existencia de 3200 variedades de serpientes <sup>[2]</sup>, de las cuales se conoce que aproximadamente 500 son especies venenosas y que 200 pueden provocar envenenamiento en humanos <sup>[3]</sup>. Las especies que son venenosas emplean sus venenos para defenderse, atacar e inmovilizar a sus víctimas y así facilitar su ingestión y digestión, existen varias familias de serpientes de las cuales se diferencia su hábitat y características tanto internas como externas. Se detallan las más importantes y como son sus sinónimos hoy en día: *Elapidae* (cobra, coral), *Colubridae* (Culebra, se le denomina así a todo ofidio inofensivo para el hombre a excepción de la “boomslang” que origina muerte en algunos humanos), *Hydrophiidae* (especies marinas), *Viperidae* (víboras, familia de serpientes muy venenosas) y *Crotalidae* (cascabel, considerada la familia con un amplio número de especies venenosas) <sup>[4]</sup>.

Varios elementos de los venenos de las serpientes cumplen sus respectivos efectos venenosos sobre diferentes caminos toxicológicos y también cuentan con una similar organización biológica como por ejemplo una ruta común hacia varias toxinas, que son referentes a diversos linajes de proteínas y presentes en los venenos de varias serpientes. Existen algunas argumentaciones que no se está de acuerdo en composición y formación de la actividad de los venenos de las serpientes, pero éstos se clasifican, en función de dos cuadros patológicos que se desarrollan que son: neurotóxico y hemotóxico. Estos dos cuadros se relacionan únicamente en cuanto a síntomas como son debilidad generalizada, dolor e inflamación local <sup>[5]</sup>.

## 1.2 Efectos tóxicos

Los efectos tóxicos de los venenos en habitual son la miotoxicidad y cardiotoxicidad y disturbios, también produce fallas en la homeostasis. Habitualmente los venenos más potentes son aquellos que poseen componentes neurotóxicos, encontrados principalmente en serpientes de la familia Elapidae e Hidrophidae, pudiendo llegar a una dosis letal  $DL_{50}$  para ratones a valores inferiores a 0,03 mg/Kg.

El contenido seco del veneno está compuesto por polipéptidos que tienen toxinas, enzimas y péptidos que cumplen como función principal cambiar el funcionamiento y fisiología de las especies envenenadas. Se conoce que el veneno seco es el 95% del veneno total y que su composición cualitativa y cuantitativa varía de acuerdo con la especie en estudio; edad, zona y dieta.

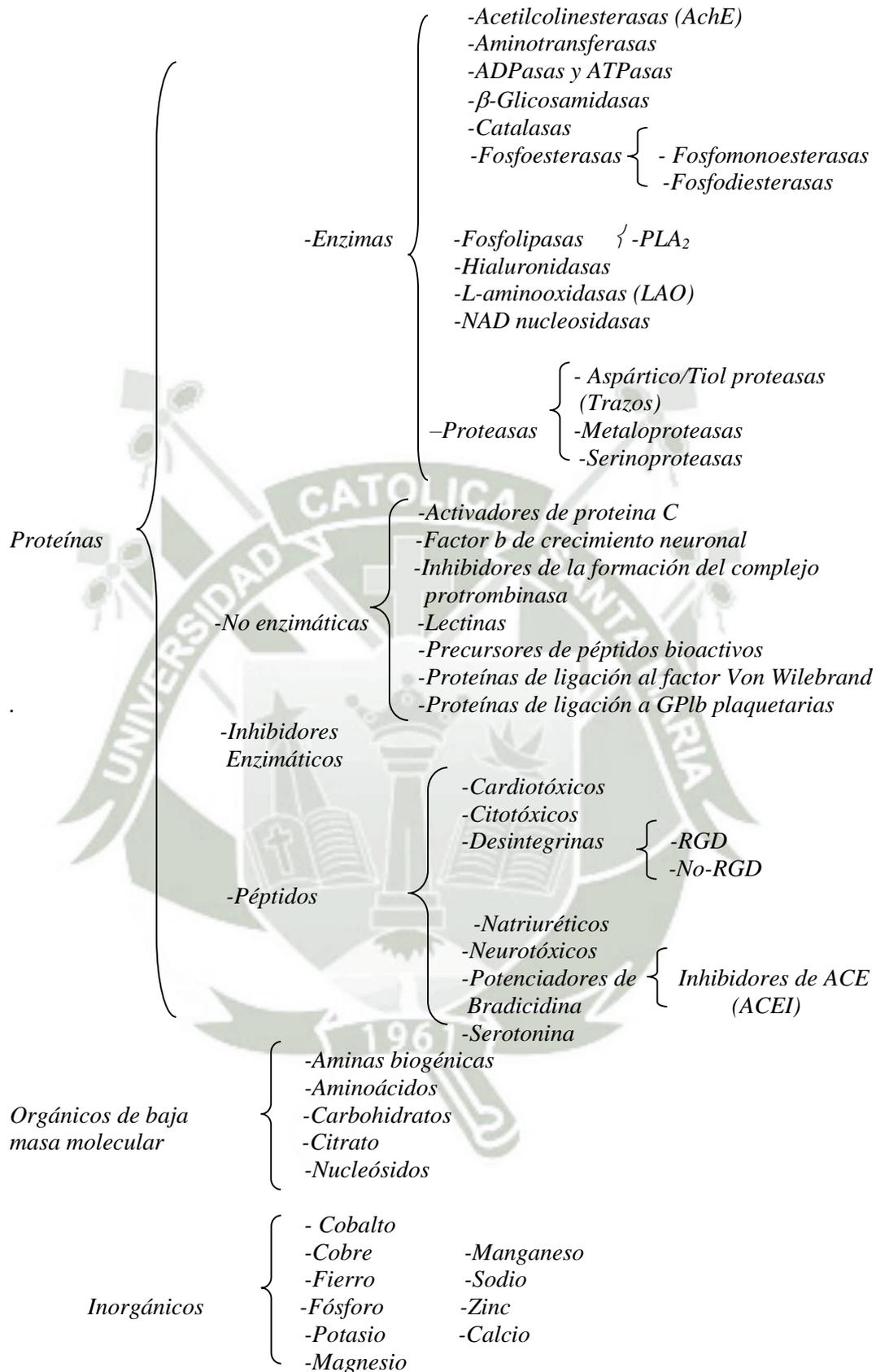
Han sido identificadas más de 20 enzimas diferentes, de distinta clasificación y función; de las cuales 12 se encuentran en varios de los venenos de distintas familias y que la enzima hialuronidasa es común en todos los venenos ya que es primordial porque tiene la función de facilitar la distribución del veneno para los tejidos de la especie envenenada <sup>[5,6]</sup>.

### 1.3 Componentes tóxicos

Dentro de los componentes tóxicos se encuentran: Acetilcolinesterasas (inhiben la transmisión de impulsos nerviosos voluntarios y autónomos, perjudicando la locomoción y pudiendo llegar a la letalidad por paro respiratorio), Adenosindifosfatasas (inhiben la agregación plaquetaria), fosfolipasas (digestión de fosfolípidos de membrana, siendo relacionados a mio/neurotoxicidad, inhibición de la formación del complejo protrombinasa e inducción de agregación plaquetaria), hialuronidasas (aumentan la difusión de los demás componentes, a través de los tejidos), L-aminoxidasas (relacionadas con apoptosis), diversos componentes que afectan la hemostasia (metaloproteasas, serinoproteasas y algunas proteínas no enzimáticas como desintegrinas y potenciadores de bradicidina) y componentes relacionados con la degradación de proteínas de la matriz extracelular y membrana basal endotelial (metaloproteasas), se puede encontrar cantidad de proteínas en los venenos no solo como los mencionados sino también como Proteínas Orgánicas de baja masa molecular y proteínas Inorgánicas al igual que inhibidores enzimáticos como se detalla en la Figura 1.

A pesar de ser identificados muchos de los efectos biológicos y los responsables de tales efectos; la farmacología actual adopta ahora una nueva posición. Así un componente presente en el veneno que pudo ser capaz de causar un desequilibrio en la homeostasis, se convierte en un elemento valioso de utilidad biológica.

Desde este punto de vista, los venenos de serpientes pasan a ser vistos desde otra perspectiva, como probables agentes terapéuticos en medicina, contra diversas patologías, así como herramientas o sondas moleculares en la investigación de diversos procesos fisiológicos [7, 8, 9, 10,11]. De esta forma, algunas enzimas fibrinolíticas altamente purificadas no producen actividad hemorrágica despertando mayor interés como agentes terapéuticos [12].



**Figura 1. Proteínas encontradas en los venenos de serpientes** [7, 8, 9,11]

## 1.4 Metaloproteasas

Las metaloproteasas son hidrolasas del tipo endopeptidasas, que necesitan de un cofactor; un metal, generalmente el Zinc, en su sitio catalítico para su respectiva acción. Estas enzimas cambian ampliamente en cuanto a su filogenia (desde bacterias hasta mamíferos) y funciones in vivo <sup>[13]</sup>. Entre las funciones más relevantes de carácter fisiológico podemos citar la angiogénesis, fertilización, fusión de mioblastos, re-estructuración proteica y re-modelamiento de tejidos <sup>[14]</sup>.

Algunas metaloproteasas conservan un papel en la señalización intracelular durante el desarrollo neuronal, como fue descrito para SUP-17 (*Caenorhabditis elegans*, una proteína homóloga a la ADAM10 de mamíferos), a través del procesamiento de la proteína “notch” y su ligando delta <sup>[15, 16]</sup>.

En mamíferos, cuando se pronuncian abundantemente, metaloproteasas, pueden favorecer para la instalación de diversas patologías como artritis, arterioesclerosis, alzhéimer y cáncer <sup>[17]</sup>. Observando así el evitar estos estados patológicos, el organismo dispone de una fina regulación en la actividad de estas enzimas, operando en distintos niveles. Así una modulación en la actividad puede ser alcanzada con la inhibición de la trascripción, a la expresión en la forma de zimógeno y la expresión de inhibidores específicos <sup>[18]</sup>.

## 1.5 Clasificación de las Metaloproteasas

De acuerdo con la similitud de las secuencias, las metaloproteinasas se pueden agrupar en 4 grupos principales: (Figura 2)

1. **Zincinas** que poseen una secuencia HEXXH, como motivo de unión al Zinc.
2. **Inverzincinas** que poseen un motivo invertido de unión al Zinc, HXXEH.
3. **Carboxipeptidasas** que poseen un motivo de unión al Zinc, HXXE
4. **DD-carboxipeptidasas** que poseen un motivo de unión de Zinc, HXH.

Todos los grupos poseen como 1° y 2° ligando un residuo de Histidina, excepto las carboxipeptidasas. El tercer ligando de metal puede ser un residuo de Histidina (excepto en las inverzincinas), o una Glutamina (zincinas e inverzincinas).

Las zincinas constituyen un mayor grupo, siendo subdivididas en Gluzincinas (aquellas en un tercer ligando de Zinc es una Glutamina) o Metzincinas (donde un tercer ligando es una His)<sup>[19]</sup>.

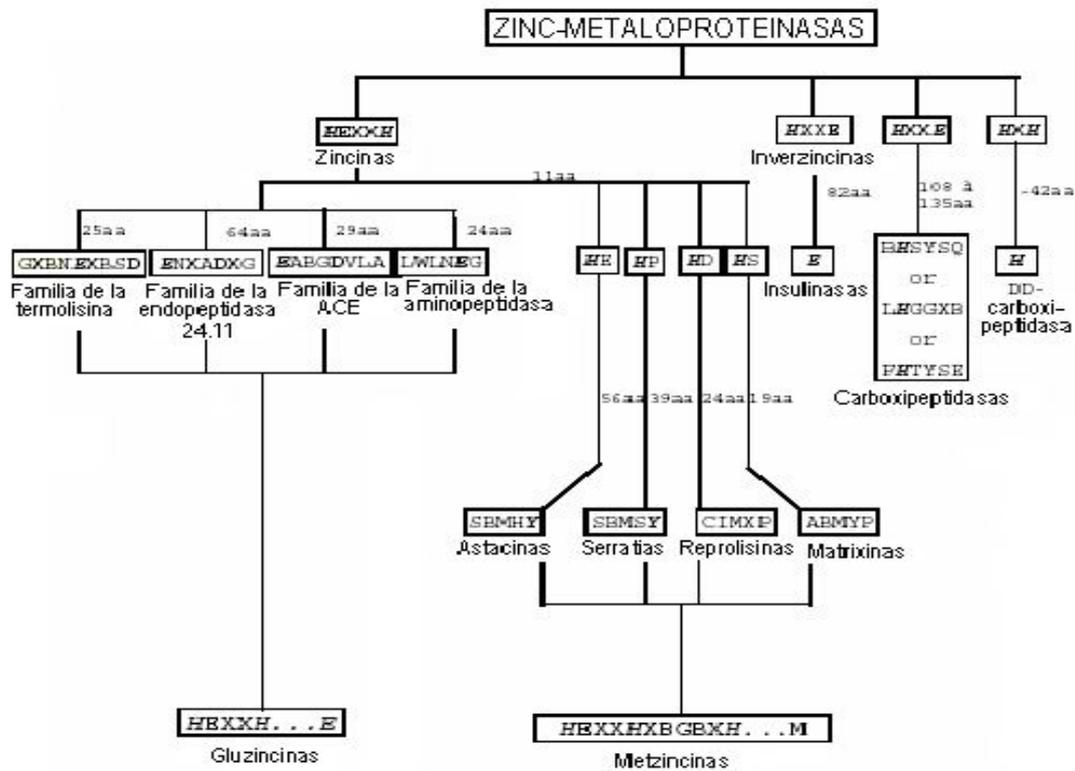
Son parte de las gluzincinas, las familias de la termolisina, de la endopeptidasa-24.11, de la enzima convertora de angiotensina (ACE) y la aminopeptidasa. Es probable que las metaloproteasas ATP-dependientes, también pertenezcan a la familia de las gluzincinas. Se trata de un grupo de enzimas recientemente descritas que pertenecen a la familia de las AAAs (ATPasas asociadas con diversas actividades celulares). Algunas de sus integrantes participan en el control de calidad proteica<sup>[20]</sup>, combinando las funciones de chaperonas y proteolíticas, por ejemplo, de la FtsH de *E. coli*. Las AAAs poseen amplia distribución filogenética y elevada conservación secuencial<sup>[21]</sup>.

Las metzincinas poseen un motivo conocido como “Met-turn” caracterizado por la presencia de una Met en una vuelta de la estructura terciaria (del cual deriva el nombre del grupo) localizada en la región C-terminal en relación al motivo de unión al zinc (HEBXHXBGBXH...M). Se incluye entre las metzincinas a las familias de las astacinas, de las serratias, de las reprotlisinas y de las matrixinas.

Las astacinas poseen inmediatamente después un tercer ligando del metal, un residuo de Glu. Son parte de esta familia la propia astacina (enzima digestiva que presenta los camarones de agua dulce), una meprina (proteasa de mamífero) y proteínas envueltas en el desarrollo de diversos organismos.

Las serratias poseen un tercer ligando de zinc, un residuo de prolina, siendo la familia compuesta por enzimas producidas por bacterias fitopatogénicas. Las reprotlisinas poseen un residuo de Asp después del tercer ligando de zinc, formado juntamente con las astacinas la familia conocida como M12<sup>[22]</sup>. Son parte de esta familia algunas enzimas relacionadas en la reproducción de mamíferos conocidas como ADAMs (Desintegrinas y Metaloproteinas), ADMTS (Desintegrina y Metaloproteinasa con motivos de trombospondina) y presentes en venenos de serpientes (svMPs-Snake Venoms Metalloproteases). Buena parte de las ADAMs son probablemente inactivas, puesto que no presenta motivos íntegros de unión al zinc<sup>[23]</sup>. El secuenciamiento del genoma humano permitió inferir 51 genes de ADAMs/ADAMTS, por lo tanto, no todas fueron debidamente caracterizadas hasta el

presente momento. También fue posible observar su compleja estructura genómica (esparcidas en diversos cromosomas) y génica (como la ADAM11 con 25 exones) [24].



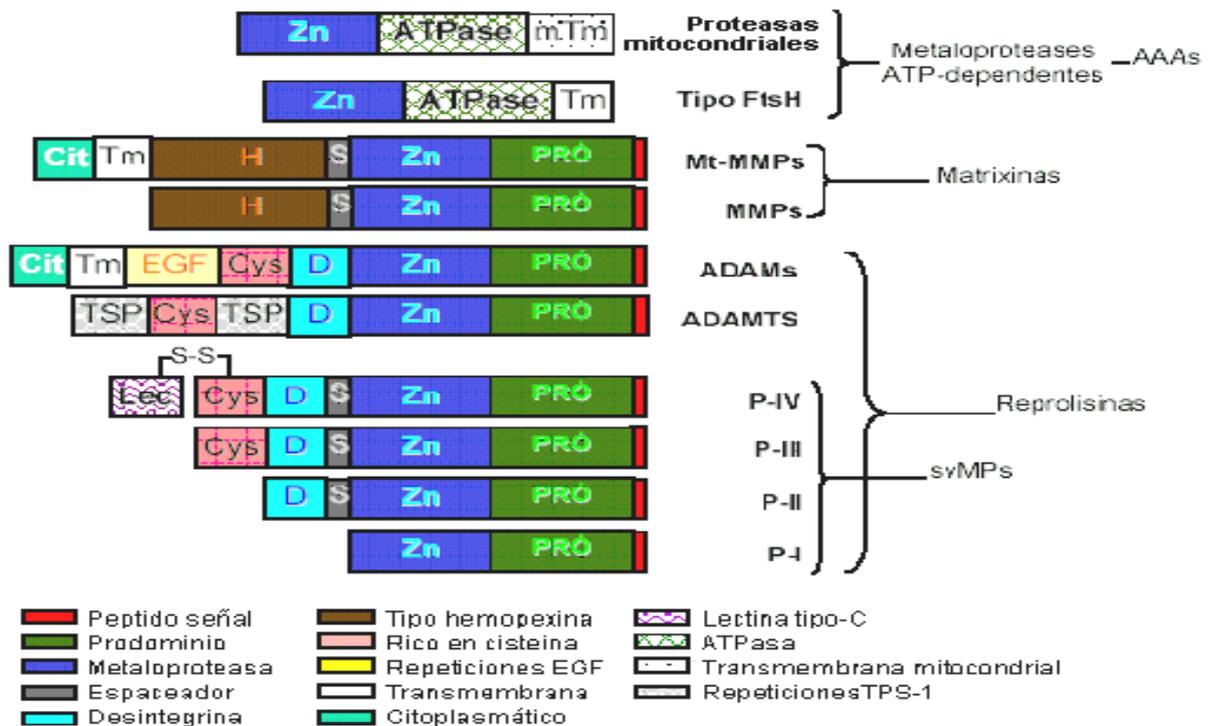
**Figura 2. Familias de metaloproteasas dependientes de Zinc: B: Residuos apolares; X: Cualquier residuo; *Itálico*: Residuos ligados al Zinc; **Negrito**: Residuos envueltos en la catálisis enzimática; aa: cantidad en residuos de aminoácidos (posición) [19]**

Las matrixinas (MMPs - matrix metalloproteasas) poseen como un tercer ligando de zinc, un residuo de Ser o Thr, formando juntamente con las serratias la familia M10. Las matrixinas consisten en colagenásas, gelatina e estro melisinas. Estas enzimas pueden ser encontradas en forma soluble asociadas a membrana celular (Mt-MMP-membrane type MMP). El secuenciamiento del genoma humano posibilito inferir 19 genes de MMPs. [23]

## 1.6 Organización en multidominios

Las metaloproteasas poseen organización multimodular con gran variabilidad (Figura 3). Las funciones de los tamaños de estas enzimas son dependientes de

recombinaciones entre diferentes dominios. Las SVMPs tienden a ser más hemorrágicas cuanto mayor sea el número de dominios [7].



**Figura 3. Organización multimodular de algunas metaloproteasas. Las proteínas son representadas desde sus porciones C-terminales hacia las N-terminales (de izquierda a derecha) [23, 24, 25]**

Algunos de los dominios posibles de ser encontrados en metaloproteasas son concisamente descritos a continuación:

- Péptido señal: con la función de dirigir la proteína para su localización sub celular o secreción [26].
- Prodominio: regula la actividad enzimática a través de la interacción entre el sulfidrilo de Cys, presente en el motivo PKMCGVTQ en svMMPs o PRCGVDP en MMPs, con Zinc presente en el dominio catalítico a través de un mecanismo conocido “cysteine-switch” [27].
- Dominio Catalítico: de forma globular, contiene el sitio activo enzimático. En algunas matrixinas y ADAMs se puede incluir un motivo homólogo a la ligación de la gelatina presente en la fibronectina [28].

