



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y  
Agrimensura  
Universidad Nacional del Nordeste

*Rol de las metaloproteinasas  
hemorrágicas en las alteraciones  
hemostáticas inducidas por el veneno  
de *Bothrops alternatus*.*

Tesis Doctoral

*Andrea Carolina Van de Velde*

2017

Trabajo de Tesis para optar al *Título de*  
*Doctor de la Universidad Nacional del Nordeste en Química*

*Directora*

**Dra. Laura Cristina Leiva**

*Co-Directora*

**Dra. Claudia Carolina Gay**

*Sub-Directora*

**Dra. Soledad Bustillo**

***Lugar de trabajo:***

- *Laboratorio de Investigación en Proteínas (LabInPro).*

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (FaCENA). Instituto de Química Básica y Aplicada (IQUIBA-NEA)- Universidad Nacional del Nordeste (UNNE). Corrientes, Corrientes, Argentina.

Con todo el amor de mi corazón...

A mis padres y hermanas que incansablemente creen en mí.

## Agradecimientos

*“Vivimos por la admiración, la esperanza y el amor”*

*William Wordsworth*

En primer lugar, a mis Directoras de Tesis Dra. Laura Leiva, Dra. Carolina Gay y Dra. Soledad Bustillo, por quienes tengo una enorme **admiración**, agradezco tantos años junto a mí, como formadoras y consejeras. Gracias por escucharme, guiarme y enseñarme con infinita paciencia.

Laura, mi querida *“Profe”*, sus enseñanzas conducen mi formación Científica, Docente y Humana. Gracias por brindarme, con su gran experiencia, las herramientas necesarias para comprender el maravilloso campo de las proteínas. Agradezco el hecho que siempre me escuchó con calma y me enseñó a creer en las buenas intenciones de las personas.

Caro, tus consejos se convirtieron en mis referencias en el camino de la Investigación. Gracias por preocuparte y acompañarme a lo largo de toda mi formación, pero por sobre todo, de enseñarme a reír luego de los errores cometidos y alentarme con confianza a seguir. Agradezco ser tu primera becaria y juntas poder aprender sobre esta enriquecedora relación.

Sol, fuiste la primera en descubrir y confiar en mis capacidades en el campo de la Investigación, gracias por aún acompañarme y guiarme en este camino. Me siento dichosa al tener la oportunidad de formarme como Docente bajo tu experiencia, consejos y recomendaciones. Agradezco cada día compartido juntas, tu tiempo y sinceras palabras.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, gran equipo humano y profesional, que me ayudan a mantener vivas todas mis **esperanzas**. Gracias Silvina E por tu luz y palabras optimistas, Luciano por tus incansables ideas y por el tiempo invertido en escucharme, Gabriela por ayudarme siempre en lo que necesito, Emilia por tus divertidas opiniones y sabios consejos y Chiqui, por tu contagiosa alegría. A Carolina B., Verónica, Antonella y Silvina M por crecer y formarnos juntas, aunque no todas sigamos el mismo camino, agradezco la amistad entablada. A Silvana y Rodolfo por la ayuda brindada en los ensayos con animales de experimentación.

Gracias al apoyo de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, de la Universidad Nacional del Nordeste que me brindó no solo un espacio donde iniciar mi formación en la investigación, sino también la posibilidad de integrar su amplio y prestigioso

plantel docente. Gracias a la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por el apoyo económico, por medio de becas de investigación, que hicieron posible la realización de este trabajo.

Agradezco al Laboratorio de Bioquímica Aplicada de la FaCENA y sobre todo, con mucho afecto a los profesionales Patricia y Natalia quienes formaron parte de mi formación brindándome sus conocimientos y experiencias, a Ariel y Maca por su ayuda en el análisis de muestras. Particularmente quiero agradecer a Gabriela, por su infinita paciencia y la amistad brindada, día a día.

Agradezco a la Dra. Heloisa Selistre de Araujo, por darme la posibilidad de realizar una pasantía en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de San Carlos, Brasil. Gracias Heloisa por compartir sus conocimientos y por el cálido recibimiento y estadía que recibí al estar allá junto con todo el equipo de trabajo, Milene, Patty, Graziela, Bruna, Rafael, Bianca, Taís y Ana.

Gracias a mis amigos, los de Corrientes, que luchamos juntos en este camino para ir creciendo y superándonos, alcanzando nuestros sueños. A los de Ocampo, que a pesar de la distancia se hacen presente cada día, acompañándome y dándome fuerzas, entendiendo mis ausencias.

Gracias a mi familia. Mis padres, quienes me enseñaron que nada se consigue sin esfuerzo. Ellos me muestran cada día lo maravilloso que es **amar** y me dan la posibilidad de estar unidos a pesar de la distancia. Es un infinito gracias por tanto y todo, por sus esfuerzos para que podamos cumplir nuestros objetivos, porque nuestras alegrías son suyas y nuestras tristezas también. Gracias por el valor que nos transmiten para seguir adelante y por contar con ustedes siempre. A mis amadas hermanas, Gracias. Por entender siempre mis tiempos, por hacerme brillar cuando están conmigo y por sobre todo, por alentarme a no bajar los brazos esos días de miedo. A mi Nona querida, que a través de sus rezos y cartitas me transmite todo su cariño y amor. Gracias por los reencuentros y ésta maravillosa vida juntos!

Gracias por último, pero no por eso menos importante, a Dios, por la **hermosa vida** que tengo y por las personas que están junto a mí, en la Tierra y en el Cielo.

*Andrea*

✓ **Publicaciones generadas a partir de este Trabajo de Tesis**

**- Purification of a fragment obtained by autolysis of a PIIIB-SVMP from *Bothrops alternatus* venom.**

Andrea Carolina Van de Velde; Claudia Carolina Gay; Milene Nobrega de Olivera Moritz; Patty Karina dos Santos; Soledad Bustillo; Juan Pablo Rodríguez; Ofelia Cristina Acosta; Mirtha Josefa Biscoglio; Heloisa Sobreiro Selistre-de-Araujo; Laura Cristina Leiva. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*. Aceptado con modificaciones. Octubre 2017.

**-Apoptosis induced by a snake venom metalloproteinase from *Bothrops alternatus* venom in C2C12 muscle cells.**

Soledad Bustillo; Andrea C. Van De Velde; Matzner Perfumo, Verónica; Carolina Gay; Laura Leiva. *APOPTOSIS*. ISSN 1360-8185. Vol. 22, 491 – 501, 2016.

**-Phospholipase A<sub>2</sub> enhances the endothelial cell detachment effect of a snake venom metalloproteinase in the absence of catalysis.**

Soledad Bustillo; María Emilia García-Denegri; Carolina Gay; Andrea C. Van De Velde; Ofelia Acosta; Yamileth Angulo; Bruno Lomonte; José María Gutiérrez; Laura Leiva. *Chemico-Biological Interactions*. ISSN 0009- 2797. Vol. 240, 30 – 36, 2015.

✓ **Trabajos presentados en Congresos y Reuniones Científicas**

**- “Caracterización estructural parcial de baltergina-DC”.**

Van De Velde, Andrea C.; Gay Claudia C; Selistre de Araujo S. Heloisa; dos Santos, Patty K; Moritz N.O., Milene. Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2017. SGCYT, UNNE. 15 y 16 de junio de 2017. Resistencia, Chaco. Argentina.

**-“Contribution of proteases in the hemostatic alterations induced by *Bothrops alternatus* venom”**

Van de Velde AC, Gay CC, Bustillo S, Leiva LC. XVIII Jornadas Anuales Multidisciplinares de la Sociedad Argentina de Biología (SAB). Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 30 de noviembre al 3 de Diciembre de 2016.

**-“Purificación y caracterización biológica de un fragmento de autolisis de baltergina”**

Van de Velde, Andrea C. - Gay, Claudia C. – Bustillo, Soledad – Leiva, Laura C. XXII Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2016. SGCyT, UNNE. 14 y 15 de junio de 2016. Corrientes, Corrientes. Argentina.

***-“Actividades biológicas del fragmento DC obtenido por autólisis de una SVMP-PIII del veneno de Bothrops alternatus.”***

Van De Velde, Andrea C.; Bustillo Soledad; Gay Claudia C. XXIII JORNADA DE JÓVENES INVESTIGADORES. ASOCIACIÓN DE UNIVERSIDADES GRUPO MONTEVIDEO. 25, 26 y 27 de Agosto de 2015, La Plata, Argentina.

***-“Actividades biológicas del fragmento DC obtenido por autólisis de una SVMP-PIII del veneno de Bothrops alternatus.”***

Van De Velde, Andrea C.; Bustillo Soledad; Gay Claudia C. XXI Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2015. SGCyT, UNNE 3 y 4 de Junio de 2015. Resistencia, Chaco, Argentina.

***-“Citotoxicity of baltergin on endothelial cells”***

Van De Velde AC, Gay CC, Leiva LC, Bustillo S. XVI Jornadas de la Sociedad Argentina de Biología, 1 al 3 de diciembre de 2014. Chascomús, Buenos Aires, Argentina.

***-“Proteasas de bajo peso molecular en el veneno de Bothrops alternatus”***

Van de Velde, Andrea C.- Gay, Claudia C.- Leiva, Laura C. XX Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2014. SGCyT, UNNE. 17, 18 y 19 de junio de 2014. Corrientes, Corrientes. Argentina.

***-“Análisis en la composición en proteinasas del veneno de yarará grande mediante empleo de Inhibidores y Anticuerpos Toxino-Específicos”***

Van de Velde, A., Gay, C., Leiva, L. XLV Reunión Anual de La Asociación Argentina de Farmacología Experimental, 20 al 23 de noviembre del 2013. Mar del Plata. Argentina.

***-“Efecto de la Temperatura y el pH en la autoproteólisis de baltergina”***

Van de Velde, Andrea C.- Gay, Claudia C.- Leiva, Laura C. XIX Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. 2013. SGCyT, UNNE. 12, 13 y 14 de junio de 2013. Resistencia, Chaco. Argentina.

***-“Contribución de las metaloproteinasas en el consumo de fibrinógeno plasmático inducido por el veneno de Bothrops alternatus”***

Van de Velde, A., Maruñak, S., Acosta, O., Leiva, L., Gay, C. Presentación en 44ª Reunión Anual de SAFE. 31 de Octubre, 1 y 2 de Noviembre de 2012. Mendoza. Argentina.

***-“Neutralización de alteraciones hemostáticas inducidas por el veneno de Bothrops alternatus mediante inhibidores de proteinasas y anticuerpos específicos anti-baltergina”***

Van De Velde, Andrea C; Gauna, María Del C; Acosta, Ofelia C; Leiva, Laura A; Gay, Claudia C. XX Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2012. SGCyT, UNNE. 27 al 29 de junio de 2012. Corrientes. Argentina.

