

**Universidad Católica de Santa María**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y**  
**Biotechnológicas.**  
**Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica**



**“CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE UNA  
FOSFOLIPASAS A2 HOMÓLOGA K49 DEL VENENO DE  
*Bothrops barnetti*, POR APROXIMACIÓN PROTEÓMICA”**

Tesis presentada por el Bachiller:

**Arenas Menéndez, Luis Angel**

Para optar por el Título Profesional de:

**Ingeniero Biotecnólogo**

Asesores:

**Blgo. Paz Aliaga, Ivan**

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

Arequipa – Perú

2018

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

Expediente N°. **16022970**  
N° Trámite en Fac. **291-2016**  
Fecha Recep. Fac. **02-06-2016**

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **ARENAS MENENDEZ, Luis Angel**

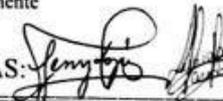
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE **INGENIERO BIOTECNOLOGO**

**"CARACTERIZACION ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE UNA FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> HOMOLOGA K49 DEL VENENO DE *Bothrops barnetti* POR APROXIMACION PROTEOMICA"**

DICTAMINADORES: 1) **Dra. Yenny López Valencia** 2) **Mgter. Julitza Paredes Fuentes**

**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 Títulos de la Facultad

Atentamente

FIRMAS:  (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA **13 de julio del 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 Títulos de la Facultad

Atentamente

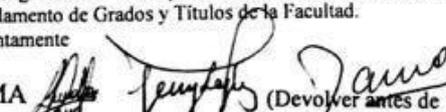
FIRMA  FECHA **08 de marzo del 2016**

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dra Yenny Lopez Valencia** 3) **Mgter. Julitza Paredes Fuentes**  
2) **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 Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA  (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA **13 de abril del 2018**

JURADOS: PRESIDENTE  
VOCAL  
SECRETARIO

FECHA **26/04/18** HORA **20.00** LOCAL **SUM C-402**

FIRMA DEL DECANO  FECHA **20/04/18**

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco primeramente a Dios, por haberme dado la dicha de tener una familia y una vida llena de aventuras las cuales me enseñaron las cosas buenas y malas de la vida, de la misma manera le agradezco a Dios por enviarme un ángel el cual es la razón de mi felicidad.*

*A mis padres y hermanos por el amor, confianza y paciencia que me brindan día a día, gracias a ellos hoy puedo seguir cumpliendo mis objetivos. A mi compañera de vida, por enseñarme que con unidad y alegría podremos seguir adelante a pesar de todas las circunstancias. A mi familia, porque cada triunfo que tenga también será suyo.*

*A la universidad, por brindarme la oportunidad de haber tenido profesores que me guiaron y enseñaron con paciencia y determinación, de la misma manera por haberme permitido conocer compañeros y amigos que fueron parte fundamental de mi formación universitaria. Sobre todo agradezco a la universidad por haberme permitido conocer a Daniela, ella me enseñó que no es necesario conocer a una persona muchos años, para entender lo que es una verdadera amistad; por demostrarme que a pesar de todos los problemas que podamos afrontar, una sonrisa en el rostro siempre mejorará las cosas, gracias Daniela por todo y sé que desde el cielo siempre nos guiaras por el buen camino.*

*A todas las personas que en este tiempo me ayudaron y brindaron conocimientos para culminar esta investigación.*

## INTRODUCCIÓN

Hasta el 2013, los estudios sobre las diferentes actividades farmacológicas atribuidas a las PLA<sub>2</sub> como tales han evidenciado que a pesar de poseer una gama de efectos tóxicos, se mostró que algunas de estas moléculas con las mismas características físico-químicas, tales como pI, masa molecular, perfil idiopático, regiones antigénicas, superficie de carga entre otras, propias de las PLA<sub>2</sub>, eran las responsables de las actividades biológicas tóxicas conocidas, sin embargo carecen completamente de actividad enzimática. Este gran descubrimiento junto al desarrollo tecnológico en la cromatografía líquida, permitió encontrar dentro del veneno otro tipo de moléculas semejantes a las PLA<sub>2</sub> pero con la sustitución del aminoácido en la posición 49 de Asp por Lys, lo que evidenció esta ausencia de la actividad enzimática. Esto no fue ningún problema para que estas moléculas homólogas pudieran desencadenar toda la gama de efectos toxicológicos. Es por ello que se empezaron a buscar este tipo de toxinas con el objetivo de entender mejor sus diferentes mecanismos de acción tóxica para futuramente poder encontrar a través de la plataforma proteómica, una nueva alternativa de anti veneno en la era póst-genómica, pues resulta crucial el descubrimiento de estas moléculas que por sus características físico-química terminan siendo enmascaradas por las PLA<sub>2</sub>, atribuyéndose erróneamente los efectos farmacológicos generados por las PLA<sub>2</sub> (K49) homólogas.<sup>46</sup>

La fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) considerada como un principal agente causante del daño tisular local está presente en todos los venenos de serpiente. Las fosfolipasas A<sub>2</sub> son enzimas dependientes de Ca<sup>2+</sup>, estas se caracterizan por su capacidad de hidrolizar el enlace éster en la posición sn-2 de un glicerofosfolípido de la membrana celular, produciendo de esta manera un ácido graso y un lisofosfolípido. La superfamilia de las PLA<sub>2</sub> cuenta con XV grupos, cuya clasificación se basa en su secuencia, masa molecular, procedencia, posición de sus puentes disulfuro, requerimiento de calcio, entre otras características. Las proteínas de los venenos de serpiente pertenecen a los grupos ia, iia y iib<sup>1</sup>. Adicionalmente, los efectos tóxicos provocados por las PLA<sub>2</sub> de venenos de serpientes incluyen neurotoxicidad pre o postsináptica, miotoxicidad

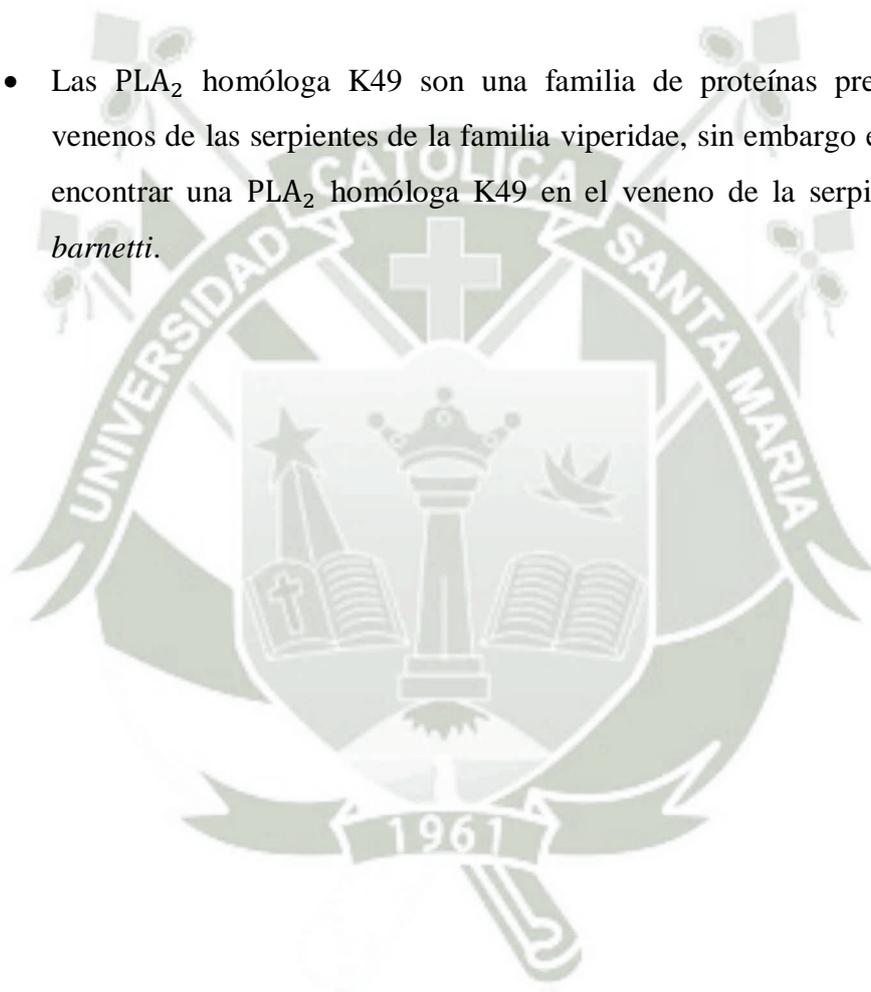
local o sistémica, anticoagulación, cardiotoxicidad, modulación de la agregación plaquetaria, actividades hemolítica, edematizante e hipotensora y daño directo en órganos como el riñón, el pulmón y el hígado<sup>2</sup>, aunque es evidente que no todas las PLA<sub>2</sub> de venenos de serpiente tienen la capacidad de inducir todos los efectos mencionados. La acción catalítica es importante para que las PLA<sub>2</sub> produzcan los daños citados; sin embargo, existe un subgrupo de PLA<sub>2</sub> enzimáticamente inactivas, las cuales poseen variaciones en algunos aminoácidos, especialmente en la sustitución de Asp49 por Lys, Arg, Ser o Gln, lo que conduce a la pérdida de la actividad enzimática, como consecuencia de la degeneración del loop de unión al calcio<sup>3</sup>. A estas proteínas se les llama “PLA<sub>2</sub> homólogas”; no obstante, es bien conocido que inducen miotoxicidad local y edema. Aunque se reconoce la participación del tridecapéptido catiónico C-terminal en el modo de acción de estas toxinas, los mecanismos por los cuales causan dichos efectos no han sido clarificados en su totalidad<sup>3</sup>. Entre los eventos que explican el daño irreversible a las células musculares se encuentra, inicialmente, la posible unión de la PLA<sub>2</sub> a la molécula blanco. Aunque no se conoce con certeza cuál o cuáles podrían ser los aceptores de las PLA<sub>2</sub>, algunos autores han identificado receptores proteicos de alta afinidad para estas toxinas, con una masa molecular de 180 kDa y repeticiones en tándem de dominios de alta homología, con dominios de reconocimiento de carbohidratos (cdr). Estos receptores fueron llamados del tipo M por su procedencia de células musculares<sup>4</sup>. Posterior a este reconocimiento inicial, las toxinas causan una pérdida de la permeabilidad celular por mecanismos dependientes de la catálisis, como es el caso de las PLA<sub>2</sub> Asp49, o por mecanismos independientes de la catálisis que involucran fuertes interacciones electrostáticas entre la región C-terminal de las PLA<sub>2</sub> Lys49 y la bicapa lipídica<sup>3</sup>. Subsecuente a esta pérdida de permeabilidad hay despolarización, pérdida de los gradientes iónicos, salida de moléculas citosólicas como creatina quinasa (CK) y deshidrogenasa láctica (LDH), importantes marcadores del daño muscular, entre otras, y entrada masiva de Ca<sup>2+</sup> que posteriormente induce una hipercontracción de las fibras musculares, lo que causa un daño mecánico en su membrana celular. Adicionalmente, hay sobrecarga de este catión en la mitocondria con posterior daño de la maquinaria metabólica de la célula y una posible implicación en la apoptosis, derivada de la activación de la vía de las

caspasas. El calcio también puede activar las calpaínas (unas de las proteasas encargadas de la remodelación del citoesqueleto), con la subsecuente hidrólisis de proteínas estructurales clave como la titina y la desmina, lo que a su vez causa desorganización sarcomérica y pérdida de las líneas Z <sup>5</sup>. La inyección intramuscular de PLA<sub>2</sub> causa inflamación, caracterizada por incremento en la permeabilidad vascular, formación de edema, reclutamiento leucocitario a los tejidos afectados y liberación de mediadores inflamatorios <sup>6</sup>. Sin embargo, cabe aclarar que los mecanismos por los que estas toxinas inducen este efecto no han sido elucidados en su totalidad, si bien las PLA<sub>2</sub> Asp49 pueden generar ácido araquidónico, que sirve como punto de partida para la producción de eicosanoides, que finalmente van a amplificar la respuesta inflamatoria.

Las PLA<sub>2</sub> homólogas inducen edema y degranulación de mastocitos de una manera independiente de la catálisis; por tanto, es evidente que la actividad enzimática no es un requisito estricto para causar los efectos mencionados. Es probable que otras características estructurales de las PLA<sub>2</sub> estén también involucradas en la inducción de la inflamación, tal y como ha sido demostrado con las regiones catiónicas de las toxinas, que cuando han sido neutralizadas por polianiones como la heparina, se evidencia una reducción del edema. Así mismo, los investigadores Lomonte y Tarkowski (1994) identificaron que la región de unión para la heparina en una PLA<sub>2</sub> Lys49 es el tridecapéptido C-terminal, y dicha interacción entre este glucosaminoglucano y la proteína provoca una reducción del edema, de la miotoxicidad y de la citotoxicidad. No obstante, son necesarios estudios adicionales que conduzcan a la identificación más certera de los determinantes estructurales implicados en la inducción de los efectos tóxicos mencionados <sup>7,8</sup>.

## HIPÓTESIS

- Las PLA<sub>2</sub> homóloga K49 son una familia de proteínas presentes en los venenos de las serpientes de la familia viperidae, en consecuencia, se espera encontrar al menos una PLA<sub>2</sub> homóloga K49 en el veneno de la serpiente *Bothrops barnetti*.
- Las PLA<sub>2</sub> homóloga K49 son una familia de proteínas presentes en los venenos de las serpientes de la familia viperidae, sin embargo es probable no encontrar una PLA<sub>2</sub> homóloga K49 en el veneno de la serpiente *Bothrops barnetti*.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Caracterizar estructural y funcionalmente una PLA<sub>2</sub> homóloga K49 a partir del veneno total de *Bothrops barnetti*, desde una perspectiva Proteómica.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Purificar una PLA<sub>2</sub> homóloga K49 a partir del veneno total de *Bothrops barnetti*, a través de una cromatografía líquida de interacción hidrofóbica.
2. Determinar la actividad fosfolipásica A2 a través de un reactivo específico.
3. Identificar una PLA<sub>2</sub> homóloga K49 a través de su peso molecular mediante el uso de una electroforesis en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)
4. Determinar la masa molecular promedio de la PLA<sub>2</sub> homóloga K49 en estudio utilizando la espectrometría de masas ESI.
5. Caracterizar estructuralmente una PLA<sub>2</sub> homóloga K49 mediante el uso de la espectrometría de masas y un análisis bioinformático por BLAST y DNA Star.
6. Caracterizar farmacológicamente PLA<sub>2</sub> homóloga K49 a partir del veneno total de *Bothrops barnetti*, a través de la actividad miotóxica, edematizante y pro-inflamatoria.

## RESUMEN

Las Fosfolipasas A2 (PLA2) forman parte de un selecto grupo de enzimas que realizan un papel indispensable en los diversos procesos celulares y fisiológicos de los organismos vivos pluricelulares. Estas enzimas intervienen en señales de transducción que activan distintos procesos como son la contracción de músculo liso, otras activan la cascada de inflamación mientras otras intervienen en procesos digestivos del intestino, procesando lípidos para su posterior absorción. Dentro de este grupo de fosfolipasas existe un subgrupo de proteínas conocido como “PLA2 homólogas”, las cuales no ejercen actividad catalítica debido a una mutación que ocurre en un aminoácido del sitio activo; pero aunque estas toxinas carecen de acción lipolítica, producen efectos biológicos similares a los de sus homólogas catalíticamente activas, entre los cuales se destacan la miotoxicidad y la inflamación.

En el presente trabajo de investigación se buscó encontrar por lo menos una PLA2 homóloga K49 en el veneno total de *Bothrops barnetti* peruana, mediante una columna de interacción hidrofóbica se obtuvieron diversas enzimas, las cuales por

un análisis de actividad pro-inflamatoria y una electroforesis en SDS-PAGE fue posible aislar una muestra de aproximadamente 14 kDa en ausencia de actividad fosfolipásica en relación al resto, la cual fue denominada como BbTX-II. Seguidamente se procedió a determinar la masa de la muestra por espectrometría de masas Electrospray (ESI) obteniendo de esta manera un peso de 14242 kDa para la muestra en estudio. Con el uso de una espectrometría de masas MALDI-TOF se realizó una caracterización de la estructura primaria, secuenciando los aminoácidos de 3 péptidos obtenidos, para finalmente realizar un estudio de homología secuencial (análisis bioinformático) con el uso de la base de datos SWISS-PROT para determinar que la muestra en estudio BbTX-II es una PLA2 homóloga K49.

Paralelamente se realizó una caracterización biológica de la muestra BbTX-II para así determinar el efecto miotóxico de la misma; evaluando de esta manera los mediadores envueltos en la migración leucocitaria y en el efecto inflamatorio como son la IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$ , observando un aumento de los mediadores dentro de las primeras 3 horas; determinando así un efecto local de la muestra.

**Palabras clave:** *Bothrops barnetti*, fosfolipasas A2, homologas k49, espectrometría de masas, secuenciación, IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ .

**ABSTRACT**

Phospholipases A2 (PLA2) are part of a select group of enzymes that play an indispensable role in the various cellular and physiological processes of living pluricellular organisms. These enzymes intervene in transduction signals that activate different processes such as the smooth muscle contraction, others activate the cascade of inflammation while others intervene in digestive processes of the intestine, processing lipids for their subsequent absorption. Within this group of phospholipases there is a subgroup of proteins known as "PLA2 homologous", which do not exert catalytic activity due to a mutation that occurs in an amino acid of the active site; but although these toxins lack lipolytic action, they produce biological effects similar to those of their catalytically active counterparts, among which are myotoxicity and inflammation.

In the present research work we sought to find for less one PLA2 homologous K49 in the total venom of *Bothrops barnetti* Peruvian, through a column of hydrophobic interaction several enzymes were obtained, which by an analysis of pro-inflammatory activity and an electrophoresis in SDS-PAGE it was possible to isolate

a sample of approximately 14 kDa in the absence of phospholipase activity relative to the remainder, which was termed as Bb-TXII. The sample was then tested by mass spectrometry Electrolysis (ESI), which thus obtained a weight of 14242 kDa for the sample under study. Using a mass spectrometry MALDI-TOF, a characterization of the primary structure was performed, sequencing the amino acids of 3 peptides obtained, to finally perform a study of biology using the SWISS-PROT database to determine which sample in study Bb-TXII is a homologous PLA2 K49.

In parallel, a biological characteristic of the Bb-TXII sample was performed to determine the myotoxic effect of the same; in this way, we evaluated the mediators involved in leukocyte migration and the inflammatory effect, such as IL-1, IL-6 and TNF $\alpha$ , with an increase in mediators within the first 3 hours; Thus determining a local effect of the sample.