-Desintegrina: posee secuencias consenso Cys (o análoga) localizada en una vuelta flexible de su estructura 3D. Las ADAMs aferradas en la membrana pueden interactuar con integrinas a través de este tripéptido, promoviendo la adhesión célula-célula.

En compensación, cuando está presente en proteínas libres inhiben ligación célula-célula y célula-matriz (entre proteínas de la matriz como fibronectina y fibrinógeno e integrinas celulares a través de competición <sup>[29, 30]</sup>.

-Rico en cisteína: poseen alta densidad de residuos de cisteína, siendo recientemente relacionado con la inhibición y agregación plaquetaria inducida por colágeno <sup>[30]</sup>.

-ATPasa: incluye los motivos Walter B (relacionados con la ligación de ATP) y SRH (Second Region of Homology, relacionado con la hidrólisis de ATP).

En conjunto estos motivos son conocidos como módulo AAA, relacionado con la actividad ATPasica. La actividad proteolítica de las metaloproteasas con ese dominio es dependiente de la actividad ATPasica <sup>[21]</sup>.

-MAM: frecuentemente encontrado en receptores, está presente en la Meprina C-terminalmente con dominio catalítico.

-Tipo hemopexina: homólogo a hemopexina (proteína plasmática que liga heme libre) está relacionado al reconocimiento de inhibidores de metaloproteasas endógenas (TIMPs), siendo exclusivo de matrixinas <sup>[31]</sup>.

-Repeticiones de EGF: contienen repeticiones del factor de crecimiento epitelial <sup>[23]</sup>.

-Repeticiones TSP-1: contienen repeticiones de tipo 1 de trombospondina, siendo exclusivo de ADAMTS. La trombospondina, en estas repeticiones posee las funciones de ligación con heparina, activando la activación de la transcripción, promueve la adhesión celular, inhibición de angiogénesis y ligación a GPIV de plaquetas <sup>[32, 33, 34]</sup>.

-Tipo lectina: homólogo a las lectinas (proteínas que ligan azúcares de manera específica), es exclusivo de svMPs de clase P-IV.

-Transmembrana o transmembrana mitocondrial: confieren a la proteína la capacidad de anclaje en membranas lipídicas.

-Citoplasmático: se encuentra interiorizado en el citoplasma, siendo relacionado con la traducción de señal <sup>[35]</sup>.

## 1.7 Caracterización enzimática de las metaloproteasas de veneno de serpientes

En su mayoría las metaloproteasas de venenos de serpientes son más activas y solubles en pHs neutros a levemente básicos <sup>[36]</sup>. La acutolisina A es un buen ejemplo, exhibiendo una reducción de 100 veces la actividad proteolítica cuando el pH varía de 7,5 a 5,0 <sup>[37]</sup>. Este factor puede estar relacionado a la disminución de la capacidad de polarización de agrupamiento carboxílico presente en Glu catalítico (aumentando la distancia de contacto con el agua catalítica), así como a la protonización de las His que ligan al zinc (distanciando o removiendo al metal).

Estas enzimas son fuertemente inhibidas por el EDTA u o-fenantrolina, exhibiendo también inhibición por el citrato [38]. Estudios de dicroísmo circular, antes y después de la remoción de zinc por estos agentes, indican una brusca disminución en el contenido de  $\alpha$ -hélices <sup>[7]</sup>.

En su mayoría, las metaloproteasas de venenos de serpientes son potencialmente hemorrágicas debido a la digestión de diversas proteínas de la membrana basal endotelial y la matriz extracelular como: laminina, nidogenio, fibronectina, colágeno tipo IV y proteoglicanos <sup>[39]</sup>.

Las proteínas relacionadas con la coagulación sanguínea con fibrinógeno y factor de von Willebrand también son blancos de la digestión enzimática, contribuyendo para la instalación del cuadro hemorrágico. Es el caso de las hemorraginas como la metaloproteasas de venenos de serpientes:

- (a) De clase P-I: HR-2<sup>a</sup> y HR-2b (*Trimeresurus flavoviridis*) con MHD de 0,07; acutolisina A (*Agkistrodon acutus*) con MHD de 0,22;
- (b) De clase P-II: HT-1 (*Crotalus ruber ruber*);
- (c) De clase P-III: HR-1A y HR-1B (*Trimeresurus flavoviridis*) con MHD de respectivamente de 0,01 y 0,02; HF-3 (*Bothrops jararaca*) con MHD de 0.015;
- (d) De clase P-IV: HR-II (*Agkistrodon halys blomhoffii*) con MHD de 0,1.

Con todo algunas metaloproteasas de venenos de serpientes no causan hemorragia, conservando la actividad proteolítica.

Diversas tentativas fueron realizadas en el sentido de identificar motivos mutuamente exclusivos de enzimas hemorrágicas y no hemorrágicas. Inicialmente fue

propuesto <sup>[40,25]</sup>, que los residuos His 92, Gln96, Ile101, Tyr185, Gln68 y Lys195 estarían relacionados con la hemorragia. Por ende, los residuos idénticos fueron encontrados en enzimas no hemorrágicas. Recientemente fue propuesto que los residuos Glu/Asp186 y Asn195, estarían asociados a actividades no hemorrágicas <sup>[41]</sup>. Los estudios de especificidad enzimática indican la preferencia por residuos de Leu en P1', no siendo exigentes en cuanto al residuo en la posición P1. Con todo, residuos con pequeñas cadenas laterales y no polares tienden a mejorar la actividad enzimática. Casi todas las metaloproteasas de venenos de serpientes estudiadas rompen la cadena B de la insulina entre Ala y Leu de la secuencia V-E-A-L-Y-L diversas enzimas fibrinolíticas no hemorrágicas ya fueron analizadas en cuanto a su sitio de clivaje en la cadena alfa de fibrinógeno.

La fibrinolasa (*Agkistrodon contortrix contortrix*) cliva entre K413-L414; a Cb1.1 (*Crotalus basiliscos*) entre K413- L414, S505-T506 y Y560-S561; a Cb1.2 (*Crotalus basiliscos*) entre G254-S255 y P516-M517; a lebetasa (*Macrobipera levetina*) entre K413-L414 y P516-M517. La lebetasa cliva aún, otros componentes endógenos como la bradicidina, sustancia P, glucagon. A2-macroglobulina, en diversas combinaciones P1-P1' sugiriendo que la actividad hemorrágica no debe estar asociada a especificidad enzimática <sup>[42]</sup>.

## 1.8 Principales serpientes venenosas del Perú

En la actualidad en nuestro país podemos encontrar 9 de 15 familias de especies que se encuentran en el mundo, teniendo más del 50% en especies ofídicas, siendo considerados el segundo país en Latinoamérica por la biodiversidad de nuestras serpientes <sup>[43,45]</sup>, y de estas especies se sabe que 33 son venenosas y solo 9 serpientes son propias de la población autóctona de la región y las 24 especies restantes son de países vecinos <sup>[44]</sup>. Las familias más relevantes y primordiales por el amplio campo de estudio de serpientes venenosas que habitan en el país son *Viperidae* y *Elapidae* <sup>[45]</sup>.

Hoy en día, los accidentes por mordedura de ofidios provocan un sin número de pérdidas de vidas humanas; si en caso no ocurra pérdidas humanas, los heridos tienden a sufrir un destrozamiento de tejidos hasta la pérdida global o parcial de algún órgano

[46], según los reportes de MINSA se estima que hubo 2035 accidentes ofídicos en el 2008, año donde fue el mayor número de afectados [47].

Teniendo en cuenta que en nuestro país se cuenta con una amplia región de la selva que supera los 600.000 Km<sup>2</sup>, se conoce que son muchas las serpientes que son registradas en este lugar, a la vez se sabe que existe especies registradas en valles interandinos y también por la costa del pacifico. No obstante, los estudios al respecto no están finalizados debido a que se tiene la seguridad que se puede obtener y trabajar futuros informes. Sin embargo, el serpentario “Oswaldo Meneses” reporto las siguientes especies que se observan en la Tabla 1 que son motivo de estudio e investigación para diversos fines académicos y relevantes para el país [48], de igual manera también se observa las características y diferencias detalladas de dos familias de serpientes que son las que más habitan en el país. (Tabla 2)

**Tabla 1. Principales serpientes venenosas del Perú [48, 49]**

FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE COMUN
<i>Viperidae</i>	<i>Bothrops atrox</i> <i>Bothrops brazili</i> <i>Bothrops pictus</i> <i>Bothrops roedingeri</i> <i>Bothriopsis bilineata</i> <i>Bothriopsis oligolepis</i> <i>Lachesis muta</i> <i>Crotalus durissus terrificus</i>	Jergón de la selva Jergón shushupe Jergón de la costa Jergón de la costa Loromachaco Lamon o jergón negro Shushupe Cascabel sudamericano
<i>Elapidae</i>	<i>Micrurus spixii</i> <i>Micrurus surinamensis</i> <i>Micrurus tschuddi</i>	Coral o naca naca Coral o naca naca Coral de la costa

**Tabla 2. Características Diferenciales entre Serpientes Venenosas de dos Familias importantes en el Perú <sup>[50]</sup>**

Características Diferenciales	Serpientes Venenosas	
	Familia <i>Viperidae</i>	Familia <i>Elapidae</i>
Cabeza	Triangular	Redonda
Pupilas	Elípticas Disposición Vertical	Elípticas Disposición Diagonal
Hábitos	Nocturnos	Nocturnos
Escamas Cabeza	Quilladas, Ásperas	Ausente
Placas Simétricas en la cabeza	Ausentes	Presentes
Movimientos	Lentos, posición de ataque	Lentos
Cuello	Estrecho	Grueso
Foseta Loreal	Presente	Ausente
Anillos Transversales de colores	Ausentes	Completos, bandas negras impares
Cola	Corta y Afinada	Larga y afinada
Colmillos	Móviles	Fijos

## 1.9 *Bothrops roedingeri*

### 1.9.1 Taxonomía

Es conocida como “JERGON DE LA COSTA”, también como “CATARI” en lengua quechua, de igual manera por pertenecer a la familia *Viperidae* también es conocido con el sinónimo de Víbora y a esta familia se le engloba como “serpientes del viejo mundo”, cuenta con características que se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Clasificación Taxonómica y nomenclatura científica [63]

<b>Reino</b>	Animalia
<b>Filo</b>	<i>Chordata</i>
<b>Subfilo</b>	<i>Vertebrata</i>
<b>Clase</b>	<i>Sauropsida</i>
<b>Orden</b>	<i>Squamata</i>
<b>Suborden</b>	<i>Serpentes</i>
<b>Familia</b>	<i>Viperidae</i>
<b>Subfamilia</b>	<i>Crotalinae</i>
<b>Género</b>	<i>Bothrops</i>

### 1.9.2 Ubicación geográfica

Esta especie podemos encontrarla en los valles cercanos al mar desde el departamento de Ica y fundamentalmente en la costa y valles del departamento de Arequipa. (Figura 4)



Figura 4. Ubicación Geográfica de la especie *Bothrops roedingeri* en la costa (marcado con rojo)

### 1.9.3 Características

Este reptil es más peligroso y temido de la costa peruana su nombre científico es *Bothrops roedingeri* de la Familia *Viperidae* mide entre 40 y 60 cm de longitud, también existen ejemplares de la misma familia de hasta 1 m de longitud, su forma general es alargada y normalmente cilíndrica, consta de la piel cubierta de escamas pequeñas en el dorso y mayores en el vientre; recubierto de una delgada piel que varía constantemente a lo largo del año. Esta piel es transparente y comienza a desprenderse por los labios y continúa por la cabeza, cuerpo y la cola. Sus ojos son redondos con pupilas circulares y verticales, con falta de parpados y protegidos por una membrana trasparente como el vidrio de un reloj. Su boca es muy dilatada que le permite ingerir alimentos de gran tamaño, con lengua larga, filiforme y protractil esta siempre húmeda y posee varios corpúsculos sensitivos que lo utiliza para el tacto y gusto (Figura 5). En el olfato consta d un sentido más desarrollado que el auditivo y por último su forma de transporte es arrastrándose mediante ondulaciones laterales del cuerpo <sup>[51]</sup>.

Su veneno se ha caracterizado por la presencia de enzimas trombina “like” es tal vez la enzima de acción más espectacular en el ataque de serpientes Viperidas. Causa rápida conversión del fibrinógeno en fibrina, es decir coagulación aún en presencia de heparina, otra característica importante es su tolerancia a la temperatura ya que soporta calentamiento hasta 80 grados centígrados sin perder su actividad <sup>[49]</sup>.



**Figura 5. *Bothrops roedingeri* – Familia *Viperidae* <sup>[51]</sup>**

### 1.10 Usos del veneno

El veneno de la serpiente “Jergón de la Costa”, posee componentes no tóxicos utilizados en medicina, como por ejemplo el captopril para el tratamiento de la hipertensión arterial, el cual deriva de la bradiquinina que es un péptido del veneno de Bothrops; también tenemos el factor promotor del crecimiento nervioso (empleado para Alzheimer), factores anticoagulantes, factores con actividad antiepiléptica, factores con actividad antitumoral (uso de la crotoxina para el tratamiento del cáncer), factores analgésicos (para artritis, migrañas, etc) y factores de acción antibacteriana [52,53].

En la actualidad las serpientes han tomado gran valor en la medicina; los componentes de su veneno son útiles en el tratamiento de diferentes enfermedades tales como el mal de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, terapias anticoagulantes, preparación de sueros antiofídicos. Las serpientes también son importantes en el control ecológico de roedores evitando la proliferación descontrolada de éstos [54].

La L-aminoácido oxidasa, es la enzima que le confiere la coloración amarilla a los venenos que la contienen. Es una glicoproteína de alta masa molecular; responsable por la degradación de aminoácidos con liberación de cetoácidos, amoníaco y peróxido de hidrógeno. Su acción antibacteriana es un notable hallazgo, como es el caso para *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y *Staphylococcus aureus* [55].

### 1.11 Conocimientos de la Proteómica

El constante avance de la proteómica corresponde parcialmente a los adelantos significativos realizados en la metodología de proteínas, estas nuevas metodologías tienen sus limitaciones. Para mejorar la rama es necesario innovar y considerar estas limitaciones y desarrollar tecnologías modernas y adecuadas a cada proteoma.

### 1.12 Identificación y caracterización de proteínas

En las investigaciones de proteomas, la caracterización es primordial. Es el paso inicial para estudios que sospechan en final etapa la determinación de los proteomas funcionales. En el caso de los geles SDS page, las identidades de sus bandas

formulan unos mapas de referencia, que describen las proteínas identificadas en un tejido en condiciones determinadas. Los proteomas o proteínas pueden ser reconocidas por cantidad de procedimientos uno de ellos puede ser la secuencia de un extremo N-terminal, para esta metodología se usará anticuerpos fijos para la detección, la estructura de aminoácidos, un traslado con proteínas ya reconocidas, sobre-expresión y una mutación de genes (delección). Estos procedimientos son metodologías de gran escala por lo tanto no resultan tan factibles tiene sus desventajas porque pueden lentos, tediosos, laboriosos, y el precio es elevado <sup>[64]</sup>.

En consecuencia, debido a que la espectrometría de masas posee propiedades como una alta sensibilidad y también por ser muy veloz es considerada como una técnica de detección de proteínas a una gran escala, también el motivo que esta técnica se haya desarrollado tanto es porque sus métodos de ionización y la forma en que transforma las moléculas con distintas propiedades como polares, no volátiles en forma gaseosa.

### 1.13 Espectrometría de masas

Los espectrómetros de masa están perfeccionados y cuentan con una fuente de iones, un analizador de masas y un detector que calcula la relación masa/carga ( $m/z$ ) en fase gaseosa. Esta técnica implica:

- La transformación de los polímeros (iones) en fase gaseosa por una metodología de ionización, como ionización/desorción presenciada con láser (MALDI) las muestras especiales son en estado sólido, también está la ionización mediante electro-spray (ESI) la muestra puede ser líquida o en solución.
- Disgregación de los iones según su  $m/z$  en un analizador de masas como el caso del indagador tipo ToF (Time of Flight) o un cuadrupolo.
- Los resultados son expresados en un espectro de masas que nos muestra la cantidad de los iones frente al valor de masa y carga y esta medida de las masas están dadas por su detector,

Para la identificación de proteínas se han desarrollado varias estrategias:

- Identificación por huella peptídica o mapeo peptídico manejando un tipo MALDI-TOF.

- Caracterización por medio de una fragmentación de proteínas obteniendo la secuencia sea total o parcial de los aminoácidos manipulando un espectrómetro de masas en forma tándem <sup>[64]</sup>.

### **1.14 Estudio bioinformático en la era post-genómica**

Los resultados obtenidos por medio de un espectrómetro de masas, son mostrados normalmente en forma de picos; a este resultado grafico se le denomina como espectro de masas. Cada pico de un espectro de masas, significa valores de masa y carga al igual que la intensidad de cada una de sus señales.

Especificar la secuencia de una proteína a partir de su espectro de masa, es un procedimiento cotidiano en el estudio de proteomas. Manejando la pesquisa contenida en sus bases de datos, se puede identificar velozmente un número elevado de proteínas y el resultado será con una precisión alta.

La caracterización de proteínas dependerá de la particularidad de los datos obtenidos en el espectrómetro de masas, de los datos disponibles en la base de datos y del método empleado en la búsqueda de datos. Finalmente se deduce que son varias maniobras para el uso de datos obtenidos por espectrometría de masas <sup>[66]</sup>.

### **1.15 Software y herramientas bioinformáticas**

Actualmente se tiene cantidad de avances en el tema de investigación referidos a las ciencias y estudio con proteomas y como consecuencia trae un gran adelanto en la solidez y complejidad de pesquisas desde el punto de vista biológico.

El avance y metodologías de la información son tecnologías que nos van a mejora el almacenamiento de los datos y también para poder interpretarlos en lugares de investigación de una mera optima y eficaz. Existen varias bases de datos y herramientas de análisis, pueden estar como hardware y también como software.

#### **1.15.1 Protein Pilot TM**

Este Software ayuda en la personalización de proteínas, accede a asemejar varias modificaciones peptídicas y también divisiones no trípticas paralelamente.

Diferenciar con total sencillez isoformas de proteínas al igual que sus subconjuntos, y eliminar los falsos positivos, así como observar la relación entre una proteína-péptido. Con el ingreso genérico para herramientas SCIEX el cual es un formato que brinda su Huella Peptídica (PMF) este software es relacionado con todos los sistemas del estudio de proteomas MS/MS <sup>[67]</sup>.

### **1.15.2 4000 Series Explorer TM**

Este Software nos permite la edición y recolección de datos provenientes del MALDI ToF/ToF, consigue EM en tiempos de vuelo en tándem, quiere decir que consta de una sensibilidad muy alta y disponible en modo MS y MS/MS, también se encargar de juntar todas las propiedades de MALDI en un espectrómetro de masa <sup>[68]</sup>.

### **1.15.3 DNASTar**

DNASTAR es considerado un software que aporta lo necesario para la indagación Proteómica de la biología estructural al igual que pesquisas genómicas, y el estudio general de la biología este software posee instrumentos individuales para facilitar, resolver y aclarar el estudio:

- EditSeq: Es una aplicación útil para importar y editar ciertos formatos de archivo que son poco comunes. Se puede modificar manualmente la secuencia.

- MegAlign: Es un software que se encarga de la alineación de secuencias, estas pueden ser secuencias de proteínas y también de ADN, consta de múltiples métodos de alineación. Tiene una propiedad que son las pantallas gráficas “Rich” estas nos permiten ajustar la alineación al finalizar el trabajo, al igual también consta de un convertidor de árboles filogenéticos donde podemos ver las diferencia en química tanto estructurales como funcionales.

- Protean: Esta herramienta nos permite presagiar patrones de visualización, características estructurales secundarias, la composición de proteínas o aminoácidos, propiedades químicas o fisicoquímicas a través de un completo análisis de proteomas con sus varias herramientas <sup>[62]</sup>.