✓ **Premios obtenidos de presentaciones a Congresos y Reuniones Científicas**

- **Mención especial y Mejor Trabajo.** “**Caracterización estructural parcial de baltergina-DC**”.

Van De Velde, Andrea C.; Gay Claudia C; Selistre de Araujo S. Heloisa; dos Santos, Patty K; Moritz N.O., Milene. Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2017.

- **Mención Mejor Comunicación Libre. Área Ecotoxicología.** “**Contribution of proteases in the hemostatic alterations induced by *Bothrops alternatus* venom**”

Van de Velde AC, Gay CC, Bustillo S, Leiva LC. XVIII Jornadas Anuales Multidisciplinares de la Sociedad Argentina de Biología (SAB) 2016.

- **Mención especial.** “**Actividades biológicas del fragmento DC obtenido por autólisis de una SVMP-PIII del veneno de *Bothrops alternatus***”.

Van de Velde, Andrea C.; Bustillo Soledad; Gay Claudia C. Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2015. Seleccionado para participar en XXIII Jornada de Jóvenes Investigadores Asociación de Universidades Grupo Montevideo.



## Lista de Abreviaturas

ADAMs: <i>desintegrinas y metaloproteinasas</i>	MM: masas moleculares
ADP: adenosín-difosfato	NaCl: cloruro de sodio;
AMPc: adenosín-monofosfato cíclico	NEA: nordeste argentino
ANOVA: análisis de varianza;	nm: nanómetros;
ATIII: antitrombina III	<i>p</i> : probabilidad de que se deba al azar;
BapNA: N $\alpha$ -benzoyl-L-arginina p-nitroanilida	PAI: Activador del Plasminógeno
<i>B. alternatus</i> : <i>Bothrops alternatus</i>	PARs: receptores activados por proteasas
CID coagulación intravascular diseminada	PBS: solución salina amortiguada con
CTL: Lecitinas tipo-C	fosfatos 0,1 M (pH 7.2);
DD: dímero D	pI: punto isoeléctrico;
DHM: dosis hemorrágica mínima	PLA <sub>2</sub> : fosfolipasa A <sub>2</sub> ;
DMEM: medio esencial mínimo de	PMSF: fenilmetilsulfonilo
Dulbecco's (en ingles: Dulbecco's minimum	PPP: plasma pobre en plaquetas
essential medium)	PRP: plasma rico en plaquetas
Dominio-DC: dominio- desintegrina y rico en	SDS-PAGE: dodecilsulfato de sodio-
cisteína	Electroforesis en gel de poliagrilamida
DS: desviación estándar;	SFB: suero fetal bovino;
DTT: ditioneitol	SVSPs Serinoproteinasas de veneno de
EDTA-Na <sub>2</sub> : etilendiaminotetraacético	serpientes
disódico	SVTLEs: Símil trombina de veneno de
e.g.: por ejemplo	serpientes
FT: factor tisular	SVMPs: metaloproteinasas del veneno de
h: horas;	serpientes;
HCl: ácido clorhídrico;	TAFI: inhibidor de la fibrinólisis activable por
i.p.: intraperitoneal;	trombina
IPG: pH inmovilizado	TFPI inhibidor de la vía del factor tisular
IRA: insuficiencia renal aguda	t-PA: activador tisular
i.v.: intravenoso;	TXA <sub>2</sub> : tromboxano A <sub>2</sub>
LAAOs:L-aminooxidasas	u-PA: activador tipo urocinasa
LDH: lactato deshidrogenasa	vWF: factor de von Willebrand
MB: membrana basal	2-ME: 2-mercaptoetanol;

## Índice analítico

### INTRODUCCIÓN

---

<b>1.1. Ofidismo en Argentina</b>	3
1.1.1. Accidentes ofídicos en el Nordeste Argentino	5
<b>1.2. Familia Viperidae</b>	7
1.2.1. Venenos	10
1.1.1. Principales toxinas del veneno ofídico	10
<b>1.3. Envenenamiento botrópico</b>	13
<b>1.4. Metaloproteinasas de Venenos de Serpientes</b>	14
1.4.1. Clasificación estructural	15
1.4.2. Actividades de las SVMPS	17
<b>1.5. Desintegina y dominio DC (Tipo desintegrinas/rico en cisteína)</b>	17
1.5.1. Clasificación estructural	17
1.5.2. Actividades de las proteínas-DC	19
<b>1.6. <i>Bothrops alternatus</i></b>	19
1.6.1. Distribución geográfica y hábitat	19
1.6.2. Componentes responsables de la toxicidad del veneno de <i>B. alternatus</i>	20
1.6.3. Baltergina	23
<b>1.7. Hemostasia</b>	24
1.7.1. Hemostasia primaria	25
1.7.1.1. Adhesión	25
1.7.1.2. Activación	26
1.7.1.3. Agregación	26
1.7.2. Hemostasia secundaria o coagulación	28

1.7.2.1. Iniciación. Exposición de Factor Tisular	29
1.7.2.2. Amplificación. Generación de trombina por células	30
1.7.2.3. Propagación	31
<b>1.7.3. Fibrinólisis</b>	32
<b>1.8. Alteraciones en la hemostasia producto del envenenamiento ofídico</b>	34
<b>1.8.1. Proteasas Pro-coagulantes</b>	35
<b>1.8.2. Enzimas Fibrino(geno)líticas</b>	36
<b>1.8.3. Activadores de la agregación de plaquetas</b>	37
<b>1.8.4. Inhibidores de la agregación plaquetaria</b>	37
<b>1.8.5. Componentes que afectan el endotelio vascular</b>	39
<b>1.9. Importancia del tema abordado en esta tesis</b>	40

## **OBJETIVOS**

---

<b>2.1. Objetivos generales</b>	43
<b>2.2. Objetivos específicos</b>	43

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

<b>3.1. Ensayos preliminares</b>	46
<b>3.1.1. Extracción de veneno de <i>B. Alternatus</i></b>	46
<b>3.1.2. Obtención y caracterización de baltergina</b>	46
3.1.2.1. Purificación de baltergina	46
3.1.2.2. Análisis 2D PAGE	46
3.1.2.3. Identificación de secuencias parciales mediante digestión tríptica y técnicas de análisis proteómicos	47
<b>3.1.3. Obtención y caracterización de baltergina-DC</b>	48

3.1.3.1. Autólisis de baltergina	48
3.1.3.2. Purificación del fragmento baltergina-DC	48
3.1.3.3. Estimación de la masa molecular por SDS-PAGE	49
3.1.3.4. Determinación parcial de la secuencia aminoterminal	49
<b>3.1.4. Obtención de Inmunoglobulinas G anti-baltergina</b>	49
3.1.4.1. Protocolo de inmunización	49
3.1.4.2. Purificación de la fracción IgG del suero de conejo	49
<b>3.2. Naturaleza de las proteasas presentes en el veneno de <i>B. alternatus</i></b>	50
3.2.1. Actividad proteolítica sobre azocaseína	50
3.2.2. Actividad proteolítica sobre BapNa	51
<b>3.3. Participación de las proteasas en la hemorragia exhibida por el veneno</b>	51
3.3.1. Estudios de la hemorragia en presencia de anticuerpos e inhibidores	51
3.3.2. Estudios <i>in vitro</i> de la interacción de proteasas del veneno de <i>B. alternatus</i> sobre células endoteliales	52
3.3.2.1. Línea Celular t-End	52
3.3.2.2. Estudio de la actividad citotóxica	52
3.3.2.3. Estudios de la adhesión celular	53
<b>3.4. Hemostasia primaria</b>	53
3.4.1. Recuento de plaquetas	53
3.4.2. Inhibición de la agregación plaquetaria	53
3.4.3. Tiempo de sangría	54
<b>3.5. Hemostasia secundaria</b>	54
3.5.1. Determinación del TC sobre plasma	54
3.5.2. Determinación del TC sobre fibrinógeno	54
3.5.3. Determinación de fibrinógeno plasmático	54
<b>3.6. Análisis Estadístico</b>	55

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

<b>4.1. Ensayos preliminares</b>	58
<b>4.1.1. Extracción de veneno de <i>B. alternatus</i></b>	58
<b>4.1.2. Obtención y caracterización de baltergina</b>	59
4.1.2.1. Purificación de baltergina	59
4.1.2.2. Análisis 2D-PAGE	59
4.1.2.3. Identificación de secuencias parciales mediante digestión trípica y técnicas de análisis proteómicos	61
<b>4.1.3. Obtención y caracterización de baltergina-DC</b>	67
4.1.3.1. Autoproteólisis de baltergina	67
4.1.3.2. Purificación del fragmento baltergina-DC	70
4.1.3.3. Estimación de la masa molecular por SDS-PAGE	71
4.1.3.4. Determinación de la secuencia aminoterminal	72
<b>4.1.4. Obtención de Inmunoglobulinas G anti-baltergina</b>	73
<b>4.1.5. Conclusiones de esta sección</b>	75
<b>4.2. Naturaleza de las proteasas presentes en el veneno de <i>B. alternatus</i></b>	76
<b>4.2.1. Actividad proteolítica sobre azocaseína en presencia de anticuerpos e inhibidores</b>	76
<b>4.2.2. Actividad proteolítica sobre BApNa en presencia de anticuerpos e inhibidores</b>	77
<b>4.2.3. Conclusiones de la sección</b>	78
<b>4.3. Participación de las proteasas en la hemorragia exhibida por el veneno de <i>B. alternatus</i></b>	79
<b>4.3.1. Estudios de la hemorragia en presencia de anticuerpos e inhibidores.</b>	79
<b>4.3.2. Estudios de la interacción de proteasas del veneno <i>B. alternatus</i> sobre células endoteliales</b>	80
4.3.2.1. Actividad citotóxica	80

4.3.2.2. Adhesión celular	82
<b>4.3.3. Conclusiones de la sección</b>	84
<b>4.4. Hemostasia primaria</b>	85
4.4.1. Recuento de plaquetas	85
4.4.2. Inhibición de la agregación plaquetaria	86
4.4.3. Tiempo de sangría	88
4.4.4. Conclusiones de la sección	91
<b>4.5. Hemostasia secundaria</b>	92
4.5.1. Determinación del TC sobre plasma y fibrinógeno	92
4.5.2. Determinación de fibrinógeno plasmático	95
4.5.3. Conclusiones de la sección	97