**Keywords:** *Bothrops barnetti*, phospholipases A2, k49 homologues, mass spectrometry, sequencing, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$



## INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	ii
INTRODUCCIÓN.....	iii
HIPOTESIS.....	vi
OBJETIVOS.....	vii
OBJETIVO GENERAL.....	vii
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	x
INDICE DE CONTENIDOS.....	xiii
INDICE DE FIGURAS.....	xiv
INDICE DE TABLAS.....	xvi
CAPITULO I.....	1
1.1 MARCO TEÓRICO.....	1
1.1.1.1 OXIDOREDUCTASAS.....	2
1.1.1.2 HIDROLASAS.....	2
1.1.1.3 GLUCOSIDASAS.....	3
1.1.1.4 LIPASAS.....	3
1.1.1.5 PROTEASAS.....	3
1.1.1.6 OTRAS MOLÉCULAS DE IMPORTANCIA.....	4
1.1.2 EL VENENO BOTRÓPICO.....	4
1.1.2.1 ACCIÓN PROTEOLÍTICA.....	4
1.1.2.2. ACCIÓN COAGULANTE.....	6
1.2.2.2 ACCIÓN HERORRÁGICA.....	6
1.1.3VARIABILIDAD EN LA COMPOSICIÓN DEL VENENO BOTHROPICO..	7
1.1.4 PRINCIPALES SERPIENTES VENENOSAS DEL PERÚ.....	7
1.1.5 ACCIDENTES OFIDICOS.....	8
1.1.6 <i>Bothrops barnetti</i> .....	10
1.1.7 "FOSFOLIPASAS A2 LIKE MIOTOXINAS.....	11
1.1.8 PERSPECTIVA BIOTECNOLOGICA.....	16
	xii

1.2 ASPECTOS GENERALES DE LA INSTRUMENTACION UTILIZADA.....	16
1.2.1 ESPECTROMETRIA DE MASAS.....	16
1.2.1.1 IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY (ESI).....	18
1.2.1.2 DESORCIÓN/ IONIZACIÓN LÁSER ASISTIDA EN MATRIZ (MALDI).....	19
1.2.1.2.1 ANALIZADOR DE MASA TOF (TIME OF FLY) .....	19
1.2.2 APROXIMACIÓN PROTEOMICA.....	20
1.2.2.1. ANALISIS DE LA HOMOLOGIA SECUENCIAL POR ESPECTROMETRIA DE MASAS .....	21
1.2.2.2 HUELLA DE MASA PEPTIDICA.....	22
1.2.2.3 ESTUDIO BIOINFORMATICO Y SECUENCIA DE NOVO.....	22
HERRAMIENTAS BIOINFORMATICAS Y SOFTWARE .....	23
CAPITULO II.....	25
2.1 UBICACIÓN.....	25
2.2 MATERIALES.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
CROMATOGRAFIA DE INTERACCIÓN HIDROFOBICA.....	36
ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE.....	38
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA A2.....	40
DETERMINACIÓN DE LA MASA INTACTA DE LA PLA2 HOMOLOGA K49 BBTX-II DE <i>Bothrops barnetti</i> POR ESPECTROMETRIA DE MASAS ELECTROSPRAY (ESI).....	40
CARACTERIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE "NOVO" POR ESPECTROMETRIA DE MASA MS/MS DE LA PLA2 HOMOLOGA K49 PROCEDENTE DEL VENENO TOTAL DE <i>Bothrops barnetti</i> .....	43
ESTUDIO DE HOMOLOGIA SECUENCIAL (ANALISIS BIOINFORMATICO) DE LA PLA2 HOMOLOGA K49 BBTX-II DE <i>Bothrops barnetti</i> .....	45
CARACTERIZACIÓN BIOLOGICA.....	47
DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE INTERLEUCINA 1 (IL-1) DESPUES DE ADMINISTRAR LA PLA2 HOMÓLOGA K49 BBTX-II DE <i>Bothrops barnetti</i> .....	48

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE INTERLEUCINA 6 (IL-6) DESPUES DE ADMINISTRAR LA PLA2 HOMÓLOGA K49 BBTX-II DE <i>Bothrops barnetti</i> .....	49
DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE FACTOR DE NECROSIS TUMORAL TNF- $\alpha$ DESPUES DE ADMINISTRAR LA PLA2 HOMOLOGA K49 BBTX-II DE <i>Bothrops barnetti</i> .....	51
CONCLUSIONES .....	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55
ANEXOS.....	61

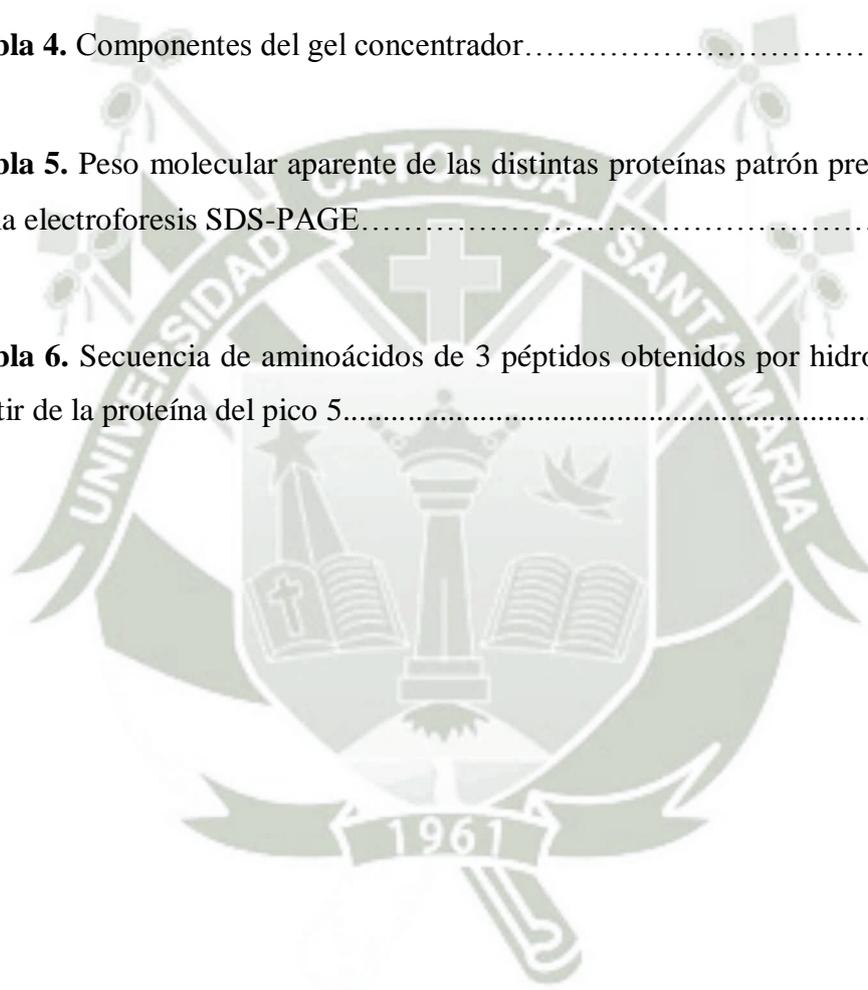


## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Bothrops barnetti</i> , serpiente endémica del norte peruano.....	10
<b>Figura 2</b> Estructura de un espectrómetro de masas.....	18
<b>Figura 3.</b> Cromatografía de interacción hidrofóbica del veneno total de <i>Bothrops barnetti</i> de procedencia peruana.....	36
<b>Figura 4</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida de la muestra BbTX-II K49.....	39
<b>Figura 5.</b> Espectro de la masa deconvolucionada de la PLA <sub>2</sub> K49 homóloga BbTX-II procedente de <i>Bothrops barnetti</i> por espectrometría de masas Electrospray (ESI).....	41
<b>Figura 6.</b> Espectros de masa cruda e intacta de la PLA <sub>2</sub> K49 homóloga BbTX-II procedente de <i>Bothrops barnetti</i> por espectrometría de masas Electrospray (ESI).....	42
<b>Figura 7</b> Estudio comparativo de homología secuencial de la proteína BbTX-II procedente de <i>Bothrops barnetti</i> con otras proteínas homólogas PLA <sub>2</sub> provenientes de veneno de serpientes de otras especies.....	46
<b>Figura 8</b> Niveles de concentración de Interleuquina 1 (IL-1) de la fracción BbTX-II PLA <sub>2</sub> homóloga K49 .....	49
<b>Figura 9.</b> Niveles de concentración de Interleuquina 6 (IL-6) de la fracción BbTX-II PLA <sub>2</sub> homóloga K49.....	50
<b>Figura 10.</b> Niveles de concentración de TNF- $\alpha$ de la fracción BbTX-II PLA <sub>2</sub> homóloga K49.....	51

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales serpientes venenosas del Perú.....	9
<b>Tabla 2</b> Miotoxinas botropicas.....	15
<b>Tabla 3.</b> Componentes del gel separador.....	30
<b>Tabla 4.</b> Componentes del gel concentrador.....	30
<b>Tabla 5.</b> Peso molecular aparente de las distintas proteínas patrón preteñidas usadas en la electroforesis SDS-PAGE.....	31
<b>Tabla 6.</b> Secuencia de aminoácidos de 3 péptidos obtenidos por hidrólisis trípica a partir de la proteína del pico 5.....	44



## CAPITULO I

### 1.1 MARCO TEÓRICO

#### 1.1.1 ASPECTOS GENERALES DE LOS COMPONENTES DE VENENOS DE SERPIENTES

El veneno de las serpientes está compuesto por una mezcla heterogénea de sustancias simples y complejas. Dentro de los compuestos simples tenemos varias moléculas orgánicas como aminoácidos libres, péptidos, nucleótidos, carbohidratos, lípidos y aminas biogénicas así como constituyentes inorgánicos referidos básicamente a cationes y aniones. Dentro de los iones podemos destacar al calcio que es un importante cofactor de algunas enzimas proteolíticas así como de fosfolipasas A<sub>2</sub>. El magnesio y el zinc también son importantes cofactores de metaloproteasas de veneno. Las sustancias complejas están referidas a proteínas y enzimas.<sup>19</sup>

El citrato es encontrado en altas concentraciones en venenos de determinadas serpientes y experimentalmente fue demostrado que el citrato actúa como un inhibidor de varias enzimas, como las nucleotidasas, esterasas, proteasas y fosfolipasas A<sub>2</sub>; el citrato actuaría como un cofactor de neutralización endógena de la serpiente contra enzimas presentes del veneno.<sup>13</sup>

Dentro del veneno total están presentes varias sustancias orgánicas denominadas aminas biógenas como la bradicinina, histamina, 4-hidroxitriptamina, N-metil-5-hidroxitriptamina, N`-N`-dimetil-5-hidroxitriptamina, serotonina, que actuarían como mediadores del dolor provocado por el veneno de las serpientes<sup>14</sup>.

El veneno de serpientes posee varias enzimas, ya fueron descritas por lo menos 26 tipos de enzimas, muchas de las cuales son de naturaleza hidrolítica. De este total, 12 son comúnmente encontradas en proporciones variadas en los diferentes grupos de serpientes, lo restante se encuentra distribuido en forma puntual<sup>15</sup>.

Clásicamente estas enzimas pueden ser agrupadas en 5 clases principales, denominadas de la siguiente manera:

#### 1.1.1.1 OXIDOREDUCTASAS

El veneno total de las serpientes posee dos enzimas responsables de las reacciones redox, las L-aminoácido oxidasas (LAO) y la Lactato deshidrogenasa. Las LAO's convierten el aminoácido libre en un alfa-cetoácido. Muchos venenos de serpientes poseen LAO muy activas, debido a la presencia de su cofactor, la riboflavina. La presencia de esta enzima determina la coloración amarilla al veneno seco; su función biológica no es totalmente conocida. Así se descubrió que las LAO son capaces de, en determinadas condiciones de laboratorio, inducir agregación plaquetaria y apoptosis en determinadas células<sup>16</sup>.

McClean, *et al.* descubrieron que el veneno de algunas serpientes puede catalizar la conversión de lactato a ácido pirúvico. La presencia del lactato deshidrogenasa fue demostrada en varios venenos, principalmente en serpientes del género *Naja* y *Dedroaspis*<sup>17</sup>

#### 1.1.1.2 HIDROLASAS

Fosfatasas, fosfodiesterasas, endonucleasas y 5-nucleotidasas) Las más conocidas son las fosfodiesterasas que son largamente utilizadas en el secuenciamiento o caracterización de oligonucleótidos y polinucleótidos<sup>18</sup>. Las 5'- nucleotidasas son fosfatasas específicas encontradas en la mayoría de los venenos de serpientes, son más inestables que las fosfodiesterasas<sup>19</sup>.

Las fosfatasas son hidrolasas que hidrolizan como sustrato fosfomonoésteres. Esas enzimas son clasificadas como fosfatasas no específicas, y pueden ser divididas en fosfatasas ácidas y fosfatasas alcalinas, basándose en el pH óptimo para la catálisis y mecanismo de reacción.<sup>19</sup>

La última clase de fosfatasas son las endonucleasas específicas para el RNA (ribonucleasas) y para DNA (desoxirubonucleasas). Son enzimas relativamente más estables que otras fosfatasas.<sup>18</sup>

### 1.1.1.3 GLUCOSIDASAS

La hialuronidasa, es la enzima más representativa, y cataliza la reacción de hidrólisis del ácido hialurónico, que es un mucopolisacárido presente en la piel, en los tejidos conectivos y en los tendones. Estas enzimas tendrían la función de facilitar la difusión de las toxinas del veneno hacia el tejido de la víctima. También son encontradas otras dos enzimas las alfa-amilasas y las NAD nucleotidasas.<sup>18</sup>

### 1.1.1.4 LIPASAS

Las fosfolipasas, las acetilcolinesterasas y las fosfodiesterasas, son enzimas más comúnmente encontradas en los venenos de las serpientes, siendo las fosfolipasas A<sub>2</sub> las más estudiadas, no solamente por sus propiedades químicas, sino por su importancia biológica <sup>20</sup>.

### 1.1.1.5 PROTEASAS

Las enzimas proteolíticas o proteinasas son enzimas que catalizan el clivaje de uniones peptídicas de proteínas. Estas proteinasas han adquirido un alto grado de especialización durante su microevolución biológica, restringiendo su mecanismo de acción sobre uniones peptídicas específicas. Muchos procesos biológicos son regulados por la acción de proteinasas, por ejemplo, coagulación sanguínea y fibrinólisis, liberación de proteínas hormonales de precursores moleculares, o transportes de proteínas secretoras a través de la membrana, activación del sistema de complemento, fertilización, germinación y control de la digestión proteolítica <sup>21</sup>.

Las enzimas son indispensables para los procesos fisiológicos en animales, más si no fueren adecuadamente controladas, pueden representar un riesgo en potencia, destruyendo componentes protéicos celulares o de tejidos. Debido a esto, el equilibrio entre las enzimas y sus inhibidores es un factor esencial para la manutención de un estado fisiológico normal. Hay dos mecanismos básicos de regulación para estas enzimas, uno de los cuales implica la activación de precursores de proteinasas inactivas (zimógenos), por proteólisis limitada, y el otro mecanismo implica la inactivación de proteinasas por la formación de complejos con inhibidores protéicos específicos <sup>22</sup>.

### 1.1.1.6 OTRAS MOLÉCULAS DE IMPORTANCIA

Además de las enzimas hidrolíticas, el veneno total también presenta otras moléculas protéicas sin actividad enzimática, como las desintegrinas y las lectinas. Las desintegrinas, son un grupo de proteínas con bajo peso molecular, ricas en residuos de cisteínas. Ellas contienen una secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp responsables de su actividad inhibidora de la interacción del fibrinógeno con sus receptores (los complejos glicoprotéicos IIb, IIIa, en la coagulación sanguínea) ocasionando hemorragia<sup>23</sup>. Las lectinas constituyen un gran grupo de proteínas o glicoproteínas, que poseen la capacidad de aglutinar células, precipitar polisacáridos y glicoproteínas, por el hecho de que se ligan específica y reversiblemente a determinados carbohidratos<sup>24</sup>.

### 1.1.2 EL VENENO BOTRÓPICO

Las serpientes del género *Bothrops* habitan una extensa región de América que abarca desde México hasta Argentina, siendo una de las especies más abundantes *Bothrops atrox*, conocida como “jergón” o serpiente “barba amarilla”. En nuestro país se han descrito hasta 17 especies de éste género, el que actualmente está incluido en la subfamilia *Crotalinae*.<sup>25</sup>

Debido a la amplia distribución y número de ejemplares de este género, se le atribuye el mayor porcentaje de accidentes ofídicos. Los efectos sintomatológicos son similares en todos los casos, y la intensidad de los efectos locales depende de la cantidad de veneno inoculado y de la localización de la mordedura.<sup>25</sup>

De modo didáctico son descritas para el veneno botrópico, tres actividades fisiopatológicas:

#### 1.1.2.1 ACCIÓN PROTEOLÍTICA

La llamada actividad proteolítica se refiere a un conjunto de fracciones del veneno botrópico, con especificidades diversas, y que son responsables de los fenómenos locales.

El cuadro inflamatorio local puede ser explicado por la interacción de diversos factores:

- a) Acción de enzimas proteolíticas: proteasas, fosfolipasas, hialuronidasas, etc.

- b) Liberación de sustancias farmacológicamente activas (bradicinina, serotonina, histamina) y otros mediadores del proceso inflamatorio (prostaglandinas, leucotrienos, PAF).
- c) Isquemia provocada por microtrombos en la circulación y/o compresión debido al edema.
- d) Acción del factor hemorrágico que, *in vitro*, causa necrosis muscular.

La actividad de enzimas proteolíticas del veneno sobre sustratos diversos puede causar lesión en el tejido (acción directa) y provocar la liberación de sustancias de los tejidos lesionados que, siendo mediadores del proceso inflamatorio, amplían estas mismas lesiones (acción indirecta).<sup>26</sup>

La acción de enzimas del veneno botrópico sobre los fosfolípidos de membranas celulares puede llevar a la liberación de ácido araquidónico. Una vez liberado, este es convertido en prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina (a través de la vía catalizada por la ciclooxigenasa), o en ácido hidroxieicosatetraénico y leucotrienos (derivados de la vía catalizada por la lipoxigenasa).<sup>26</sup>

En la patogénesis del edema causado por la serpiente con veneno de actividad proteolítica, hay participación de mastocitos, neutrófilos y cininas plasmáticas. También fue detectada la participación del factor activador de plaquetas (PAF) y de los metabolitos del ácido araquidónico en el edema inducido por el veneno Botrópico de especímenes adultos <sup>26</sup>.

Con intensidad variable, las acciones coagulante y hemorrágica también influyen en la evolución de la actividad inflamatoria. La acción coagulante, al formar trombos en la microvasculatura, provoca consecuentemente hipoxia, con agravio de edema y hasta necrosis del tejido. La acción hemorrágica amplía el cuadro inflamatorio, particularmente en la región de la mordida, a través de la lesión del endotelio vascular que propicia el extravasamiento de líquidos hacia el espacio intersticial.<sup>26</sup>

### 1.1.2.2. ACCIÓN COAGULANTE

El veneno botrópico posee capacidad de activar factores de coagulación sanguínea, ocasionando consumo de fibrinógeno y formación de fibrina intravascular. Induce frecuentemente, un estado de incoagulabilidad sanguínea.<sup>27</sup>

La mayoría de las serpientes del género *Bothrops* posee, aislada o simultáneamente, sustancias capaces de activar fibrinógeno, protrombina y el factor X (FX). Se realizaron estudios comparativos con venenos de *Bothrops* sp. Encontrando variaciones en la capacidad coagulante en diferentes especies y subespecies.<sup>27</sup>

### 1.1.2.3. ACCIÓN HEMORRÁGICA

La acción hemorrágica del veneno botrópico es atribuida a componentes específicos denominados hemorraginas. Son metaloproteasas, representan cerca del 1% del veneno total, y son distintas de las fracciones coagulantes. Son conocidos dos factores hemorrágicos en el veneno de *Bothrops jararaca* (denominados Bothropasin y HF2), dos de *Bothrops neuwiedi* (denominados NHFa y NHFb) y uno en el de *Bothrops moojeni* (moojeni protease A).<sup>28</sup>

Se ha atribuido a la hemorragina, la actividad sobre la membrana basal del endotelio vascular; inicialmente con aumento de la permeabilidad y, a seguir por la pérdida de la función entre las células, dando lugar a la ruptura de la integridad vascular. Otro mecanismo de acción es, en el cual las hemorraginas ejercerían acción lesiva sobre la membrana basal y posterior destrucción del endotelio capilar.<sup>28</sup>

Los factores hemorrágicos no presentan actividad sobre la coagulación sanguínea, así, como la incoagulabilidad (causada por el consumo de fibrinógeno) no constituye causa primaria del sangrado. Este hecho puede ser comprobado por las siguientes observaciones:

El sangrado sistémico puede ocurrir en accidentes por serpientes sin veneno coagulante.