#### 1.15.4 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool):

Esta herramienta informática cumple la función de búsqueda de homólogos según los resultados o datos de alineamiento local, se pueden observar opciones como las regiones de similitud entre secuencias. Otra función relevante de BLAST es que puede comparar nucleótidos, secuencias de proteínas y a la vez también calcula una estadísticamente, se puede diferenciar relaciones funcionales y evolutivas entre todas las secuencias y con este resultado se podrá identidad sus familias respectivas <sup>[69]</sup>.

- BLAST NCBI: Esta opción nos facilita la información y se puede acceder a la información biomédica y genómica.

#### 1.15.5 SWISS-MODEL:

Es considerado un asistente de homología proteica estructural la cual en pocas palabras se le resume como un modelado automatizado, ExPASy es su servidor Web en el cual dentro se encuentra este asistente. Su función principal es obtener un modelamiento de la proteína de una manera fácil, sencilla y veloz <sup>[70]</sup>.



## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. UBICACIÓN

- La presente investigación se realizó en los laboratorios ubicados en las instalaciones de la Universidad Nacional de San Agustín en el Laboratorio de Bioquímica (3 piso) perteneciente a la Facultad de Biología a cargo del Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D. y del Mg. Ronald Navarro Oviedo para el trabajo de Cromatografía, Electroforesis y Actividad Hemorrágica (Inoculación Intradérmica).
- También se hizo pruebas como espectrometría de masas en el Laboratorio de Química de Proteínas del Instituto de Biología de la Universidad Estadual de Campinas (UNICAMP) – Brasil a dirección del Prof. Mauricio Aurelio Gomes Heleno Ph.D.

## 2.2 MATERIALES

### 2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

- El veneno total de *Bothrops roedingeri* fue proporcionado por el Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D.
- 6 ratones Bal/66

### 2.2.2 MATERIAL DE LABORATORIO:

- Tubos de Ensayo de 16 x 150 mm.
- Probeta de 10 ml
- Matraces
- Fiolas de 50 ml y 100 ml
- Vaso de Precipitación de 100 ml
- Vaso de Precipitación de 250 ml
- Puntas para micropipeta de 0-20 uL.
- Puntas para micropipeta de 0-200 uL.
- Puntas para micropipeta de 100-200 uL.
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml
- Tubos Eppendorf de 22  $\mu$ l
- Pipeta Pasteur
- Pipeta de 10 ml
- Propipeta
- Pizeta
- Papel Filtro
- Espátula

### 2.2.3 EQUIPOS, APARATOS E INSTRUMENTOS:

- Incubadora
- Refrigeradora (Electrolux)
- Autoclave

- Micropipetas 0.5-10 $\mu$ L, 5-50 $\mu$ L, 20-200 $\mu$ L, 100-1000 $\mu$ l, 1-5mL.
- Centrífuga refrigerada
- Columnas Quelantes HITrap
- Espectrofotómetro UV visible Evolution 260Bio Thermo Scientific
- Fotocolorímetro Klett Summerson
- Materiales para Formación de Geles: Bandeja para formación de geles.
- Cristales de Vidrio 10x10 cm. (delgados)
- Peines 10 cm x 10
- Pozos y Separadores de 0.8 mm de 10 cm (ThermoScientific)
- Fuente de Poder Eléctrica (ThermoScientific)
- Maldi Tof/Tof ABsciex 4800
- Placa MALDI (OptiPlate-384 Microplate)
- Cuadrupolo-time of flight (Q-TOF, Micromass Manchester, UK)

#### 2.2.4 REACTIVOS:

- Tame 98% (Aldrich Chemical Co)
- ZnSO<sub>4</sub> -99% (Fisher scientific compani USA)
- Dymethyl sulfoxido 99% (Fisher scientific compani USA)
- Tris-HCl 90% (Aldrich Chemical Co)
- CaCl<sub>2</sub> 95% (Aldrich Chemical Co)
- NaCl 99% (Aldrich Chemical Co)
- Glicina 98% (Merck)
- TEMED Sigma 99 % (Bio Rad Laboratories)
- Ditiotreitól (DTT) 97 % (Sigma Chemical Co)
- Bicarbonato de Amonio 94% (Merck)
- Solución de acrilamida/bisacrilamida 40% (Merck)
- Persulfato de Amonio (PSA) 10% (Merck)
- Tampón del gel separador: Tris 1M; pH = 8,8 (Thermo Fisher Scientific)
- Tampón de la muestra:
  - Tris 0,5 M; pH = 6,8 (Thermo Fisher Scientific)

- SDS 20% (Thermo Fisher Scientific)
- 2-Mercaptoetanol 25% (Merck)
- Glicerol 25% (Merck)
- Azul de Bromofenol 0.2 mg/ml (Merck)
- Azul de Comassie 99% (Merck)
- Metanol 40% (Merck)
- Ácido Acético 10% (Merck)

#### 2.1.5 MATERIALES VARIOS:

- Alcohol
- Agua destilada
- Caja de tecnopor
- Guantes
- Bandeja de disección
- Estuche de disección
- Tips varios
- Parafilm
- Gradilla
- Papel Toalla
- Cinta de Embalaje
- Marcador Grueso
- Papel de Aluminio
- Barbijos

#### 2.1.6 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS:

- Origin 6.0: Software de aplicación para análisis de datos que nos proporciona una calidad de gráficos. La aplicación ofrece una interfaz fácil de usar para los principiantes y la habilidad para que los usuarios avanzados personalicen las tareas de análisis y gráficos utilizando temas, plantillas, informes personalizados, procesamiento en grandes cantidades de información y

programación. (Cromatografía de Interacción hidrofóbica y Determinación de la Actividad Proteolítica)

- 4000 Series Explorer™ nos permitirá el adecuado manejo y la respectiva compilación de datos obtenidos del Equipo MALDI ToF/ToF ABSciex 4800 Plus.
- Protein Pilot™ simplifica la identificación de proteínas.
- DNASTAR nos proporciona información genómica, y proteómica.
- EditSeq importa y edita secuencias
- MegAlign se encarga del Alineamiento múltiple de secuencias
- Protean una herramienta de análisis de proteínas
- BLAST útil para la búsqueda de homólogos según el alineamiento
- NCBI una base de datos con información y herramientas importantes para usos informáticos para aspectos biotecnológicos y médicos.
- SWISS-PROT un servidor de homología proteica estructural de modelado

## 2.3 METODOLOGÍA

### 2.3.1 Lugar de ejecución y recolección de muestras

La muestra cruda de *Bothrops Roendigeri* fue cedida por el Prof. Luis Ponce Soto Ph.D. en forma cristalizada para poder empezar con la purificación en el laboratorio de Bioquímica de la Universidad Nacional de San Agustín (UNSA).

### 2.3.2 Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

Las metaloproteasas, procedente del veneno de *Bothrops roedingeri* es purificada en columnas del sistema HiTrap (H&C USA.) El sistema cromatográfico usado es el de cromatografía convencional. Son recaudadas fracciones activas a una columna quelante HiTrap (1 ml) que será cargada con 0,1 M de ZnSO<sub>4</sub>, se lavó con agua y se equilibró con Tampón de fosfato 0,05 M, pH 7,5. Después de lavar la

columna con tampón de fosfato para eliminar el material no consolidado, las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal (0-1.0 M) de NaCl a un caudal de 60 ml / h.

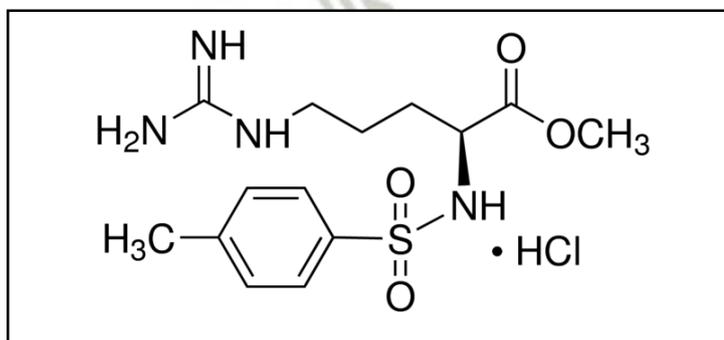
El perfil de elución fue monitoreado a 280 nm

Las fracciones que presentan mayor actividad metaloproteasa y/o hemorrágica y son empleadas para la obtención del “pool” y guardadas a 0°C.

### 2.3.3 Actividad Proteolítica de la Metaloproteasa

El sustrato sintético, N-p-Tosyl-L-Arginina metil ester (TAME) fue utilizado para el dosaje de la muestra (Figura 6). Este sustrato ha sido empleado para medir la actividad amidásica para enzimas proteolíticas del tipo metaloproteasa. Estos sustratos, péptidos derivados de p-Tosyl, han sido ampliamente utilizados principalmente por la alta sensibilidad fotométrica de la absorbancia a 405 nm de la p-Tosyl liberada después de la hidrólisis enzimática, según el método de ERLANGER, con las consiguientes modificaciones <sup>[56]</sup>.

El sustrato cromogénico utilizado N-p-Tosyl-L-Arginina metil ester (TAME) 0,1 M para el dosaje de la fracción (1 mg/ml.); 100 ul. de la muestra fueron colocados en un medio de incubación que contiene 1000 ul. de solución de sustrato previamente disuelto en Dymethyl sulfoxido como solución stock a ser utilizado en la proporción de 1/10 (10 ul.) en tampón Tris-HCl, (10 mm), CaCl<sub>2</sub> (10 mm), NaCl, (100 mm) pH=7.8, además de contener 250 ul. del mismo tampón. Para un volumen final de 1350 ul. Después de 30 minutos la reacción es bloqueada con ácido acético 30% (500 U<sub>l</sub>.). Los cambios de absorbancia son leídos a 405 nm.



**Figura 6. Sustrato Cromogénico N-p-Tosyl-L-Arginina metil ester (TAME) <sup>[58]</sup>**

### 2.3.4 Electroforesis en SDS-PAGE

Para realizar el armado de la cámara de electroforesis vertical se usará dos placas de vidrio, estas tienen que ser del mismo grosor, dos espaciadores que son placas alargadas de un material muy flexible y que son muy resistentes, cumpliendo la función de determinar el grosor del gel, peines cuyos dientes son del mismo grosor que los espaciadores estos se encargaran de moldear los pocillos donde se colocará la muestra, una base que nos permita el ensamblaje de los vidrios con los espaciadores por medio de unas prensas que ejercen presión y también mantienen fijo el sistema, un recipiente el cual contendrá el buffer de corrida y finalmente la fuente de poder que proveerá energía eléctrica a la cámara. Hay que resaltar que esta cámara se armó en una superficie plana y nivelada eso para evitar un futuro derrame por desnivelación y evitar la distorsión de bandas de las proteínas.

Seguidamente se realizará la preparación de geles de poliacrilamida (Anexo 1) Uno es el gel de resolución con un 7,5 % y otro el gel es el de empacamiento con 4,8% de acrilamida junto con el persulfato de amonio y el TEMED en la cual dan inicio a la reacción de polimerización por lo tanto estos son insertados al final y así seguir con el llenado de la mezcla. Se empezará con la polimerización del gel de resolución teniendo en cuenta que la mezcla aun este líquida y se llenará el espacio entre las dos placas a unos 2.5 cm del borde del cristal (empleando pipeta pasteur), añadir agua destilada en la parte superior para que la superficie del gel se mantenga recta, la polimerización del gel tardara aproximadamente 40 min a una hora, una vez hecho esto y observar la mezcla sobrante retirar el agua destilada y secar en papel filtro, encima de este gel agregar el gel de empacamiento y antes que ocurra la reacción de polimerización echarlo sobre la parte superior del peine, esto hará que en el gel se formen unos pocillos para aplicar las muestras.

La preparación de la muestra biológica debemos mezclar la proteína con el buffer de la muestra (Anexo 2) concentrada (4x) en proporción 4:1, asegurar los tubos con láminas extensibles de parafina e introducir la muestra a temperatura de 100°C por 6 minutos Realizar este procedimiento con los marcadores que vienen a ser las proteínas patrón preteñidas (Tabla 4), los tubos deben estar con 10 µL de marcadores preteñidos de peso molecular conocido y centrifugarlos.

**TABLA 4: Proteínas Patrón preteñidas para Preparación de muestras en Electroforesis SDS-PAGE**

<b>Proteína patrón preteñida</b>	<b>Peso molecular aproximado (Daltons)</b>
Miosina	198.840
B-galactosidasa	115.700
Albúmina sérica	96.740
Ovoalbúmina	53.540
Anhidrasa carbónica	37.130
Inhibidor de tripsina	29.130
Lisozima	19.540

Usar las cámaras con los geles que se armó anteriormente, retirar el peine y cargarlos con el tampón de corrida y que tengan contacto con ambos extremos del gel. Añadir las muestras y los patrones preteñidos con micropipetas. Se añade el tampón de la muestra diluyendo el tampón de corrida, añadiéndolos a los pocillos y anotar el orden para una futura identificación. (Anexo 3)

Finalmente ensamblar los cables de la bandeja a una fuente de corriente teniendo en cuenta la polaridad: negro (-) y rojo (+), el gel de resolución tiene que estar en contacto con la banda azul de bromofenol para esto aplicar 80 V y una vez este en contacto subirlo a 120 V, cuando se observe que la banda azul se acerca al extremo inferior, quitar la electricidad y retirar el sándwich normalmente esta dura entre una hora a una hora y 20 minutos, quitar las placas de vidrio, retirar el gel y una vez finalizada la transferencia teñir el gel con solución de azul de coomassie y luego a una solución de decoloración y observarlo finalmente. (Anexo 4)

### **2.3.5 Determinación de masa por Espectrometría de Masa Electrospray (ESI)**

La espectrometría de masas en Tandem ESI-CID-MS/MS fue elaborada empleando un espectrómetro de masas híbrido Cuadrupolo-time of flight (Q-TOF, Micromass Manchester, UK), suministrado con una fuente de nano spray operando en modo de ionización positivo. Las condiciones de ionización fueron: voltaje capilar de 2.3 kV, un cono voltaje y lentes RF1 de 30 y 100 V, respectivamente y una energía de

colisión de 10eV. La temperatura de la fuente fue de 70°C y el cono de gas fue N<sub>2</sub> a un flujo de 80 l/h. El gas argonio para la fragmentación de los iones.

•Fue realizada una calibración externa con yoduro sódico en una faja de masas de 50 a 3000 m/z. Todos los espectros fueron adquiridos con el analizador TOF en modo Vmode (TOF kV=9,1) y el voltaje MCP a 2150 V.

### **2.3.6 Secuenciación “*de novo*” de péptidos trípticos por espectrometría de masa (MALDI TOF/TOF ABsciex 4800)**

La caracterización molecular de la metaloproteasa, está basada en protocolos determinados para estudios de proteómica en otras especies de veneno de serpientes. Un análisis exhaustivo de la bibliografía ha conducido a considerar en el diseño y adaptación de protocolos (extracción, pre-separación por nano2D LC, obtención de valores m/z y secuenciación por MALDI TOF/TOF). Los análisis de secuencias peptídicas para la caracterización de las proteínas serán realizados, mediante el programa PROTEIN PILOT.

La comparación cualitativa de múltiples muestras requiere algoritmos y métodos automáticos para el tratamiento de los datos, por lo que los programas MZmine 2 core y pkDACCLASS, han sido seleccionados.

Para los análisis de cuantificación libre de etiqueta se considerará el conteo espectral y la intensidad de picos mediante el uso de softwares libres (Neilson et al., 2011).

### **2.3.7 Estudio bioinformático de las enzimas.**

A partir de los resultados obtenidos se realizará los estudios de homología secuencial en consulta con las bases de datos disponibles en la red:

Con la ayuda del software DNA Star, se procederá al estudio bioinformático de proteínas, el cual revelará informaciones de carácter estructural de las proteasas encontradas, utilizando específicamente EditSeq para importar y editar las secuencias con estos datos obtenidos y alineados con ayuda de MegAlign.

Con esta información se ingresará a la base de datos de blast para observar la homología secuencial por medio de Blast (Swiss-prot: Annotated protein sequence database)

### 2.3.8 Actividad hemorrágica

#### ○ **Método en piel:**

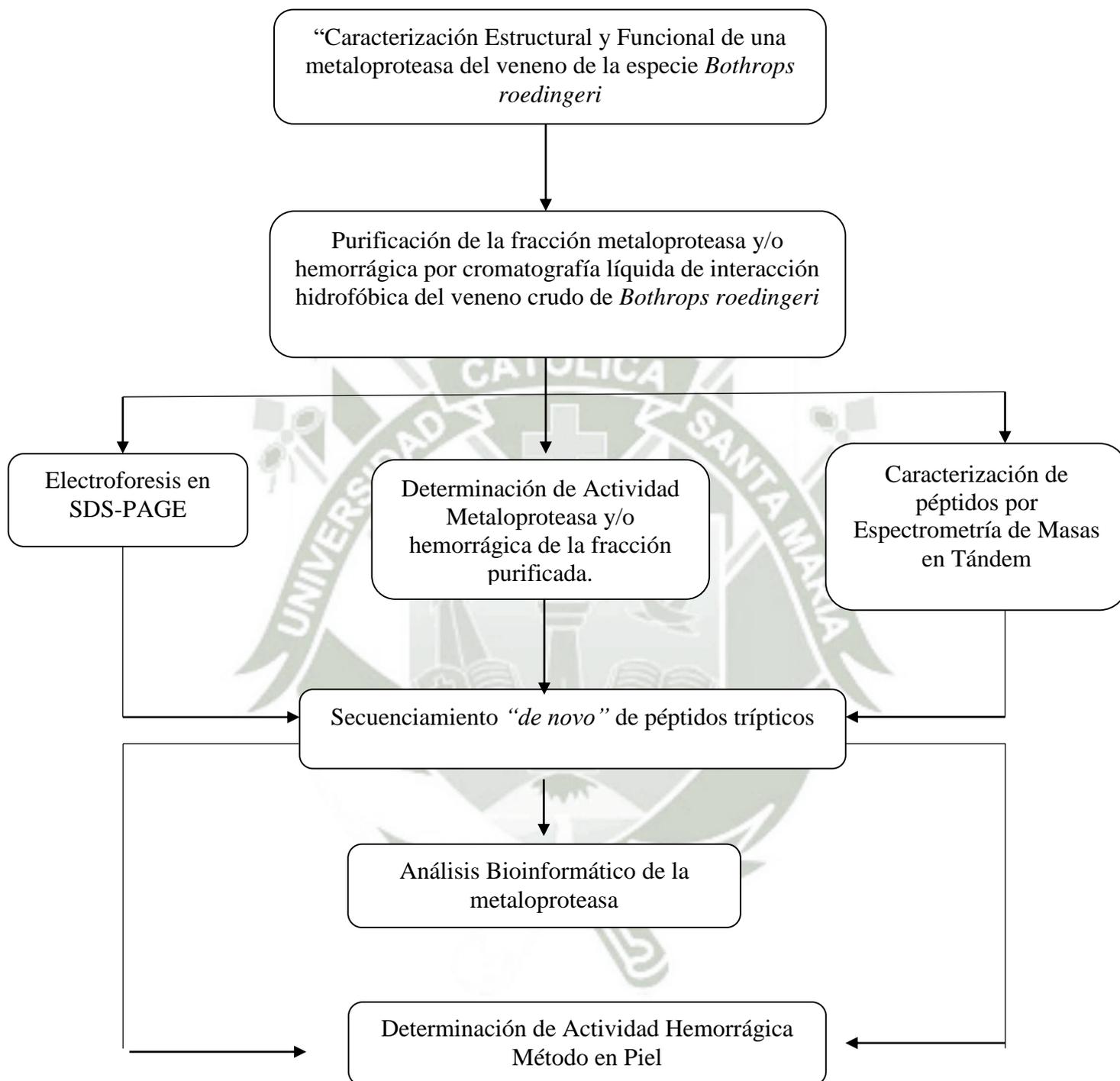
Este procedimiento fue descrito originalmente por KONDO et al. [78] empleando conejos. Sin embargo, el procedimiento ha sido modificado para ser empleado en ratas y ratones GUTIÉRREZ [79]. La técnica consiste en la inoculación intradérmica de veneno total, así como la fracción metaloproteasa esta se diluye en, agua desionizada en una concentración de 10 µg/ml. en dos zonas del dorso previamente depilada del ratón. Al cabo de un determinado periodo de tiempo, los animales son sacrificados y se remueve la piel. Seguidamente, se mide el área hemorrágica del lado interno de la piel. La actividad hemorrágica se expresa como la “dosis hemorrágica mínima “, (DHM), para este caso es de 10 µg/ml. e induce un área hemorrágica de 10 mm de diámetro. El análisis estadístico empleado fue de promedios incluyendo su desviación estándar.