## **CONCLUSIONES**

---

<b>Conclusiones parciales</b>	99
<b>Conclusiones finales</b>	100

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

Referencias bibliográficas	103
----------------------------	-----

## **RESUMEN**

---

*Capítulo 1*  
*Introducción*

## **Introducción**

### **1.1. Ofidismo en Argentina**

#### **1.1.1. Accidentes ofídicos en el Nordeste Argentino**

### **1.2. Familia Viperidae**

#### **1.2.1. Veneno**

#### **1.2.2. Principales toxinas del veneno ofídico**

### **1.3. Envenenamiento botrópico**

### **1.4. Metaloproteinasas de Venenos de Serpientes**

#### **1.4.1. Clasificación estructural**

#### **1.4.2. Actividades de las SVMPs**

### **1.5. Desintegrina y dominio DC (Tipo desintegrinas/rico en cisteína)**

#### **1.5.1. Clasificación estructural**

#### **1.5.2. Actividades de las proteínas-DC**

### **1.6. *Bothrops alternatus***

#### **1.6.1. Distribución geográfica y hábitad**

#### **1.6.2. Componentes responsables de la toxicidad del veneno de *B. alternatus***

#### **1.6.3. Baltergina y baltergina-DC**

### **1.7. Hemostasia**

#### **1.7.1. Hemostasia primaria**

##### **1.7.1.1. Adhesión plaquetaria**

##### **1.7.1.2. Activación de las plaquetas**

#### **1.7.2. Hemostasia secundaria o coagulación**

##### **1.7.2.1. Iniciación. Exposición de Factor Tisular**

##### **1.7.2.2. Ampliación. Generación de trombina por células**

##### **1.7.2.3. Propagación**

#### **1.7.3. Fibrinólisis**

### **1.8. Alteraciones en la hemostasia producto del envenenamiento ofídico**

#### **1.8.1. Proteasas Pro-coagulantes**

#### **1.8.2. Enzimas fibrino(geno)líticas**

#### **1.8.3. Activadores de la agregación de plaquetas**

#### **1.8.4. Inhibidores de la agregación plaquetaria**

#### **1.8.5. Componentes que afectan el endotelio vascular**

### **1.9. Importancia del tema abordado en esta tesis**



## 1.1. Ofidismo en Argentina

Los envenenamientos por mordeduras de serpientes constituyen un importante problema de salud pública en amplias regiones de África, Asia y América Latina, afectando principalmente a la población rural de bajos ingresos en los países tropicales (Gutiérrez *et al.*, 2010; Dolab *et al.*, 2014). Se estima que en el mundo ocurren entre 1,8 a 2,7 millones de mordeduras de serpientes en el año, con una mortalidad estimada de 81.410 a 137.880 personas (Kasturiratne *et al.*, 2008). En Latinoamérica ocurren entre 137.000 a 150.000 accidentes por envenenamiento y mueren 3.400 a 5.000 personas cada año (Plata, 2007; Kasturiratne *et al.*, 2008). En las zonas principalmente afectadas los habitantes saben de la presencia y peligrosidad de estos animales, pero por muy diversos motivos que van desde lo cultural a lo económico, los envenenamientos y muertes provocados por estos reptiles siguen ocurriendo. Cada caso de accidente ofídico constituye una emergencia médica que debe ser tratada con los medios adecuados y cuanto antes para evitar las lesiones locales o sistémicas, o inclusive la muerte. En estos casos no existe la posibilidad de retardar el tratamiento y un mal diagnóstico puede costarle la vida al paciente (Rosenfeld, 1971; Warrell, 1996; Chippaux and Goyffon, 1998; de Roodt, 2014).

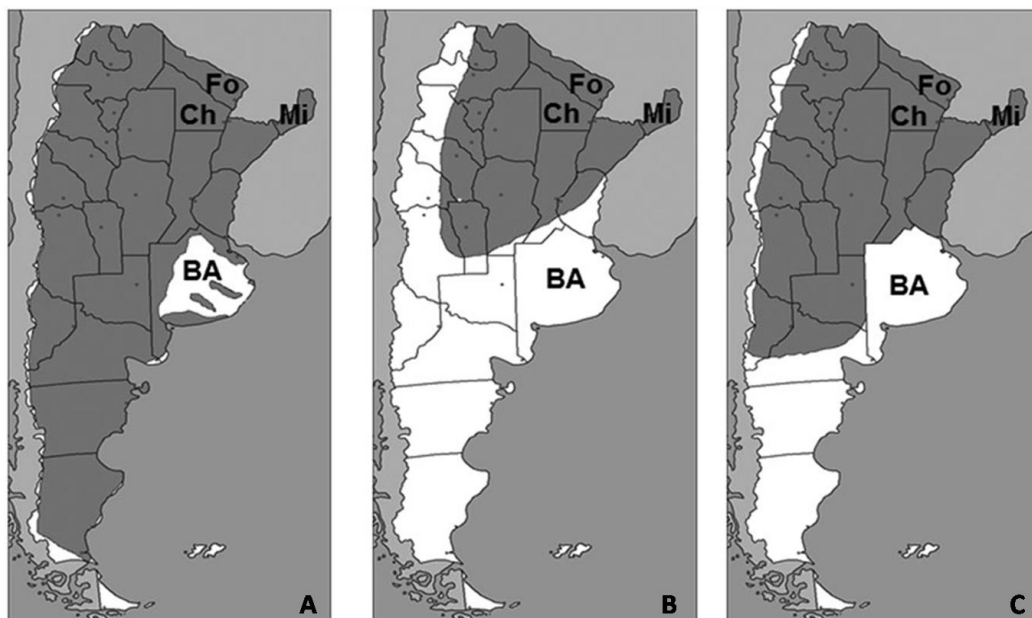
En Argentina, hay una abundante fauna de serpientes. De las 136 especies descritas, 18 pueden causar envenenamiento de severidad variable. Aquellas que son consideradas de importancia sanitaria por la potencia de su veneno y la facilidad para inocularlo comprenden a dos familias que se agrupan a tres géneros: *Bothrops* (conocidas como yarará con variaciones de sus nombres vulgares en las diferentes regiones, 10 especies), *Crotalus* (serpiente de cascabel, una especie) y *Micrurus* (serpientes de coral, 7 especies) (Fig 1.1.) (PNGCAM, 2007; Giraudo *et al.*, 2012; de Roodt, 2014).

Aunque las mordeduras de serpiente se reportan en todo el país, la distribución geográfica es heterogénea. El género *Bothrops* es casi omnipresente en Argentina, mientras que la distribución de *Crotalus* y *Micrurus* es más restringida (Fig. 1.2.) (Dolab *et al.*, 2014).

Las especies de serpientes de mayor importancia médica responsables de accidentes en humanos, pertenecen a la familia Viperidae (Subfamilia Viperinae). Estas son conocidas como “víboras” y son las responsables de alrededor del 99% de los accidentes registrados en Argentina, siendo los accidentes comunicados por yarará cercanos al 98% del total y los producidos por cascabel alrededor del 2% (PNGCAM, 2007; de Roodt, 2014; Dolab *et al.*, 2014). Esto es explicable dado que poseen un aparato venenoso muy evolucionado que les permite inocular grandes cantidades de veneno en fracciones de segundos. Esta inoculación de veneno, en el caso de *Bothrops* trae como consecuencia síndromes hemohistotóxicos y



**Figura 1.1.** Especies de serpientes venenosas de Argentina. **A)** *Bothrops alternatus* (*B. alternatus*) (yará grande) **B)** *Crotalus durissus terrificus* (cascabel) **C)** *Micrurus altirostris* (coral) Extraído de [www.fotosaves.com.ar](http://www.fotosaves.com.ar), [www.infoserpientes.com](http://www.infoserpientes.com) y [www.ecoregistros.org](http://www.ecoregistros.org).



**Figura 1.2.** Distribución por género de serpientes venenosas en Argentina. **A.** *Bothrops*; **B.** *Crotalus*; **C.** *Micrurus*; BA: Buenos Aires; Ch: Chaco; Fo: Formosa; Mi: Misiones (Dolab et al., 2014).

en el caso de *Crotalus durissus terrificus* un síndrome neurotóxico y miotóxico, que puede también llegar a ser nefrotóxico agudo (de Roodt, 2014).

Las otras serpientes responsables de accidentes pertenecen a la familia Elapidae, y al Género *Micrurus*, con 7 especies, conocidas como “coral” dados los colores rojos brillantes a rayas que exhiben en su piel. Estas serpientes son tímidas, huidizas y a diferencia de las víboras, raramente atacan, siendo las mordeduras y envenenamiento por éstas poco frecuentes. Representan menos del 1% de los accidentes por serpientes venenosas y sin embargo, cuando se producen son una urgencia médica importante debido a sus venenos neurotóxicos (Gutiérrez, 2011; de Roodt, 2014).

### **1.1.2. Accidentes ofídicos en el Nordeste Argentino**

Los accidentes por serpientes en el mundo se observan mayormente en las zonas tropicales y subtropicales. En Argentina, también las zonas más cálidas son aquellas en las que más accidentes se comunican, en especial en el Nordeste (NEA), región comprendida por las provincias de Misiones, Corrientes, Chaco, Santa Fe, Entre Ríos y Formosa (PNGCAM, 2007).

Un trabajo publicado por Dolab y colaboradores (2014) llevó a cabo el estudio epidemiológico de los casos clínicos tratados con suero antiofídico que fueron registrados durante el período 1978-1998. Del análisis de estos datos, se observó que la mayoría de los envenenamientos ocurrieron particularmente en las provincias del Chaco, Misiones y Formosa (Fig. 1.3.).

En los años recientes, en base a la cantidad de accidentes ofídicos reportados al Ministerio de Salud de la Nación durante los años 2000-2011, se observó mayor cantidad de casos en esa región, que en el resto del país, superando ampliamente los valores en las provincias de Formosa y Chaco (Fig.1.4). Por último, en los años 2012-2013, la provincia de Misiones registró el 56% de las notificaciones de la región del Nordeste (276/499), Formosa registró el 24% (121/499), Chaco el 15% (76/499) y Corrientes el 5% (26/499) (de Roodt, 2014).

Asimismo, en el Nordeste argentino han ocurrido la mayor cantidad de óbitos debidos a envenenamiento por mordedura de serpientes, como se observa en la Figura 1.5. siendo las provincias del Nordeste (Misiones, Chaco y Formosa) aquellas más afectadas durante el período 1994-2011 (de Roodt, 2014).