La desfibrinación completa puede persistir por largo tiempo sin que haya sangrado.

En síntesis, es correcto afirmar que el estado de incoagulabilidad sanguínea puede prolongar y/o intensificar las manifestaciones hemorrágicas, más la actividad coagulante no justifica, aisladamente, el que ocurra sangrados.

El veneno botrópico presenta, *in vitro*, actividad hemolítica, siendo observada en algunos pacientes, sobre todo en los casos moderados y graves. La hemólisis sería explicada por la acción mecánica del coágulo sobre los hematies, por la hidrólisis de fosfolípidos de la membrana, o indirectamente a través de la liberación de lisolecitina de la lecitina plasmática.<sup>28</sup>

### 1.1.3. VARIABILIDAD EN LA COMPOSICIÓN DEL VENENO BOTRÓPICO

Para una misma especie, la composición del veneno puede variar en función de, por lo menos tres factores:

- Edad del animal: es demostrado que los venenos de *Bothrops jararaca* y *Bothrops moojeni* jóvenes, poseen mayor actividad pro-coagulante (activación del factor X y protrombina) y menor actividad proteolítica con relación a serpientes adultas.
- Distribución geográfica: serpientes de la misma especie colectadas en ambientes diferentes, pueden presentar variaciones de actividad en los venenos.
- Carácter individual entre serpientes: constatada por el encuentro de fracciones diversas en el veneno de serpientes de la misma procedencia.

Entre las diferentes especies de *Bothrops*, ésta variabilidad también es verificada, a pesar de ser todavía limitado el conocimiento de las diferencias en la actividad de los venenos de varias especies existentes en el Perú.

### 1.1.4. PRINCIPALES SERPIENTES VENENOSAS DEL PERÚ

El Perú es un país con una gran biodiversidad, tanto de flora como fauna, esto debido a que gran parte del territorio nacional pertenece a la región selvática, 754.139,84 km<sup>2</sup> es la longitud de la selva peruana. En el Perú han sido registradas una gran variedad de serpientes tanto en los valles interandinos, en las costas del pacífico como en la región selvática. En 1974 Meneses, reportó un aproximado de 50 especies venenosas<sup>25</sup>, posteriormente en 1995 Carrillo e Icochea describieron 33 especies de serpientes de este tipo.<sup>9</sup> Sin embargo, la investigación en la descripción de las distintas especies de serpientes no ha concluido, ya que es seguro que en un futuro cercano se realizarán más informes y se determinarían nuevas especies. Tanto en esta investigación como en todas

las que se realizan teniendo como objeto de estudio a las serpientes peruanas, se utiliza el serpentario de “Oswaldo Meneses”, el cual ha reportado las siguientes especies de serpientes venenosas en el Perú (Tabla 1).<sup>29</sup>

### 1.1.5. ACCIDENTES OFÍDICOS.

Los accidentes con serpientes venenosas ocurren alrededor del mundo, debido a esto; se toma a este tipo de accidentes como un problema para la salud pública, especialmente en países tropicales. En el mundo existen aproximadamente 3000 especies de serpientes, dentro de las cuales del 10 al 14% son consideradas venenosas; en el Perú según el Ministerio de Salud, ocurren entre 7000 a 8000 accidentes ofídicos por año, la mayoría de accidentes causados por la especie *Bothrops*.<sup>47</sup>

Las serpientes venenosas del género *Bothrops* son endémicas de la amazonia del Perú, la especie *Bothrops atrox* presenta el mayor índice de víctimas, con mayor frecuencia varones adultos y un tercio de los pacientes son niños. De la misma manera, los pacientes más afectados pertenecen a la población económicamente activa.<sup>47</sup>

A pesar de ser un problema para la salud pública, las serpientes brindan un importante servicio para las zonas rurales más pobres, debido a que realizan un control de roedores que contaminan los productos almacenados y transmiten enfermedades a los seres humanos.<sup>47</sup>

**Tabla 1. Principales serpientes venenosas del Perú según Yarlequé (2000).<sup>29</sup>**

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

### 1.1.6. *Bothrops barnetti*

Se encuentra distribuida en el desierto costero del Perú, entre los 0 y 1000 metros sobre el nivel del mar. Se trata de una especie endémica del Perú y se encuentra distribuida en los departamentos de La Libertad, Lambayeque, Piura y recientemente, existen reportes de haber sido registrada en la zona sur del Perú, tal como Arequipa, Moquegua y Tacna. Su morfología se presenta a manera de triángulos blancos y negros, generalmente crece hasta los 120 cm. Existe un dimorfismo sexual que revela algunas características puntuales, así tenemos que las hembras se muestran en menor tamaño y más finas.<sup>9</sup>

Hasta el presente no se han registrados estudios sobre la existencia de PLA<sub>2</sub> homólogas (K49) presentes en el veneno de *Bothrops barnetti*. Estudios preliminares han evidenciados la presencia de esta familia de proteínas, lo que ha motivado el presente estudio en extenso a fin de poder caracterizar al menos una de ellas en relación a su estructura-función.



**Figura 1.** *Bothrops barnetti*, serpiente endémica del norte peruano.<sup>59</sup>

### 1.1.7. “FOSFOLIPASAS A<sub>2</sub> LIKE MIOTOXINAS “

Las fosfolipasas A<sub>2</sub> K49 homologas son denominadas toxinas debido a una gama de efectos tóxicos atribuidos a la molécula tales como: miotoxicidad, neurotoxicidad, actividad proinflamatoria, entre otros efectos farmacológicos. Todas estas actividades que desencadenan las PLA<sub>2</sub> K49 (homólogos) son atribuidas a regiones o dominios de la molécula que no se encuentran relacionadas con la actividad catalítica, como podría suponerse, en ese sentido la gama de efectos farmacológicos de estas moléculas permiten denominar como toxinas. A pesar de que muchos mecanismos de acción toxinológica aún permanecen desconocidos, existen otras más aún sin entender. Sin embargo estudios de mutagénesis sitio-dirigidas de cada aminoácido responsable de la actividad farmacológica se está comenzando a estudiar a fin de elucidar la contribución de cada aminoácido a lo largo de la cadena polipeptídica, en los diferentes efectos tóxicos.<sup>46</sup>

Las miotoxinas, incluyen diferentes grupos de péptidos aislados de veneno de serpientes y abejas, que podrían causar mionecrosis. Dentro de los varios grupos podemos destacar tres en particular, por su importancia: las fosfolipasas A<sub>2</sub> miotóxicas; los péptidos citolíticos no enzimáticos y los péptidos no citolíticos, no enzimáticos.<sup>30</sup>

Las fosfolipasas A<sub>2</sub> miotóxicas son macromoléculas compuestas por cerca de 110 a 135 residuos de aminoácidos que poseen una estructura básica de la fosfolipasas A<sub>2</sub> cuantitativamente activas. Las miotoxinas fosfolipasas A<sub>2</sub> pueden ser divididas en dos grandes grupos. Las fosfolipasas A<sub>2</sub> miotóxicas Asp49 (D49) que poseen un residuo de Asp 49 conservado esencial para su pleno funcionamiento. Otro grupo de miotoxinas son caracterizadas por tener en lugar de Asp, Lys 49, llevando la pérdida de unión al Ca<sup>2+</sup>, disminuyendo sustancialmente o reduciendo la actividad hidrolítica sobre sustratos purificados o sobre la lecitina de huevo.<sup>30</sup>

El modo de acción de las fosfolipasas miotóxicas Lys49 y de las Asp49 sobre el músculo son generalmente del mismo tipo, tanto las miotoxinas Lys49 y Asp49 pueden causar lisis rápida del sarcolema, llevando a un rápido estado de mionecrosis.<sup>31</sup>

El papel de la actividad catalítica, llevado a cabo por estas miotoxinas es un punto no esclarecido y controversial ya que las miotoxinas, con estructura fosfolipasa A<sub>2</sub> “like” Lys 49 no poseen un actividad lipolítica, portando otros mecanismos que deben estar relacionados en la expresión de actividad miotóxica. <sup>30</sup>

En América Latina, de modo general la mayoría de los accidentes ofídicos son causados por serpientes del genero Bothrops .La picada de estas serpientes lleva generalmente a un cuadro de mionecrosis local, provocadas por la presencia de las miotoxinas fosfolipasa A<sub>2</sub> “like“, que son proteínas estructuralmente semejantes a las fosfolipasas A<sub>2</sub> activas, no obstante sin o con actividad enzimática residual o baja. <sup>32</sup>

Varias miotoxinas aisladas en estos últimos años han sido caracterizadas como proteínas básicas de masa molecular entorno de 13 kDa, estas miotoxinas fosfolipasas A<sub>2</sub> “like” además por su fuerte carácter en la formación de dímeros, que es la forma más común de polimerización encontrada para las fosfolipasas A<sub>2</sub> miotóxicas de modo general y eventualmente en tetrameros. Todas las miotoxinas aisladas hasta el presente momento, han empleado una cromatografía de intercambio iónico, como un paso de orden para su purificación. En muchos casos las miotoxinas de carácter básico, son los últimos componentes en ser eluidos por cromatografía de intercambio cationico usando gradientes de sales neutras, como fosfato, Tris-HCl, Acetato de Amonio. <sup>33</sup>

El veneno Botrópico así como el veneno de otras especies de serpientes ha mostrado la presencia de isoformas, tanto para diferentes individuos de una misma especie, como para el mismo individuo .Se sabe que serpientes, poseen varios genes que codifican varias isoformas, con todo la expresión y la síntesis de diferentes isoformas permanece aún desconocido .La separación de estas isoformas ha sido posible por el uso de HPLC de fase reversa. <sup>34</sup>

Las miotoxinas aisladas hasta el presente momento, se trata de moléculas compactas extremadamente estables a variaciones de temperatura, pH, concentración salina alta y la presencia de solventes orgánicos.

Debido a estas características, las fosfolipasas A<sub>2</sub> miotóxicas no se desnaturalizan en condiciones usuales de trabajo, durante los procesos de purificación y ensayos biológicos. <sup>33</sup>

Las miotoxinas del género *Bothrops* han sido clasificadas como fosfolipasas A<sub>2</sub> del grupo II extracelulares con una masa molecular de 13 a 15 kDa y pueden ser subdivididas en dos grupos distintos:

- a) Las fosfolipasas A<sub>2</sub> D49 que se caracterizan por poseer en su sitio catalítico la presencia de Ca<sup>2+</sup> y alta actividad enzimática.
- b) Las fosfolipasas A<sub>2</sub> K49 que poseen una actividad catalítica baja o ausente debido a la presencia de residuos de lisina en la posición 49 (K49) promoviendo un impedimento espacial y esteroquímico de unión al Ca<sup>2+</sup>. Las fosfolipasas A<sub>2</sub> K49 a pesar de no poseer Ca<sup>2+</sup> como cofactor de su actividad puede eventualmente promover la ruptura de la bicapa de la membrana de liposomas, a través de un mecanismo de actividad independiente de actividad enzimática. Así, aun no se conoce con precisión el mecanismo de este evento.<sup>33</sup>

Las fosfolipasas A<sub>2</sub> miotóxicas han sido objeto de muchos estudios en razón de tres motivos principales:

- Son factores importantes.
- Son de fácil aislamiento.
- Representan cerca del 20 a 30 % de veneno total.

Muchas de las miotoxinas ya fueron aisladas y parcialmente estudiadas desde el punto de vista bioquímico y farmacológico (Tabla 2).

El mecanismo de acción de las miotoxinas fosfolipasa A<sub>2</sub> “like” aún permanece oscuro.<sup>33</sup> La hipótesis del mecanismo de acción de las miotoxinas indica que las fosfolipasas A<sub>2</sub> miotóxicas se ligan a determinados receptores para intermediar la acción miotóxica. En líneas generales la hipótesis tendría los siguientes eventos:

- La miotoxina se une a receptores de membrana.
- Ocurre una alteración de los flujos iónicos de sodio y potasio.
- Ocurre un aumento de concentración de fluido para dentro de la célula.
- Se inicia una vacuolización.

- Se inicia un proceso de desorganización de las fibras musculares.
- Pérdida acentuada de la integridad celular.

Las fosfolipasas A<sub>2</sub> tanto D49 como K49 pueden estar o no en forma agregada, más comúnmente en forma dimérica. Estas neurotoxinas necesitan para llevar a cabo el evento miotóxico de residuos cargados positivamente tales como Lisina, Arginina e Histidina. Las fosfolipasas A<sub>2</sub> ácidas de *Bothrops jararacussu* no causan miotoxicidad, por tanto aminoácidos cargados positivamente son extremadamente importantes para la expresión de miotoxicidad.<sup>35</sup>

Díaz-Oreiro y Gutiérrez (1997), demostraron que modificaciones químicas realizadas en los residuos de lisina inhiben sustancialmente la actividad miotóxica y anticoagulante, mostrando la importancia de los residuos de lisina<sup>31</sup>. Estas lisinas en otros aminoácidos cargados son comunes en las fosfolipasas A<sub>2</sub> miotóxicas<sup>35</sup>. Estos residuos cargados positivamente ayudarían a las fosfolipasas A<sub>2</sub> miotóxicas a que se posicionen sobre uno o más sitios receptores localizados en la membrana celular de las fibras musculares. De acuerdo con Gutiérrez y Lomonte (1995) existen evidencias de la existencia de receptores de alta afinidad.<sup>33</sup>

En la actualidad se desconoce la presencia de proteínas Lys49 con estructura PLA<sub>2</sub> mionecróticas de la especie *Bothrops barnetti* de procedencia peruana, en los que se haya purificado utilizando técnicas de alta eficiencia para su obtención de manera que se pueda determinar su presencia en forma precisa caracterizándola bioquímica como biológicamente, por lo que el presente trabajo se justifica plenamente y en colaboración poder llevar a cabo estudios con todos estos elementos que puedan revelar valiosas informaciones.

**Tabla 2 Miotoxinas botropicas.<sup>31</sup>**

Especie	Nombre de la toxina	KDa	PI	PLA <sub>2</sub>	Referencias
<i>B. asper</i>	Miotoxina I	10,7	Nd	+	Gutiérrez <i>et al.</i> , (1984)
<i>B. Asper</i>	Miotoxina II	13,3	Nd	-	Lomonte & Gutiérrez, (1989)
<i>B. Asper</i>	Miotoxina III	13,9	>9,5	+	Kaiser <i>et al.</i> , (1990)
<i>B. Asper</i>	Miotoxina IV	15,5	Nd	-	Díaz <i>et al.</i> , (1995)
<i>B. asper</i>	Miotoxina PLA <sub>2</sub>	14,1	Nd	+	Mebs & Samejima, (1986)
<i>B. mummifer</i>	Miotoxina	16,0	Nd	-	Gutiérrez <i>et al.</i> , (1993)
<i>B. mummifer</i>	Miotoxina pico IV	15,0	~10,6	-	Bruses <i>et al.</i> , (1993)
<i>B. jararacussu</i>	Bothropstoxin I	13,8	~8,2	-	Homsí-Brandeburgo <i>et al.</i> , (1988); Cintra <i>et al.</i> , (1993)
<i>B. jararacussu</i>	Bothropstoxin II	15,7	~7,7	+	Homsí-Brandeburgo <i>et al.</i> , (1988)
<i>B. insularis</i>	Miotoxina	15,0	Nd	+	Selistre <i>et al.</i> , (1990)
<i>B. atrox</i>	Miotoxina	13,4	Nd	+	Lomonte <i>et al.</i> , (1990)
<i>B. moojeni</i>	Miotoxina I (IV*)	13,4	Nd	-	Lomonte <i>et al.</i> , (1990)
<i>B. moojeni</i>	Miotoxina II (V*)	13,4	Nd	-	Lomonte <i>et al.</i> , (1990)
<i>B. moojeni</i>	MOO-1	15,0	Nd	-	Moura da Silva <i>et al.</i> , (1999)
<i>B. pradoi</i>	PRA-1	15,0	Nd	+	Moura da Silva <i>et al.</i> , (1999)
<i>B. godmani</i>	Miotoxina I	13,3	~8,2	+	Díaz <i>et al.</i> , (1992)
<i>B. godmani</i>	Miotoxina II	13,4	~8,9	-	Díaz <i>et al.</i> , (1992)
<i>B. pirajai</i>	PrTX-I	~13,5	~8,3	-	Mancuso <i>et al.</i> , (1995); Toyama <i>et al.</i> , (1995)
<i>B. pirajai</i>	PrTX-II	~13,5	~8,2	-	Mancuso <i>et al.</i> , (1995); Toyama <i>et al.</i> , (1995)
<i>B. pirajai</i>	PrTX-III	~13,5	~8,0	+	Mancuso <i>et al.</i> , (1995); Toyama <i>et al.</i> , (1995)

### 1.1.8. PERSPECTIVA BIOTECNOLÓGICA

El envenenamiento ofídico es un problema de salud pública de considerable magnitud, ya que 2,5 millones de personas son mordidas por serpientes cada año, donde más de 100,000 son graves que termina en muerte <sup>36</sup>. No obstante, a pesar de las mordeduras y sus consecuencias de mortalidad, hoy se considera el veneno un recurso de orden biológico, en razón de que contiene varios componentes, entre proteínas, enzimas y péptidos bioactivos con un potencial valor terapéutico.