#### ○ **Legislación internacional:**

Al momento de realizar esta metodología con animales nos vamos a referir a reactivos biológicos, debido a que son seres vivos hay que tener en cuenta una bioética bien definida y planteada para lo cual se tendrá en cuenta legislación internacional como es el caso de “La protección de animales en el laboratorio” decretado por la Unión europea el 22 de septiembre del 2010 teniendo en cuenta los ámbitos sujetos a la experimentación animal se consideró la investigación fundamental para calidad, mejoramiento, eficacia y seguridad. De la misma forma al momento de sacrificar a los animales se tendrá en cuenta el método alternativo de las tres “erres” que se menciona en el Capítulo 3 de dicho decreto.

- Reducción: Se minimizará el número de animales a sacrificar, interpolando dosis o descartando pruebas que no nos serán de utilidad.
- Refinamiento: Nos basaremos en reducir el daño o estrés que cause al animalito al momento de sacrificarlo, para que no sufra ni sienta mucho dolor.
- Reemplazo: Tratar de sustituir a los animales con otros métodos ya sea informáticos o técnicas de realidad virtual, este método se tendrá en cuenta para un futuro estudio de investigación y mejoramiento.

## 2.4 FLUJOGRAMA DE PROCESOS



## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se sabe que la especie de la cual se obtuvo el veneno es un espécimen procedente del distrito de Mejía en la provincia de Islay perteneciente al Departamento de Arequipa, una vez capturada se mantuvo en cautiverio en el Serpentario de la Universidad Nacional de San Agustín “MUSA”, donde el veneno fue extraído por presión manual de las glándulas venenosas de la serpiente, fue centrifugado y finalmente liofilizado, manteniéndolo en refrigeración hasta el momento en ser proporcionado para su purificación.

#### **3.1 Purificación de la metaloproteasa a partir del veneno total de *Bothrops roedingeri* a través de cromatografía de interacción hidrofóbica y una Electroforesis en SDS PAGE**

Las técnicas de purificación tanto cromatografía como la electroforesis se realizaron en la Universidad Nacional de San Agustín en el Laboratorio de Bioquímica (3 piso) a cargo del Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D. y del Mg. Ronald Navarro Oviedo.

### 3.1.1 Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

Uno de los procesos Biotecnológicos para separación y purificación de proteínas es la Cromatografía y la técnica que se aplicó fue la Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC) debido a que la muestra que se analizó como es la metaloproteasa cuenta con altas concentraciones de sal y esto en consecuencia de que las proteínas se unen reversiblemente a ligandos con acción hidrofóbica.

Según Hjerten et al. [76] la HIC tiene una relevancia en biotecnología por estudiar y conocer como las condiciones y las características de las proteínas afectan el perfil de elución y el tiempo de retención, se pudo concretar que una de las variables primordiales de este proceso es debido al tipo y la concentración de sal que se usa para poder formar el gradiente de elución.

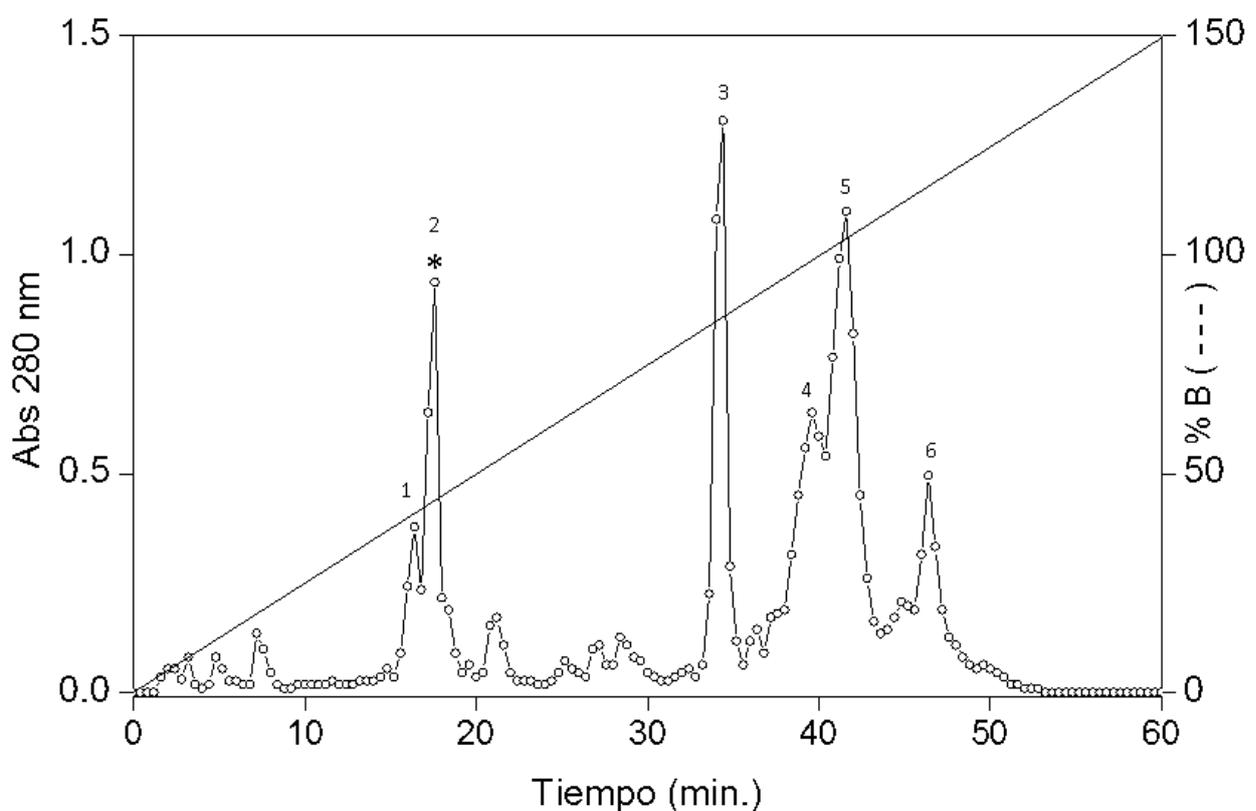
Al tener conocimiento del porque y para que usaremos esta técnica se continuó a empezar armando la columna de Interacción hidrofóbica que fue previamente equilibrada con 0,2mM de bicarbonato de amonio a pH 7.9. Se tuvo en cuenta que al momento de armar la columna se hizo uso de unas columnas quelantes llamadas HITrap debido a que cumplen dos funciones muy importantes una de ellas es que al poseer dentro Acetonitrilo o Sepharosa se encargarán de la separación de proteínas Hidrofóbicas (No son miscible con el agua) de las Hidrofílicas (Posee afinidad con el agua) y la otra función que se encargan de la eliminación de sales.

Se evaluó 10 mg. del veneno de *Bothrops roedingeri* obtenida de una especie peruana. Las fracciones fueron eluidas con un flujo de 10 ml/h. y con un gradiente lineal 20mM a 1M de bicarbonato de amonio, las fracciones fueron colectadas y discriminadas por su actividad hemorrágica, una vez analizadas estas fracciones se introdujo los datos respectivos del tiempo de retención de cada muestra y fueron ingresados al Software Origin 6.0 para poder graficar y poder realizar ajuste de curvas y el respectivo análisis de picos. Como resultado nos reveló la presencia de seis picos, siendo el pico número 2 aquel que mostró actividad hemorrágica y además posee una masa molecular de aproximadamente 23 kDa en relación a los demás picos (Figura 7).

Se afirma que el pico 2 es la muestra que tiene actividad hemorrágica debido al tiempo de retención y cómo afecto al perfil de elución separándolo del más pesado al más ligero, se puede interpretar que la separación fue de acuerdo a sus diferencias en hidrofobicidad en la cual interactúan tanto las proteínas y la matriz y también todo

esto se ve influenciado por presencia de sales en el buffer, estas sales se encargan de eliminar las partículas de agua que tapan las regiones hidrofóbicas de las proteínas y por consecuencia exponen las parte hidrofílicas facilitando la interacción , al momento de disminuir la fuerza iónica esta interacción se invierte y las proteínas con bajo nivel de hidrofobicidad son eluidas primero .

Mahn <sup>[77]</sup>, nos indica que la retención de proteínas en HIC es modelada a partir de la hidrofobicidad de proteínas y a la vez por las características del sistema, mediante modelos empíricos, pero el problema es que estos modelos son limitados porque no siempre se cuenta con información adecuada



**Figura 7. Cromatografía de interacción hidrofóbica, registrando el pico número 2 (\*) como la muestra con actividad hemorrágica.**

Para complementar el uso de esta amplia y muy importante técnica se conoce que no solo la HIC es usada para procesos de purificación para especies de la familia *Bothrops*:

Stroka et.al.<sup>[57]</sup> realizó una purificación de exclusión molecular o gel filtración de la especie *Bothrops lanceolatus* usando “Sephadex” siendo el rango de exclusión de las moléculas “G-100”, el veneno se eluyó a un ritmo de flujo de 5 ml/h (1.5 ml / fracción) y su perfil fue monitoreado a 280 nm obteniendo como resultado que el veneno contiene más de una proteínasa con acción hemorrágica, que fue expresada en dos picos y Torres Huaco et.al.<sup>[71]</sup>, empleo una metodología similar a la mencionada anteriormente pero con modificaciones una de ellas fue trabajar con la especie *Bothrops marajoensis*, en este caso se purificó con el sobrenadante obtenido e inyectado a un HPLC en fase reversa de exclusión molecular “Superdex” usando dos tampones (trifluoroacético ácido-TFA) por 15 min, su elución se llevó a cabo un gradiente lineal del segundo tampón (acetonitrilo), controlado a 280 nm obteniendo como resultado 13 fracciones con alta actividad hemorrágica

Stroka et.al.<sup>[57]</sup> aplicó también la cromatografía de Afinidad junto con unas columnas quelantes este método tiene similitudes con el actual trabajo, se utilizó en ambos métodos el Tampón Fosfato 0,05 M, pH 7.5 para el equilibrio y eluidos con un gradiente lineal de NaCl (sales neutras) el cual es específico para eluciones de miotoxinas, tuvo como resultado obtuvo dos picos con actividad hemorrágica y el más alto fue sometido a otro proceso de propiciación en una columna de fenil-Sepharose; concluyendo que este tipo de columnas y cromatografías son las más empleadas para purificar proteínas de familia de Hemorraginas.

Cabe resaltar que de todas las técnicas mencionadas la masa molecular obtenida varía entre 20 hasta 29 kDa entonces, se puede deducir que las proteasas presentes en diversas especies de *Bothrops* varían en actividad hemorrágica debido a los componentes proteicos que existen en los venenos.

Existen algunas diferencias con respecto de todo lo mencionado una de ellas es el uso de distintos protocolos ya sea el método o columnas, así como los reactivos con los cuales son equilibrados, en algunas investigaciones se usa el Sulfato de Amonio a pH 7,0 y a 0,05M y en la actualidad se usó bicarbonato de amonio a pH 7.9 y a 0,2 mM, ambos son utilizados como flocculantes y su función la purificación de ácidos, es probable que esta diferencia sea por los requisitos del equipo, capacidad y su forma de expresar las fracciones o como reaccionaria la enzima.

### 3.1.2 Electroforesis en SDS-PAGE

Al igual que la cromatografía la electroforesis es una técnica para purificación, identificación y separación de proteínas, se basa principalmente en la atracción de cargas es decir el traslado de solutos en un campo eléctrico, un cambio de dirección hacia distintos electrodos (+ y -) en base a su peso molecular y carga.

Según la Metodología aplicada y detallada anteriormente la expresión de las proteínas se puede comparar de forma cuantitativa depende de la aparición de manchas, esta nos proporcionara información sobre la expresión.

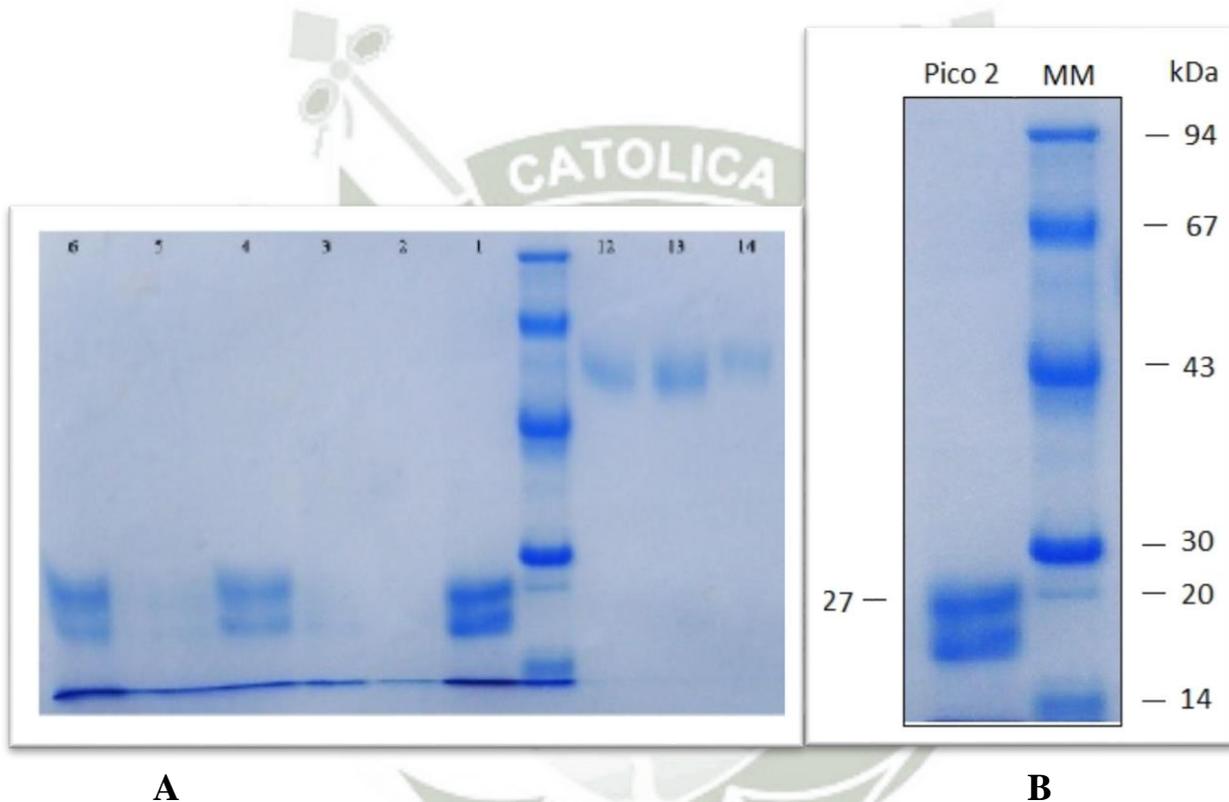
Una vez obtenidos nuestros respectivos geles se añadió la muestra con actividad hemorrágica obtenida del pico 2 en el método anterior, la cual paso por una centrifugación previa para concentrar la muestra en el fondo, no solo se usará las muestras si no también marcadores estos con la finalidad de poder calcular los pesos moleculares de las muestras problema y también para una comparación por el tamaño de las moléculas , como marcadores se uso fosforilasa B (97 kDa), albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa) y alfa lacto albúmina de leche (14 kDa).

El perfil de masa molecular en PAGE-SDS, de la fracción HFBr, aislada a partir del veneno total de *Bothrops roedingeri*, está mostrado en la Figura 8, en la figura “A” se observa el gel completo donde varias columnas fueron usadas como ensayo para pruebas de Tips y/o micropipetas y se logra evidenciar muestras de proteínas pero no tan intensas, pero en la imagen “B” se recorta las dos columnas con la fracción hemorrágica y los marcadores mencionados donde la fracción indicada presenta una masa molecular de 23 kDa aproximadamente, en condiciones reductoras, en presencia de DTT este agente reductor tiene la propiedad de desnaturalizar proteínas haciendo que los enlaces disulfuro de estas y así mejorar la separación. En la imagen “B” nos muestra la diferencia entre la HFBr y los marcadores y se observó por las manchas como se evidencia aproximadamente entre 14 y 30 kDa y así sacar un promedio aproximado de 23 kDa según los marcadores esto desde el punto de vista cualitativo, pero para ser exactos se puede realizar un método cuantitativo hallando el Rf que se puede interpretar con la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia que migra una determinada proteína}}{\text{Distancia que migra el frente del gel}}$$

Con este dato se puede interpretar el valor del logaritmo del peso molecular frente a su movilidad en la electroforesis

Y en condiciones no reductoras evidencia una masa molecular de ~27 kDa sin presencia de agentes reductores, también agregar que tanto los marcadores como la muestra fue coloreada y revelado por comassie blue que es un colorante que se une a todo tipo de proteínas, hay que tener en cuenta que este colorante fue rehusado varias veces y tener presente que su sensibilidad baja por lo tanto se dedujo que es mejor usar pequeñas cantidades y mantenerlo a temperatura ambiente.



**Figura 8.**

**A. Gel de poliacrilamida completo**

**B. Electroforesis en gel de poliacrilamida**

**HFBr (Pico 2) aislada a partir de veneno total de *Bothrops roedingeri* de procedencia peruana reducido. mm: marcadores de masa molecular**

De igual forma se puede decir que los ensayos realizados para la investigación de metaloproteasas aplicando esta técnica de SDS-PAGE es extensa.

Recopilando información se concluyó que el peso molecular de una metaloproteasa con actividad proteolítica de especies que pertenecen a la familia *viperidae* de especie *Bothrops*, se encuentran en el rango de 23 kDa hasta 80 kDa.

Borkow et.al. <sup>[59]</sup> purifico hemorraginas de la especie *Bothrops asper* y evidencio que el peso molecular está dentro los 26 y 24 kDa, Bjarnason et.al. <sup>[7]</sup> trabajo con la especie *Bothrops atrox* y su peso se encontraba entre 24 y 25.7 kDa y López Lozano et.al <sup>[60]</sup> utilizó la misma especie *Bothrops atrox* y la masa molecular fue de 23 kDa; por lo tanto, en este caso se puede inferir que la variación se debe al lugar, alimentación, desarrollo u origen de estos animales. Podemos deducir que la familia de las metaloproteasas tiene peso molecular variable eso se debe al sustrato con el que se está trabajando; por tal motivo como se mencionó las metaloproteasas son enzimas dependientes del  $Zn^{2+}$ , el cual es un requerimiento estricto para su actividad proteolíticas y a la vez degradan fosfolípidos de membrana e inducen efectos como miotoxicidad, neurotoxicidad, anticoagulación.

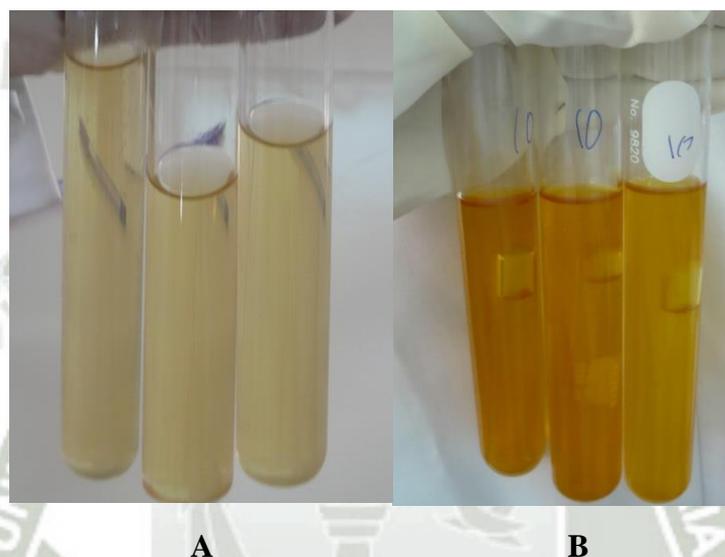
Matsui et.al <sup>[11]</sup> afirmó que varias toxinas son útiles en el diagnóstico de alteraciones hemostáticas estas inducidas por la protrombina (proteína del plasma sanguíneo,) y activadores de factores V, VII Y X <sup>[61]</sup>. Por ende, la función de esta enzima tiene una participación directa con la degradación de fibrinógeno/fibrina y tiene interacción con plaquetas, es en este caso donde observamos un tipo de metaloproteasas denominadas las integrinas que pertenecen a la familia de las desintegrinas la cual una de sus funciones es bloquear el enlace de fibrinógeno todo esto se lleva a cabo en la superficie de plaquetas y como consecuencia tenemos una vinculación con el colágeno, consumo de coagulación.