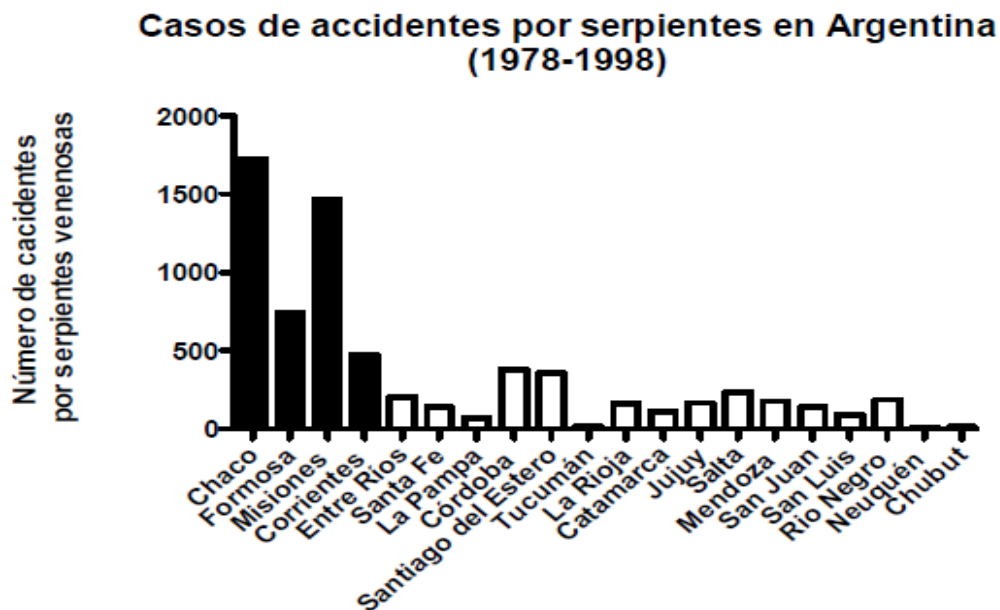


Figura 1.3. Número de envenenamientos por serpientes venenosas por provincia Argentina, 1978-1998. (de Roodt, 2014)

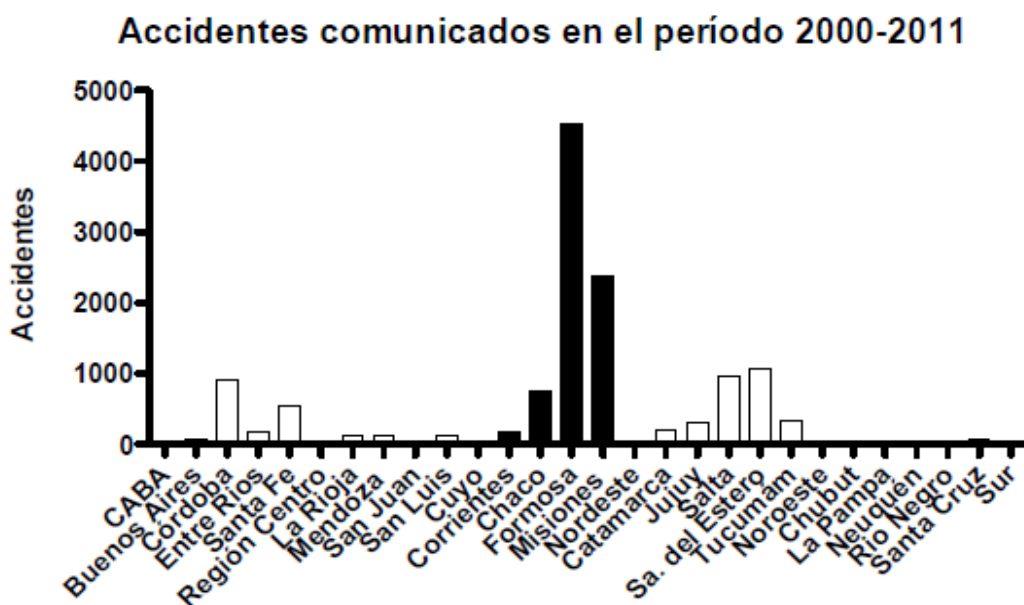
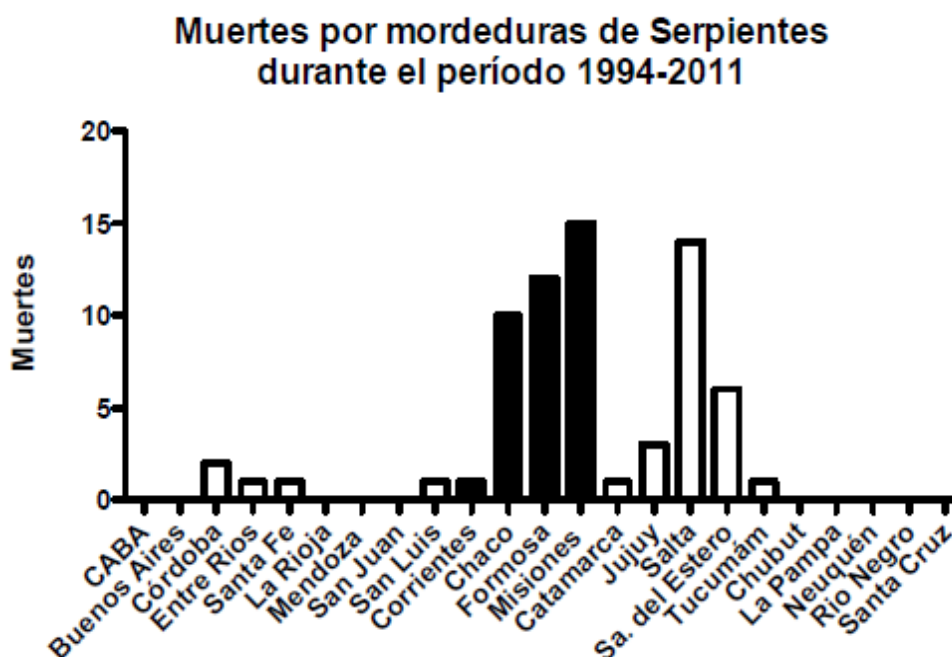


Figura 1.4. Número de envenenamientos por serpientes venenosas por provincia Argentina, 2000-2011 (de Roodt, 2014).



**Figura 1.5.** Muertes provocadas por mordedura de serpientes durante el período 1994-2011 en Argentina. Nótese la mayor cantidad de óbitos en las provincias del Norte del país. Datos de la Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud de la Nación. (de Roodt, 2014).

## 1.2. Familia Viperidae

Las serpientes son importantes en el ecosistema donde se encuentra inserto el ser humano ya que ejercen un eficiente control sobre las poblaciones de roedores, capaces de transmitir graves enfermedades, además de las pérdidas que ejercen sobre la agricultura. Sin embargo las especies venenosas constituyen un peligro para el ser humano, el ganado y animales domésticos (Ceí, 1993).

Si bien en Argentina existe una gran variedad de serpientes, son 9 las especies pertenecientes a la familia Viperidae consideradas peligrosas para el hombre (Tabla 1.1.) (Cardoso *et al.*, 2003; de Roodt, 2014) y consecuentemente de importancia sanitaria en la región Nordeste del país debido al gran número de accidentes ofídicos en los que están involucradas (Fig 1.6.) (Dolab *et al.*, 2014).

Como indica la Tabla 1.1, dos géneros de esta familia están presentes en el país: *Crotalus* y *Bothrops*. Estas serpientes se identifican por tener dos orificios a cada lado de la cabeza por delante de los ojos (orificios nasales y el correspondiente a las fosetas loreales) y también por poseer pequeñas escamas en el dorso cefálico. Cuando van a atacar se enroscan en espiral, con los 2/3 posteriores replegados a manera de base firme. Consiguen

así una posición dinámica que les permite proyectar su cabeza rápidamente hacia su presa y volver a su posición inicial (PNGCAM, 2007).

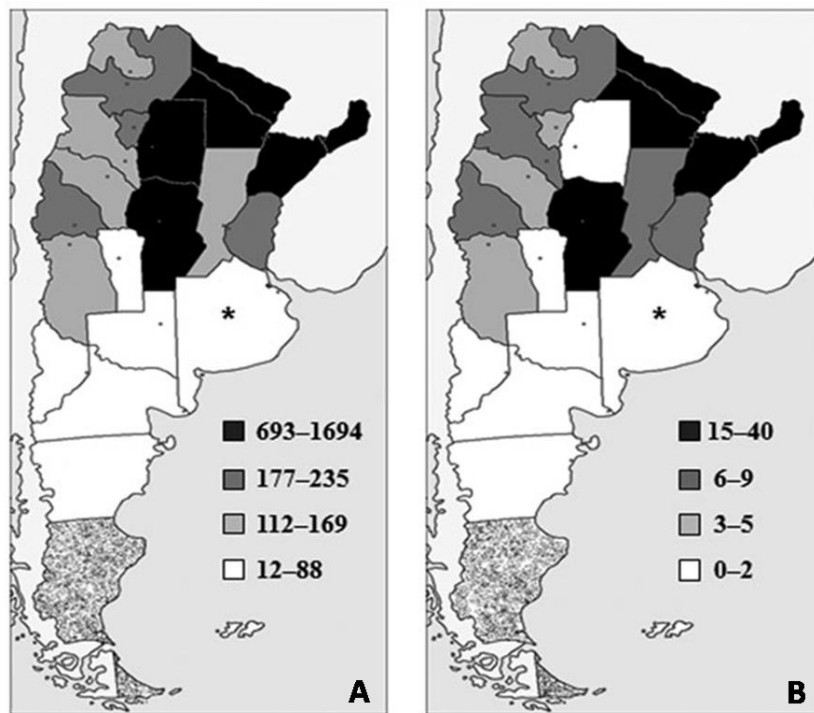
En los ofidios venenosos el veneno es secretado por glándulas especiales localizadas a lo largo de la parte posterior y superior del labio superior (Fig. 1.7. A.). Son glándulas salivales modificadas que secretan una mezcla de diferentes sustancias, algunas de función digestiva y otras tóxicas (Scrocchi *et al.*, 2006).

Cada tipo de serpiente tiene diferentes componentes en el veneno y su acción varía de acuerdo a la especie. Por otra parte, la efectividad del veneno está relacionada a la capacidad de inyectarlo. Las glándulas se conectan por un conducto glandular a dientes especializados o “colmillos” para la inoculación del mismo (Kardong, 1996). Los vipéridos presentan una dentición maxilar del tipo solenoglifas (solen = tubería). Se trata de un par de colmillos huecos que rotan de modo que pueden ser “guardados” en el techo de la boca cuando no están en uso (Fig. 1.7. B.). Esto les permite tener colmillos largos que inyectan el veneno profundamente en la víctima (Lee and Scanlon, 2002; Vidal, 2002).

