

Area de Beca: CE - Cs. Exactas y Naturales

Título del Trabajo: **CARACTERIZACIÓN DE UNA FRACCIÓN CON ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA AISLADA DEL VENENO DE BOTHROPS ALTERNATUS MEDIANTE REPARTO LÍQUIDO-LÍQUIDO COMBINADO CON TAMIZ MOLECULAR**

Autores: GOMEZ, GABRIELA N. - BUSTILLO, SOLEDAD - LEIVA, LAURA C.

E-mail de Contacto: bioq_g@yahoo.com.ar

Teléfono: 0362-154536355

Tipo de Beca: UNNE Perfec. Tipo B

Resolución Nº: 974/11 C.S

Período: 01/03/2012 - 28/02/2014

Proyecto Acreditado: PI F018 "Aislamiento de proteínas ofídicas por combinación de reparto líquido-líquido y extracción con polielectrolitos insolubles" SGCyT - UNNE 2011-2014

Lugar de Trabajo: Facultad de Cs. Exactas y Naturales y Agrimensura

Palabras Claves: Polietilenglicol - Sistemas Bifásicos Acuoso - Toxinas ofídicas

Resumen:

Trabajos previos demostraron la aplicabilidad de los Sistemas Bifásicos Acuoso (SBA) formados por el polímero de cadena flexible PEG (polietilenglicol) y fosfato de potasio para la purificación de proteínas de secreciones ofídicas, con un rendimiento que quintuplica al método convencional (cromatografía líquida). Así se empleó con éxito el sistema PEG 3350-fosfato, para el aislamiento de una fracción enzimática con actividad proteolítica (Metaloproteinasas, MP) del veneno de *Bothrops alternatus* a partir de la fase inferior del sistema, rica en fosfato. En este trabajo se caracterizó esta fracción proteica aislada por esta metodología alternativa, MP_{SBA}, a los efectos de compararla con la MP_{Balergina} purificada por método cromatográfico convencional.

Para su caracterización se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE (en condiciones reductoras y no reductoras) para la estimación de la masa molecular de MP_{SBA}. La actividad proteolítica se determinó sobre caseína mientras que el efecto de EDTA se evaluó sobre azocaseína preincubando la enzima aislada con este inhibidor (0 a 180 mM) durante 30 minutos a 37°. El efecto de cationes divalentes fue determinado también sobre azocaseína preincubando MP_{SBA} con MgCl₂, CaCl₂, ZnCl₂, y HgCl₂ (concentración final 5 mM). Se constató la actividad hemorrágica de la fracción enzimática aislada a través de la observación de halos de hemorragia producidos al inyectar MP_{SBA} por vía intradérmica en la región abdominal de ratones albinos de la cepa CF-1, removiéndose la piel luego de 2 hs. El efecto mitotóxico *in vitro* se llevó a cabo sobre la línea celular de mioblastos murinos C₂C₁₂ (DMEM - 5% de SFB - 5% CO₂, 37 °C) con MP_{SBA} (0 a 150 ug/ml), midiéndose la viabilidad celular por colorimetría (cristal violeta).

El SDS-PAGE mostró, en presencia y ausencia de β-mercaptoetanol, una banda del orden de 59 kDa evidenciando ser una proteína constituida por una única cadena polipeptídica. MP_{SBA} exhibió actividad hemorrágica y proteolítica (18.02 U/mg), las que fueron inhibidas por la acción del EDTA, concentración dependiente, anulándose la actividad sobre azocaseína a niveles de 40 mM de EDTA. Estos resultados demuestran que MP_{SBA} es una metaloproteinasas, tratándose de una enzima Zinc-dependiente, sensible a este quelante orgánico. La actividad proteolítica sobre azocaseína, medida en presencia de los cationes divalentes metálicos, mostró que Zn²⁺ y Hg²⁺ actuaron como inhibidores reduciendo en un 65 y 20% la actividad total, respectivamente, para la dosis ensayada. En cambio, la actividad se incrementó con Mg²⁺ en un 138% y sensiblemente con Ca²⁺, 180%. En cuanto al efecto mitotóxico *in vitro* se observó una reducción de la viabilidad celular en función de la concentración de MP_{SBA}.

Se obtuvo así una fracción con actividad proteolítica y hemorrágica compatible por su tamaño y comportamiento con una metaloproteasa tipo PIII, semejante a MP_{Balergina}. Teniendo en cuenta que es una metodología sencilla con un rendimiento superior al método convencional, se concluye que el reparto a través de Sistemas Bifásicos Acuoso combinado con tamiz molecular, se muestra como una metodología apropiada para obtener esta fracción y ser así *e.g.* empleada en la preparación de sueros antiofídicos específicos, los cuales requieren cantidades considerables de antígenos.

Becario
(Firma)

Co-Autor
(Firma)

Co-Autor
(Firma)

Director de Beca
(Firma y Aclaración)

Director de Proyecto
(Firma y Aclaración)

Control: 23qbqo1kf