### 3.2 Determinación de la actividad proteolítica de la metaloproteasa

Para medir la actividad proteolítica de una metaloproteasa o proteínas pertenecientes a las hemorraginas es necesario seguir el método descrito por Erlanger <sup>[56]</sup>, utilizando como substrato  $N\alpha$ -p-Tyrosil-L-Arginina metil Ester (TAME).

Las muestras utilizadas tienen una concentración de 0,1 mg. en el volumen final de reacción. Para este procedimiento se usó dos muestras una es del veneno total y la otra es la fracción hemorrágica en tubos de ensayo (Figura 9), al momento de echar el

substrato cromogénico se tiene que observar y medir el tiempo en el q reacciona. Se observó que el veneno total (VT) su cambio de color cambio a un tono medio plumizo, pero pasado el tiempo se tornaba amarillo pero muy bajo dando a entender que su actividad frente a este sustrato es muy baja (A); mientras que la muestra de la HFBr al momento de tener contacto dio un color amarillo, de esta manera se pudo deducir que esta fracción tiene una actividad enzimática elevada y reacciona rápidamente al contacto con proteasas (B).



**Figura 9. Muestras en contacto con sustrato cromogénico**

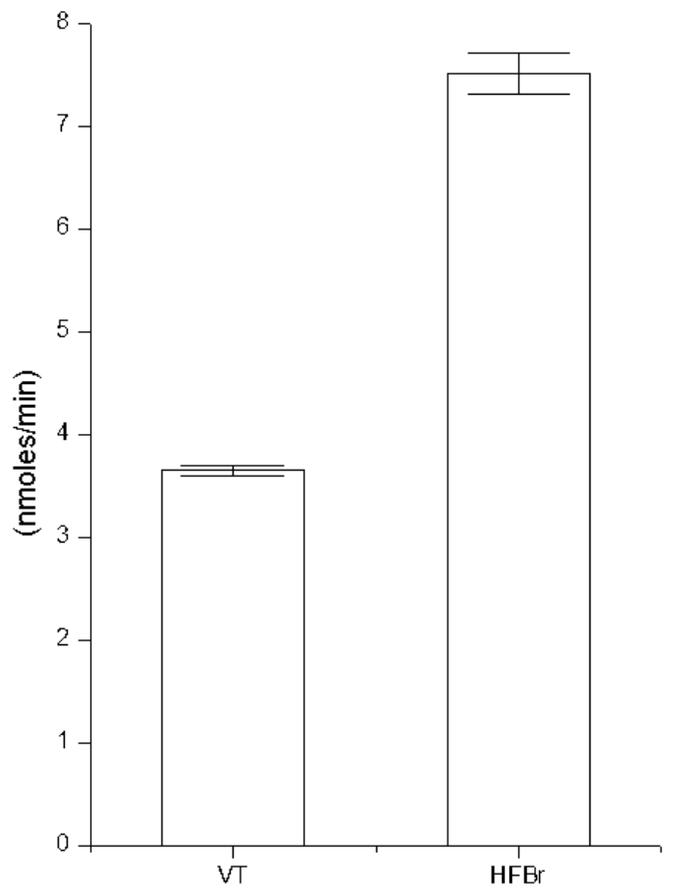
**A: Veneno total reaccionando con el TAME**

**B: HFBr reaccionando con TAME**

Con los datos obtenidos se sacó un promedio de los 3 tubos de cada muestra y se ingresó los datos a Origin 6.0 un software de gráficos y análisis de datos más completo para poder interpretar la medida de la actividad de la metaloproteasa y observar la diferencia, dando como resultado que el veneno total de *Bothrops roedingeri* es de 3,652 nmoles/min.  $\pm$  0,05 y para la fracción HFBr es 7,51 nmoles/min.  $\pm$  0,201. (Figura 10).

Veridiana et.al. [72] afirma que los sustratos pueden variar dependiendo de la enzima a caracterizar, se conoce que para la especie *Bothrops neuwiedi* se utilizó caseína como sustrato y también a la vez ensayado con presencia de iones divalentes

( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) y con inhibidores (EDTA, EGTA, PMSF) esto para observar si existe alguna actividad proteolítica sobre el fibrinógeno.



**Figura 10. Medida de la actividad metaloproteasa de veneno total de *Bothrops roedingeri* y la fracción hemorrágica HFBr sobre el sustrato N $\alpha$ -p-Tirosil-L-Arginina metil ester (TAME).**

*Bothrops neuwiedi* reveló actividad proteolítica; entonces se prosiguió a medir la actividad fibrinolítica usando como sustrato Laminina, fibrocetina o colágeno Tipo I, este método para la actividad fibrinolítica no se realiza fisicoquímicamente como los que se realizaron para las proteolíticas si no sobre las proteínas de la matriz extracelular, analizándola mediante SDS-PAGE. Las fibrinogenasas que se encontró revelaron actividad proteolítica por lo tanto se usó el TAME y se observó que *Bothrops neuwiedi* no reaccionaba con presencia del TAME y por lo tanto no ocasiona hemorragias, entonces se dedujo que esta metaloproteasa es de la clase I según la clasificación de Bjarnason et.al [7],

Boldrini et.al <sup>[75]</sup> realizó una investigación a la especie *Bothrops moojeni* realizando todos los pasos anteriores y obteniendo una respuesta igual a la especie *Bothrops neuwiedi*; entonces concluyó que la actividad hemorrágica es baja debido a que ambos poseen enzimas que son inactivas con el TAME, debido a la ausencia del dominio similar a la desintegrina en el terminal carboxi, que podría contribuir a una mayor actividad hemorrágica y poder asegurar la teoría que una metaloproteasa siempre está unida con el Zn y que estas dos especies pertenecen a la familia de proteasas pero no tienen actividad proteolítica, pero si poseen actividad fosfolipásica porque reaccionaron con un sustrato llamado ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzoico que es específico para fosfolipasas.

### **3.3 Caracterización y determinación de la masa intacta del veneno por la técnica de Espectrometría de masas**

Estas metodologías se trabajaron en el laboratorio de Química de Proteínas del Instituto de Biología de la Universidad Estadual de Campinas (UNICAMP) – Brasil a dirección del Prof. Mauricio Aurelio Gomes Heleno Ph.D. el motivo por el cual se trabajó en estos laboratorios fue porque actualmente en la ciudad de Arequipa no contamos con este tipo de Equipos de alta eficiencia y por ende se tuvo que enviar dichas muestras porque era necesario para seguir con el protocolo ya presentado y nuestras siguientes metodologías.

Existen dos métodos para la medida de masa de péptidos, proteínas y macromoléculas a la vez estos métodos se encargan de producir iones en fase gaseosa que son Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI), para muestras sólidas y el método de Ionización por “Electrospray” (ESI) para muestras líquidas es por ello que es una técnica básica para la secuenciación y análisis de las proteínas. En esta investigación se utilizó ambos métodos para la identificación de Metaloproteasas procedente del veneno de serpiente *Bothrops roedingeri* peruana.

### 3.3.1 Determinación de la masa intacta de HFBr de *Bothrops roedingeri* por espectrometría de masas Electropray (ESI).

El análisis de la masa deconvolucionadas y cruda o intacta, por espectrometría de masas Electropray (ESI), muestra ser de aproximadamente de 27342.6641 Da (Figura 11 y 12 respectivamente).

En la identificación de una metaloproteasa necesitamos como principal recurso el peso molecular de dicha muestra esto para detallar si la muestra a analizar es la que se desea encontrar o tal vez encontrar alguna otra estructura homóloga, es por tal motivo que se usó la Espectrometría de masas Electropray (ESI) debido a que una de sus ventajas es la alta precisión que cuenta, para esta técnica de Ionización se tuvo que tener ciertos criterios de selección y algunas consideraciones, el péptido o la proteína que en este caso es la metaloproteasa tiene que ser un compuesto iónico, polímeros o biopolímeros que en disolución adquieren múltiples cargas, su concentración dependerá de la concentración del analito, el pH de la fase móvil es crítico, es decir que con gradientes se puede controlar el pH, el solvente orgánico de la fase móvil apenas afecta la ionización, necesita un tampón volátil <25 mM, si se trabajaría en concentraciones elevadas pueden dificultar la evaporación/ionización por alguna formación de par iónico, también un tampón no volátil <5-10 mM, este dificulta la desolvatación/ionización se puede usar el fosfato ya que dificulta menos con su polaridad negativa, pero ensucia el detector y fácilmente forma aductor con Na y K (dificultan la Fragmentación).

Se obtuvo como resultado que HFBr posee una masa molecular de 27342.6641 kDa, se usó dos tipos de muestra, una con masa cruda o intacta y otra con una masa deconvolucionada, cabe aclarar que en la masa deconvolucionada se usa la masa de la proteína dividida 10 veces más o es multicargada acá obtenemos un peso promedio de la muestra HFBr dejando de lado rastros de otras proteínas y obteniendo el peso de la metaloproteasa deseada la cual denominada masa cruda aquí se usó la masa nativa quiere decir la masa total tal como es, si es positiva (+) o negativa (-) y fue sometida nuevamente al análisis ESI para determinar la masa exacta de la HFBr.

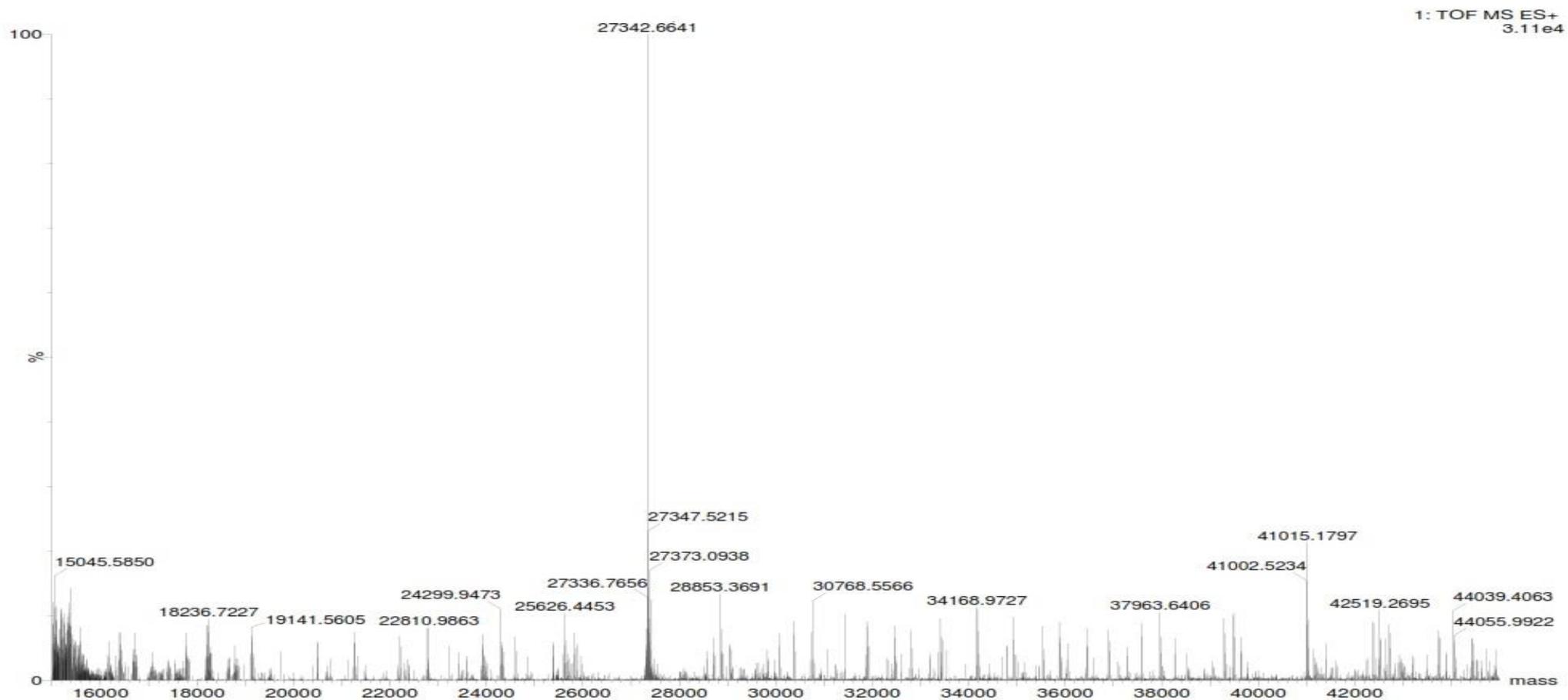


Figura 11. Espectro de la masa deconvolucionada de la fracción HFBr procedente de *Botrhops roedingeri* por espectrometría de masas Electrospray (ESI).

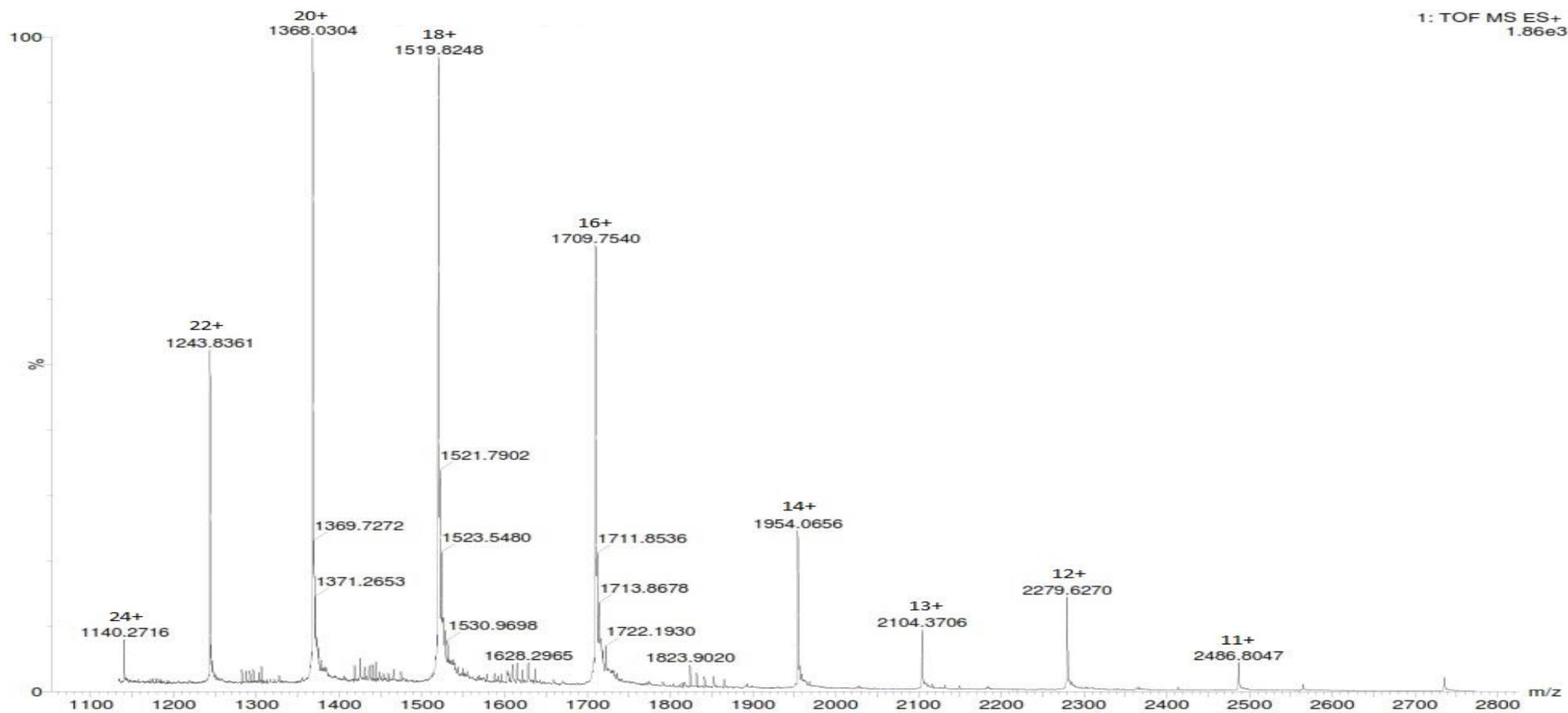


Figura 12. Espectro de masa cruda e intacta de la fracción HFBr procedente de *Bothrops roedingeri* por espectrometría de masas Electropray (ESI)

### 3.3.2 Caracterización de la estructura primaria de “*novo*” por espectrometría de masa MALDI/TOF de la fracción HFBr procedente del veneno total de *Bothrops roedingeri*.

La HFBr que pertenece al pico número 2 del cromatograma procedente del veneno total de *Bothrops roedingeri*, fue digerida con tripsina bovina y los péptidos trípticos resultantes fueron secuenciados por espectrometría de masa MS/MS. La tabla 5 muestra la masa observada de 6 péptidos trípticos, así como la secuencia del mismo y su posición en la secuencia deducida.

El analizador 4800 MALDI TOF/TOF incluye procesos que posee un analizador reflectrón. El medio reconoce proteínas estipulando la masa puntual de péptidos desarrollados por asimilación enzimática, de igual forma este medio consigue con seguridad identificar y caracterizar proteínas por aislamiento y fragmentación de un ion de interés y determinar las masas de los iones fragmento.

**Tabla 5. Secuencia de aminoácidos de 6 péptidos obtenidos por hidrólisis tríptica a partir de la proteína correspondiente al pico 2 de la cromatografía de interacción hidrofóbica del veneno de *Bothrops roedingeri*.**

<i>Péptido No.</i>	<i>Masa medida (Da)</i>	<i>Secuencia de aminoácidos</i>	<i>Masa teórica (Da)</i>
1	673.82	KFPQR	673.78
2	678.89	SCIMAR	678.85
3	843.04	DLIKVEK	843
4	1173.34	LANLEVWSDK	1173.3
5	2238.48	AHELGHNLGMDHDETCTCGAK	2238.44
6	3315.79	SDHALEFSDCSVDYQTVGLAYTGPQCILRK	3316.69

Para la identificación de proteínas es necesario tener en cuenta diversos factores para que no afecten el resultado del análisis como por ejemplo el número de péptidos obtenidos en la digestión enzimática, el grado de purificación de la proteína, sensibilidad

y la precisión de la medida y calidad de la base de datos utilizada que en este caso fue el SWISS- PROT <sup>[61]</sup>.

Hay que tener en cuentas ciertas consideraciones para determinar e identificar el mapeo peptídico por MALDI TOF/TOF una de estas es que la masa de cualquier péptido es determinada por la unión de masas de cada aminoácido y por ende su número son finitos, por consecuencia no alcanza cualquier valor; entonces es en esta parte donde recordamos el fundamento de la técnica utilizada de  $m/z$  para analizar si la señal dada corresponde al péptido a analizar y a la vez para tener conocimiento de su composición de aminoácidos <sup>[61]</sup>.

La proteína identificada como HFBr fue sometida a una ruptura y digestión triptica de una banda llamada spot que fue de aproximadamente 15 kDa usando para esto la enzima tripsina que tuvo como función definir el grado de secuenciamiento, la cual corto en el extremo carboxílico del enlace peptídico de los residuos de lisina y arginina de la cadena de aminoácidos de las proteínas, para obtener el resultado de esta identificación de la proteína en estudio es necesario también la medida de la masa de varias señales de la misma proteína con la mayor exactitud posible.

En el proceso del mapeo peptídico a la muestra HFBr se determinó la secuencia de 6 péptidos obtenidos por hidrolisis triptica, donde la metionina fue modificada por oxidación en la preparación de la muestra para el análisis vía MS.

La secuenciación peptídica de *novó* fue utilizada para caracterizar e identificar la proteína y poder tener conocimiento si esta secuenciado o no lo está, si en caso la secuencia ya se conoce se podrá comparar y poder confirmar si es correcta

El punto principal de encontrar múltiples secuencias de los péptidos de una proteína mediante MS/MS, realizando una exploración de homologías frente a proteínas existentes en diversas plataformas de datos y concluir por secuenciación *de novo* es obtener una secuencia de proteína ya deducida.