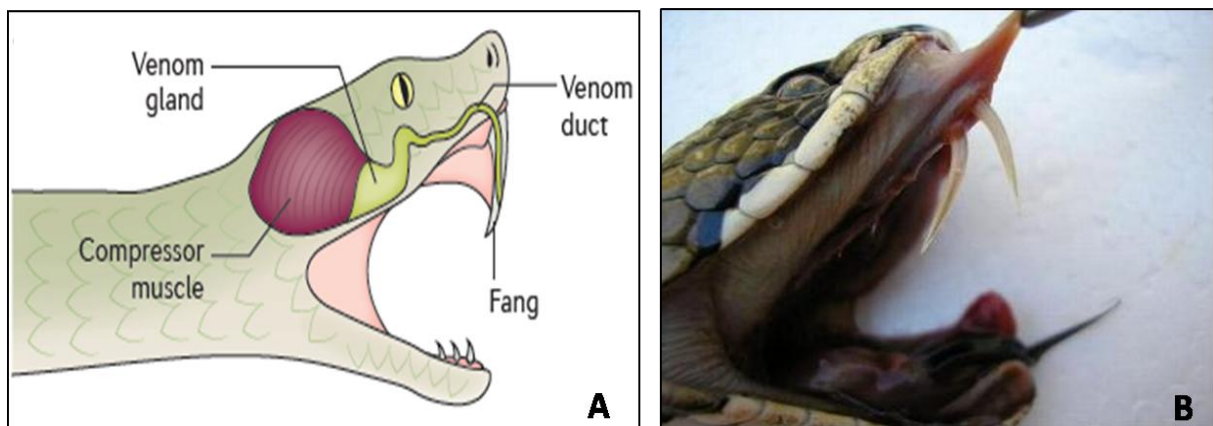
**Tabla 1.1.** Serpientes venenosas en Argentina

FAMILIA – SUBFAMILIA		GÉNERO	ESPECIES
Familia Viperidae	Subfamilia Crotalinae	Género <i>Bothrops</i> (yaraarás)	<i>B. alternatus*</i>
			<i>B. diporus</i>
			<i>B. jararaca</i>
			<i>B. jararacussu</i>
			<i>B. cotiara</i>
			<i>B. moojeni</i>
			<i>B. ammodytoides</i>
			<i>B. jonathani</i>
			<i>B. mattogrossensis</i>
			Género <i>Crotalus</i> (cascabel)

\* Especie estudiada en esta tesis



**Figura 1.6.** Accidentes causados por serpientes de la Familia Viperidae, por provincia Argentina. **A.** *Bothrops*; **B.** *Crotalus*; (Dolab et al., 2014).



**Figura 1.7. A)** Esquema de la disección parcial de la cabeza de una serpiente venenosa donde se observa la glándula de veneno y su comunicación con el colmillo. **B)** Fotografía de los colmillos del tipo solenoglifos de *B. alternatus*. (Gutiérrez et al., 2017) y [www.wikifaunia.com](http://www.wikifaunia.com).

### 1.2.1. Venenos

Los venenos ofídicos son secreciones utilizadas por el animal para capturar la presa, inmovilizarla y luego realizar la digestión de la misma. En caso de que un ofidio se sienta agredido puede utilizar el veneno como defensa, y en estos casos provoca en la víctima, una variedad de fenómenos tóxicos (Esteso, 1985).

Los venenos contienen alrededor de un 25% de sólidos totales, de los cuales el 70 a 90% están constituidos por una importante variedad de moléculas, muchas de ellas con actividad enzimática, constituyendo así una mezcla compleja de toxinas (Tu, 1977); se trata de proteínas y polipéptidos de peso molecular frecuentemente elevado, que ocasionan la mayoría de los efectos biológicos descritos en los envenenamientos (Zabaleta, 1990). El restante 10 a 30% de los solutos están constituidos por una amplia gama de sustancias orgánicas de bajo peso molecular como carbohidratos, péptidos pequeños, aminoácidos libres, aminas biógenas, nucleótidos, compuestos inorgánicos y elementos tanto aniónicos como catiónicos (Fig. 1.8.) (Yarlequé, 1992). La elevada concentración de sólidos le confiere a los venenos una gran viscosidad.

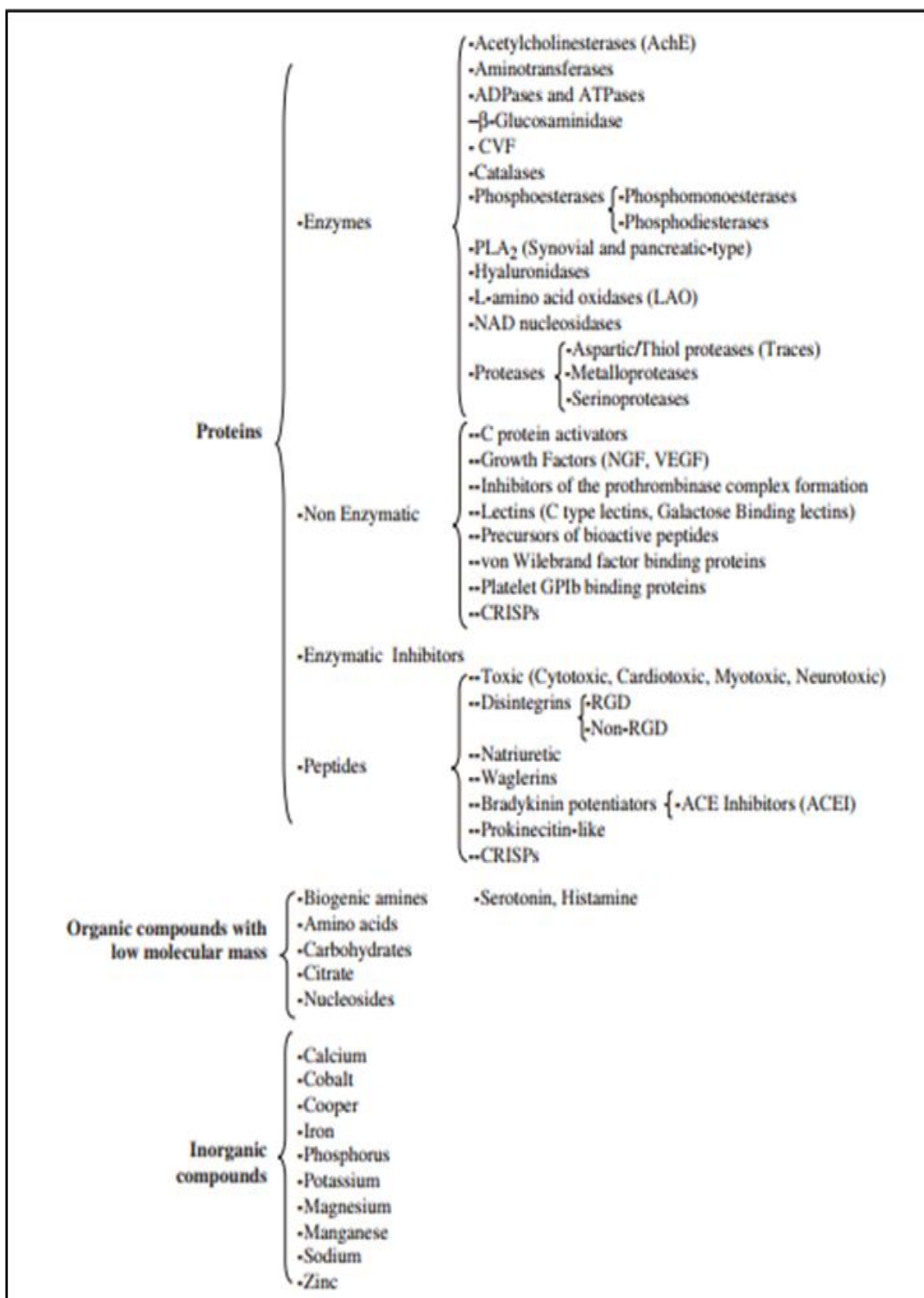
Los venenos de los vipéridos (subfamilias Viperinae y Crotalinae) poseen un arsenal de proteínas capaces de degradar la matriz extracelular e interferir con la cascada de coagulación, el sistema hemostático y la reparación de tejidos (Markland, 1998; Fox and Serrano, 2005; Kini, 2006). Sin embargo, el perfil proteico y la abundancia relativa de los diferentes grupos de proteínas varían ampliamente de especie a especie e incluso existe variación entre una misma especie dependiendo de la edad, estación del año, zona geográfica y temperatura (Juarez Gómez, 2007).

Dentro de los componentes proteicos, enzimáticos y no enzimáticos, se encuentran tipos moleculares de los cuales se reúne evidencia de tener participación en la fisiopatología del accidente ofídico: Metaloproteinasas, Fosfolipasas A<sub>2</sub>, Serinoproteasas, L-aminooxidadas y Lectinas, las que se describen con mayor detalle en el ítem siguiente. Es asimismo importante resaltar, la gran variedad de isoformas de cada familia proteica que se hallan en los venenos analizados hasta el presente. Ello contribuye a la complejidad en la composición proteica y a la gran diversidad de los efectos biológicos de los venenos.

### 1.2.2. Principales toxinas del veneno ofídico

Se describe a continuación una breve reseña de aquellos componentes proteicos responsables de los daños observados en el accidente botrópico:





**Figura 1.8.** Componentes del veneno de serpientes. ACE: enzima convertidora de angiotensina, CRISP: proteína secretora rica en cisteína, CVF: proteínas de veneno de cobra, LAO: L-amino ácido oxidasa, PLA<sub>2</sub>: fosfolipasa A<sub>2</sub> (Ramos and Selistre-de-Araujo, 2006).

### - Fosfolipasas

Las fosfolipasas del tipo A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>: *Phospholipase A<sub>2</sub>*) son enzimas que catalizan la hidrólisis, calcio dependiente, de glicerofosfolípidos liberando ácidos grasos en posición sn-2 y lisofosfolípidos. Las que provienen de venenos de serpientes pertenecen a la clase II de la familia de las PLA<sub>2</sub>s secretadas (Six and Dennis, 2000; Valentin and Lambeau, 2000). Estas enzimas son capaces de inducir miotoxicidad por acción citotóxica directa sobre la célula muscular esquelética, y constituyen las miotoxinas más importantes y abundantes presentes en los venenos animales (Gutiérrez and Ownby, 2003).

### - Serinoproteasas

Las serinoproteasas (SVSPs: *Snake Venom Serine Proteases*) son hidrolasas que degradan enlaces peptídicos de péptidos y proteínas y que poseen en su centro activo el aminoácido serina, esencial para la catálisis enzimática (Mathews, 2003). Los venenos botrópicos presentan serinoproteasas 'tipo trombina'. Estos componentes, de fuerte acción coagulante in vitro, consumen el fibrinógeno in vivo, induciendo desfibrinación y alteraciones en las pruebas de coagulación (Gutiérrez, 2002). Otras serinoproteinasas presentes en la familia Viperidae son los activadores de factor X y V, activadores de protrombina y activadores de plaquetas (de Lima *et al.*, 2005).

### - L-amino ácido oxidasas

Las enzimas L-amino ácido oxidasas (LAAOs: *L-amino Acid Oxidases*), perteneciente a la familia de las oxidoreductasas, son flavoproteínas que catalizan la desaminación oxidativa de un L-aminoácido al α-cetoácido correspondiente, con producción de peróxido de hidrógeno y amonio (Stabeli *et al.*, 2004). Si bien su proporción no es tan alta comparada con la de las fosfolipasas y metaloproteinasas, es suficiente como para ser consideradas toxinas. La mayoría las LAAO aisladas de venenos ofídicos han demostrado inducir la agregación plaquetaria, edema, apoptosis, hemorragia y poseer actividad bactericida (Li *et al.*, 1994; Suhr and Kim, 1996; Torii *et al.*, 2000; Stabeli *et al.*, 2004).