El veneno se ha utilizado en el tratamiento de una variedad de condiciones fisiopatológicas, en Ayurveda, la homeopatía y la medicina popular. Con el advenimiento de la biotecnología, la eficacia de tales tratamientos ha sido justificada por los componentes presentes en el veneno de serpientes y su purificación ha venido a delinear sus propiedades terapéuticas de cada uno de ellos. Así en el presente trabajo pretendemos encontrar al menos una PLA<sub>2</sub> homóloga (K49), la misma que por modificaciones post-traduccionales ha perdido su actividad enzimática, sin pérdida de la actividad farmacológica

El primer inhibidor de una PLA<sub>2</sub> fue aislada del suero de *Trimeresurus flavoviridis* (*Protobothrops flavoviridis*; EMBL Reptile Database). <sup>10</sup>

Los inhibidores de las PLA<sub>2</sub> muestran una alta actividad anti enzimática, antimiotóxica, antiedematogénica, anticitotóxica y antinatibacteriana. <sup>11</sup> Existen varios estudios de los posibles efectos desde la perspectiva biotecnológica en su aplicación, el efecto anticancerígeno, el cual podría convertir a la proteína en una herramienta de uso biotecnológico o como sonda molecular para el entendimiento de los procesos pro inflamatorios. <sup>12</sup>

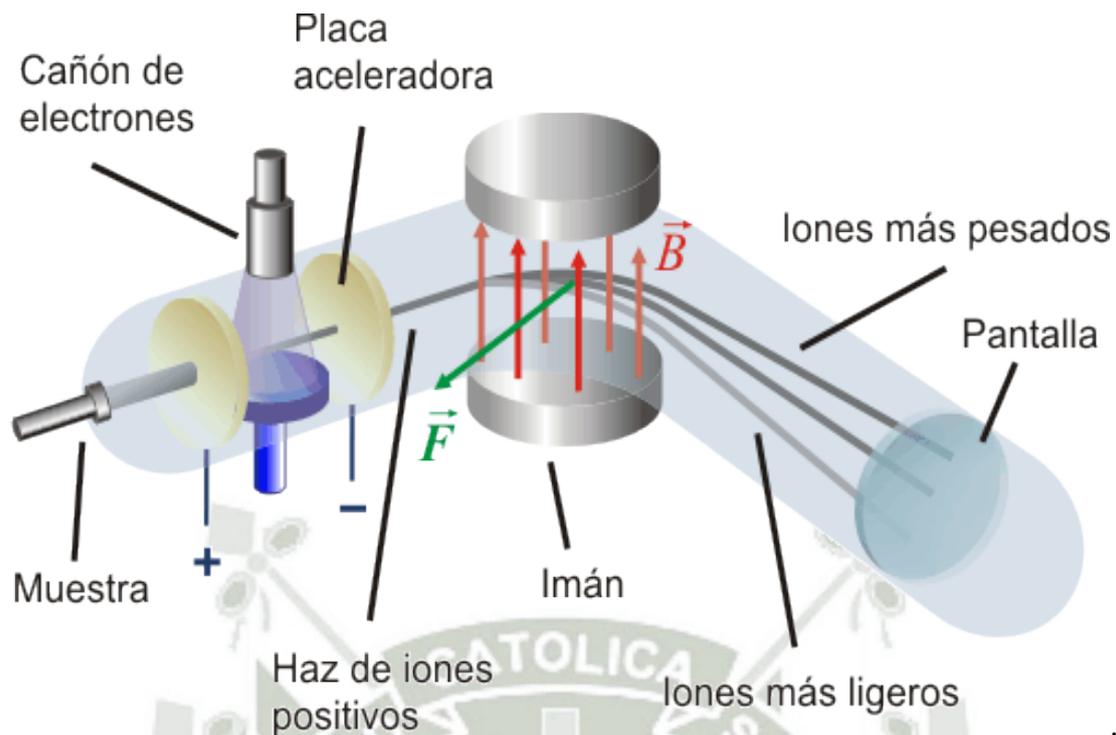
## 1.2 ASPECTOS GENERALES DE LA INSTRUMENTACIÓN UTILIZADA

### 1.2.1 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas es una herramienta espectroscópica analítica que tiene como función principal la separación de diferentes especies moleculares y atómicas en

base a su masa; esta herramienta es utilizada con frecuencia en el estudio de proteínas debido a la alta precisión que posee el cual puede ser empleada para comprobar o validar diversas fórmulas empíricas.<sup>55</sup>

El espectrómetro de masas está compuesto por 4 elementos que son el sistema de inyección, la fuente de iones, un analizador de masa y un detector; las muestras que son introducidas en el espectrómetro van directamente a la fuente de iones en una sonda, o si es el caso de mezclas, estos van por sistemas intermediarios. Al encontrarse la muestra en la fuente de iones, las moléculas de la misma son sometidas a la ionización, para poder realizar este tipo de ionización la sustancia es bombardeada con un rayo de electrones que tienen la suficiente energía para romper la molécula, los diversos fragmentos positivos que son producidos se aceleran en vacío a través de un campo electromagnético y son distribuidos de acuerdo a su relación carga/masa. Debido a que la mayoría de los iones producidos en el sistema del espectrómetro son de carga positiva, el valor de la relación  $m/z$  es equivalente al peso molecular del fragmento.<sup>55</sup> Una parte de las moléculas que pertenecen a la muestra son llevadas a la cámara de ionización, donde son bombardeadas por un haz de electrones de elevada energía; estas moléculas se fragmentan y los cationes producidos son acelerados y dirigidos al analizador, la trayectoria de las moléculas cargadas es desviado por un campo magnético aplicado. Los iones de menor masa son desviados con mayor facilidad provocando que estas choquen con las paredes del analizador, del mismo modo los iones de elevada masa no serán desviados lo suficiente para seguir la trayectoria curva y chocaran contra la pared del analizador; los iones que poseen una relación  $m/z$  adecuada no serán desviados y podrán seguir la trayectoria del analizador, saliendo de esta manera por la ranura de salida y chocando con el colector, el cual genera una corriente eléctrica, la que es amplificada y detectada como se puede observar en la figura 2.



**Figura 2 Estructura de un espectrómetro de masas.**<sup>60</sup>

La información obtenida por el espectrómetro de masa es una gráfica de intensidad relativa vs la relación carga/masa, el pico que presenta mayor intensidad es considerado como el “pico base” y los demás picos son reportados en relación a la intensidad del pico base.<sup>55</sup>

#### 1.2.1.1 IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY (ESI)

Este tipo de espectrometría de masas se basa en el empleo de grandes gotas cargadas producidas por nebulización neumática, donde se aplica un potencial suficientemente elevado para poder dispersar la solución, la cual produce pequeñas gotas más finas que son cargadas todas con la misma polaridad. El solvente es evaporado, reduciendo de esta manera el volumen que contiene la gota y elevando la concentración de la carga en la superficie de la gota; la repulsión coulombica supera la tensión superficial de la gota y ésta explota, produciendo gotas más pequeñas y con menos carga. El proceso de disminución de volumen seguido de la explosión de la gota, se repite hasta poder formar iones individuales cargados del analito “puro”.<sup>55</sup>

### 1.2.1.2 DESORCIÓN/ IONIZACIÓN LÁSER ASISTIDA EN MATRIZ (MALDI)

La espectrometría de masas MALDI se basa en la radiación de muestras o compuestos polares de bajo peso molecular con un pulso laser de alta intensidad, produciendo iones que pueden ser analizados por su masa. Las moléculas del analito están distribuidas en la matriz de tal manera que estas se encuentran aisladas unas de otras, esto es indispensable para que la matriz pueda formar una solución sólida homogénea. Se incide energía laser en la solución sólida, donde parte de la misma es absorbida por la matriz produciendo de esta manera vibraciones y causando una desintegración local de la solución, formando agregados que poseen moléculas individuales de analito rodeadas de moléculas de matriz neutras y excitadas, las moléculas de la matriz son evaporadas de los agregados dejando en solitario a la molécula excitada del analito.<sup>55</sup>

Las moléculas del analito excitado son ionizados por protonación de la matriz excitada fotónicamente, produciendo compuestos cargados, los cuales producen espectros propios de MALDI, dando lugar a señales características de cada compuesto.<sup>55</sup>

#### 1.2.1.2.1 ANALIZADOR DE MASA TOF (TIME OF FLY)

Es uno de los analizadores más simples y con mayor sensibilidad en un rango ilimitado de masas, este analizador mide la relación  $m/z$  de un determinado ion, basándose en el tiempo que necesita este ion para poder recorrer un tubo con una determinada longitud desde la fuente de iones, impulsado con una velocidad inicial dependiente de su masa. El tiempo de vuelo que recorre el ion es proporcional a la raíz cuadrada de su relación  $m/z$ , dada una aceleración constante provocado por el voltaje.<sup>55</sup>

$$\textit{T tiempo de vuelo} = k \cdot \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Algunos analizadores TOF de espectrometría de masas contienen al final del tubo de vuelo una especie de espejo de iones, el cual tiene como función principal el repeler los iones que recorren a través del tubo y dirigirlos al detector; produciendo de esta manera que la longitud del tubo de vuelo sea mayor con lo cual mejora la resolución. Otra función del espejo o también llamado reflectrón es corregir las diferencias en la energía cinética que es producida entre iones de masas iguales, estas diferencias de energía ocurren por la posición que ocupa cada ion en la fuente de iones cuando estos son acelerados al aplicar una diferencia de potencial; estas diferencias son reducidas en el reflectrón debido a que los iones que contienen mayor energía cinética viajan una mayor distancia en el reflectrón que los iones con energía cinética menor, esta acción produce que los iones que poseen masas iguales se enfoquen de una mejor manera en el detector mejorando de manera considerable la resolución y la precisión del cálculo de masas.<sup>55</sup>

### 1.2.2 APROXIMACIÓN PROTEOMICA

La proteómica como ciencia estudia el proteoma que es expresado en un organismo vivo bajo determinadas condiciones concretas, el termino proteoma fue acuñado por Wilkins en 1994 como equivalente lingüístico al concepto del genoma; este fue el inicio de toda una era post-genómica gracias a la secuenciación de un elevado número de especies.<sup>55</sup>

La proteómica como herramienta ayuda a separar, identificar y caracterizar un grupo de proteínas con el objetivo de poder estudiar y realizar un análisis adecuado, conociendo de esta manera la abundancia, localización, modificación e interacción de las diferentes proteínas presentes en cada especie.<sup>55</sup>

Para poder identificar o secuenciar una determinada proteína en los estudios proteómicos, es indispensable comenzar por su espectro de masa, debido a que la información brindada por esta nos permite comparar los espectros obtenidos con la información contenida en la base de datos identificando de una manera rápida y con gran precisión la proteína en estudio.<sup>55</sup>

El espectrómetro de masas genera una serie de datos, representados por una gráfica en la que se visualiza un grupo de picos, estos picos contienen la información de cada valor de  $m/z$  y la intensidad de señal de cada aminoácido, este conjunto de picos es denominado como el espectro de masas. Una identificación adecuada de cada proteína depende de la calidad del espectro obtenido, además del método utilizado en la búsqueda en la base de datos.<sup>55</sup>

### **1.2.2.1. ANALISIS DE LA HOMOLOGIA SECUENCIAL POR ESPECTROMETRIA DE MASAS**

Mediante el uso de la espectrometría de masas como herramienta de identificación, se puede fragmentar los péptidos contenidos en la proteína a analizar, esta información expresada en secuencias es más útil para una identificación adecuada que la información de otras herramientas utilizadas antiguamente donde se obtenida solamente el peso molecular de la proteína; es por ello que solo es necesario una secuencia de un péptido lo suficientemente larga para poder identificar una proteína que haya sido caracterizada anteriormente en la base de datos.<sup>56</sup>

Los datos obtenidos en el espectro de masas, pueden ser analizados manualmente, sin embargo estos datos también pueden ser analizados mediante el uso de la base de datos, esta búsqueda se denomina MS/MS; mayormente solo es necesario obtener la secuencia de 2 péptidos para así de esta manera conocer la proteína en estudio. Las bases de datos son variadas y en todas se pueden realizar identificaciones exitosas, sin embargo existen problemas cuando la proteína en estudio presenta modificaciones post-traduccionales y polimorfismos.<sup>56</sup>

### 1.2.2.2 HUELLA DE MASA PEPTIDICA

La huella de masa peptídica como herramienta, es una serie de pasos utilizados para la correcta identificación de proteínas problema; estos pasos comprenden: digestión de la proteína problema, análisis de la proteína problema por la espectrometría de masas MALDI-TOF y el empleo de algoritmos de búsqueda en las distintas bases de datos.<sup>57</sup>

En el proceso de identificación es indispensable que cada proteína analizada en la base de datos utilizada, sea digerida usando teóricamente el mismo agente para fragmentar que el de la proteína problema; seguidamente el espectro obtenido por el MALDI-TOF es comparado con los distintos espectros que se encuentran en la base de datos, estos son calculados y se les asigna una puntuación de homología, finalmente la proteína que se puede identificar como la adecuada es aquella que posee la puntuación más alta de homología.<sup>57</sup>

Utilizando esta técnica se puede obtener un resultado rápido, sin embargo no es adecuado cuando se trabaja con mezclas de proteínas, debido que a pesar de que ya han sido desarrollados algunos programas para arreglar este problema, el resultado sigue siendo variado y no es confiable. Otro problema presentado en esta herramienta es la presencia de elevadas modificaciones post-traduccionales en la proteína problema, lo cual puede generar un espectro diferente a los que se poseen en la base de datos.<sup>57</sup>

### 1.2.2.3 ESTUDIO BIOINFORMÁTICO Y SECUENCIA DE NOVO

La aproximación proteómica tiene como finalidad la obtención de secuencias de distintos aminoácidos mediante la deducción de novo proveniente de los resultados de la espectrometría de masas y con esta información obtenida buscar secuencias homologas de proteínas en la base de datos.<sup>57</sup>

El uso de la secuencia de novo es necesaria cuando el análisis realizado en la espectrometría de masas no da resultados confiables; este tipo de resultados ocurren en su mayoría, cuando el genoma del organismo del cual procede la proteína no ha sido caracterizado completamente. Sin embargo, a pesar de que la proteína en estudio no llegue a ser identificada o sea una proteína desconocida, la información recopilada de la secuencia obtenida puede servir para clonar el gen correspondiente.<sup>57</sup>

#### a) **HERRAMIENTAS BIOINFORMATICAS Y SOFTWARE**

El gran crecimiento de la biotecnología en los últimos años en cuanto al modelado molecular, ha llevado a la necesidad de crear y desarrollar sistemas computacionales; los cuales tienen como finalidad posibilitar el almacenamiento e interpretación de los datos obtenidos en las distintas investigaciones de un modo eficiente y adecuado.<sup>58</sup>

##### i) **DNASTAR**

DNASTAR como herramienta nos proporciona la información genómica y proteómica necesaria de la estructura biológica, además de la biología evolutiva; nos permite editar, alinear y analizar secuencias problema, esta herramienta se subdivide en 3 funciones específicas:

- EdtSeq: herramienta que nos permite importar y modificar secuencias problema que se encuentran en archivos específicos.
- MegAlign: herramienta utilizada principalmente para el alineamiento de secuencias problema de proteína o ADN
- Protean: herramienta que permite predecir patrones de visualización, composición de aminoácidos, estructuras secundarias y propiedades físico-químicas de las secuencias problema en estudio.<sup>58</sup>

##### ii) **SWISS MODEL**

Es un servidor que permite analizar la homología estructural de las secuencias de una manera automatizada, el objetivo principal de este servidor es poder realizar un modelamiento completo de la proteína a estudiar, de una manera accesible para los investigadores a través del servidor web ExPASy.<sup>58</sup>

### **iii) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)**

Herramienta utilizada mayormente para la búsqueda de secuencias homologas según su alineamiento básico local, lugar donde es posible encontrar las regiones que poseen similitud local entre las distintas secuencias a analizar; este servicio permite la comparación de nucleótidos o secuencias enteras de distintas proteínas en la base de datos de la misma, calculando de esta manera la similitud entre las secuencias analizadas.<sup>58</sup>

El servidor BLAST sirve además para poder inferir las relaciones funcionales y evolutivas entre las secuencias analizadas, así como también permite la identificación de los miembros de las familias de los distintos genes.<sup>58</sup>

### **iv) PROTEIN PILOT**

Software utilizado para la identificación de las secuencias problema, tiene como principal función la identificación de las modificaciones peptídicas y las divisiones no trípticos de una manera simultánea, además de distinguir de una manera simple las isoformas de las distintas proteínas, subconjuntos de proteínas.<sup>58</sup>

Protein Pilot como herramienta permite suprimir de una manera eficaz los falsos positivos producidos por distintos factores, es posible visualizar las asociaciones proteína-peptido. El software de esta herramienta es compatible con todos los sistemas de la proteómica MS/MS.<sup>58</sup>

### **v) 4000 Series Explorer**

Software que trabaja de la mano con la espectrometría de masas, esta herramienta permite la manipulación y recolección de todos los datos provenientes del equipo MALDI-ToF/ToF ABSciex 4800 plus; permite obtener los espectros del equipo de una manera eficaz y con una sensibilidad alta.<sup>58</sup>

## CAPITULO II

### 2.1 UBICACIÓN

Los procedimientos que se realizaron en el presente trabajo, fueron divididos en dos partes que se desarrollaron de la siguiente manera.

- Las pruebas de determinación de la actividad fosfolipásica, cromatografía de interacción hidrofóbica y electroforesis en SDS-PAGE fueron realizados en las instalaciones de la Universidad Nacional de San Agustín en el laboratorio de Bioquímica perteneciente a la facultad de Biología a cargo del Prof. Mg. Ronald Navarro Oviedo y el Ph.D. Luis Alberto Ponce Soto.
- Las pruebas de espectrometría de masas Maldi TOF y ESI como las pruebas de actividad miotóxica fueron realizadas en el laboratorio de Química de Proteínas del Instituto de Biología de la Universidad Estadual de Campinas (UNICAMP)- Brasil a cargo del Ph. D. Mauricio Aurelio Gomes Heleno.

### 2.1 MATERIALES

#### MATERIAL BIOLÓGICO

- Veneno total de serpiente *Bothrops barnetti* proporcionado por el Dr. Luis Alberto Ponce Soto
- 6 Ratones Balb

#### MATERIAL DE LABORATORIO

- Tubos de ensayo de 16 x 150 mm.
- Vaso de precipitado de 100ml.
- Vaso de precipitado de 250 ml.
- Pipetas de Pasteur
- Pipeta de 10 ml.
- Probeta de 10 ml.
- Tubos centrifuga de 50 ml.
- Tubos ependorf de 1.5 ml.
- Puntas para micropipetas de 0-20  $\mu$ l.

- Puntas para micropipetas de 0-200  $\mu$ l.
- Puntas para micropipetas de 100-1000  $\mu$ l.
- Propipeta.

#### EQUIPOS, APARATOS E INSTRUMENTOS

- Columnas del sistema HITRAP
- Equipo de cromatografía
- Refrigeradora (electrolux)
- Accesorios para formación de geles en electroforesis
  - Cubeta de formación de geles
  - Cristales planos de vidrio de 10 x 10 cm.
  - Peines de 10 cm x 10 pozos y separadores de 0.8mm.
- Fuente de poder eléctrico (Thermo Scientific)
- Incubadora
- Fotocolorímetro Klett-Summerson
- Maldi Tof/Tof ABsciex 4800.
- Placas MALDI (OptiPlate-384 well Microplate)
- Espectrómetro de masas Electrospray (ESI)
- Centrífuga refrigerada (PrO-Research)
- Micropipetas 0.5-10 $\mu$ L, 5-50 $\mu$ L, 20-200 $\mu$ L, 100-1000 $\mu$ l, 1-5mL.
- Gradilla

#### REACTIVOS

- Bicarbonato de amonio
- Forforilasa B
- Albúmina bovina
- Albúmina de huevo
- Anhidrasa carbónica
- Alfa lacto albumina de leche
- Agua destilada
- Acrilamida/Bisacrilamida
- Tris 1M pH 8.8

- SDS 10%
- TEMED
- Persulfato amónico
- Acido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzoico
- PBS
- Kit CK-NAC
- Tampón de carbonato sódico
- Tampón fosfato salino
- Suero fetal bovino
- ELISA específico para IL
- Tampón Tris-HCl
- Tampón de ruptura 5x
- Colorante coomassie blue

#### SOFTWARE Y HERRAMIENTAS BIOINFORMATICAS

- DNASTar (Ver. 5.0)
  - EditSeq
  - MegAlign
  - Protean
- 4000 Series Explorer ( Software requerido para la manipulación y recolección de datos obtenidos del Equipo MALDI TOF Absciex 4800 plus)
- Protein pilot
- Blast
- SWISS-MODEL

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 VENENOS, REACTIVOS Y EQUIPOS

El veneno total de *Bothrops barnetti* fue cedido por el Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D. docente de la Escuela de Postgrado de la Universidad Católica de Santa María.

Todos los solventes, productos químicos y reactivos químicos utilizados fueron de un alto grado de pureza, procedentes de Aldrich (Aldrich Chemical Co, Inc. - Wisconsin, U.S.A.), Applied Biosystems (Applied Biosystems - Perkin Elmer Division, U.S.A.), Bio-Rad (Bio Rad Laboratories - California, U.S.A.), Merck (Merck - Darmstadt, Germany), Sigma (Sigma Chemical Co - St. Louis, U.S.A.), Pierce (Pierce Chemical Company - Illinois, U.S.A).

### 2.2.2 CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA

Se purificó la fosfolipasa  $A_2$  homóloga, procedente del veneno de *Bothrops barnetti*, en columnas del sistema HITrap (H&C USA.) Se utilizó el sistema cromatográfico de cromatografía convencional, en el cual se aplicó 10 mg. del veneno total de *Bothrops barnetti* y fueron eluidas con un flujo de 10 ml/h, con un gradiente lineal de 20 mM a 1M de bicarbonato de amonio; finalmente se recolectaron fracciones de 1 ml. por tubo, determinándose la presencia de proteínas. Las fracciones que presentaron 14 kDa. de peso molecular y menor o nula actividad fosfolipásica  $A_2$  fueron empleadas para la obtención del “pool” y se guardó a 5°C.