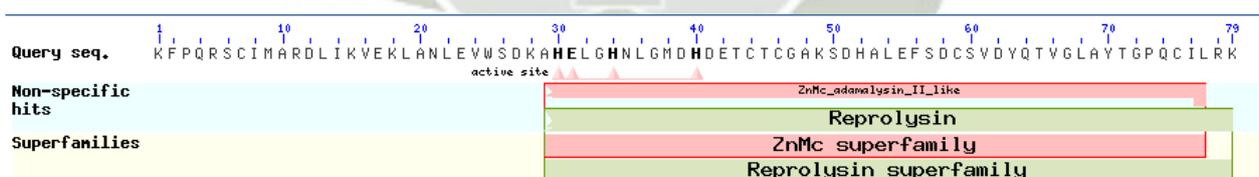
Los péptidos secuenciados fueron utilizados para hacer la búsqueda en la base de datos del NCBI (BLAST) y fue suficiente para identificar a la familia de proteínas a la que pertenece, con alto match de identidad, la comparación fue “Teórico- Práctico” y una diferencia fue la función de señales como el uso de diferentes algoritmos matemáticos.

### 3.4 Caracterización Bioinformática con uso de Software (DNASStar, SWISS-PROT) para comparar la similitud con otras especies.

#### 3.4.1 Estudio de homología secuencial (Análisis bioinformático), de la fracción 2 (HFBr) de *Bothrops roedingeri*.

Con las secuencias obtenidas del paso anterior se procedió a juntar en una sola fila las 6 secuencias y llevarlos a la base de datos llamada NCBI, en la cual tiene un sitio de acceso llamado “Blast” [69], esta herramienta tiene la función de buscar homólogos según el alineamiento que se obtuvo y dentro de esta herramienta existe una opción llamada “Swiss-Prot” que tiene como función específica la homología proteica estructural de modelado. Una vez realizada la búsqueda la cual duro unos 3 a 4 minutos aproximadamente nos expresó el resultado como muestra la figura 13.

Observamos datos relevantes como que su RID es 1E97324W015 y su QueryID: lcl|Query\_8840 e interpretando la imagen se observa que la metaloproteasa estudiada pertenece a la familia de las reprotolisina. Hooper [19], menciona en su clasificación que las reprotolisinas están dentro de la superfamilia de las hemorraginas, entonces se afirma hasta ahora que las metaloproteasas presentes en el veneno son Hemorraginas. Una vez hecha la relación se procedió a realizar comparaciones de identidad con las primeras 3 secuencias encontradas en la descripción para un posterior alineamiento.



**Figura 13. Familia y Superfamilia de la Búsqueda de las Secuencias obtenidas y analizadas en BLAST**

Las secuencias: KFPQR, SCIMAR, DLIKVEK, LANLEVWSDK, AHELGHNLGMDHDETCTCGAK, SDHALEFSDCSVDYQTVGLAYTGPQCILRK fueron obtenidas por medio de la espectrometría de masa hecha anteriormente y se usó para obtener la información tanto de la familia a la cual pertenece como al porcentaje de identidad el cual es mayor al 55% y su puntuación mayor 64.3.

Annotated protein sequence database: reveló que las 3 primeras alineaciones significativas en la lista de identidad también pertenecen a la familia de reprotinas y estas las encontramos en las siguientes serpientes BpMP-1 de *Bothrops pauloensis* (Accesion C0HJU2), Q5XUW8 de *Bothrops insularis* y Q8UVGO de *Bothrops erythromelas* se ingresó a cada una y se extrajo los siguientes datos

**C0HJU2** - Snake venom metalloproteinase BpMP-1; Full=Fibrinogenolytic metalloproteinase

Puntuación de 64.3, Identidad de 55%, E-Value de  $2e^{-13}$

```

yielavvadh gmftkynsnv ntirtwvhem vnslnqffrs mxvddaslvn levwsktlts
fgewrdllpr ishhdhaqlt tivfdqqtig iaytagmcdp sqsvavvmdh vavtmahelg
hnlqmdhddt ctcgakscim astiskglf efsdcsqnqy qtyvtkhnpg cilnk
    
```

**Q5XUW8** - Zinc metalloproteinase/disintegrin; Full=Disintegrin insularin

Puntuación de 65.9, Identidad de 47%, E-Value de  $3e^{-13}$

```

miqvllvtic laafpyqgss iilesnvnnd yevvyarkvt elpkgavqqk yedamqyefk
vngpevvlhl eknkqlfseq ysethyspdg rqiityppfe dhcyyhgrie ndadstasis
acnglkgfhk lqgetylyep lklpdseaha vykyenveke deapkmcgvt etnwesyepe
ekasqsnltp eqqkfspryi elavvadghm ftkynsnlnt irtrvhemvn tlngffrsvn
vdaslanlev wskkdlikve kdssktltsf gewrerdlp rishdhaqlt ttivfdqgti
glaytagmcd prqsvavvmd hskknlrvav tmahelghnl gmdhddtctc gaksimast
iskglsfefs kcsqnqyqy ltdhnpqcil nkplttvsgn elleageecd cgapenpcdd
aatcklrpra qcaeglccdq crfkgagkic rragrdnpdd rctgqsadcp rnrffa
    
```

**Q8UVGO** - Zinc metalloproteinase-disintegrin-like berythracivase; Full=Snake venom metalloproteinase

Puntuación de 59.7, Identidad de 44%, E-Value de  $4e^{-11}$

```

miqvllviic leafpyqgss iilesnvnnd yevvyprkvt alskgavhpk yedamqyefk
vngpevvlhl eknkqlfseq yseihyspdg reittyplve dhcyyhgrig ndadssasis
acnglkgfhk lqgemyliep fklpdseaha vfykyenveke deapkmcgvt etnwesdepi
kksallnltp eqqayldakk yvefvvldh gmykkykddl dkikrriyei vntmnmfip
lnicvaltgl eiwskgdkin vtseswftli lftnwrpadl lkrkshdnaq llntndfdgs
tigratihgsm chpylsvgi qdyspvnllv astmahemgh nlgmhhdndt ctcgapscvm
aaaaiskdpk lfsncsqeyq rkyliknrpq cllnkplrtd iisppvcgne llevgeecdc
gtpencrdpc cnattckltp gsqcveglcc dqcrfrktgt ecraakhdc dlpesctgqsa
dcpmddfqrn ghpcqnnngy cyngkcpme nqcldlvpgk atvaedscfk dnqkgnfygy
crkengkip cepqdvkcg lycndnspgq nnpckciyfp rnedrgmvp gkcdagkvc
snrhcvdvt ay
    
```

Se escogieron las 3 primeras especies porque presentan mayor porcentaje de identidad y así poder ser alineadas en base a las secuencias obtenidas anteriormente.

En la Figura 14 se muestra como se compara la secuencia obtenida por “secuenciación de *novo*” con las otras especies significativas y como gracias a la herramienta MegAlin

fueron alineadas y así comparar la homología secuencial final. Los trazos (-), observados corresponden a los generados por el software para el proceso de alineamiento.

Cuando mencionamos una comparación de secuencias parecidas se concluye que dos secuencias de proteínas expresan una identidad mayor al 55% que estas representan a más de 55 aminoácidos por cada 100 homólogos dentro de esta variada identidad, es casi posible confirmar que la homología es cierta por las secuencias encontradas en el BLAST.

Hay que resaltar que ciertas definiciones como Homología, Identidad y Similitud son iguales, pero en realidad existe diferencias; una homología se denominara como la propiedad que existe o no existe, vendría hacer la identidad medida o la base de la similitud, la Similitud es la medida de cuan tan cercanos es la identidad de dos aminoácidos y con Identidad nos referimos a la medida hecha en una alineación, lo más idéntica que es o cuan idéntica es. Al presentar una identidad de 55% se sabe que tienen la misma estructura y si fuera menos a 50 se diría que “probablemente” tengan la misma estructura.

Para el uso del software DNASTar se debe tener en cuenta que dentro de este programa se usara dos subprograma uno para la edición de las secuencias llamado EditSequene y el MegAlign para el alineamiento , el uso de cada subprograma se detallara en el (ANEXO 5) , entonces la homología se basa ante la presencia de secuencias parecidas y el alineamiento se basa en la variedad de pares y diversos métodos de alineación, se puede mencionar el “Clustal” donde su función es crear sin dificultad alineaciones seleccionando rangos extensos para crear bloques con una misma similitud, al igual que eliminar alguna desigualdad de los datos, pero usamos el MegAlign porque tiene una función especial esta es la de mostrar una secuencia mayor o si no el promedio del alineamiento de las secuencias homólogas<sup>[62]</sup>.

Boldrini<sup>[75]</sup> realizo un estudio con la especie *Bothrops pauloensis* y se conoce que su composición de veneno tiene doble acción tanto de proteasa como de fosfolipasa debido a la presencia de la (PLA2) y trabajó con el mismo protocolo de identificación de proteínas con una diferencia que fue la actividad biológica debido a la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por colágeno y para determinarla usó métodos de ELISA.



Zelanis <sup>[73]</sup> trabajo con la especie *Bothrops insularis* y se pudo conocer que esta especie es selectiva en sus presas y es muy intensa en artrópodos y aves, su masa molecular es de 24 kDa por ende es considerado por su rango entre todas las metaloproteasas, cabe mencionar que cuenta con actividad miotóxicas y neurotóxicas.

Y Bernardes-Oliverira <sup>[74]</sup> hizo una investigación muy interesante con la especie *Bothrops erythromelas* por que ejerce efectos citotóxicos, al ser ensayo con células se trabajó con citometría de flujo en células tumorales presentando un potencial anticanceroso, y estudiarla como desarrollo de nuevas terapias

### **3.5 Caracterizar la metaloproteasa procedente del veneno de *Bothrops roedingeri*, a través de la actividad hemorrágica**

Este procedimiento se realizó en la Universidad Nacional de San Agustín en el Laboratorio de Bioquímica (3 piso), para esto se consiguió 6 ratones bal/66 en el bioterio de la Universidad Católica de Santa María.

Se tuvo en cuenta una normativa internacional para la protección de los animalitos con los que se trabajó con el procedimiento de las 3 “erres” considerando así la Reducción de especies, solo se usó 6 ratones y se inocularon en cada uno de ellos las dos muestras tanto la HFBr y el veneno total en distintos lugares del dorso del ratón para así simplificar un uso de aproximadamente 12 ratones, luego el Refinamiento se evitó que la especie tenga estrés o sufra dolor alguno, no se tuvo en cautiverio, tampoco se le hizo sufrir, los cortes que se realizó fueron después de haber ya fallecido el animal, pero al momento de asimilar el veneno fue rápido y no causo un sufrimiento aparte. En lo que se basa en el Reemplazo es un poco probable que se trabaje en otras especies ya que los ratones presentan características y propiedades que son de utilidad para la investigación que reaccione igual o distinto al de un ratón, se puede trabajar con métodos informáticos, como se propuso técnicas de realidad virtual

#### **3.5.1 Caracterización Biológica:**

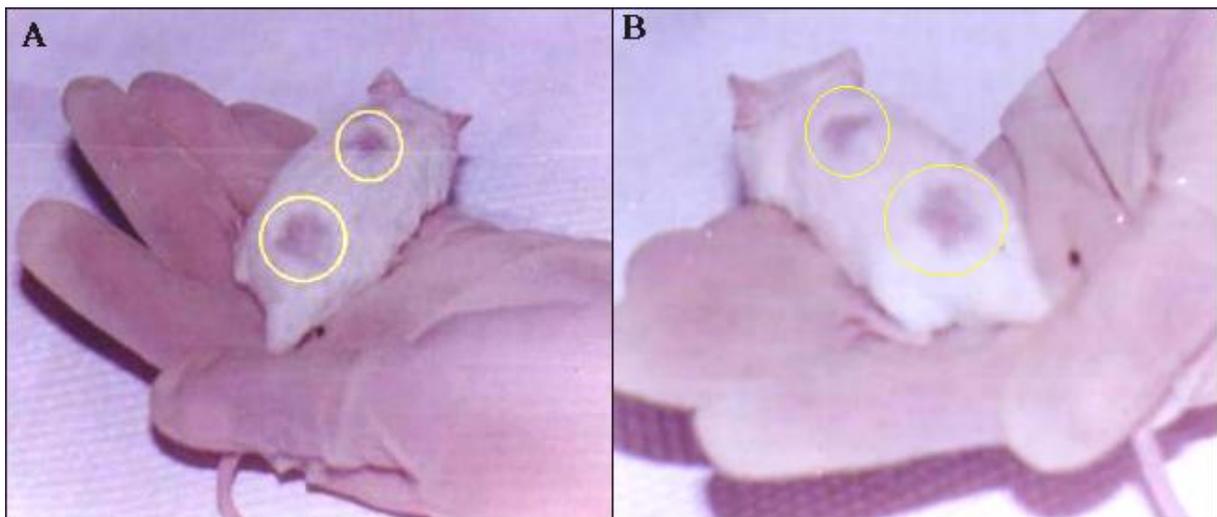
##### **Medida de la actividad hemorrágica.**

La Figura 15 muestra las dos zonas previamente depiladas, del ratón en las que son inoculadas intradérmicamente tanto veneno total, como la fracción HFBr proveniente de *Bothrops roedingeri*, además es inoculada con suero fisiológico (NaCl 0,9%) el que

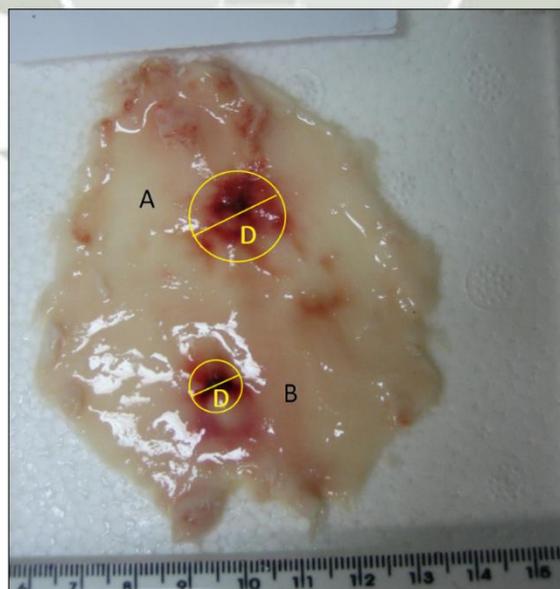
corresponde al control. Fueron inoculadas 6 dosis de las cuales se seleccionó la dosis de 30  $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$  por ser la más representativa en el presente estudio

En la Figura 15 se muestra el sacrificio de los animales por punción cervical ya desangrados y preparados para ser removida la piel.

En la figura 16 mostramos el diámetro de la hemorragia producida por veneno total de *Bothrops roedingii* (B) y la fracción HFBr (A) luego de haber inoculado éste por vía parenteral.



**Figura 15. Dorso depilado del ratón mostrando las dos zonas en las que se aplican las muestras respectivas intradérmicamente en la dosis de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .**



**Figura 16. Diámetro de hemorragia producido por veneno total.**

La actividad hemorrágica de los venenos de serpientes, así como de sus fracciones, se expresa como la “Dosis Hemorrágica Mínima” (DHM), definida como la dosis de veneno o fracción mínima que induce un área hemorrágica de 10 mm de diámetro. La dosis hemorrágica mínima (DHM) tiene como concepto la cantidad de veneno en  $\mu\text{g}$  que genera un diámetro hemorrágico de 10 mm después de un tiempo de la aplicación del veneno

En nuestros experimentos, los diámetros registrados para todas la dosis se muestran en la siguiente tabla, siendo la más representativa la de 30  $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$ .

**Tabla 6. Valores de hemorragia inducida por el veneno total de *Bothrops roedingeri* y su fracción hemorrágica HFBr, en diferentes dosis**

<b>HEMORRAGIA</b>						
<b>Dosis</b>	<b>Medidas (mm)</b>					
	<b>HFBr</b>			<b>Veneno Total</b>		
	<i>Diam1</i>	<i>Diam2</i>	<i>X<sub>1</sub></i>	<i>Diam1</i>	<i>Diam2</i>	<i>X<sub>2</sub></i>
2,5 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$	0	0	0	0	0	0
5 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$	3	3	3	2	3	2.5
10 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$	5	4	4.5	6	4	5
20 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$	0	0	0	0	0	0
30 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$	9	7	8	9	10	9.5
60 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$	14	12	13	11	13	12

La actividad hemorrágica cumple un papel importante para la gran variedad de los SVMP su función es aclarar los mecanismos de los SVMP como las hemorragias <sup>[7]</sup>. Se conoce que para el estudio de la patogénesis de los SVMP hemorrágicos se tiene que tener como muestras el veneno crudo y la fracción hemorrágica, estas inyecciones serán intramuscular, las metaloproteasas en general tienden a expresar resultados como por ejemplo: Extensas áreas de hemorragia que rodean a los músculos y a la células adiposas

y pasado un tiempo la hemorragia se torna más extensa, aumenta, si se usa microscopia electrónica se observarían las células endoteliales éstas se encuentran con grandes ampollas, otras delgadas y alteradas, En los vasos sanguíneos donde se observan uniones intercelulares se encuentran intactas incluso cuando la lámina basal de las células estaba dañada, se puede decir que toda metaloproteasa que tenga actividad proteolítica no solo causan hemorragias si no también alteraciones de la estructura de la membrana basal y también considerada en la desestabilización de membranas.

Como se sabe estas enzimas tienen acción proteolítica por lo tanto son denominadas hemorraginas, se conoce que las hemorraginas se dividen en 4 subgrupos de acuerdo al peso molecular, las primeras metaloproteasas son las que tienen el peso molecular más bajo que se encuentra en un rango de 20 a 30 kDa con poca o casi nula actividad hemorrágica, las de tipo II son toxinas de un tamaño mediano de 30 a 60 kDa es muy similar a una desintegrina debido a sus dominios, el tipo III va más allá de una desintegrina y es rico en cisteína y el IV tipo es similar al tipo III solo que posee un dominio adicional de lectina <sup>[71]</sup>.

Boldrini <sup>[75]</sup>, realizó un estudio de comparación de actividades biológicas, utilizó veneno de *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedii* y *Crotalus durissus sp.*, pasó por inoculación intradérmica y una vez sacrificados se determinó la prueba (DMH) con 3 dosis cada una con distinta proteína se obtuvo como resultado que la muestra de *Bothrops moojeni* y *Bothrops neuwiedii* tienen una dosis mínima de 1.43 y 3.79 respectivamente mientras que la especie *Crotalus* no presentó actividad hemorrágica, las hemorragias son causadas normalmente después de la picadura, estas pueden ser locales o sistémicas la cual influyen mucho la acción de la enzima proteolítica.

Borkow <sup>[59]</sup>, obtuvo una fracción denominada BaH4 purificada de *Bothrops Asper* siguió el mismo procedimiento que esta investigación con la diferencia de que fue estudiada con microscopia intravital, una nueva técnica de microscopia a través de fotones aquí observó que la hemorragia ocurre en los vasos sanguíneos capilares y pequeñas vénulas, el sangrado se detenía por pocos segundos, y dedujo que las metaloproteinasas de alto peso molecular generalmente muestran mayor hemorragia que son de tipo III por presentar dominios de desintegrina y de cisteína y contribuyen a la actividad hemorrágica mediante función plaquetaria.

## CAPÍTULO IV

### Conclusiones

Con cada método aplicado en esta presente investigación, se llegó a las siguientes conclusiones.

- El veneno de la serpiente *Bothrops roedingeri* contiene metaloproteasas que se pudo aislar y purificar mediante métodos de purificación como son la cromatografía de interacción hidrofóbica en la cual de 7 muestras analizadas se evidencio que la muestra 2 es la que obtuvo la actividad hemorrágica expresándose en el cromatograma y en la técnica de electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) se observó que la muestra HFBr tiene una masa molecular de 23 kDa en condiciones reducidas y en condiciones no reducidas tiene ~27 kDa. (aproximadamente) de masa molecular.
- La muestra analizada HFBr demostró ser una metaloproteasa al poder observar una actividad elevada frente al sustrato específico cromogénico N $\alpha$ -p-Tyrosil-L-Arginina metil Ester (TAME) comparado con el veneno total.
- La determinación de masa intacta de la fracción HFBr mediante espectroscopia de masas (ESI) se halló la masa molecular de 27342.6641 Da. y su caracterización de “*novo*” por espectroscopia de masas (MALDI/TOF) nos secuencio 6 aminoácidos dependientes de los péptidos trípticos que son KFPQR, SCIMAR, DLIKVEK, LANLEVWSDK, AHELGHNLGMDHDETCTCGAK, SDHALEFSDCSVDYQTVGLAYTGPOCILRK.
- Con el estudio bioinformático se pudo caracterizar la muestra HFBr y nos dio como resultado que pertenece a la familia de las reprotolisinas–hemorraginas según la base de datos SWIIS-PROT y sus homólogos pertenecen también a metaloproteinasas de distintas especies y con una identidad mayor a 55%
- Se caracterizó la metaloproteasa procedente del veneno de *Bothrops roedingeri*, a través de la actividad hemorrágica expresado como la “Dosis Hemorrágica Mínima” siendo la más representativa la de 30 ug /0.1ml.