### - Lectinas

Las lectinas son proteínas capaces de unirse específicamente a determinados mono u oligosacáridos. Su principal papel radica en los fenómenos de reconocimiento, tanto a nivel molecular como celular. La mayoría de las lectinas de tipo C de los venenos de la familia Viperidae (CTL: *C-type lectins*) han sido descritas como dímeros unidos por puentes disulfuro de dos polipéptidos homólogos de aproximadamente 14 KDa. Estas tienen

actividad aglutinante eritrocitaria y otras propiedades como adhesión a proteínas plasmáticas, actividad mitogénica en linfocitos, unión a receptores plaquetarios induciendo tanto activación como inhibición de la agregación plaquetaria y reducción del flujo renal y flujo de filtración glomerular (Elifio-Esposito *et al.*, 2007).

#### - Metaloproteinasas

Dado su importancia en esta tesis, en los ítems 1.4. y 1.5. se describen en detalle las metaloproteinasas (SVMPs: *Snake Venom Serine Metalloproteases*) y las desintegrinas y dominios-DC, respectivamente.

### 1.3. Envenenamiento botrópico

Se denomina accidente ofídico botrópico, o también ofidiotoxicosis botrópica, al cuadro clínico característico producido por la acción y los efectos de las toxinas inoculadas en un organismo por la mordedura de una serpiente venenosa del género *Bothrops* (Croce, 2007).

Estos envenenamientos se caracterizan principalmente por manifestaciones locales que se presentan minutos después de la inyección del veneno (Fig. 1.9.), tales como dolor intenso e inmediato, edema, sangrado interno (equimosis) y hemorragia local de aparición precoz y de carácter progresivo durante las primeras 6 horas (Cardoso *et al.*, 2009; Otero-Patiño, 2009; Gutiérrez, 2011). Tales signos son seguidos en muchos casos por infarto ganglionar, dermonecrosis y mionecrosis que rodea al sitio de mordedura y formación de ampollas que pueden aparecer de forma tardía luego de 12 horas de ocurrida la injuria, dejando secuelas en las víctimas (Navarrete Zamora *et al.*, 2010). Esta patología local frecuentemente se complica por infecciones por diversos microorganismos (Otero-Patiño, 2009). Por otra parte, estos venenos en casos de accidentes graves provocan además alteraciones sistémicas, caracterizadas por hemorragia distante al sitio de inyección, trastornos de la coagulación, coagulación intravascular diseminada (CID), defibrinogénación y alteraciones hemodinámicas que pueden llevar a choque cardiovascular, e insuficiencia renal aguda (IRA), con alto riesgo de secuelas permanentes incluso la muerte (Cardoso *et al.*, 2009; Otero-Patiño, 2009; Gutiérrez, 2011; Gutiérrez *et al.*, 2017).

La progresión y extensión del edema y la presencia de necrosis definen el grado de envenenamiento local, mientras que las alteraciones en la coagulación de la sangre, el tiempo de sangrado y la presencia de complicaciones que amenazan la vida, como shock, IRA y daño de órganos vitales, define la gravedad del envenenamiento sistémico (Otero-Patiño, 2009).



**Figura 1.9.** Fotografías de accidentes botrópicos. **A.** Hemorragia local y Edema. **B.** Hemorragia local. **C.** Edema **D.** Ampollas **E.** Equimosis en el miembro inferior. (Gutiérrez et al., 2010), [www.sertox.com.ar](http://www.sertox.com.ar), (Gutiérrez et al., 2017) y (PNGCAM, 2007).

#### 1.4. Metaloproteinasas de Venenos de Serpientes

Desde el descubrimiento de las proteinasas dependientes del zinc (Zn) en venenos de serpientes de la familia Viperidae, los investigadores han estudiado la estructura y función de estas proteasas para comprender su rol en la patología del envenenamiento (Takahashi and Ohsaka, 1970). Con la primera secuencia aminoacídica determinada pensaron que pertenecían a la familia de proteasas de la metaloproteinasas de matriz (Shannon *et al.*, 1989). Sin embargo, pronto se hizo evidente que en realidad constituían una nueva familia de metaloproteinasas, la familia M12, a la cual las ADAMs (su siglas en inglés: *a disintegrin and metalloproteinase*) también pertenecen. Tanto las ADAMs como las metaloproteinasas pertenecen a la subfamilia “Reprolisinas” (Bjarnason and Fox, 1995). Este término hace referencia a que algunos miembros de la subfamilia provienen de reptiles (*rep*), mientras que otros pertenecen a un grupo de proteasas inicialmente descritas en tejidos reproductivos de mamíferos (*repro*) (Fox and Serrano, 2005). Sin embargo, las proteínas ADAMs están ampliamente distribuidas en una variedad de organismos y tejidos (White, 2003).

### 1.4.1. Clasificación estructural

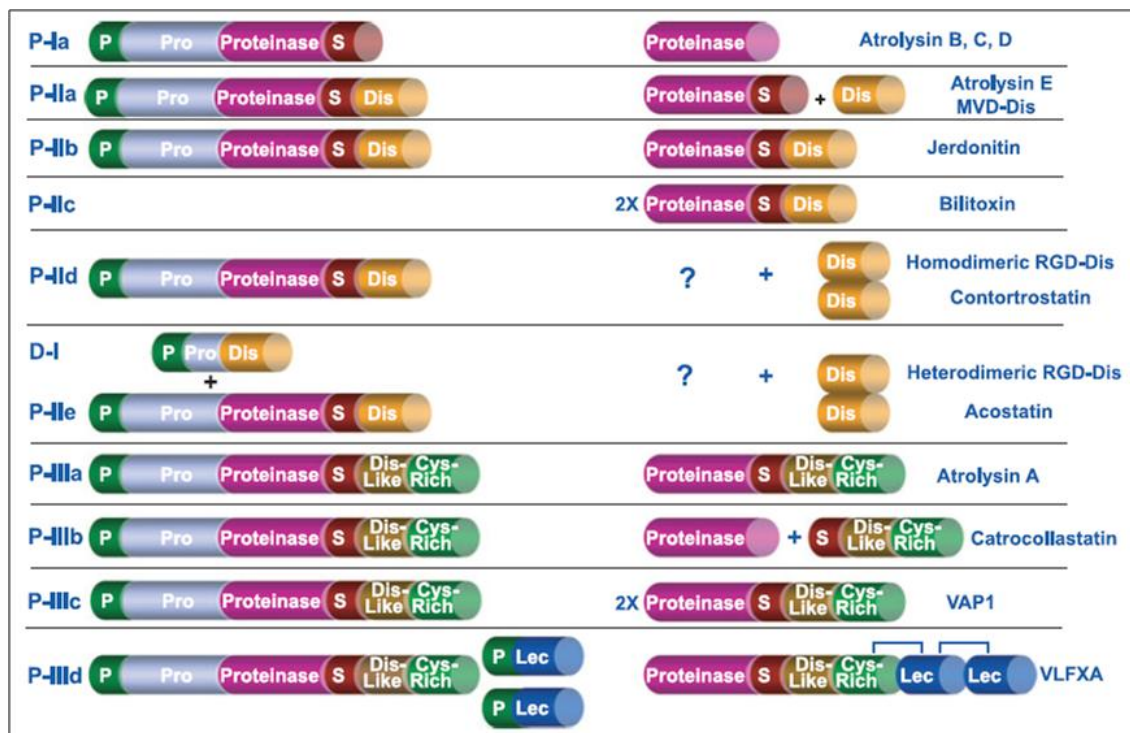
Las SVMPs originalmente se clasificaron en clases de acuerdo a la presencia de varios dominios estructurales y la organización de los mismos (Bjarnason and Fox, 1995). Todas estas enzimas comparten el dominio metaloproteinasa caracterizado por la secuencia consenso *HEXXHXXGXXH* que es el motivo de unión al Zn. El análisis de la secuencia de cDNA indica que las SVMPs se sintetizan en forma de zimógeno, siendo activadas a través de un mecanismo similar a las metaloproteinasas de matriz (Bode *et al.*, 1993; Gutiérrez and Rucavado, 2000; Fox and Serrano, 2010).

La última revisión de la clasificación de las SVMPs la realizaron Fox y Serrano (2005, 2008b). Se clasifican en tres clases según la presencia o ausencia de varios dominios no-proteinasa (Fig. 1.10.), comparando los ARNm transcritos y las proteínas identificadas en el veneno.

La primera clase, denominada P-I, es la más simple de las SVMPs, ya que sólo está constituida por un dominio metaloproteinasa. En su forma nativa, tienen una secuencia peptídica denominada péptido señal, del tipo pre-prodominio que es proteolíticamente procesado a la forma madura, y un dominio o péptido “espaciador” (S: *spacer*) unido a la región C-terminal del dominio metaloproteinasa. El peso molecular de las enzimas de esta clase es ~ 25 kDa.

La segunda clase son las SVMPs del tipo P-II, similares a la clase P-I, sólo que presentan un dominio desintegrina unido al extremo carboxilo terminal, que en algunos casos (P-IIa) puede ser autoproteolizado para generar un fragmento denominado desintegrina. En la subclase P-IIb el dominio desintegrina no es procesado y permanece como parte estructural de la proteinasa. La subclase P-IIc es la forma dimerica de la clase P-IIb. La subclase P-IId proviene de un precursor que da origen a una desintegrina homodimérica observada en algunos venenos, y la P-IIe representa desintegrinas heterodiméricas. El peso molecular de las enzimas de la clase P-II está comprendido entre 25 y 50 kDa.

Las SVMPs P-III presentan en su forma nativa varios dominios: el péptido señal, el prodominio, dominio metaloproteinasa, espaciador, dominio tipo desintegrina (*disintegrin like*) y un dominio rico en cisteína. La familia P-III está dividida en 4 subclases, con masas moleculares superiores a 50 kDa. El dominio de *disintegrin like* comparte una alta homología con el dominio desintegrina de las SVMP P-II, pero son distintas, ya que tienen una diferente disposición de puentes disulfuro, particularmente en el sitio de unión a integrinas. Esta diferencia se debe al reemplazo del motivo RGD (Arg-Gly-Asp) encontrado en las desintegrinas (*RGD-integrin binding site*), por las secuencias no-RGD: DCD (Asp-Cys-Asp)



**Figura 1.10.** Esquema de clasificación de las SVMPs. Los signos de interrogación indican que el producto procesado no ha sido identificado en el veneno. (Fox and Serrano, 2008).

o ECD (Glu-Cys-Asp) halladas en los dominios tipo desintegrina de las P-III (Hite *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1995; de Araujo *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 2000).