### 2.2.3. ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE

Sé realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico para poder determinar el peso molecular de la proteína en estudio (PLA<sub>2</sub>), esto debido a que el SDS como detergente aniónico se une a las proteínas y las desnaturaliza, provocando de esta manera que el tamaño de la molécula de la proteína sea directamente proporcional a su longitud en aminoácidos y de esta manera sea visible en gel.<sup>49</sup>

El gel de poliacrilamida es utilizado por ser químicamente inerte, insoluble en agua, relativamente no iónico y por permitir una buena visibilidad de las bandas en el mismo.<sup>48</sup>

### Montaje del sistema de electroforesis

Se utilizó un gel plano de 1,5 mm de grosor, de acuerdo al cual se realizó el montaje del sistema a utilizar. Se armaron las dos placas laterales de vidrio en forma de sándwich, teniendo en cuenta que una de las placas posee un rebaje, seguidamente se colocaron los dos separadores en forma vertical entre ellas y a ambos lados.

El “sándwich” formado por los separadores y las placas fue colocado en el soporte formador de geles, para ser sujeto todo en conjunto y de esta manera formar el sistema de electroforesis. En este sistema se utilizó una mezcla de geles, un gel separador que contenía 7,5% de acrilamida y un gel acumulador que contenía 4,8% de acrilamida, ocupando la mayor parte el gel separador donde se da la separación de los componentes y en la parte superior el gel acumulador donde se concentra la muestra en una banda estrecha.<sup>49</sup> Se procedió a preparar los dos geles mezclando en un vaso de precipitado los componentes indicados en las tablas 3 y 4.

Primeramente se procedió a polimerizar el gel separador (tabla 3) agregando la mezcla líquida en el espacio que existía entre las dos placas del sistema de electroforesis, se llenó hasta unos 3 cm del borde superior del cristal más corto, utilizando una pipeta de Pasteur. Posteriormente se añadió una pequeña cantidad de agua destilada, con la finalidad de asegurar la polimerización y evitar la contaminación; se esperó el tiempo prudente para la correcta polimerización del gel separador y se procedió a retirar el agua destilada excedente del sistema. Se añadió sobre el gel separador la mezcla del gel acumulador (tabla 4) y antes de que este segundo gel polimerice se colocó en la parte superior del sistema de electroforesis el “peine” para que se procedan a formar en el gel acumulador los pocillos en los cuales posteriormente se aplicaran las muestras de proteínas. Finalmente se guardó el gel en conjunto (gel acumulador y gel separador) en una cámara de frío.

**Tabla 3. Componentes del gel separador**

Gel separador (7.5%):	Cantidad
Agua destilada	12 mL
Acrilamida/Bisacrilamida	6.25 mL
Tris 1M pH 8.8	6.25 mL
SDS 10%	250 µl
TEMED	12.5 µl
Persulfato amónico (100mg/1mL)	200 µl

**Tabla 4. Componentes del gel concentrador o acumulador.**

Gel concentrador:	Cantidad
Agua destilada	5.8 mL
Acrilamida/Bisacrilamida	1.65 mL
Tris 0.5 M pH 6.8	2.5 mL
SDS 10%	100 µl
TEMED	6.5 µl
Persulfato amónico (100mg/1mL)	94 µl

#### Preparación de las muestras

Una vez polimerizado el gel en conjunto se procedió a aplicar las muestras de proteínas, para esto se procedió a realizar los cálculos respectivos para que todas las muestras contengan una masa proteica en torno a 24-30 µg, al poseer todas las muestras de proteínas la misma concentración, se procedió a tomar el volumen que fue necesario de cada una de ellas. Para esto, se tomó 24 µl de la solución que contenía la muestra problema y se le agregó a la misma 6 µl de tampón de ruptura 5X para que este en una relación 4:1 (V:V). Adicionalmente para conocer el tamaño de las proteínas presentes en las diferentes muestras, se utilizó un tubo de 10 µl que contenía un marcador de peso

molecular que fue diluido previamente con el tampón de ruptura; este marcador empleado contenía patrones preteñidos de las proteínas mencionadas en la tabla 5.

**Tabla 5. Peso molecular aparente de las distintas proteínas patrón preteñidas usadas en la electroforesis SDS-PAGE**

Proteína patrón preteñida	Peso molecular aparente (kDa)
Miosina	540
B-galactosidasa	464
Albúmina sérica	66,382
Ovoalbúmina	45
Anhidrasa carbónica	29
Inhibidor de tripsina	35
Lisozima	14.3

Se incubaron las muestras problema a 100 °C durante 5 minutos, posteriormente se centrifugaron los tubos durante 1 minuto a baja velocidad para poder obtener una mayor concentración de la muestra problema en el fondo del tubo.

Del sistema de electroforesis armado anteriormente, se retiró el peine de la parte superior del gel creando de esta manera los pocillos para las muestras problema; seguidamente se procedió a retirar el gel formado del sistema, sacando las placas de vidrio y los separadores. El gel obtenido se colocó de manera vertical en la cubeta de electroforesis, a continuación se procedió a llenar las cámaras superior e inferior de la cubeta de electroforesis que contenían los electrodos con el tampón de electroforesis, para que de esta manera pueda entrar en contacto con los extremos de gel.

Finalmente mediante el uso de micropipetas se aplicaron las muestras y los patrones de peso molecular en los pocillos del gel de poliacrilamida, se completaron los pocillos del gel con tampón de ruptura 1X preparado, diluyendo el tampón de ruptura 5X en tampón de electroforesis.

### Desarrollo de la electroforesis

Se conectaron los cables de energía, de la cubeta donde se encontraba el gel a una fuente de corriente continua y se procedió a aplicar 80 V hasta que el frente entre en el gel separador; después se subió la energía a 120 V. Cuando el frente se acercó al extremo inferior del gel, se desconectó el sistema de la corriente y se sacó el sándwich de electroforesis de la cubeta. Finalmente se separaron las placas de vidrio y se sacó el gel con cuidado para no invertir su orientación.

Al obtener el gel con las muestras, este fue teñido mediante su inclusión en una solución de tinción que contenía Azul de Coomassie, ácido acético y metanol durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente el gel fue colocado en una solución de distinción que contenía ácido acético al 10% y metanol al 10% en agua, para poder desteñir el gel durante toda la noche.

#### **2.2.4 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASICA A<sub>2</sub>**

La determinación de la actividad fosfolipásica A<sub>2</sub> se realizó según el método descrito por Cho & Kézdy, (1991) y Holzer & Mackessy (1996), se utilizó como sustrato el ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico. Se utilizaron muestras con una concentración inicial de 1,0 mg/ml. en el caso del veneno total y fosfolipasa A<sub>2</sub> aisladas. El ensayo contiene 0,5 ml. de muestra, 0,5 ml de sustrato y 4,0 ml. de tampón Tris-HCl 0,1M Ca<sup>2+</sup> 0,01 M pH 8.0. Las muestras se encuentran en una concentración final de 0,1 mg en 5 ml del volumen final de reacción y son incubadas por 20 minutos a 37°C. Enseguida la reacción es bloqueada con ácido acético al 30% y la absorbancia leída a 420 nm (filtro azul) en un fotocolorímetro.

#### **2.2.5 CARACTERIZACION DE PEPTIDOS POR ESPECTROMETRÍA DE MASA (MALDI TOF/TOF ABSCIEX 4800)**

La caracterización molecular de la Fosfolipasa A<sub>2</sub> homologa, fue basada en protocolos establecidos para estudios de proteómica en otras especies de veneno de serpientes.

Un análisis exhaustivo de la bibliografía condujo 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). Los análisis de secuencias peptídicas para la caracterización de las proteínas fueron realizadas mediante el programa PROTEIN PILOT el cual utilizó algoritmos Paragon y Progroup.

La comparación cualitativa de múltiples muestras requiere algoritmos y métodos automáticos para el tratamiento de los datos, por lo que se utilizaron los programas MZmine 2 core y pkDACLASS.

Para los análisis de cuantificación libre de etiqueta se consideró el conteo espectral y la intensidad de picos mediante el uso de softwares libres.

#### **2.2.6 ESTUDIO BIOINFORMÁTICO DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS.**

A partir de los resultados obtenidos en la espectrometría de masas MALDI TOF se procedieron a realizar los estudios de homología correspondientes, consultando con las bases de datos disponibles en la red.

Los péptidos obtenidos de la muestra de PLA<sub>2</sub> homóloga K49 fueron comparados por homología con secuencias de la misma proteína presente en distintas especies de la misma familia. Estas comparaciones se realizaron en la base de datos SWISS-PROT ubicable en la página web del Centro Nacional de Información Biotecnológica NCBI, en el servidor BLAST.

Al identificar las secuencias con mayor homología a la muestra BbTX-II obtenidas del servidor BLAST, se procedió a utilizar el software DNA Star (Ver 5.0), con el cual se editaron los péptidos descargados del BLAST y se guardaron utilizando el sub programa Edit Sequence, posteriormente se alineó las secuencias en estudio utilizando el sub programa Meg Align con lo cual las secuencias de las proteínas recibieron un orden y alineamiento mediante el uso de Clustal W, inmediatamente se obtuvieron las nuevas posiciones en función de regiones y/o dominios conservados y se analizó con el sub programa Protean las distintas secuencias para poder obtener un estudio comparativo de las mismas.

### 2.2.7 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MIOTOXICA

Se determinaron los niveles de CK plasmáticos en ratones inoculados por vía intramuscular para determinar la miotoxicidad local e intravenosa para la miotoxicidad sistémica.

Se utilizó una solución stock de 100µg/100µl de la PLA<sub>2</sub> de *Bothrops barnetti* a partir de la cual se prepararon soluciones de 1,5, 10 y 20µg/100µl de concentración de la PLA<sub>2</sub> miotóxica, estas dosis fueron diluidos en 100µl de PBS, enseguida se inyectó los 200 µl de la mezcla final, a nivel intramuscular e intravenoso a grupos de cuatro ratones.

A las 0, 2, 4, 6, 12 y 24 horas después del tratamiento a cada ratón se le extrajo sangre del extremo caudal que fue colectado en capilares heparinizados, el plasma fue separado mediante centrifugación durante 5 min a 10,000 rpm, para posteriormente determinar los niveles de creatina kinasa (CK), se utilizó el kit CK-NAC (Creatine Kinase Diagnostick Germany), adicionando a 1 ml de sustrato 15 µl de plasma y este se incubo por 2 min a 37 °C y se leyó a 340 nm. La aplicación de la PLA<sub>2</sub> se realizó a nivel intravenoso e intramuscular a fin de establecer el mecanismo mionecrotico local y sistémico.

### 2.2.8 CITOQUINAS

Los niveles de citoquinas, interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 (IL-1), en el suero de ratones BALB fueron evaluados a través de la técnica de ELISA (Enzyme-Like ImmunoSorbent Assay).

Las placas de ELISA se revistieron con 100µl (1µg/mL) de los anticuerpos monoclonales anti-IL-6 y anti-IL-1. En tampón de carbonato sódico 0,1 M (pH 8,2) y se incubaron durante 6 horas a temperatura ambiente. Los pozos se lavaron con 0,1% tampón fosfato salino (PBS/Tween-20) y se bloquearon con 100µl de 10% de suero fetal bovino (FCS) en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, por duplicado, las muestras de suero de 50 µl, fueron añadidas a cada pocillo. Después de 18 horas de incubación a 4°C, los pocillos se lavaron y se incubaron con 100µl

(2µg/mL) de los anticuerpos biotinilados monoclonales anti-IL-6 y anti-IL-1 como segundos anticuerpos durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de un lavado final, la reacción se desarrolló mediante la adición de orthophenyldiamine (OPD) a cada pocillo. Las densidades ópticas se midieron a 405 nm en un lector de microplacas. El contenido de citoquinas de cada muestra se leyó a partir de una curva estándar establecida con las citoquinas recombinantes apropiados (expresado en picogramos por mililitro). Los niveles mínimos de cada uno de citoquinas detectable en las condiciones de los ensayos son de 10 pg / ml para la IL-6 y 300 pg / ml para IL-1

Para medir la citotoxicidad de TNF-α presente en el suero de ratones BALB, el porcentaje de citotoxicidad se calculó como sigue:

$$\left( \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \right) \times 100$$

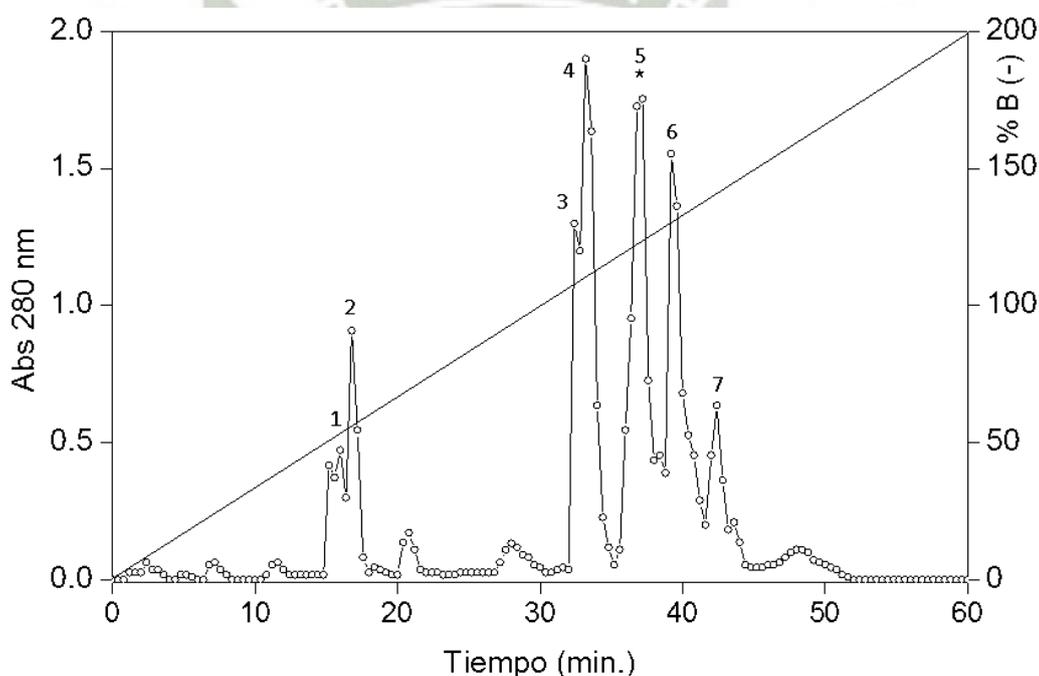
Los resultados se calcularon como el recíproco de la dilución de la muestra en la que se lisa 50% de las células en la monocapa. La actividad del TNF-α se expresó como unidades/ml, estimados a partir de la relación de una dosis de 50% citotóxico de la prueba estándar de TNF-α recombinante.

## CAPITULO III

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 3.1 CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA

El veneno total de *Bothrops barnetti* de procedencia peruana, fue aplicado en una columna de interacción hidrofóbica y reveló la presencia de 7 picos, siendo el pico 5 aquel que mostró actividad pro-inflamatoria y con una masa molecular de aproximadamente 14 kDa en ausencia de actividad fosfolipásica A<sub>2</sub> en relación a los demás (Fig. 3).



**Figura 3. Cromatografía de interacción hidrofóbica, previamente equilibrada con 0,2mM de bicarbonato de amonio, pH 7.9. Se aplicaron 10 mg. del veneno total de *Bothrops barnetti* de procedencia peruana. Las fracciones fueron eluidas con un flujo de 10 ml/h. y con un gradiente lineal 20mM a 1M de bicarbonato de amonio y las fracciones fueron colectadas y discriminadas por su actividad pro-inflamatoria y con una masa molecular de aproximadamente 14 kDa en ausencia de actividad fosfolipásica A<sub>2</sub>, siendo registrado en el pico 5 (\*).**

Los resultados al realizar una cromatografía de interacción hidrofóbica en columnas del sistema HITrap, demostraron la presencia de una fracción con actividad miotóxica a la cual se le denominó como pico 5 ó BbTX-II K49, posteriormente se procedió a purificar la fracción demostrando de esta manera su actividad pro-inflamatoria y con una masa molecular de aproximadamente 14kDa en ausencia de actividad fosfolipásica A<sub>2</sub>.

En relación a la purificación de las proteínas presentes en el veneno de la serpiente, las investigaciones realizadas en fosfolipasas A<sub>2</sub> homologas presentan distintos pasos cromatográficos, entre los cuales podemos mencionar cromatografía líquida convencional, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular. Al realizar la cromatografía de intercambio catiónico la fuerza iónica que ejerce el tampón de elución va a ser determinante en la elución de estas miotoxinas de carácter básico, debido a que estos son los últimos componentes en ser eluidos usando gradientes de sales neutras.<sup>37</sup>

En las investigaciones con proteínas y enzimas que provienen del veneno de serpiente, se ha registrado la presencia de isoformas, las cuales son el resultado de la expresión de uno o varios genes. Para poder purificar estas isoformas mayormente es necesario el empleo de un sistema de purificación en HPLC de fase reversa.<sup>34</sup>

Anteriormente se ha demostrado la presencia de PLA2 homóloga K49 en otras especies de serpientes de la familia de Bothrops alrededor del mundo, en las cuales esta enzima fue aislada y caracterizada bioquímica y farmacológicamente. Esta diversidad de isoformas de PLA2 homóloga K49 en distintas especies de serpiente, produce que se realicen más estudios acerca del tema, buscando en cada estudio la manera de desarrollar nuevas metodologías eficientes para la purificación e identificación rápida y adecuada de la misma. Es por ello que en este estudio se desarrolla un solo paso cromatográfico, a comparación de otros estudios donde se utilizan dos pasos cromatográficos; a diferencia de los anteriores, en este estudio se utilizan columnas del sistema HITrap que potencializan la separación de las distintas proteínas de acuerdo a su interacción hidrofóbica en una cromatografía convencional.

Las fosfolipasas A<sub>2</sub> miotóxicas están formadas por 110 a 135 residuos de aminoácidos demostrando una estructura básica, estas fosfolipasas están divididas en dos grupos; el

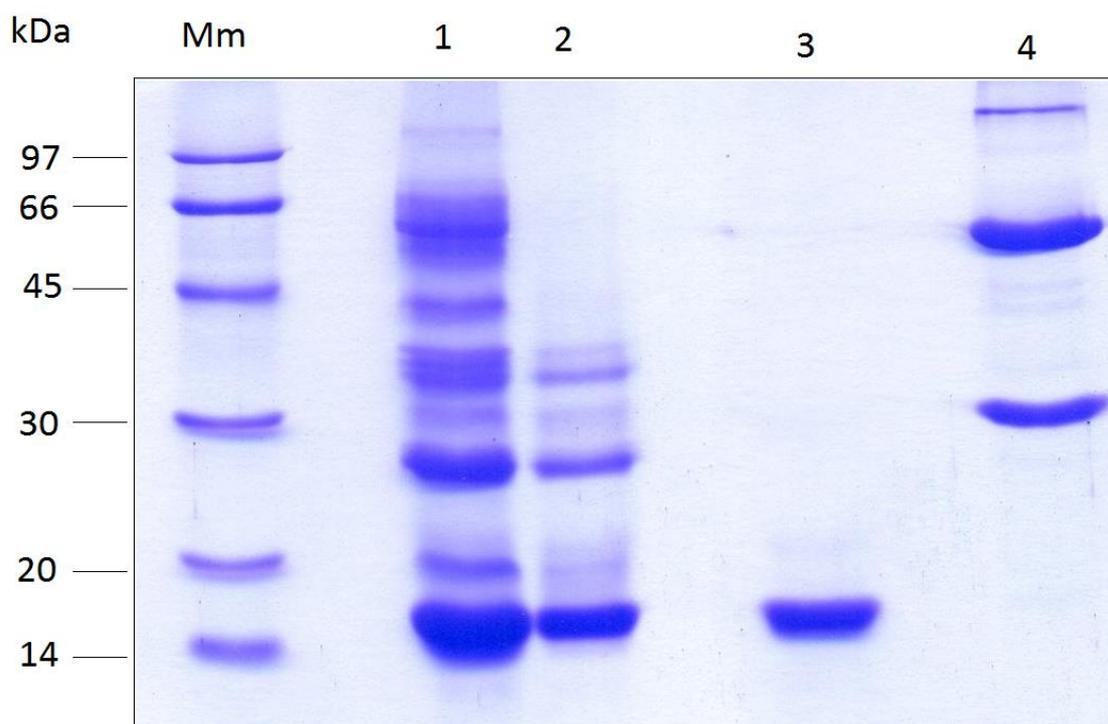
primer grupo de fosfolipasas A<sub>2</sub> miotóxicas Asp49 (D49) las cuales poseen un residuo de Lisina en la posición 49 conservando el dominio para la actividad catalítica, y el otro grupo de fosfolipasas A<sub>2</sub> miotóxicas Lys49 (K49) que están caracterizadas por poseer una Lisina en vez de Lisina en la posición 49; evitando de esta manera la unión al Ca<sup>+2</sup>, produciendo una disminución parcial o total de la actividad hidrolítica.<sup>30</sup>

### 3.2 ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE

El perfil de masa molecular en SDS-PAGE, de la fracción 5 denominada de BbTX-II K49 homóloga, aislada a partir del veneno total de *Bothrops barnetti*, está mostrado en la Figura 4, donde la fracción indicada presenta una masa molecular de 14 kDa aproximadamente, en condiciones reducidas (3), en la presencia de DTT y en condiciones no reducidas evidencia una masa molecular de 33 kDa aproximadamente (4), correspondiente a la formación dimérica, propia de esta familia de proteínas, luego de 45 kDa (4). El veneno total se muestra en los carriles 1 y 2 respectivamente en condiciones reducidas (2) y no reducidas (1).