### Recomendaciones

- Con la finalidad de ampliar el catálogo de péptidos con actividades biológicas y así permitirnos brindar información, continuar y mejorar el estudio bioinformático de los compuestos proteicos del veneno de serpiente y con esto tener proyecciones para futuros usos biotecnológicos.
- Seguir con el estudio Bioinformático de todas las proteínas presentes en el veneno de la serpiente *Bothrops roendigeri*
- Impulsar el avance de proyectos de investigación, para que ingresen a concursos financiados por el estado o empresas privadas esto para poder implementar y mejorar los equipos y materiales en los laboratorios, estas investigaciones servirán para la iniciativa de incrementar la base de datos de artículos científicos.
- Dar un mayor impacto académico para la importancia de uso de programas para el estudio Bioinformático de proteínas, estudios de modelaje, comparaciones de regiones y/o dominios específicos
- En futuras investigaciones tratar de modificar o utilizar nuevas metodologías para un buen resultado, ya que con los resultados obtenidos en la presente investigación se pudo continuar con estudios a partir de estos como estudio de otra alguna proteína dentro de la especie.
- Brindar conocimiento de los variados métodos de espectrometría de masas en universidades, mediante cursos, seminarios, proyectos; para poder despertar interés hacia esta metodología moderna y avanzada en los jóvenes investigadores y así motivar a las universidades adquirir el uso de estos equipos y mejorar el aprendizaje.
- Brindar una nueva metodología de estudio para tratar de reemplazar el uso y sacrificio de ratones por medio de técnicas informáticas.

## Referencias Bibliográficas

- [1] Concha Gil García. La metodología Proteómica, una herramienta para la búsqueda de función. Actualidad SEM- pp.35-12/35-20
- [2] Hider R.; Karlsson E.; Namiranian S. Separation and purification of toxins from snake venoms. In Harvey, A. L. Ed. Snake Toxins. New York: Pergamon Press, Inc., 1991, pp 1-36
- [3] Matsui T.; Fujimura Y.; Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. Biochim. Biophys. Acta. v. 1477, 2000.
- [4] Pérez Nogués; Rojo Solís et.al, Estudio del veneno de serpientes: Tipos y Tratamientos. ISSN: 1988-2688 RCCV Vol. (2). 2008
- [5] Pereira, CF, Fernandez, CM, Zuliani, JP y Zamuner, SF. 2005. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. Mem. I. Oswaldo Cruz.
- [6] Karalliedde, L. 1995. Animal toxins. British Journal of Anaesthesia, 74
- [7] Bjarnason, J. B.; Fox, J. W. Hemorrhagic metalloproteinase from snake venoms. Pharmac. Ther. V. 62, 1994.
- [8] Kamiguti, A. S. et al, Insights into mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. Toxicon. v. 34, 1996.
- [9] Marsh, N. A. Snake venom affecting the haemostatic mechanism – a consideration of their mechanisms, practical applications and biological significance. Blood Coag. Fibrinol. v. 5, 1994.
- [10] Suhr S. M.; Kim Doo-Sik. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. v. 224, 1996.
- [11] Matsui T.; Fujimora Y.; Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. Biochim. Biophys. Acta. v. 1477, pp 146-156, 2000.
- [12] Markland, F. S. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: An update inventory. Thromb. Haemost. V. 79,1998.
- [13] Blundell T. L. Metalloproteinase super-families and drug design. Nature Struct. Biol. v. 1, pp 70-75, 1994.
- [14] Borkakoti N. Matrix metalloproteinase: variations on a theme. Prog. Biophys. Mol. Biol. v.70, 1998.
- [15] Wen C.; Metzstein N. M.; Greenwald I. SUP-17, a Caenorhabditis elegans ADAM protein related to Drosophila. V. 124, 1997.

- [16] Nishiwaki K.; Hisamoto N. E.; Matsumoto K. a metalloproteinase disintegrin that controls cell migration in caenorhabditis elegans. *Science*. v. 288, 2000.
- [17] George S. J. Therapeutic potential of matrix metalloproteinase inhibitors in atherosclerosis. *Exp. Opin. Invest. Drugs*. V. 9, 2000.
- [18] Lafleur, M. A. et al. Perivascular cells regulate endothelial membrane type-1 matrix metalloproteinase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 282, 2001.
- [19] Hooper N.M. 1994. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* 354:1-6.
- [20] Schumann W. FtsH-a single-chain chaperonin *FEMS Microbiol. Rev.* v. 23, pp 1.11, 1999. 1998.
- [21] Karata K. et al. Dissecting the role a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. *J. Biol. Chem.* v. 274, 1999.
- [22] Declerk Y.A. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur. J. Cancer*. v. 36, 2000
- [23] Wolfsberg T. G.; Write J. M. ADAMs in fertilization and development. *Dev. Biol.* v. 180, 1996.
- [24] Yamamoto S. et al. ADAM family proteins in the immune system. *Immunol. Today*. V. 20, n 6, pp 278-284, 1999.
- [25] Paine M. J. L. et al. Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloproteinase, jararhagin, from Bothrops jararaca venom. *J. Biol. Chem.* v. 267, 1992.
- [26] Shah Z. H. et al. The human homologue of the yeast mitochondrial AAA metalloprotease Yme1p complements a yeast yme1 disruptant. *FEBS Lett.* v. 478, 2000.
- [27] Grams F. Et al. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS Lett.* V. 335, pp 72-80, 1993.
- [28] Tang B. L. Adamts: A novel family of extracellular matrix proteases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* v. 33, pp 30-45, 2001.
- [29] Soszka T. Et al. Inhibition of murine melanoma cell- matrix adhesion and experimental metastasis by albolabrin, an RGD-containing peptide isolated from the venom of *Trimeresurus albolabris*. *Exp. Cell Res.* v. 196, 1991.
- [30] Jia L-G Et al. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Toxicon*. v. 34, 1996.

- [31] Brew K. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1477, 2000.
- [32] Bornstein P. Thrombospondins: structure and regulation of expression. *FASEB J.* v. 6, 1992.
- [33] Abbaszade I. et al. Cloning and characterization of ADMMTS 11, and aggrecanase from the ADAMTS family. *J. Biol. Chem.* v. 274, 1999.
- [34] Morandi V. Thrombospondin: Relationship to protease and growth factor/cytokine activity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 27, 1994.
- [35] Coelho A. L. J. et al. Effects of Jarastatin, a novel snake venom disintegrin, on neutrophil migration and actin cytoskeleton dynamics. *Exp. Cell Res.* v. 251, pp 383 - 395, 1999.
- [36] Manning M. C. Sequence analysis of fibrolase, a fibrinolytic metalloproteinase from *Agkistrodon contortrix contortrix*. *Toxicon.* v. 33, 1995.
- [37] Zhu, X. et al. Studies on relationships between the biological activities and circular dichroism of south Anhui *Dienagkistrodon acutus*. *Biochim. Biophys. Acta Sinica.*, v. 29, pp 27-55, 1997.
- [38] Odell G. V. et al. Citrate inhibition of snake proteases. *Toxicon.* v. 26, 1998.
- [39] Baramova E.N. et al. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 275, 1990
- [40] Takeya H. A. et al. Primary structure of a hemorrhagic proteinase, HT-2, isolated from the venom of *Crotalus rubber rubber*. *J. Biochem.* v. 108 1990.
- [41] Gazmi A. et al. Amino acid sequence of VIF: identification in the C-terminal domain of residues common to non-hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 9, 2000.
- [42] Trummel, Katrin et al. MALDI-TOF mass spectrometry analysis of substrate specificity of lebetase, a direct-acting fibrinolytic metalloproteinase from *Vipera lebetina* snake venom. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1476, 2000.
- [43] Zavaleta A; Salas. M Ofidismo: Envenenamiento por mordedura de serpientes. Separata Instituto Nacional de Salud. Perú. 1996.
- [44] Carrillo de Espinoza, N. 1970. Contribución al Conocimiento de los Reptiles del Perú. Publicaciones del Museo de Historia Natural "Javier Prado". UNMSM. Serie A Zoología N° 22. Lima, Perú.
- [45] Campbell, J.A; W.W. Lamar. 1989. The venomous reptiles of Latin America. The Herpetologist leaguem (pub). Museum Natural History. Pittsburgh, U.S.A.

- [46] Pesantes O. 2000. Prevención y Tratamiento de Accidentes por Serpientes Venenosas. Oficina de Relaciones Públicas SEDAPAL. Lima-Perú
- [47] Navarro A. M. Responsable Componente Especial de Zoonosis – Dirección General de Salud de las Personas MINSA. Exposición: Accidentes por Animales Ponzñosos Perú. Lima, Perú. 2009
- [48] Meneses O. Los animales venenosos y sus peligros. Instituto de Salud Pública, Lima-Perú. Publicación No. 2, pp. 3-14. 1974
- [49] Yarleque A. Las serpientes peruanas y sus venenos. Universidad Nacional mayor de San Marcos. Fondo Editorial. (2000)
- [50] Ministerio de Salud del Perú. Ofidismo. Oficina General de Epidemiología, Instituto Nacional de Salud. Módulo Técnico. Serie de Documentos Monográficos 10. Lima-Perú. 57p. 2000
- [51] [Animalesyplantasdeperu.blogspot](http://animalesyplantasdeperu.blogspot) [Actualizado 4 de junio de 2007; citado 30 Oct2017] Disponible en:  
<https://animalesyplantasdeperu.blogspot.pe/2007/06/vbora.html>
- [52] Cárdenas J.; Y. Cisneros; E. Escobar; A. Yarlequé; S. Gutiérrez. Acción Antibacteriana de Venenos de Serpientes e Identificación del componente bioactivo. 2004. Disponible en:  
URL:[www.unmsm.edu.pe/biologia/reunio/csr15.htm](http://www.unmsm.edu.pe/biologia/reunio/csr15.htm)
- [53] Sierra M; B. Pérez. 2001. Serpientes exóticas: nueva moda, nueva urgencia. Medicina Intensiva. Vol. 25. Nº 2. España. En: <http://db.doyma.es>.
- [54] Carrillo de Espinoza, N; J. Icochéa. 1995. Lista Taxonómica Preliminar de los reptiles vivientes del Perú. Publicaciones del Museo de Historia Natural. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Nº.49:1-27.
- [55] Solis C., Escobar, E., Yarleque A., Y Gutierrez, S. Purificación y caracterización de la L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* “jergón shushupe”. Revista Peruana de Biología 6 (1): pp 75-84. 999.
- [56] Erlanger B.F. and Goode L. Antibacterial activity of acyclic decapeptide analogs of gramicidin S. Science. 1961
- [57] Stroka A., Donato J.L. et.al. “Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) snake venom”, Toxicon 45. pp 411–420 (2005)

- [58] SIGMA-ALDRICH - N-p-Tosyl-L-Arginina metil ester (TAME) “Product Information” – Product Number T4626
- [59] Borkow, G., Gutiérrez, J.M., Ovadia, M., 1993. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* 31,
- [60] López-Lozano, J.L., de Sousa, M.V., Ricart, C.A., et al. , Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. *Toxicon* 40, 2002.
- [61] Abián J, Carrascal M and Gay M. Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica. Laboratorio de Proteómica CSIC/UAB, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona IIBB-CSIC. Barcelona. 2008
- [62] Ponce Soto L. DNASTar. Software que proporciona lo necesario para la información genómica, y proteómica de la biología estructural, marzo 2015.
- [63] [Sistema Integrado de Información Taxonómica. «Bothrops \(TSN 209554\)»](#)
- [64] Simpson RJ. Proteins and proteomics. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2003.
- [65] Christensen V., et.al .The Peruvian fisheries sector. *Marine Policy* 2014. pp. 302–311.
- [66] Graves P.R. Molecular biologist's guide to proteomics. *Rev Mar*; 66 2002. pp. 39-63
- [67] ABSciex, Protein Pilot™, Software. Getting Started Guide D1000085732B, September 2010
- [68] Applied Biosystems. /MDS SCIEX 4800 MALDI TOF/TOF™ Analyzer. Getting Started Guide. Version 3.0 Series Software. 2004
- [69] BLAST NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) agosto 2017
- [70] SWISS-MODEL: Servidor de homología proteica estructural de modelado totalmente automatizado, accesible a través del servidor web ExPASy. Disponible en: <http://swissmodel.expasy.org/>
- [71] Torres Huaco F., Ponce Soto LA, et al., Purification and Characterization of a New Weak Hemorrhagic Metalloproteinase BmHF-1 from *Bothrops marajoensis* Snake, *Protein J* (2010) 29,407-416

- [72] Veridiana M. Rodrigues, Andreimar M. Soares et al, Structural and Functional Characterization of Neuwiedase, a Nonhemorrhagic Fibrin(ogen)olytic Metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake Venom Vol. 381, No. 2, September 15, pp. 213–224, 2000
- [73] Zelanis A., Travaglia-Cardoso S, et al, Ontogenetic changes in the venom of *Bothrops insularis* (Serpentes: *Viperidae*) and its biological implication- South American Journal of Herpetology 3(1):43-50. 2008
- [74] Bernardes-Oliveira E., Lopes Gomes D. et al, Bothrops jararaca and Bothrops erythromelas Snake Venoms Promote Cell Cycle Arrest and Induce Apoptosis via the Mitochondrial Depolarization of Cervical Cancer Cells. 2016 Volume 2016, Article ID 1574971. pp 9
- [75] Boldrini J, Hamaguchi A. et al. Estudo Comparativo de Atividades Biológicas Presentes nas Peçonhas de Três Serpentes Brasileiras: *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi pauloensis* e *Crotalus durissus* sp.
- [76] Hjerten S., K. Yao, O. Eriksson y B. Johansson; Gradient and isocratic high - performance hydrophobic interaction chromatography of proteins on agarose columns. J. Chromatogr.: 359, 99- 109 (1986).
- [77] Mahn A.V. Modelación Fenomenológica de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica, Departamento de Ingeniería Química. Información Tecnológica Vol.20(3),135-144(2009)
- [78] Kondo, H. et al. Studies on the quantitative method for the determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. Biol. v. 13, p. 43-51, 1960.
- [79] Gutiérrez, J.M. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. Toxicon 23: 884-893, 1985

## Anexos

- ANEXO 1: Tabla de componentes y contenidos para Montaje del sistema de electroforesis

### ✓ Gel de Resolución (Running Gel)

<b>Gel de Resolución (7.5%):</b>	<b>mL /ul</b>
<i>Agua destilada</i>	<i>12 ml</i>
<i>Acrilamida/Bisacrilamida</i>	<i>6.25 ml</i>
<i>Tris 1M pH 8.8</i>	<i>6.25 ml</i>
<i>SDS 10%</i>	<i>250 <math>\mu</math>l</i>
<i>TEMED</i>	<i>12.5 <math>\mu</math>l</i>
<i>Persulfato amónico (100mg/1mL)</i>	<i>200 <math>\mu</math>l</i>

### ✓ Gel de Empacamiento (Stacking Gel)

<b>Gel de Empacamiento (4.8%):</b>	<b>mL /ul</b>
<i>Agua destilada</i>	<i>5.8 ml</i>
<i>Acrilamida/Bisacrilamida</i>	<i>1.65 ml</i>
<i>Tris 0.5 M pH 6.8</i>	<i>2.5 ml</i>
<i>SDS 10%</i>	<i>100 <math>\mu</math>l</i>
<i>TEMED</i>	<i>6.5 <math>\mu</math>l</i>
<i>Persulfato amónico (100mg/1mL)</i>	<i>94 <math>\mu</math>l</i>

- ANEXO 2: Preparación Muestra Biológica y Running buffer (Tampón De corrida)

### Muestra Biológica

Coloca las muestras de las proteínas a procesos físico-químicos para fraccionamiento

- Micropipetas volumen desde 20 a 1000 ul
- Puntas desde 20 a 1000 ul
- Tubo de Polipropileno de 1.5 ml
- Baño María
- Vaso de Precipitación
- Buffer de corrida

### Tampón de Corrida

- Tris-HCl 0.020M
- Glicina 0.185M
- SDS 0.1% - Ph 8.0

Reactivos	gr/ml
<i>Tris</i>	<i>14.6 gr</i>
<i>Glicina</i>	<i>71.5 gr</i>
<i>SDS</i>	<i>4 gr</i>
<i>Agua</i>	<i>400 ml</i>

Observación: Colocar aproximadamente 250 ml de agua y ajustar a ph 8.0, seguido adicionar 4 gr de SDS, en caso no se disuelva proceder a un calentamiento corto.

○ **ANEXO 3: Tampón de la muestra y Tampón de corrida**

**Tampón de la muestra**

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Concentración</b>
<i>Tris 0.5M Ph 6.3</i>	<i>2.5 ml</i>	<i>0.125 M</i>
<i>SDS 20%</i>	<i>2.5 ml</i>	<i>5 %</i>
<i>2-Mercaptoetanol</i>	<i>2.5 ml</i>	<i>25%</i>
<i>Glicerol</i>	<i>2.5 ml</i>	<i>25%</i>
<i>Azul de Bromofenol</i>	<i>2.0 mg</i>	<i>0.2mg/ml</i>

**Soluciones Stock (5ml)**

SDS	500 ul
Glicerol	500 ul
Tris	400 ul
Agua	3.0 ml
Bromofenol	27 ul

**Tampón de corrida**

**Para 500 ml**

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Concentración</b>
<i>Tris Ph 8.3</i>	<i>15.2 gr</i>	<i>0.025M</i>
<i>SDS</i>	<i>2.5 ml</i>	<i>1 %</i>
<i>Glicina</i>	<i>72.2 gr</i>	<i>0.19M</i>

○ **ANEXO 4: Colorante y Descolorante de Azul de Coomasie**

Se trabajó para 250 ml.

**Colorante Azul de Coomasie**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Concentración</b>
<i>Coomasie Blue</i>	<i>0.0625 g</i>	<i>0.25 %</i>
<i>Metanol</i>	<i>100 ml</i>	<i>40 %</i>
<i>Ácido Acético</i>	<i>30 ml</i>	<i>10%</i>
<i>Agua</i>	<i>130 ml</i>	<i>50%</i>

**Descolorante Azul de Coomasie – Para 1000 ml**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Concentración</b>
<i>Metanol</i>	<i>400 ml</i>	<i>40 %</i>
<i>Ácido Acético</i>	<i>100 ml</i>	<i>10%</i>
<i>Agua</i>	<i>500 ml</i>	<i>50%</i>

**Observación:** Existe soluciones para decoloración rápida (se mezcla 10 ml de ácido acético con 50 ml de metanol luego llevarlo a una solución de 100 ml con 40 ml de agua destilada.

Y una decoloración lenta en la que se mezcla 10 ml de ácido acético con 5 ml de metanol. La solución llevarla a 100 ml con 80 ml de agua destilada.