Las subclases P-IIIa y P-IIb son similares, las SVMPs P-IIIa no sufren ninguna modificación post-traducciona y se las encuentra en su forma nativa en el veneno. Por el contrario en la subclase P-IIIb, los dominios espaciador, tipo desintegrina y rico en cisteína pueden, bajo ciertas condiciones, separarse del dominio metaloproteína, por un proceso autoproteolítico. El dominio metaloproteína puede ser procesado completamente quedando así un dominio estable a la autólisis conteniendo el dominio espaciador, tipo desintegrina y rico en cisteína (dominio DC). El mecanismo por el cual la subclase P-IIIb es sensible a la autoproteólisis y no la subclase P-IIIa hasta la fecha se desconoce. Un estudio sugiere que el procesamiento de los dominios proteína está vinculado a la disposición de puentes disulfuro y/o al plegamiento de la proteína (Moura-da-Silva *et al.*, 2003). La subclase P-IIIc es la forma dimerica de P-IIIa, mientras que la subclase P-IIId es una estructura modificada de P-IIIa con la adición de dos dominios tipo lectina unidos mediante puentes disulfuro, acoplados pos-traduccionalmente.

### 1.4.2. Actividades de las SVMPs

Un gran número de actividades bioquímicas y biológicas han sido descritas para las SVMPs, mostrando un papel clave en la toxicidad global del veneno; son responsables de la hemorragia, producto de su acción proteolítica, lo que representa un peligro para la salud de las víctimas (Florea *et al.*, 2016).

Las SVMPs escinden selectivamente un pequeño número de proteínas claves en la coagulación sanguínea, en la agregación plaquetaria y sobre aquellas que constituyen la membrana basal, perjudicando la integridad del endotelio vascular. Dicha proteólisis limitada conduce a la activación o inactivación de la proteína implicadas en estos procesos, dando como resultado una interferencia en la coagulación, en la agregación plaquetaria y la contención de la sangre dentro del sistema vascular (Gutiérrez *et al.*, 2005; Kini and Koh, 2016).

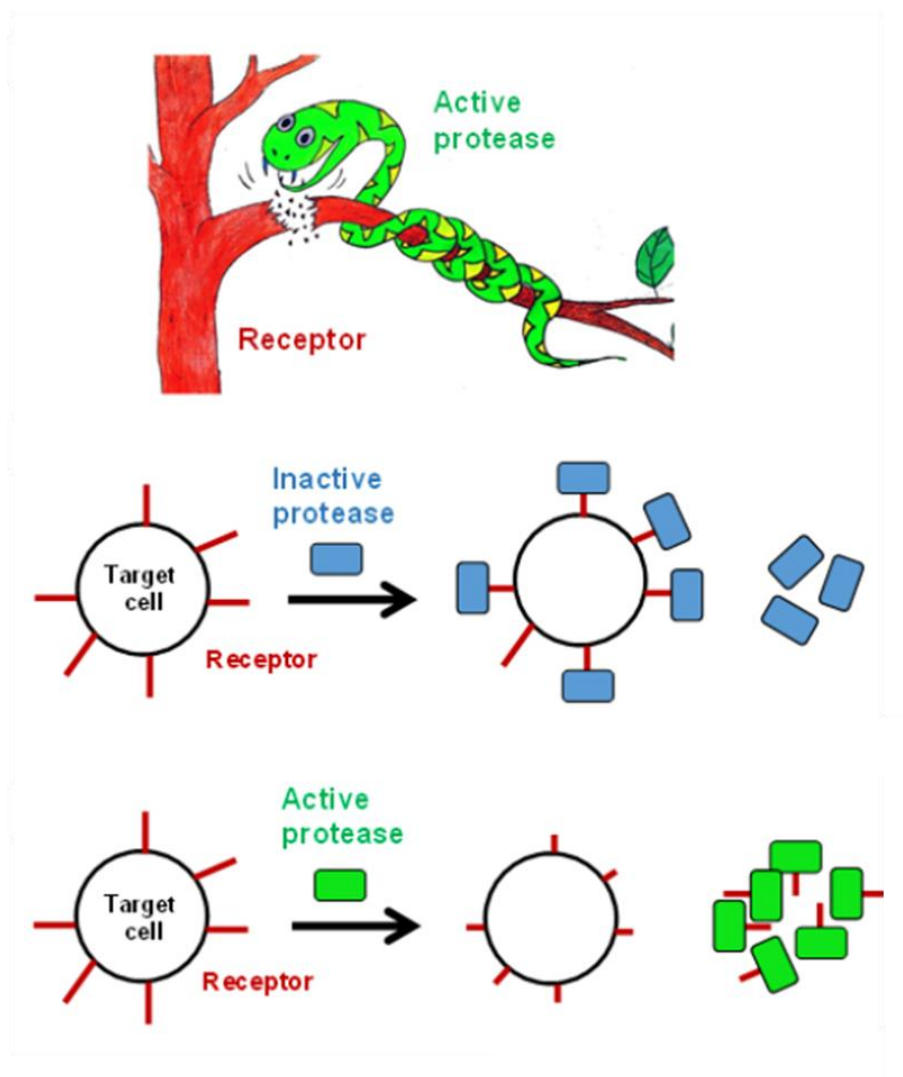
La toxicidad general que exhiben las SVMPs depende ampliamente de su actividad proteolítica. Sin embargo, con el avance de las investigaciones se evidencia claramente que la presencia de los dominios no-metaloproteinasa juegan un rol fundamental en la modulación de la actividad (Fox and Serrano, 2010). Por ejemplo, las enzimas de la clase P-I son mucho menos hemorrágicas que las pertenecientes a la clase P-III, esta diferencia es debida a la presencia de los dominios adicionales en esta última (dominios desintegrinas-rico en cisteína), que les permite interactuar con receptores de membrana de las superficies celulares, realizando la actividad / funcionalidad de las toxinas (Fig. 1.11.) (Fox and Serrano, 2005).

## 1.5. Desintegrinas y dominios DC (tipo desintegrina/rico en cisteína)

Las disintegrinas son una familia de proteínas pequeñas (40-100 aminoácidos), no enzimáticas y ricas en cisteínas, encontradas en los venenos de las serpientes de las familias Viperidae, Crotalidae, Elapidae y Colubridae (McLane *et al.*, 2004). Se ha demostrado que estas proteínas tienen la capacidad de interactuar con integrinas e inhibir su actividad. Pueden ser clasificadas estructuralmente dependiendo su origen (Macedo *et al.*, 2015).

### 1.5.1. Clasificación estructural

Las disintegrinas derivan, por un lado, como resultado de la síntesis de cortos ARN mensajeros (sus siglas en inglés, mRNA) (Bazaa *et al.*, 2005). Por otro lado, las disintegrinas tienen origen como productos de degradación de sus precursores las SVMPs (P-II y P-III), donde como resultado de un proceso autoproteolítico, el dominio



**Figura 1.11.** Diagrama esquemático de la importancia del dominio catalítico y no-catalítico de las SVMPs. Acción sobre células dianas, cuando la enzima se encuentra activa e inactiva (Kini and Koh, 2016).

es escindido (Takeya *et al.*, 1993; Moura-da-Silva *et al.*, 2003; Selistre-de-Araujo *et al.*, 2010)

Según la clase de SVMPs (ítem 1.4.1.) y al procesamiento proteolítico que es sometido, se originan diferentes desintegrinas y pueden dividirse estructuralmente en monómeros, homodímeros o heterodímeros. Desintegrinas monoméricas derivan del procesamiento de la subclase P-IIa de SVMPs (Fig 1.16.), generalmente son de bajo peso molecular (5-8 kDa) y contienen el motivo- RGD en su secuencia aminoacídica. Esta clase de desintegrina es bastante común en los venenos de serpientes y juega un papel crítico en las interacciones



de proteínas con integrinas de superficie celulares. Las desintegrinas homodiméricas derivan de la subclase P-IId, mientras que las desintegraciones heterodiméricas se procesan a partir de SVMP P-Ile, éstas están formadas por una subunidad resultado del procesamiento proteolítico y la otra subunidad por un producto de traducción de un gen con dominio desintegrina solamente (Calvete *et al.*, 2005; Fox and Serrano, 2008; Macedo *et al.*, 2015).

Las SVMP P-III, a su vez, dan lugar a proteínas simil disintegrina (carecen del motivo RGD), unido covalentemente al dominio rico en cisteína, ambos son llamados dominio-DC, con masas moleculares de aproximadamente 30 kDa (Calvete *et al.*, 2005; Fox and Serrano, 2008; Macedo *et al.*, 2015).

### 1.5.2. Actividades de las proteínas-DC

En las últimas décadas las desintegrinas de venenos de serpientes están siendo profundamente investigadas, principalmente en lo que respecta a sus aplicaciones en terapéutica para procesos patológicos, como la angiogénesis tumoral, ya que las integrinas juegan un rol relevante (de Roodt, 2014).

Los efectos asociados a la interacción de las desintegrinas con receptores tipo integrinas de membrana de superficie son: inhibición de la agregación plaquetaria e inhibición de la adhesión celular a componentes de la matriz extracelular. El mecanismo de acción aún no se conoce muy bien (Souza *et al.*, 2000; McLane *et al.*, 2004; Selistre-de-Araujo *et al.*, 2010; Macedo *et al.*, 2015); (de Queiroz *et al.*, 2017). Estas actividades están íntimamente ligada al motivo tripeptídico específico denominado como sitio de unión a integrinas, ya sea el que se encuentra presente en el dominio desintegrina de la clase P-II (*RGD-integrin binding site*) (Calvete *et al.*, 2005) como los motivos *DGD-* ó *ECD-integrin binding site* situados en el dominio tipo desintegrina (Kamiguti *et al.*, 1996); (Kamiguti *et al.*, 2003).

## 1.6. *Bothrops alternatus*

### 1.6.1. Distribución geográfica y hábitat

*Bothrops alternatus* (*B. alternatus*) es conocida por los lugareños argentinos como yarará grande o víbora de la cruz y es la especie que mayor distribución y abundancia presenta en el NEA, extendiéndose desde el sudoeste de Misiones por toda la Mesopotamia, este de Formosa y Chaco, casi toda la provincia de Santa Fe (no se encuentra en el extremo sudoeste), y gran parte de Córdoba, hasta las Sierras de San Luis y sectores de La Pampa. En Santiago del Estero ocupa áreas abiertas e inundables del río Dulce y de los bajos Sub-

meridionales. Habita en áreas abiertas, principalmente pastizales y humedales con pajonales, siendo muy frecuente en islas y áreas de inundación de los grandes ríos, habitando también en áreas modificadas por el hombre (Fig. 1.12) (Giraudó *et al.*, 2012).

En cuanto a los accidentes provocados por esta especie durante el período 2000-2003, más del 60% de las mordeduras totales reportadas en Argentina (18%), se registraron en la provincia de Corrientes (de Torrent *et al.*, 2004). Esto motivó la elección de la especie *B. alternatus* para la elaboración de este trabajo de Tesis.