Se debe indicar el alto grado de homogeneidad molecular en que se encuentra la fracción BbTX-II K49 homóloga y grado de pureza. Las proteínas utilizadas como marcadores son 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).

En los estudios y análisis con fosfolipasas A<sub>2</sub> “like” se demostró que por su hidrofobicidad y su fuerte carácter básico tienden a la formación de dímeros, debido a que es la forma más común de polimerización encontrada para todas las fosfolipasas A<sub>2</sub>, sin embargo eventualmente tienden a la formación de tetrámeros; es por ello que en las últimas décadas se han podido identificar a este tipo de miotoxinas como proteínas básicas de masa molecular entorno de 13 a 16 kDa.<sup>31</sup>



**Figura 4 Electroforesis en gel de poliacrilamida 12,5% (M/V). BbTX-II K49 homóloga aislada a partir de veneno total de *Bothrops barnetti*; de procedencia peruana. No reducido (4) y Reducido (3). Mn: marcadores de masa molecular, coloreado con comassie blue.**

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE para determinar la pureza de la fracción BbTX-II K49, donde se pudo demostrar que el pico 5 aislada a partir del veneno total de *Bothrops barnetti* mostrado en la figura 4, presenta un alto grado de homogeneidad molecular y una gran pureza, pudiendo identificar en el carril 3 del gel SDS-Page una sola banda proteica con una masa molecular de 14 kDa aproximadamente en condiciones reducidas con DTT (monómero) y en condiciones no reducidas presenta un masa molecular de 33 kDa aproximadamente debido a la formación de dímeros, propio de esta familia de proteínas lo cual pudo ser observado en el carril 4. La información obtenida por la electroforesis pudo ser confirmada por la espectrometría de masas ESI donde se reafirma el peso molecular de la proteína que fue de 14243 Da.

### 3.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPÁSICA A<sub>2</sub>.

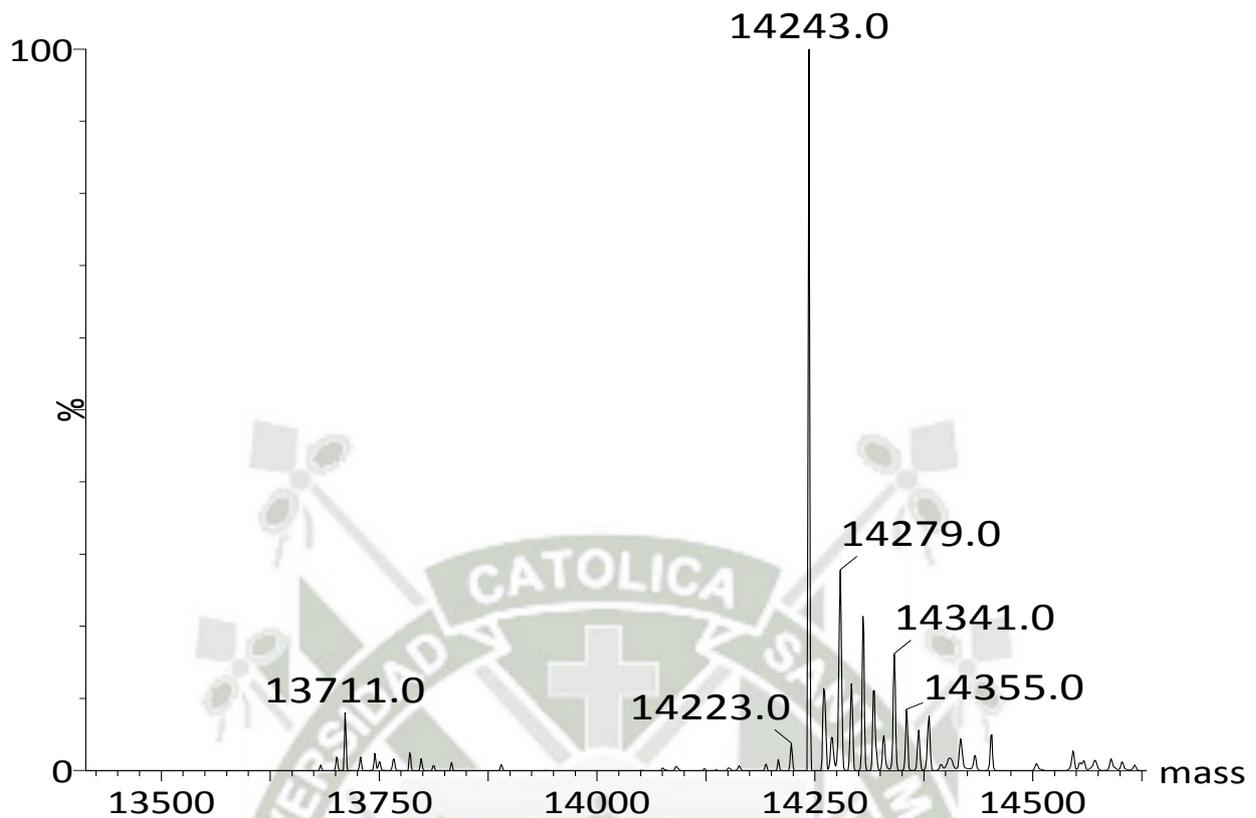
La muestra obtenida del pico 5 de la cromatografía de interacción hidrofóbica, denominada como BbTX-II procedente del veneno de *Bothrops barnetti* fue analizada mediante el método descrito por Cho & Kézdy, (1991) y Holzer & Mackessy (1996), utilizando como reactivo específico el ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzoico, demostrando una actividad fosfolipásica activa, al reaccionar la muestra con el reactivo específico se pudo observar una coloración amarilla en el tubo analizado, confirmando el resultado en el fotocolorímetro con un filtro azul a 420 nm.

Para poder evidenciar la actividad miotóxica de la fracción BbTX-II K49 se utilizó el ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzoico, siguiendo el protocolo descrito por Cho & Kézdy, (1991) y Holzer & Mackessy (1996), el cual demuestra que es un sustrato cromogénico no micelar que posee un elevado grado de sensibilidad, ideal para determinar la actividad catalítica; al aparentar una reacción similar al de la célula cuando entra en contacto con la PLA<sub>2</sub>. El uso de este sustrato cromogénico ha sido utilizado por mucho tiempo en la detección de enzimas, debido a su eficaz precisión en la detección fotocolorimétrica.<sup>38</sup>

En la investigación se pudo determinar la eficacia del ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzoico en la identificación de la PLA<sub>2</sub> en comparación con los métodos utilizados antiguamente, debido a que este método es más específico y eficaz al utilizar un sustrato cromogénico y posteriormente un análisis en un fotocolorímetro, sin embargo es más complicado y costoso que el uso de fosfolípidos obtenidos de la yema de huevo como sustrato para un posterior análisis por titulación con NaOH.<sup>54</sup>

### 3.4 DETERMINACIÓN DE LA MASA INTACTA DE LA PLA<sub>2</sub> HOMÓLOGA K49 BBTX-II DE *Bothrops barnetti* POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS ELECTROSPRAY (ESI).

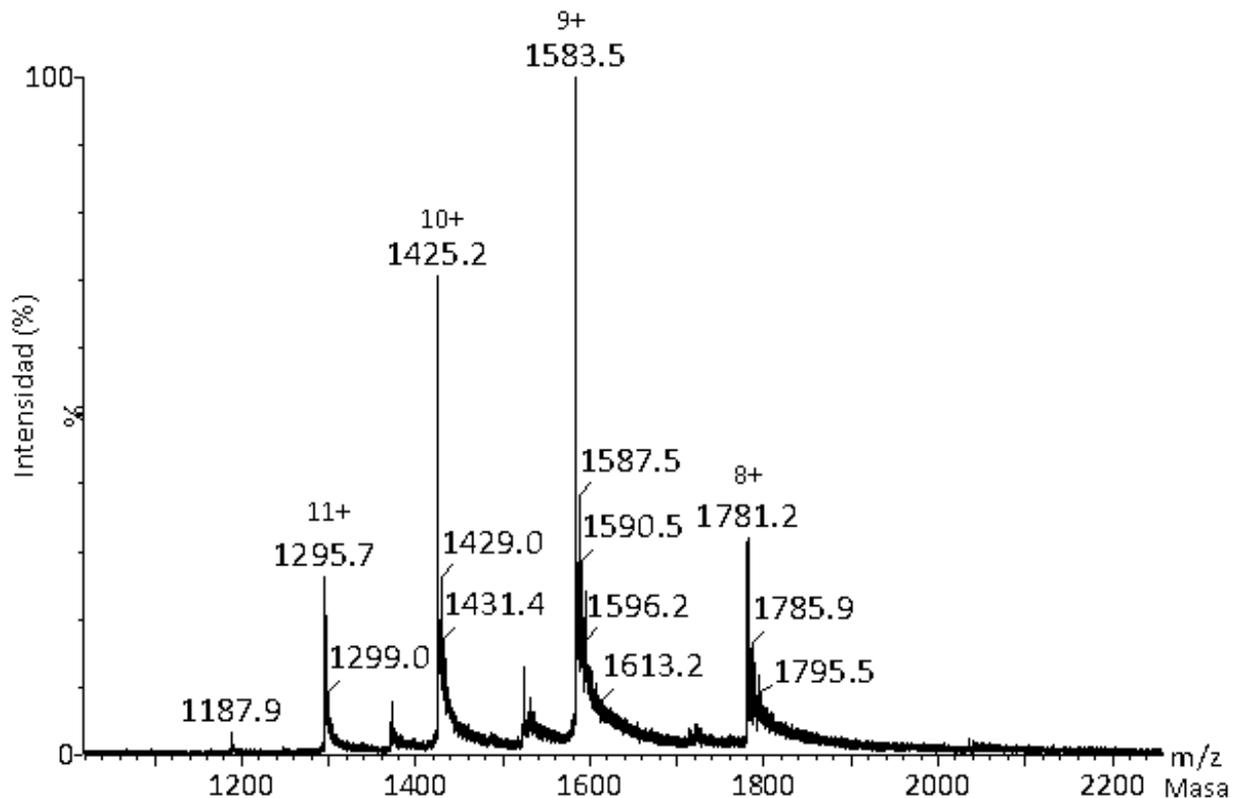
El análisis de la masa deconvolucionada y cruda o intacta, por espectrometría de masas Electro spray (ESI), muestra ser de aproximadamente de 14242 kDa (Figura 5 y 6 respectivamente).



**Figura 5. Espectro de la masa deconvolucionada de la PLA<sub>2</sub> K49 homóloga BbTX-II procedente de *Bothrops barnetti* por espectrometría de masas Electro spray (ESI); donde se puede observar un gran pico que resalta del resto, este pico nos da un peso promedio de la fosfolipasa ( 12243 Da) dejando de lado los rastros de otras proteínas.**

La espectrometría de masas fue introducida en el análisis de biomoléculas al final de los años 70, esta técnica permitía la ionización de moléculas termolábiles de gran tamaño, como son las proteínas; en los años 90 se comenzaron a utilizar dos métodos de ionización suave, el electro spray (ESI) y la desorción por láser asistida por matriz (MALDI) los cuales se constituyen como herramientas básicas para el análisis y secuenciación de proteínas; es por ello que en el presente trabajo se utilizó los dos

métodos de espectrometría mencionados para la identificación de una PLA<sub>2</sub> homóloga K49 procedente del veneno de una serpiente *Bothrops barnetti* peruana.<sup>39</sup>



**Figura 6. Espectros de masa cruda e intacta de la PLA<sub>2</sub> K49 homóloga BbTX-II procedente de *Bothrops barnetti* por espectrometría de masas Electrospray (ESI); el pico puro obtenido de la masa deconvolucionada, se multicarga para obtener un peso molecular con mayor precisión, obteniendo de esta manera un resultado de 14242 Da.**

En la identificación de una PLA<sub>2</sub> K49 es esencial la determinación del peso molecular de la fosfolipasa en estudio, para poder conocer de primera instancia si la muestra analizada es la que se desea encontrar o quizás alguna otra fosfolipasa homóloga, para esto se utilizó la espectrometría de masas electrospray (ESI), debido a que por comparación con investigaciones anteriores, la PLA<sub>2</sub> K49 posee una masa molecular de 14 kDa aproximadamente; se utilizó el ESI por ser una técnica de análisis con elevada precisión (+\_0,005%). Se realizó el análisis por ESI con dos tipos de muestra, uno con

masa deconvolucionada y otro con masa cruda o intacta; con el análisis de la masa deconvolucionada se pudo obtener un peso promedio de la muestra BbTx-II PLA<sub>2</sub> homóloga K49 dejando de lado los rastros de otras proteínas y solo obteniendo el peso de la fosfolipasa deseada, la cual denominada masa cruda o intacta fue sometida nuevamente al análisis ESI para determinar la masa exacta de la BbTx-II PLA<sub>2</sub> homóloga K49, obteniendo de esta manera el peso molecular de la muestra el cual fue 14242 KDa.

### **3.5 CARACTERIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE “NOVO” POR ESPECTROMETRÍA DE MASA MS/MS DE LA PLA<sub>2</sub> HOMÓLOGA K49 PROCEDENTE DEL VENENO TOTAL DE *Bothrops barnetti*.**

La proteína correspondiente al pico 5 del cromatograma e identificada como BbTX-II procedentes del veneno total de *Bothrops barnetti*, fue digerida con tripsina bovina y los péptidos trípticos resultantes fueron secuenciados por espectrometría de masa MS/MS. La tabla 6 muestra la masa observada de 3 péptidos trípticos, así como la secuencia del mismo y su posición en la secuencia 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, perteneciendo a la súper familia de las PLA<sub>2</sub> homólogas K49 procedentes del veneno de serpientes.

Se realizó la determinación de la masa molecular y la secuenciación de la fosfolipasa PLA<sub>2</sub> K49 por espectrometría de masas, debido a que esta técnica de ionización suave permite observar iones moleculares de compuestos como proteínas; que con otro tipo de técnica, sufriría degradaciones por el exceso de energía depositado en ellos.<sup>39</sup>

**Tabla 6. Secuencia de aminoácidos de 3 péptidos obtenidos por hidrolisis triptica a partir de la proteína correspondiente al pico 5 de la cromatografía de interacción hidrofóbica del veneno total de *Bothrops barnetti*. La metionina fue modificada por oxidación.**

<i>Péptido</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Masa (kDa)</i>
1	YSYSWK	831.89
2	ENLGTYNK	936.99
3	LFELGKMILQETGKNPAK	2016.40

Para poder obtener el resultado adecuado en la identificación de la proteína en estudio BbTX-II PLA<sub>2</sub> homóloga K49, es necesaria la medida de la masa de varias señales de la misma proteína con la mayor exactitud posible.<sup>39</sup>

Es por ello que mediante el mapeo peptídico a la muestra de BbTX-II PLA<sub>2</sub> homóloga K49 se determinó la secuencia de 3 péptidos obtenidos por hidrolisis triptica, donde la metionina fue modificada por oxidación tal y como se puede observar en la Tabla 6.

En relación al mapeo de masas peptídicas o huella de masas peptídicas, se utilizó la espectrometría de masas MALDI-TOF como mecanismo de análisis, aislando de esta manera la muestra de BbTx-II PLA<sub>2</sub> homóloga K49 convirtiéndola en péptidos de tamaño medio, mediante la acción de la bovina tripsina. Estos péptidos tripticos que son derivados de la muestra en estudio son característicos del mismo, estos pueden ser utilizados para identificar a la proteína en estudio tal y como lo determino Cleveland en 1997. Para realizar la identificación de proteínas es necesario tener en cuenta diversos factores que pueden afectar el resultado del análisis, como puede ser el grado de purificación de la proteína, el número de péptidos obtenidos en la digestión enzimática, sensibilidad y precisión de la medida y calidad de la base de datos utilizada que en este caso fue el SWISS-PROT.<sup>39</sup>

Se utilizó la técnica de espectrometría de masas para un adecuado análisis e identificación de la proteína PLA<sub>2</sub> K49, en la actualidad se viene utilizando un tipo de instrumentación diferente para la identificación de péptidos y proteínas para realizar un

mapeo de masas con lo cual se obtiene la secuenciación de proteínas mediante la espectrometría de masas.

En la determinación del mapeo peptídico por espectrometría de masas MALDI-TOF, la masa de un péptido es proporcionado por la combinación de las masas de cada uno de sus aminoácidos y el número de estos es finito, por ende este no puede alcanzar cualquier valor; es por ello que este tipo de técnica utiliza el valor de  $m/z$  para determinar si la señal emitida corresponde al péptido en estudio y también para conocer la composición aminoacídica de la misma. Estas circunstancias hacen que sea posible la identificación de una proteína en una base de datos como en este caso es el SWISS-PROT a partir de la medida exacta de sólo uno de sus péptidos de digestión.<sup>39</sup>

### **3.6 ESTUDIO DE HOMOLOGÍA SECUENCIAL (ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO), DE LA PLA<sub>2</sub> HOMÓLOGA K49 BBTX-II DE *Bothrops barnetti*.**

La figura 7 muestra los estudios de homología secuencial, por un análisis Bioinformático, usando el software DNASTar (Ver 5.0), de la PLA<sub>2</sub> homóloga K49 BbTX-II procedente del veneno total de *Bothrops barnetti*.

La secuencia de los péptidos trípticos generados del pico 5 de la cromatografía de interacción hidrofóbica, a partir del veneno total de *Bothrops barnetti* es sometido a un análisis de homología secuencial en la base de datos SWISS-PROT:

El análisis de las secuencias demuestra de que la muestra en estudio es una proteína perteneciente a la súper familia de las PLA<sub>2</sub> homólogas K49 procedentes del veneno de serpientes, que esta disponible en la base de datos consultada, con la que guarda un alto match o grado de homología secuencial con el péptido tríptico secuenciado por espectrometría de masa (MS/MS) (Figura 7).

Se observan también trazos identificados como ( - ), los cuales pertenecen a los generados por el software para el proceso de alineamiento.