○ **ANEXO 5: Tutoriales del uso del DNA STAR**

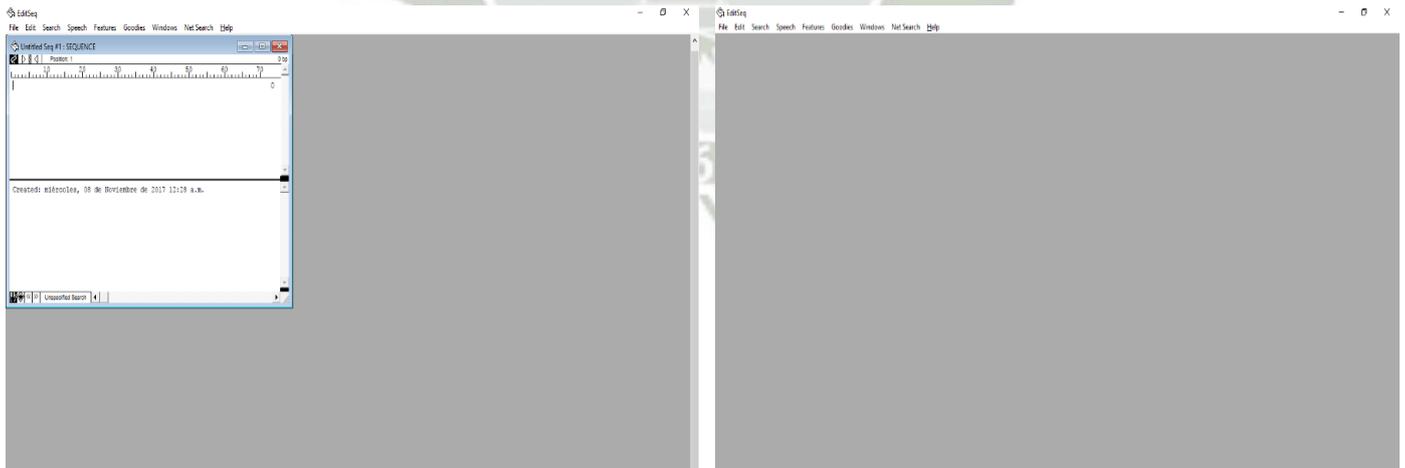
**TUTORIAL USO DNA STAR**

✓ **EditSeq**

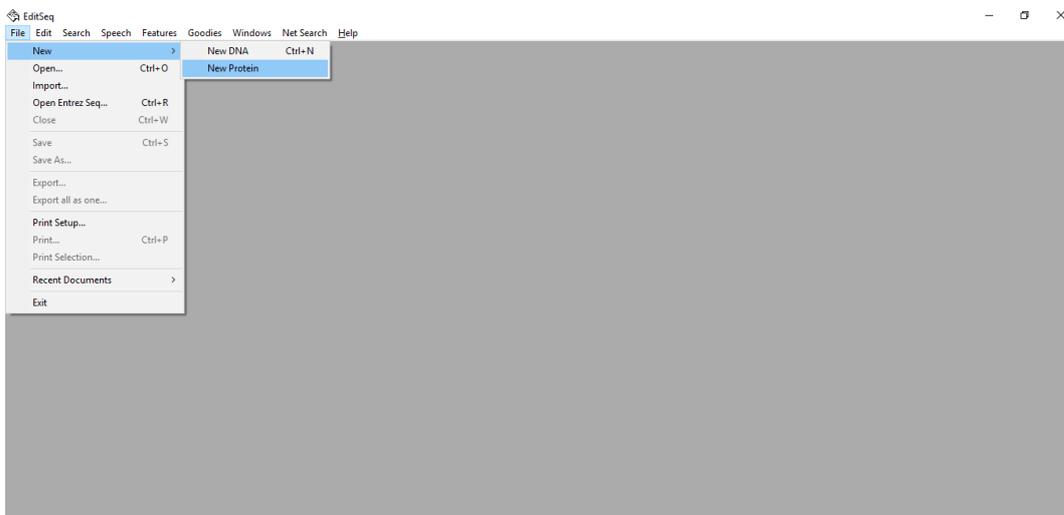
1) Ingresa al Programa EditSequence



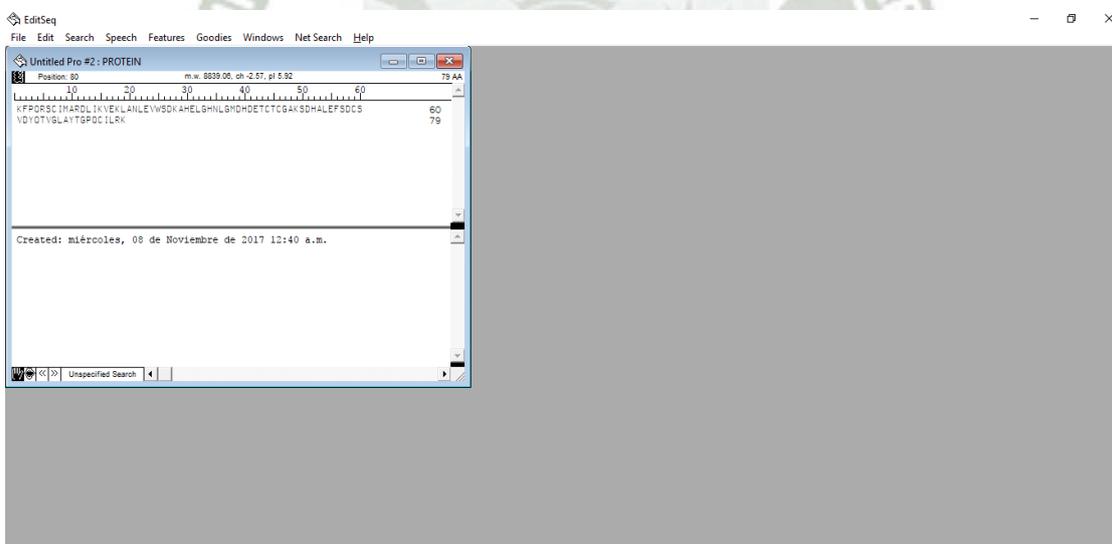
2) Se abrirá un cuadro para ingresar e ingresar la secuencia (Sin especificar si es respectivamente DNA, RNA o alguna proteína), al cerrarla por ende nos aparece una ventana blanca.



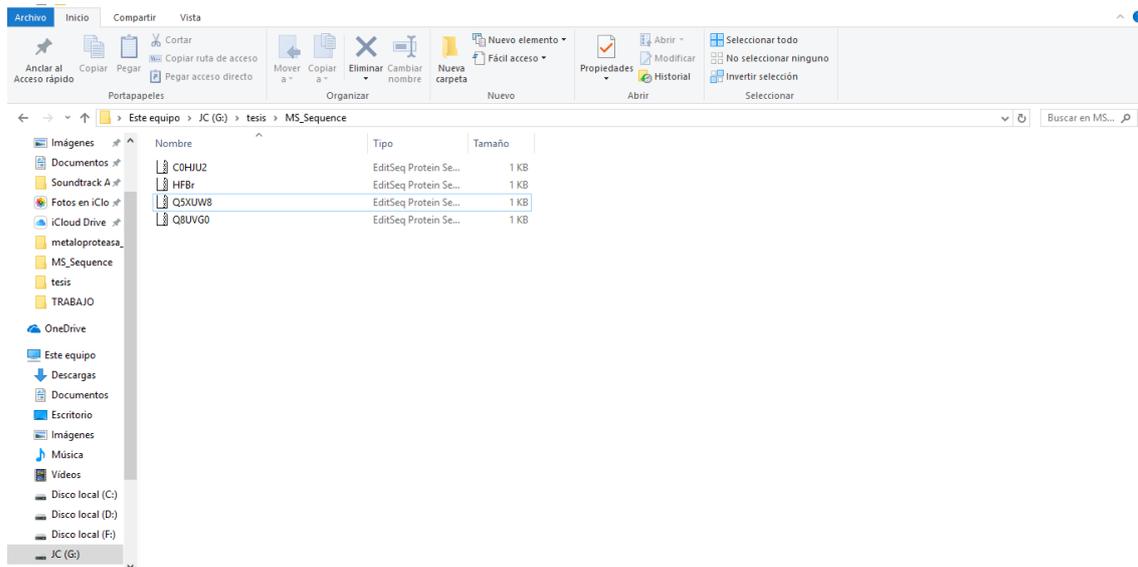
3) Procedemos abrir un nuevo documento en la opción “file” para “Proteína”



4) Ingresamos las secuencias copiadas del Blast (fueron las 3 primeras con identidad mayor) y también la secuencia obtenida a través de la secuencia de “*novo*” y guardamos generando un respectivo nombre para cada una

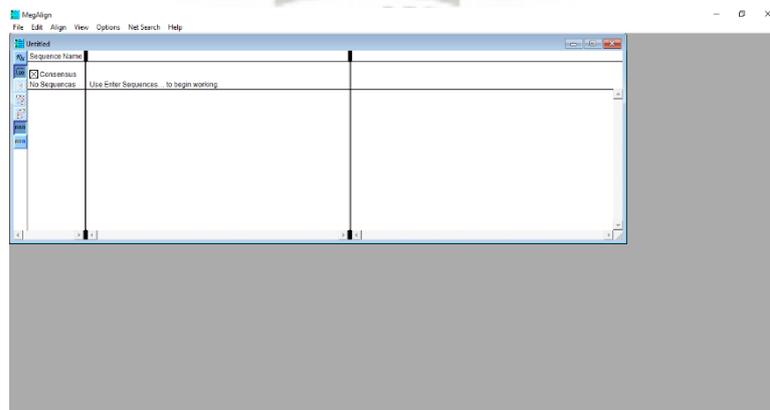


5) Finalmente ubicamos el lugar de acceso de cada secuencia guardada

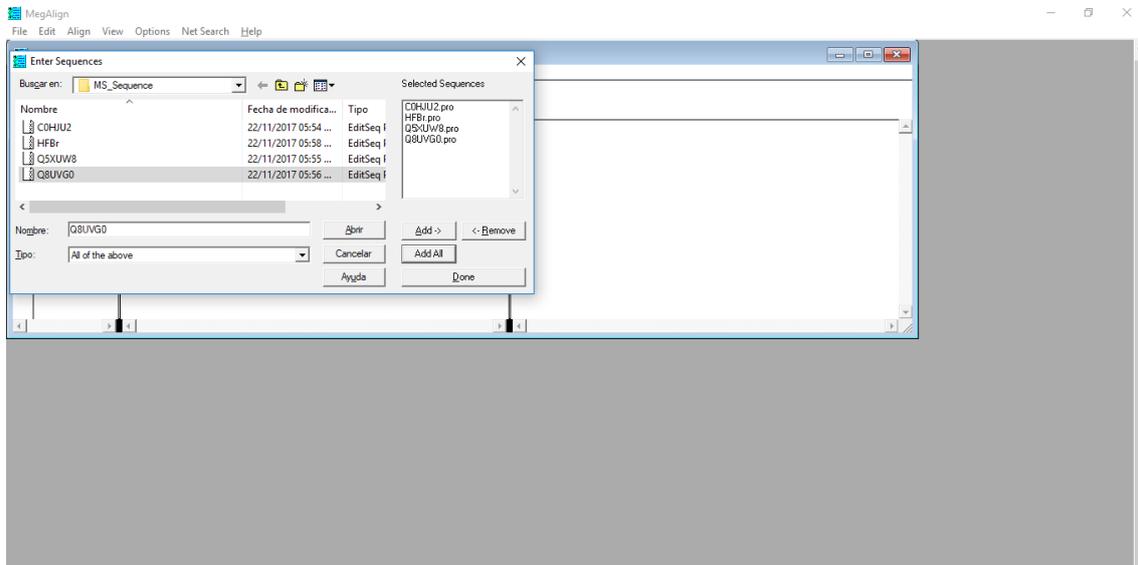


✓ **MegAlign**

1) Abrimos el sub-programa, nos aparecerá una página por defecto en blanco.

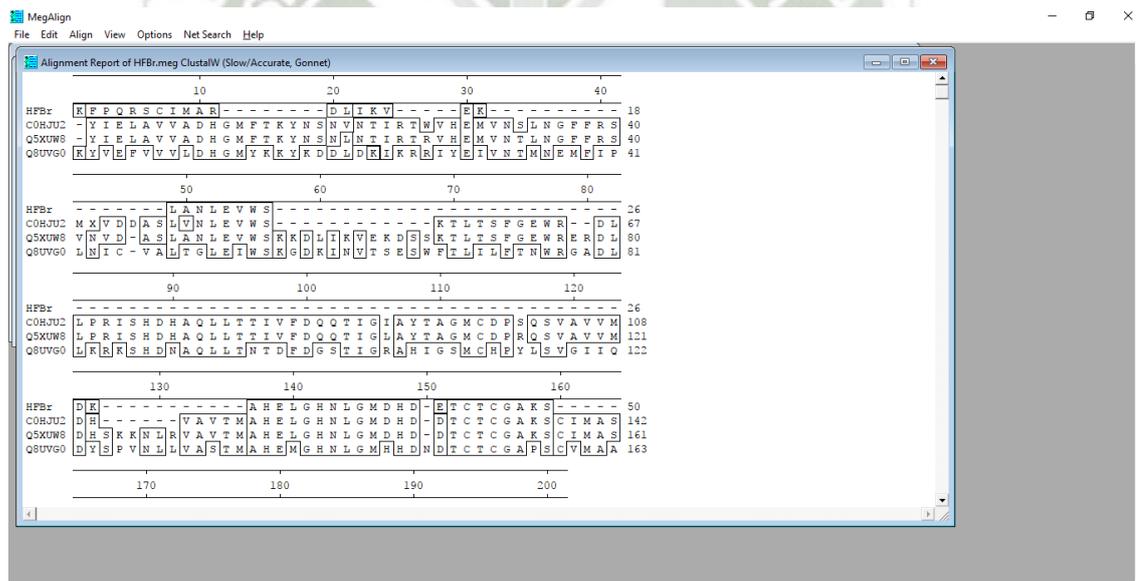
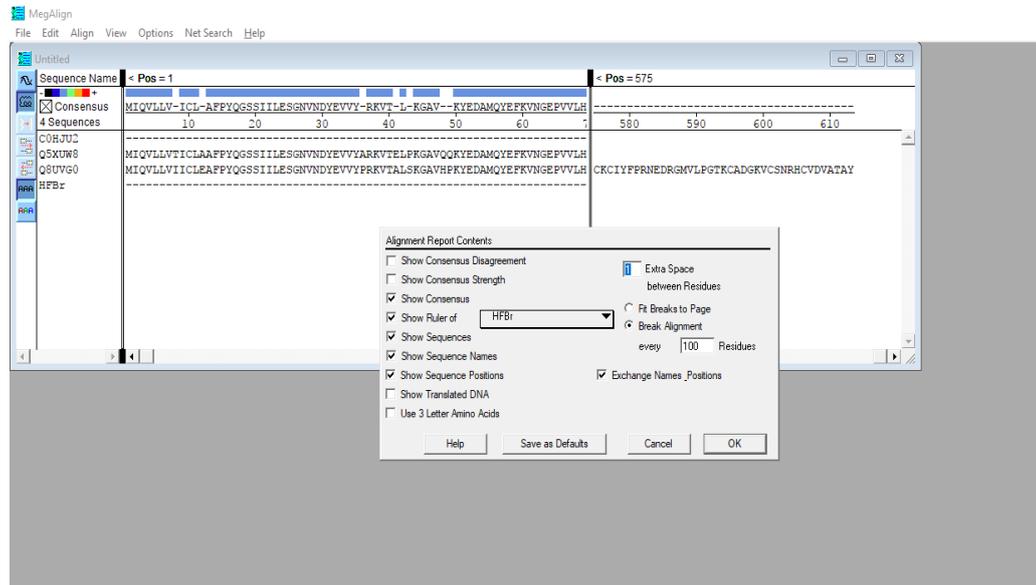


- 2) Ingresar a la Opción Enter Sequences para situar la ruta de acceso de las muestras a analizar.
- 3) Ingresaremos a la opción de localización de la forma simple (Add) o tal (Add All).



- 4) Ubicamos en la ventana, varias opciones, tales como
  - a) “The concensus”, donde se añadirá la secuencia que se estudiará...
  - b) Una visión de los calificativos que anden de derecha a izquierda o viceversa.

- 4) Ingresamos a la opción “View” y nos vamos donde dice Aligment Report para poder observarlo

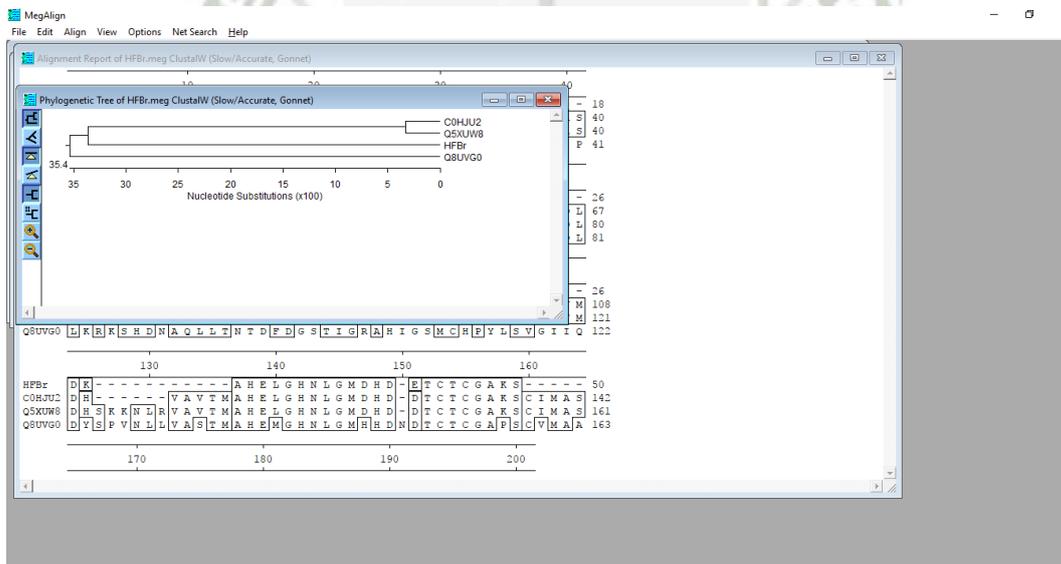


- 5) En la Opción View se puede visualizar el nivel o el grado de la homología dado en porcentajes.

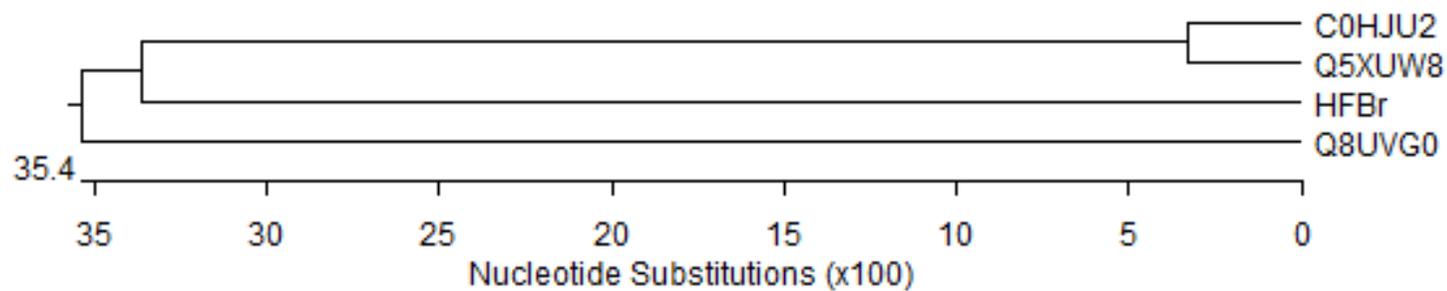
6) E observa en la nueva ventana los niveles de porcentaje de nuestra secuencia y con esto se puede ordenar según el grado de la homología



7) Podemos aplicar la construcción de un árbol filogenético por medio de la opción “view”



○ ANEXO 6: ÁRBOL FILOGENETICO



Árbol Filogenético respectivo de la Metaloproteasas de la especie de *Bothrops roedingeri* en comparación con 3 familias que corresponden según base de datos NCBI

- ✓ C0HJU2 (BpMP-1) de *Bothrops pauloensis*
- ✓ Q5XUW8 de *Bothrops insularis*
- ✓ Q8UVGO de *Bothrops erythromelas*

○ ANEXO 7: Carta de Invitación de la Universidad Estadual Campinas



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
Departamento de Bioquímica

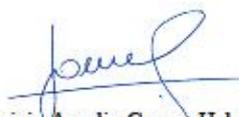


Campinas, 05 de Maio de 2016.

Prezado  
Sr. Juan Carlos Campos  
Arequipa- PERU

Como Pesquisador do Laboratório de Química de Proteínas do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), BRASIL, gostaria de convidá-lo a um ESTAGIO, com uma duração de 30 dias (a partir de 15 de julho até 14 de agosto do 2016), a fim pudermos realizar estudos de Caracterização estrutural y Funcional de uma metaloprotease do veneno de *Bothrops roedingi* por Aproximação Proteômica, em este estagio.

Sem mais para o momento, aproveito para renovar meus votos de estima e apreço.



Prof. Mauricio Aurelio Gomes Heleno Ph.D.  
Functional and Molecular Biology,  
Researcher