		10		20		30		40	
BbTX_II	-	L F E L G K M I L Q E T G K N P A K	-	- - - - -	-	- - - - -	-	- - - - -	-
BaTX	S	L F E L G K M I L Q E T G K N P A K	S	Y G A Y Y C Y C G W G G Q G Q P K D A T D					
BthTX-I	S	L F E L G K M I L Q E T G K N P A K	S	Y G A Y G C N C G V L G R G K P K D A T D					
PrTX-I	S	L F E L G K M I L Q E T G K N P A K	S	Y G A Y G C N C G V L G R G K P K D A T D					
		50		60		70		80	
BbTX_II	-	- - - - - *	-	- - - - -	-	Y S Y S W K	-	- - - - -	-
BaTX	R	C C Y V H K C C Y K K L T G C N P K K D R	R	Y S Y S W K	D	K T I V C G E N N S C L			
BthTX-I	R	C C Y V H K C C Y K K L T G C N P K K D R	R	Y S Y S W K	D	K T I V C G E N N P C L			
PrTX-I	R	C C Y V H K C C Y K K L T G C N P K K D R	R	Y S Y S W K	D	K T I V C G E N N P C L			
		90		100		110		120	
BbTX_II	-	- - - - -	E	N L G T Y N K					32
BaTX	K	E L C E C D K A V A I C L R	E	N L <span style="border: 1px solid black;">N</span> T Y N K	K	Y R Y Y L K P L C K K A D A C			121
BthTX-I	K	E L C E C D K A V A I C L R	E	N L G T Y N K	K	Y R Y H L K P F C K K A D P C			121
PrTX-I	K	E L C E C D K A V A I C L R	E	N L G T Y N K	L	Y R Y H L K P F C K K A D D C			121

**Figura 7 Estudio comparativo de homología secuencial de la proteína BbTX-II procedente de *Bothrops barnetti* con otras proteínas homólogas PLA<sub>2</sub> provenientes de veneno de serpientes. BthTX I de *Bothrops jararacussu* K49 (Homs-Brandeburgo, *et al.*, 1988; Cintra, *et al.*, 1993),), PrTX I de *Bothrops pirajai* (Toyama, M.H., *et al.*, 1998) y BaTX de *Bothrops alternatus* (Ponce-Soto *et al.*, 2007).**

Con las secuencias obtenidas de la espectrometría de masas MALDI-TOF, se realizó un análisis bioinformático, usando el software DNASTar (Ver 5.0) el cual nos permitió analizar y visualizar los datos genómicos de la secuencia en estudio. Seguidamente la muestra fue sometida a un análisis de homología secuencial en la base de datos SWISS-PROT.

Las proteínas con estructura fosfolipásica PLA<sub>2</sub> K49 homólogas comprenden una familia de proteínas con estructura altamente conservada, distinta de la PLA<sub>2</sub> D49. Estas proteínas PLA<sub>2</sub> K49 poseen características propias de la familia, como es la indispensable presencia de un elevado número de residuos básicos (Lys 15% de residuos totales) en la

región C-terminal que reacciona estructuralmente con la heparina, esto demuestra el efecto neutralizante de la heparina en esta proteína.<sup>7</sup>

La determinación de la masa de los péptidos obtenidos por la digestión de la enzima permitieron realizar la comparación con las masas teóricas obtenidas a partir de las secuencias almacenadas en la base de datos SWISS-PROT, esta comparación de identidad entre los resultados prácticos y teóricos se determina en función al número de señales de masa identificadas y la diferencia entre lo teórico y lo experimental mediante el uso de diferentes algoritmos matemáticos.<sup>39</sup>

Al utilizar los algoritmos en la identificación de la homología de secuencias en los diferentes bases de datos, la probabilidad de una correcta identificación aumenta con el número y el peso molecular de los péptidos ya identificados que en el caso de nuestra muestra son 3 y disminuye con factores extras que pueden derivar del proceso de digestión, como es la degradación proteolítica incompleta o las roturas no específicas.

Annotated protein sequence database indicó con los resultados de homología de secuencia que la muestra de BbTX-II se trata de una proteína correspondiente a la súper familia de las PLA<sub>2</sub> homólogas K49 procedente del veneno de serpiente, disponible en la base de datos consultada, con la que guarda un alto match o grado de homología secuencial. Como se muestra en la Figura 7 la muestra de BbTX-II fue comparada con otras proteínas PLA<sub>2</sub> homólogas K49 provenientes de serpientes como *Bothrops jararacussu* K49, *Bothrops pirajai* y *Bothrops alternatus*.

### 3.7 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA:

Se determinó la existencia de la PLA<sub>2</sub> homóloga en el veneno de la serpiente *Bothrops barnetti* de procedencia peruana, siendo esta una de las primeras investigaciones sobre una fosfolipasa A<sub>2</sub> homóloga con esta especie de serpientes peruanas, demostrando las propiedades de esta enzima homóloga, la cual posee actividad farmacológica más no actividad catalítica, sin embargo existen estudios previos de la serpiente *Bothrops barnetti*, donde se estudia la estructura de otros tipos de enzimas presentes en el veneno

de la serpiente como son una trombina homóloga y una nueva metaloproteinasa fibrinolítica.<sup>50,51</sup>

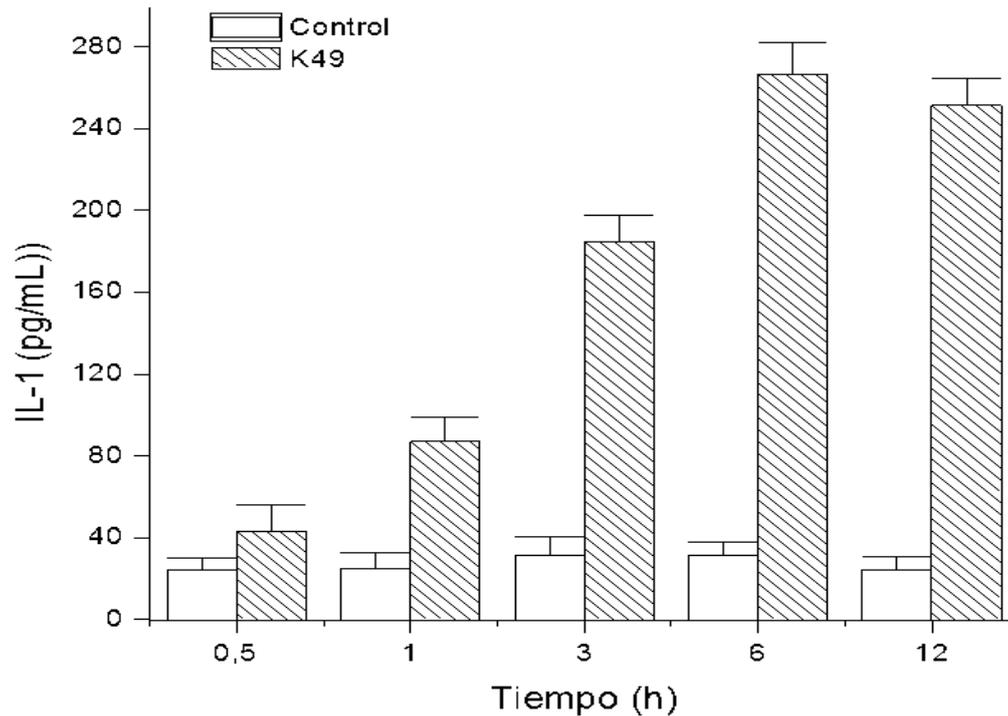
Respecto a la actividad farmacológica de las PLA<sub>2</sub> homóloga K49, los estudios no son relevantes debido a su escasas, sin embargo existen más estudios sobre las PLA<sub>2</sub> homóloga D49, los cuales sirven de comparación por la similitud en la actividad de las PLA<sub>2</sub>; estas proteínas D49 activan enzimas lipolíticas de tejido, lo que produce un aumento en los niveles de los ácidos grasos.<sup>42</sup>

En el presente estudio se caracterizó miotóxicamente a la PLA<sub>2</sub> homóloga K49, la cual a pesar de carecer de la actividad catalítica, es capaz de efectuar un efecto miotóxico. El mecanismo miotóxico de las fosfolipasas A<sub>2</sub> D49 y K49 es generalmente similar, puesto que ambas causan una lisis rápida del sarcolema, llevando esto a un estado de mionecrosis.<sup>43</sup>

### **3.7.1 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE INTERLEUCINA 1 (IL-1) DESPUÉS DE ADMINISTRAR LA PLA<sub>2</sub> HOMÓLOGA K49 BBTX-II DE *Bothrops barnetti*.**

Se inyectaron 10 µg de la fracción PLA<sub>2</sub> BbTX-II procedente del veneno total de *Bothrops barnetti*, en el músculo tibial anterior derecho de ratones y la concentración de IL-1 en el plasma fue monitoreado en distintas horas.

La fracción PLA<sub>2</sub> BbTX-II homóloga K49, causó incremento significativo en los niveles plasmáticos de IL-1, al ser comparadas con el control, alcanzando un incremento máximo 6 horas después de la aplicación (266.36 ± 15.95). Manteniéndose incrementados los niveles de IL-1 hasta las 12 horas de estudio (Figura 6).



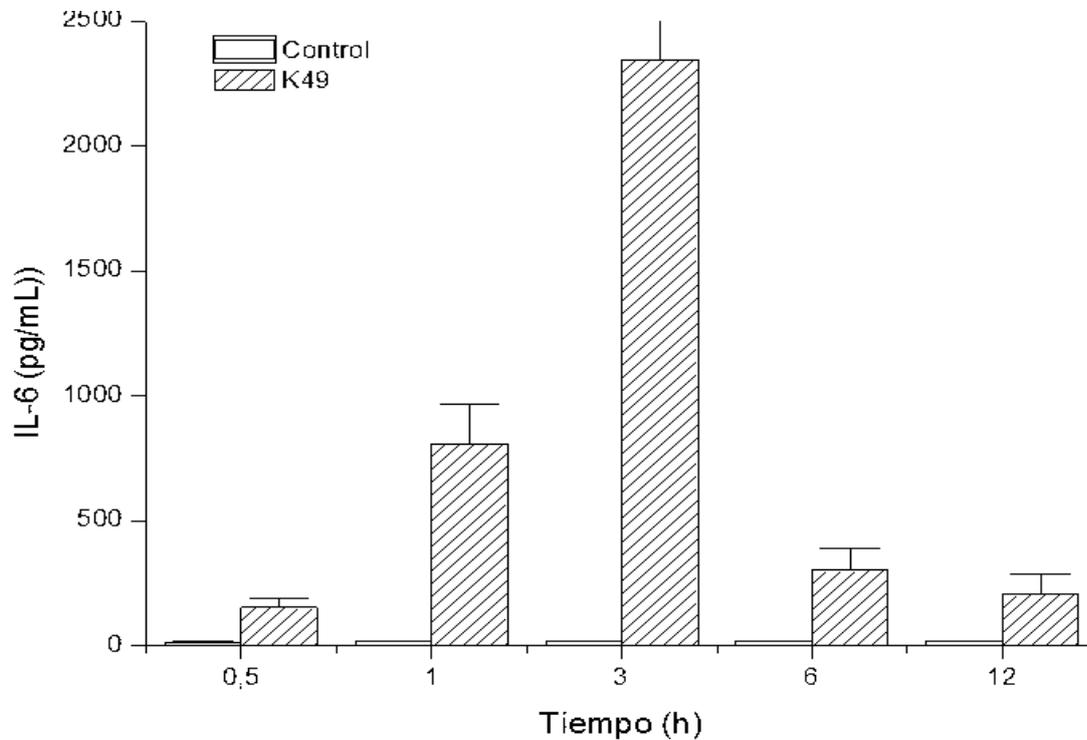
**Figura 8. Niveles de concentración de Interleuquina 1 (IL-1), plasmática indicada por 10 µg de la fracción BbTX-II PLA<sub>2</sub> homóloga K49 procedente del veneno total de *Bothrops barnetti* en ratones. La concentración de IL-1 plasmática fue determinada en diferentes horas después de la aplicación de la toxina.**

### **3.7.2 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE INTERLEUCINA 6 (IL-6) DESPUÉS DE ADMINISTRAR LA PLA<sub>2</sub> HOMÓLOGA K49 BBTX-II DE *Bothrops barnetti*.**

Se inyectaron 10 µg de la fracción PLA<sub>2</sub> BbTX-II procedente del veneno total de *Bothrops barnetti*, en el músculo tibial anterior derecho de ratones y la concentración de IL-6 en el plasma fue monitoreado en distintas horas.

La fracción PLA<sub>2</sub> BbTX-II homóloga K49, causó incremento significativo en los niveles plasmáticos de IL-6, al ser comparadas con el control, alcanzando un incremento

máximo 3 horas después de la aplicación ( $2345.21 \pm 192.78$ ). Después de las 3 horas los niveles de IL-6 cayeron drásticamente, mostrando ser un efecto local (Figura 7).



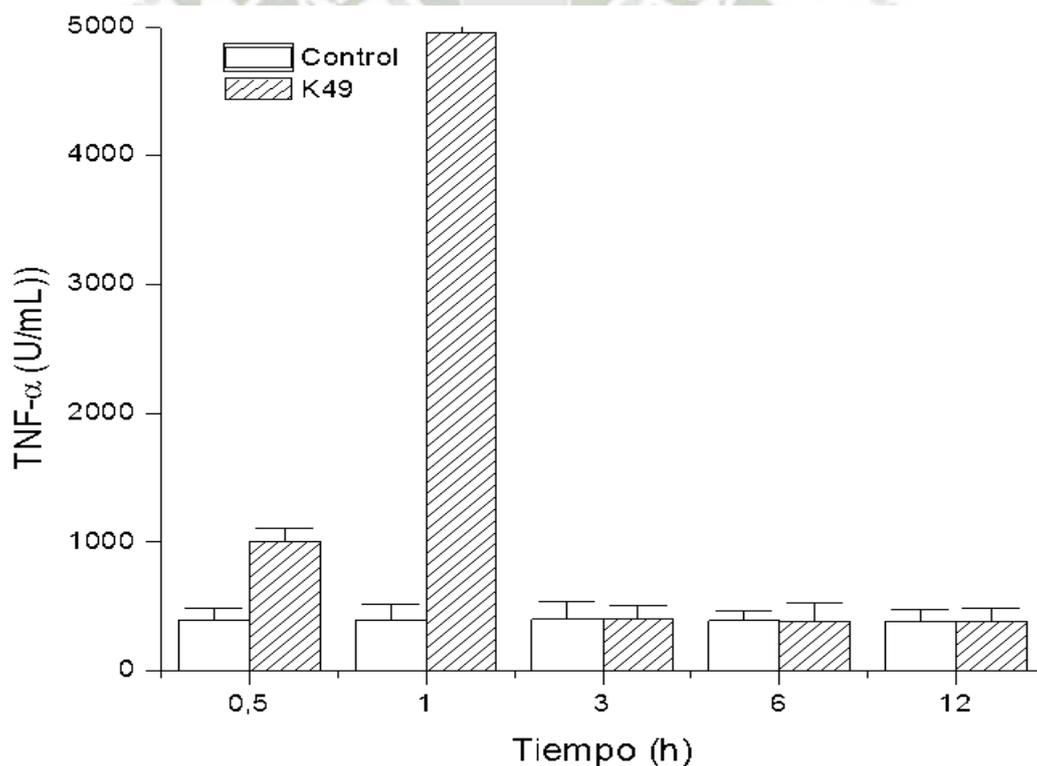
**Figura 9. Niveles de concentración de Interleuquina 6 (IL-6), plasmática inducida por 10  $\mu$ g de la fracción BbTX-II PLA<sub>2</sub> homóloga K49 procedente del veneno total de *Bothrops barnetti* en ratones. La concentración de IL-6 plasmática fue determinada en diferentes horas después de la aplicación de la toxina.**

Con estos resultados obtenidos podemos sugerir que la IL-1 puede contribuir al infiltrado leucocitario inducido por BbTX-II, se observó que el incremento de la IL-1 y la IL-6 ocurren en un tiempo relativo, demostrando de este modo un positivo rol regulatorio de la IL-1 en la liberación de la IL-6. La IL-6 es un importante mediador del proceso inflamatorio causando leucocitosis caracterizado por la liberación de leucocitos PMN de la médula ósea.<sup>40</sup>

### 3.7.3 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL TNF- $\alpha$ DESPUÉS DE ADMINISTRAR LA PLA<sub>2</sub> HOMÓLOGA K49 BBTX-II DE *Bothrops barnetti*.

Se inyectaron 10  $\mu$ g de la fracción PLA<sub>2</sub> BbTX-II procedente del veneno total de *Bothrops barnetti*, en el músculo tibial anterior derecho de ratones y la concentración de TNF- $\alpha$  en el plasma fue monitoreado en distintas horas.

La fracción PLA<sub>2</sub> BbTX-II homóloga K49, causó incremento significativo en los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$ , al ser comparadas con el control, alcanzando un incremento máximo a la hora después de la aplicación ( $4958.23 \pm 95.01258$ ). Después de una hora los niveles de TNF- $\alpha$  cayeron drásticamente, mostrando ser un efecto local (Figura 8).



**Figura 10. Niveles de concentración de TNF- $\alpha$ , plasmática inducida por 10  $\mu$ g de la fracción BbTX-II PLA<sub>2</sub> homóloga K49 procedente del veneno total de *Bothrops barnetti* en ratones. La concentración de TNF- $\alpha$  plasmática fue determinada en diferentes horas después de la aplicación de la toxina.**

La TNF- $\alpha$  también participa activamente en la contribución del infiltrado leucocitario, además de cumplir un rol en la liberación de otras citoquinas, que permiten el incremento de la permeabilidad vascular; es importante determinar que tanto la IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  inducen o potencian la expresión y liberación del grupo IIA PLA<sub>2</sub>.<sup>41</sup>

Se evaluó los mediadores envueltos en la migración leucocitaria y en el efecto inflamatorio como son las citoquinas IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$ ; los resultados de los análisis muestran que la fracción de BbTX-II obtenida a partir del veneno de *Bothrops barnetti* induce a un incremento en IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$ . Como se pueden observar en las figuras 8, 9 y 10.

Para el análisis de los tres mediadores se utilizaron 10  $\mu$ g de la fracción PLA<sub>2</sub> BbTX-II procedente del veneno total de *Bothrops barnetti*, debido a que esta es la dosis adecuada para obtener un correcto resultado.<sup>44</sup> Los niveles de IL-1 sufrieron un incremento significativo en comparación con el control, alcanzando de esta manera un incremento máximo a las 6 horas siguientes de la aplicación, manteniendo un incremento continuo hasta las 12 horas. Los niveles de IL-6 sufrieron al igual que la IL-1 un incremento significativo en comparación con el control, alcanzando un incremento máximo a las 3 horas seguidas a la aplicación, después de las 3 horas los niveles cayeron drásticamente, demostrando de esta manera que es un efecto local. Del mismo modo se observó un incremento significativo en los niveles de TNF- $\alpha$  al ser comparadas con el control, se obtuvo un incremento máximo a la hora seguida de la aplicación, después de una hora los niveles cayeron drásticamente, concluyendo con esto que al igual que la IL-6 es un efecto local (Figura 8, 9 y 10).

Con los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas podemos reafirmar lo descrito previamente en otros reportes que también estudian las PLA<sub>2</sub> homologas, donde se demuestra que las dos isoformas de las fosfolipasas, tanto las fosfolipasas K49 como las D49 inducen efectos locales en el organismo de las víctimas, como es la inflamación resultado de la liberación de interleuquinas, además de inducir apoptosis en neuronas y otros tipos de células.<sup>52</sup> Rodrigo Mora et al. en su investigación con una PLA<sub>2</sub> homologa K49 obtenido del veneno de *Bothrops asper* revela que esta toxina en altas concentraciones induce un daño en la membrana, produciendo una alteración en la permeabilidad celular, al igual que en esta investigación, determinando de esta manera

que la alteración de la permeabilidad celular es inducida por la PLA<sub>2</sub> homóloga K49 obtenida de cualquier tipo de serpiente perteneciente a la familia *Bothrops*, al incrementar los niveles de TNF- $\alpha$  y estas a su vez liberando otras citoquinas que incrementan la permeabilidad vascular.<sup>53</sup>

En conclusión BbTX-II induce una reacción inflamatoria en el presente estudio. Todos estos efectos biológicos nos demuestran que, aunque la actividad catalítica de la PLA<sub>2</sub> contribuye a los efectos farmacológicos, esto no siempre debe ser un prerrequisito para el desencadenamiento de las acciones farmacológicas causadas por las PLA<sub>2</sub> y las homólogas K49.<sup>45</sup>



## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- Mediante el análisis cromatográfico de interacción hidrofóbica, se logró purificar una miotoxina con estructura fosfolipásica  $A_2$  a partir del veneno total de *Bothrops barnetti* y fue denominada como BbTX-II K49.
- La muestra analizada BbTX-II demostró ser una  $PLA_2$  homóloga K49 al evidenciar actividad fosfolipásica  $A_2$  frente al sustrato específico cromogénico que fue el 4-nitro-3-(octanoiloxy) ácido benzoico.
- Se identificó en la electroforesis de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), que la muestra BbTX-II K49 posee una masa molecular aproximada de 14 KDa en condiciones reducidas y en condiciones no reducidas presenta una masa molecular aproximada de 33 KDa correspondiente a la formación dimérica.
- Por espectrometría de masas electrospray (ESI) se pudo determinar que la masa molecular promedio de la muestra BbTX-II es de 14242 kDa.
- Con los resultados obtenidos y con la comparación de homología en la base de datos SWISS-PROT se pudo determinar que la muestra BbTX-II corresponde a una fosfolipasa  $A_2$  homóloga K49.
- Al evidenciar los efectos de los mediadores IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  se pudo notar que la miotoxina purificada de BbTX-II K49 tiene un efecto local, induciendo una reacción pro-inflamatoria; además los resultados de la caracterización biológica demuestran que, aunque la actividad catalítica de la  $PLA_2$  contribuye a los efectos farmacológicos, esto no siempre debe ser un prerrequisito para el desencadenamiento de las acciones farmacológicas causadas por las  $PLA_2$  y las homólogas K49.

## CAPITULO V

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1761(11): 1246-59.
2. Kini RM. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon*. 2003; 42(8): 827-40.
3. Lomonte B, Angulo Y, Calderón L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*. 2003; 42(8): 885-901.
4. Lambeau G, Schmid-Alliana A, Lazdunski M, Barhanin J. Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A2 in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1990; 265(16): 9526-32.
5. Gutiérrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*. 2003; 42(8): 915-31.
6. Teixeira CF, Landucci EC, Antunes E, Chacur M, Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. *Toxicon*. 2003; 42(8): 947-62.
7. Lomonte B, Tarkowski A, Bagge U, Hanson LA. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparin sulfate family. *Biochem Pharmacol*. 1994; 47(9): 1509-18.
8. Lomonte B, Moreno E, Tarkowski A, Hanson LA, Maccarana M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin ii a Lys-49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *J Biol Chem*. 1994; 269(47): 29867-73.
9. Carrillo de Espinoza N, y Icochea J. Lista taxonomica preliminar de los reptiles vivientes del Perú. *Publicaciones del Museo de Historia Natural. Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. 1995; 49: 1-27.

10. Kihara H. Studies on phospholipase A in *Trimeresurus flaviviridis* venom III. Purification and some properties of phospholipase A inhibitor in Habu serum. 1976; 80: 341-349.
11. Soares M, Marcusi S, Stabeli R, Franca S, Giglio J, et al. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A2 myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 302: 193-200.
12. Basavarajappa B and Gowda T. Comparative characterization of two toxic phospholipases A2, from Indian cobra (*Naja naja naja*) venom. *Toxicon.* 1992; 30: 1227-1238.
13. Francis B, Seebart C and Kaiser II. Citrate is an endogenous inhibitor of snake venom enzymes by metal-ion chelation. *Toxicon.* 1992; 30(10): 1239-46.
14. Ferreira LA, Henriques OB, Lebrun I, Batista MB, Prezoto BC, et al. A new bradykinin-potentiating peptide (peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Toxicon.* 1992; 30(1): 33-40.
15. Iwanaga, S. and Suzuki, T. Enzymes in snake venom, in: *Handbook of Experimental Pharmacology.* Springer Verlag, New York. 1979; 52:61-158.
16. Li Z, Yu T, Lian E. P and characterization of L- amino acid oxidase from King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. *Toxicon* 1994 32 (11): 1349-1358.
17. McLean JH. A revised classification of the family Turridae with the proposal of new subfamilies, genera and subgenera from the eastern Pacific. *The Veliger.* 1971;14(1):114-130.
18. Laskowski M. In the enzymes. Academic Press. New York. 1971; 4: 2289-311.
19. Mebs D. A comparative study of enzyme activities in snake venoms. *International J Biochem.* 1970; 1: 335-342.
20. Ponce Soto L, Toyama M, Hyslop S, Novello C and Marangoni. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a Novel PLA2 from *Crotalus durissus collilineatus* Venom. *Journal of protein Chemistry.* 2002; 21.
21. Declerck YA and Irmen S. Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. *Eur J Cancer.* 1994; 30A: 2170-2180.

22. Neurath H. Evolution of proteolytic enzymes. *Science*. 1984; 224(4647): 350-357.
23. Kamiguti AS, Zuzel M, Theakston RDG. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. *Braz J Med Biol Res*. 1999; 31: 853-862.
24. Carvalho, M.; Sgarbieri, V. 1998. Relative importance of phytohemagglutinin (lectin) and trypsin-chymotrypsin inhibitor on bean (*Phaseolus vulgaris* L) protein absorption and utilization by the rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*. 44(5): 685-696.
25. Meneses O. Los animales venenosos y sus peligros. Instituto de la Salud Publica. Perú. 1974; 2: 3-14.
26. Wang J and Teng C. Rat paw edema induced by trimucase II, a kinin-releasing enzyme from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. Pharmacological Institute, College of medicine, National Taiwan University. Taiwan. 1988.
27. Nahas L, Kamiguti AS and Barros Ma. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb Haemost*. 1979; 41(2): 314-28.
28. Queiroz L, Neto H, Asakura M, Reichi A and Mandelbaum F. Muscular lesions induced by a hemorrhagic factor from *Bothrops neuwiedi* snake venom. 1985; 18: 337-340.
29. Yarleque A. Las serpientes peruanas y su veneno. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Peru. 2000.
30. Fletcher JE, Hubert M, Wieland SJ, Gong QH and Jiang MS. Similarities and difference in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins.
31. Diaz Oreiro C and Gutierrez JM. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon*. 1997; 35(2): 241-52.
32. Gutierrez JM, Ownby CL and Odell GV. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon*. 1984; 22(1): 115-28.
33. Gutierrez JM and Lomonte B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venom. *Toxicon*. 1995; 33(11): 1405-24.

34. Bruses J, Capaso J, Katz and Pilar G. Specific in vitro biological activity of snake venom myotoxins. *Journal of Neurochemistry*. 1993; 60(3): 1030-1042.
35. Arni R and Ward R. Phospholipase A2- a structural review. *Toxicon*. 1996; 34(8): 827-41.
36. Koh D.C.I., Armugan A and Jeyaseelan K. "Snake venom components and their applications in biomedicine". *Cellular and molecular life science*. 2006.
37. Homsí-Brandenburg M, et al. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. Departamento de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia- MG, Brazil. 1998
38. Erlanger B.F. and Goode L. Antibacterial activity of acyclic decapeptide analogs of gramicidin S. *Science*. 1960
39. 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
40. T. Suwa, J. C. Hogg, D. English, and S. F. Van Eeden, Interleukin-6 induces demargination of intravascular neutrophils and shortens their transit in marrow. *American Journal of Physiology*, vol. 279, no. 6, pp. H2954- H2960, 2000
41. C. Schalkwijk, J. Pfeilschiener, F. Marki, and H. Van den Bosch, "Interleukin-1, tumor necrosis factor and forskolin stimulate the synthesis and secretion of group II phospholipase A2 in rat mesangial cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 174, no. 1, pp. 268–275, 1991.
42. Marangoni S., Ponce-Soto L., Bonfim V., de Carvalho D and Kassab B. "Toxicity of phospholipases A2 D49 (6-1 and 6-2) and K49 (Bj-VII) from *Bothrops jararacussu* venom." *Cell Biol Toxicol*. 2009.
43. Ponce-Soto L., et al. "Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochim Biophys Acta*. 2007.
44. Gutierrez JM., Ponce-Soto L., Marangoni S. and Lomonte B. "Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A2

- comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue.”  
Toxicon. 2008.
45. Kini RM. “Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. Toxicon 2003.
  46. Ponce-Soto L., Leiva L. and Teizem Landucci C. “Understanding the molecular mechanism and structure-function relationship of the toxicity of PLA<sub>2</sub> and K49 homologs in snake venom”. BioMed Research International. 2013.
  47. Manrique H. “Ofidismo”. Ministerio de Salud. 2000.
  48. García H. “Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia”. Cuba. 2001.
  49. Biomodel. “Electroforesis de proteínas y de ácidos nucleótidos”. Disponible en: <http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm>
  50. Vivas-Ruiz et al. “Coagulant thrombin-like enzyme (barnettobin) from *Bothrops barnetti* venom: Molecular sequence analysis of its cDNA and biochemical properties”. Biochimie. 2013.
  51. Flores E. et al. “A novel fibrinolytic metalloproteinase, barnettlysin-I from *Bothrops barnetti* (barnett’s pitviper) snake venom with anti-platelet properties”. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). 2016.
  52. Taketo M, Sonoshita M. “Phospholipase A<sub>2</sub> and apoptosis”. Biochim. Biophys. 2002.
  53. Mora R, Valverde B, Díaz C, Lomonte B, Gutierrez J. “ A Lys49 phospholipase A<sub>2</sub>homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line”. Toxicon 45. 2005.
  54. Geoghegan P, Angulo Y, Cangelosi A, Díaz M and Lomonte B. “Characterization of a basic phospholipase A<sub>2</sub> homologue myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops neuwiedii* (yará chica) from Argentina”. Toxicon. 1999
  55. Graves P and Haystead T. “Molecular biologist guide to proteomics. Microbiol 2002.
  56. De Hoffman E and Stroobant V. “Mass Spectrometry Principles and Applications. 2004.

57. Westermier R and Naven T. “Proteomics in practice”. WILEY-VCH, Germany. 2002.
58. Alegre Loayza C. “Análisis bioinformático de una proteína expresada en el músculo de *Engraulis ringens* (anchoveta peruana). Una perspectiva nutricional. Universidad Católica de Santa María. 2015.
59. Disponible en: <https://andrebaertschi.photoshelter.com/image/I0000pyljtK9vofk>
60. Disponible en:  
<http://www2.montes.upm.es/dptos/digfa/cfisica/magnet/espectrometro.html>



## ANEXOS

**1.-Electroforesis****1.1.-Preparación de las soluciones:**

## 1.1.1.- PSA 10% (Persulfato de amonio)

0.1 gr. PSA ----- 1 ml. de agua destilada

10 gr. PSA ----- 100 ml de agua destilada

## 1.1.2.- Tris HCl 1M pH 8.8

Para 50 ml.

$$1M = \frac{x \text{ mol}}{0.05 L} \rightarrow 0.05 \text{ mol}$$

$$0.05 \text{ mol} \left( \frac{157.6 \text{ gr.}}{1 \text{ mol}} \right) \rightarrow 7.88 \text{ gr.}$$

Corregir el pH para 8.8 con HCl

## 1.1.3.- Tris HCl 0.5 M pH 6.8

Para 50 ml.

$$0.5M = \frac{x \text{ mol}}{0.05 L} \rightarrow 0.025 \text{ mol}$$

$$0.025 \text{ mol} \left( \frac{157.6 \text{ gr.}}{1 \text{ mol}} \right) \rightarrow 3.94 \text{ gr.}$$

Corregir pH para 6.8 con HCl

## 1.1.4.- SDS 10%

10 gr. de Sodio dodecil sulfato → 100 ml. de agua destilada

## 1.1.5.- DTT 1M

Masa = 154.

Para 5 ml → 0.7715 gr.

*Para 2.5 ml → 0.3086 gr.*

1.1.6.- Running Buffer (Tampón de corrida 10X Tris-HCl 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS 0.1%, pH8.3)

*Tris → 15,2 gr.*

*Glicina → 72,2 gr.*

*SDS → 5 gr.*

*Agua destilada → 500 ml.*

1.1.7.- Colorante Azul de Coomasie

*Para 250 ml.*

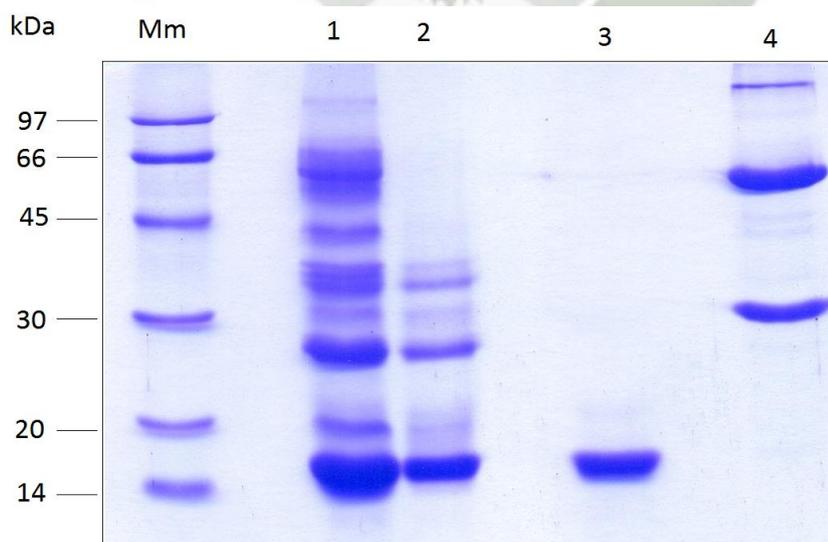
*Coomasie blue R 250 0.25% → 0.0625g.*

*Metanol 40% → 100 ml.*

*Acido acetico al 10% → 25 ml.*

*Agua 50% → 125 ml.*

## 2.- Determinación del peso molecular de las muestras en el gel SDS-Page



$$RF = \frac{\text{Distancia que migra una determinada proteína}(Dp)}{\text{Distancia que migra el frente del gel} (Df)}$$

$$DF = 29.1$$

Masa molecular del marcador (kDa)	Distancia recorrida Dp(mm)	RF	Log Mm
97	3	0.103	1.987
66	6	0.206	1.819
45	8	0.275	1.653
30	12	0.412	1.477
20	16	0.550	1.301
14	19	0.653	1.146

Con los resultados obtenidos en la tabla, se puede calcular la masa molecular relativa de la proteína problema trazando en el eje X los valores de RF y en el eje Y el Log de la masa molecular de los marcadores; se procede a realizar un ajuste a la recta por regresión y correlación inversa para poder obtener la masa relativa de la proteína problema.

Ecuación de la recta

$$Y = -1.4828x + 2.103$$

$$R^2 = 0.9884$$

Proteína problema	Dpm	Rfm (x)	Log Mm(y)
3	18.66	0.6413	1.152
4	11.52	0.3959	1.516

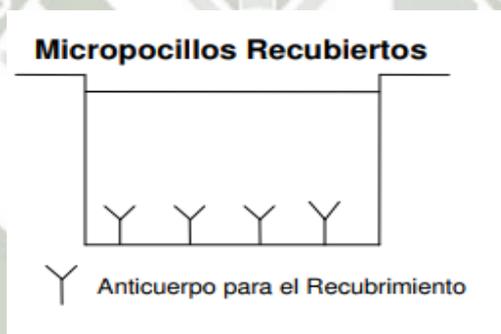
Al realizar el cálculo basándose en la recta por regresión y correlación inversa, se puede obtener la masa molecular relativa de las proteínas problema, calculando el antilogaritmo de los datos obtenidos

$$\text{Masa molecular} = \text{antilog}(y)$$

Proteína problema	Masa molecular
3	14.186
4	32.838

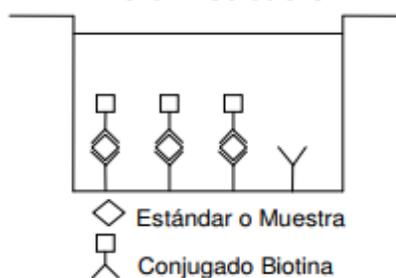
## 2.- Principio de ensayo para IL-1 e IL-6

Las placas de ELISA se revistieron con  $100 \mu\text{l}$  ( $\frac{1\mu\text{l}}{\text{mL}}$ ) anticuerpos monoclonales anti-IL-1 y anti-IL-6 en tampón de carbonato sódico 0,1M. (pH 8.2) y se incubaron durante 6 horas a temperatura ambiente.



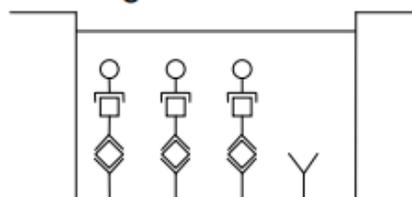
Los pozos son lavados con 0.1% de tampón fosfato salino (PBS) y son bloqueados con  $100 \mu\text{l}$  de 10% de suero fetal bovino en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado por duplicado, se añadieron  $50 \mu\text{l}$  de las muestras de suero a cada pocillo; después de 18 horas de incubación a  $4^{\circ}\text{C}$ , los pocillos son lavados e incubados con  $100 \mu\text{l}$  ( $2 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ) de los anticuerpos biotinilados monoclonales anti-IL-1 y anti-IL-6 como segundos anticuerpos durante 45 minutos a temperatura ambiente.

### Primera Incubación



Después de un lavado final, la reacción se desarrolló mediante la adición de orthophenyldiamine (OPD) a cada pocillo.

### Segunda Incubación



Se forma un producto de color proporcional a la cantidad de IL-1 e IL-6 presente en la muestra de suero; las densidades ópticas se midieron a 405 nm en un lector de microplacas.

#### 4.- Datos de los gráficos del estudio de la actividad mitotóxica.

##### Niveles de interleucina 1 (IL-1) después de administrar la PLA2 homóloga k49

	A(X)	B(Y)	C(yEr±)	D(Y)	E(yEr±)
1	0,5	24.69	5.69	43.26	12.98
2	1	24.89	7.95	87.19	11.98
3	3	31.48	9.26	184.95	12.65
4	6	31.56	6.54	266.36	15.95
5	12	24.49	5.98	251.48	12.98

##### Niveles de interleucina 6 (IL-6) después de administrar la PLA2 homóloga k49

	A(X)	B(Y)	C(yEr±)	D(Y)	E(yEr±)
1	0,5	12.69	3.654	152.68	35.95
2	1	15.65	2.36	808.45	156.19
3	3	16.36	3.46	2345.21	192.78
4	6	18.98	1.95	301.45	85.65
5	12	17.12	2.95	204.95	83.46

##### Niveles de Factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) después de administrar la PLA2 homóloga k49

	A(X)	B(Y)	C(yEr±)	D(Y)	E(yEr±)
1	0,5	389.56	98.59	1001.23	108.08
2	1	395.65	120.22	4958.23	95.01
3	3	401.59	135.46	398.32	105.50
4	6	389.14	75.42	387.45	136.49
5	12	387.65	89.29	381.26	102.98



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
Departamento de Bioquímica



Campinas, 05 de Maio de 2016.

Prezado  
Sr. Luis Angel Arenas Menéndez  
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 ate 14 de agosto do 2016), a fim pudermos realizar estudos de Caracterização Estrutural e Funcional de uma Fosfolipasa A<sub>2</sub> homóloga K49 do veneno de *Bothrops barnetti*, por Aproximación Proteómica, 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