### 1.6.2. Componentes responsables de la toxicidad del veneno de *B. alternatus*

En las últimas décadas ha cobrado importancia en la salud pública el estudio de la composición de los venenos de serpientes y las posibles aplicaciones, ya sea en el campo farmacológico, en la terapia anti-venómica y en la evolución de la función tóxica (Öhler *et al.*, 2010).

Respecto al veneno de *B. alternatus*, se han realizado estudios para dilucidar sus componentes, han sido identificadas por métodos proteómicos alrededor de 100 proteínas con pesos moleculares en el rango de 10 a 100 kDa (Ohler *et al.*, 2010). Estas proteínas fueron agrupadas en familias de la siguiente manera: Metaloproteinasas, Serinoproteinasas, Fosfolipasas A<sub>2</sub>, L-Aminooxidasas, Desintegrinas y Lectinas tipo C (Fig. 1.13.); siendo las 3 primeras, las más abundantes y principales responsables de los daños observados en el accidente producido por *B. alternatus* (Öhler *et al.*, 2010) (Fig. 1.13. A). Se realizó además un estudio transcriptómico de la expresión génica en glándulas de tres adultos de esta especie y se encontró la expresión de genes que codifican para las mismas familias de toxinas, con algunas variantes respecto a lo publicado en el trabajo de Ohler y colaboradores (Cardoso *et al.*, 2010) (Fig. 1.13. B). Estas variantes podrían explicarse por la diversidad en las características geográficas, climáticas, genéticas y dependiendo incluso de la edad de la serpiente (Chippaux *et al.*, 1991; Juárez Gómez, 2007) aún siendo de regiones geográficamente similares su patrón de toxicidad podrían variar (Lanari *et al.*, 2010).

A continuación se describe brevemente la acción deletérea de los principales componentes enzimáticos responsables de la toxicidad del veneno de *B. alternatus*.

- Han sido aisladas **serinoproteinasas** del veneno de *B. alternatus*, Bhalternin, Balterobin y SPBA, que coagulan el plasma y la sangre *in vivo* y poseen actividad fibrinogenolítica, además son capaces de hidrolizar un sustrato cromogénico específico para serinoproteasas llamado BapNA (N $\alpha$ -benzoyl-L-arginina p-nitroanilida), lo que sugiere que son enzimas tipo trombina (Smolka *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2010; de Oliveira *et al.*, 2013).

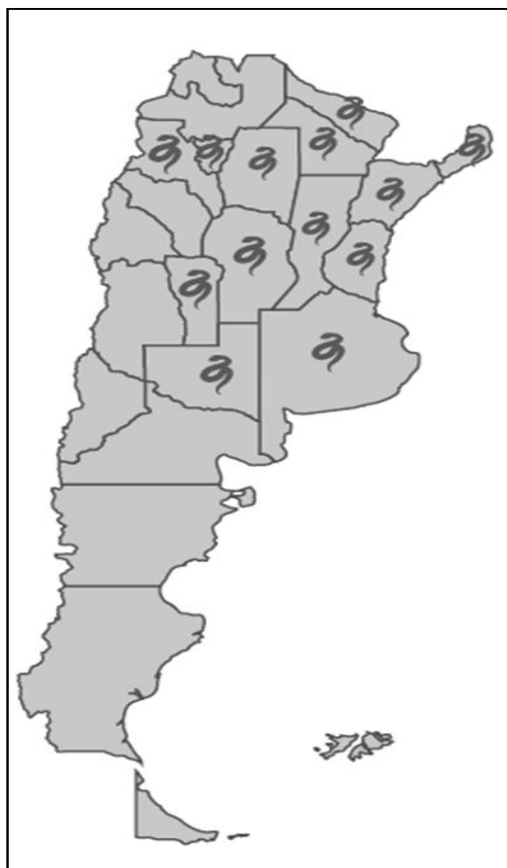


Figura 1.12. Distribución de *B. alternatus* en Argentina. Extraído de (Orduna, 2014).

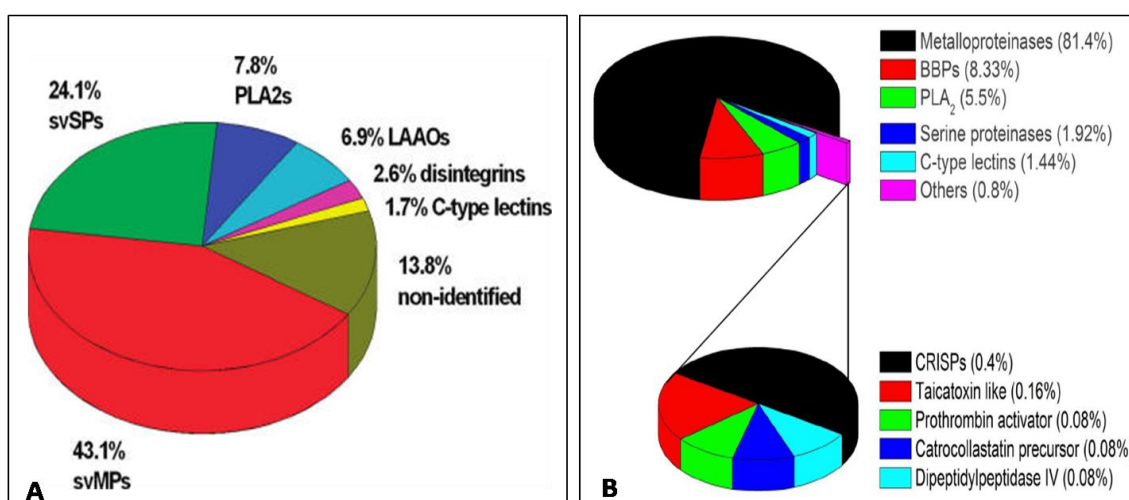


Figura 1.13. Componentes proteicos del veneno de *B. alternatus*. **A.** Resultados observados del análisis proteómico del veneno. Extraído de (Öhler *et al.*, 2010) **B.** Resultados observados del análisis transcriptómico del veneno. Extraído de (Cardoso *et al.*, 2010).

Este tipo de enzimas junto a las SVMPs activadoras de protrombina, ambas con acción coagulante, son las principales responsables de provocar depleción de fibrinógeno en animales de experimentación y la consiguiente incoagulabilidad de la sangre (Gutiérrez et al., 2009).

- En el veneno de *B. alternatus* se encuentran **fosfolipasas A<sub>2</sub>** de naturaleza ácida y básica (Cardoso et al., 2010). De las enzimas básicas se ha aislado una Lys49 PLA<sub>2</sub>, denominada BaTX, la cual presenta actividad miotóxica causando bloqueo neuromuscular (Ponce-Soto et al., 2007; Ponce-Soto et al., 2009). Por otro lado, una PLA<sub>2</sub> ácida aislada de veneno de especímenes del NEA denominada *Ba SpII RP4*, indujo edema e inflamación de la plantilla plantar del ratón y provocó retraso en el tiempo de coagulación, con nula actividad miotóxica incluso a altas dosis (Denegri et al., 2010).

- Las **L-aminoácido oxidasas** son activas a una amplia gama de pHs y temperaturas (Izidoro et al., 2014). Si bien su proporción en el veneno de *B. alternatus* no es tan alta comparada con la de las metaloproteinasas, serinoproteinas y fosfolipasas (Öhler et al., 2010) es suficiente para ser consideradas toxinas. Ha sido aislada y caracterizada de este veneno una LAAO denominada Balt-LAAO-I (Stabeli et al., 2004), la cual muestra diferentes actividades: es capaz de inducir edema, hemorragia y actividad bactericida (Stabeli et al., 2004; Izidoro et al., 2014).

- Otras proteínas no enzimáticas presentes en los venenos de vipéridos son las **lectinas tipo C** (proteínas dependientes de calcio, de ahí su nombre, capaces de interactuar con carbohidratos) que actúan como inhibidores de la trombina (Öhler et al., 2010) y, en el caso particular de Bothroaltein, aislada del veneno de *B. alternatus* produce inhibición en la agregación plaquetaria inducida por trombina (Castro et al., 1998; Ogawa et al., 2005).

- Hasta el momento han sido aisladas e identificadas del veneno de *B. alternatus* **metaloproteinasas** pertenecientes a diferentes clases (ítem 1.4.1.), Alternagin, BaG, Baltergin, BaltMP-I y BaltMP- II, las que presentan importante actividad proteolítica sobre diversos sustratos y son las responsables del efecto hemorrágico característico (principalmente las pertenecientes a la clase SVMP P-III) del envenenamiento por serpientes de la familia de los viperinos (Souza et al., 2000; Cominetti et al., 2003; Gay et al., 2005; Costa et al., 2007; Takeda et al., 2012). Representan el 43% de los componentes

identificados, siendo las toxinas más abundantes en esta secreción (Fig 1.10. A) (Öhler *et al.*, 2010).

- También se han aislado dos **desintegrinas**: alternagina-C, una proteína de 28 kDa aislada del veneno de especímenes de *B. alternatus* de la región de San Pablo, Brasil (Souza *et al.*, 2000). Inhibe la adhesión, migración y proliferación de células endoteliales al unirse a las integrinas  $\alpha_2\beta_1$  presentes en la superficie celular (Souza *et al.*, 2000; Cominetti *et al.*, 2004). La otra desintegrina es baltergina-DC, fragmento obtenido por autoproteólisis de baltergina (metaloproteinasa P-III que describe en detalle en el próximo apartado). Este fragmento-DC fue obtenido por Gay (2010) y caracterizado en el marco de esta tesis.

### 1.6.3. Baltergina

En el Grupo de Investigación donde se encuadró el plan de trabajo de esta tesis, se ha logrado el aislamiento de Baltergina (Gay *et al.*, 2005; Gay *et al.*, 2009). Se trata de una metaloproteinasa perteneciente a las SVMPS de la clase P-III que posee una amplia especificidad proteolítica, efectivamente inhibida por agentes quelantes de metales.

Baltergina posee actividad hemorrágica, edematogénica y miotóxica, manifestaciones características del daño local producido en el envenenamiento botrópico. Si bien es menos letal que el veneno entero, es capaz de inducir *per se* hemorragia pulmonar y sangrado de mucosas. Afecta además otros órganos vitales como riñón e hígado debido a la hipoxia tisular, secundaria a la hemorragia sistémica.

Hidroliza el colágeno presente en la membrana basal del endotelio capilar, así como también moléculas de fibrinógeno y fibrina, contribuyendo al sangrado. Actúa de modo sinérgico con otros componentes del veneno, como fosfolipasas, que promueven mayor daño muscular (Bustillo *et al.*, 2012).

Es capaz de autolizarse produciendo un fragmento estable llamado baltergina-DC, vinculado a moléculas de tipo desintegrina. Este efecto la convierte en una valiosa herramienta biológica para estudios de adhesión celular e inhibición de la agregación plaquetaria, efectos que están íntimamente relacionados con las alteraciones hemostáticas producidas por el envenenamiento por *B. alternatus*.

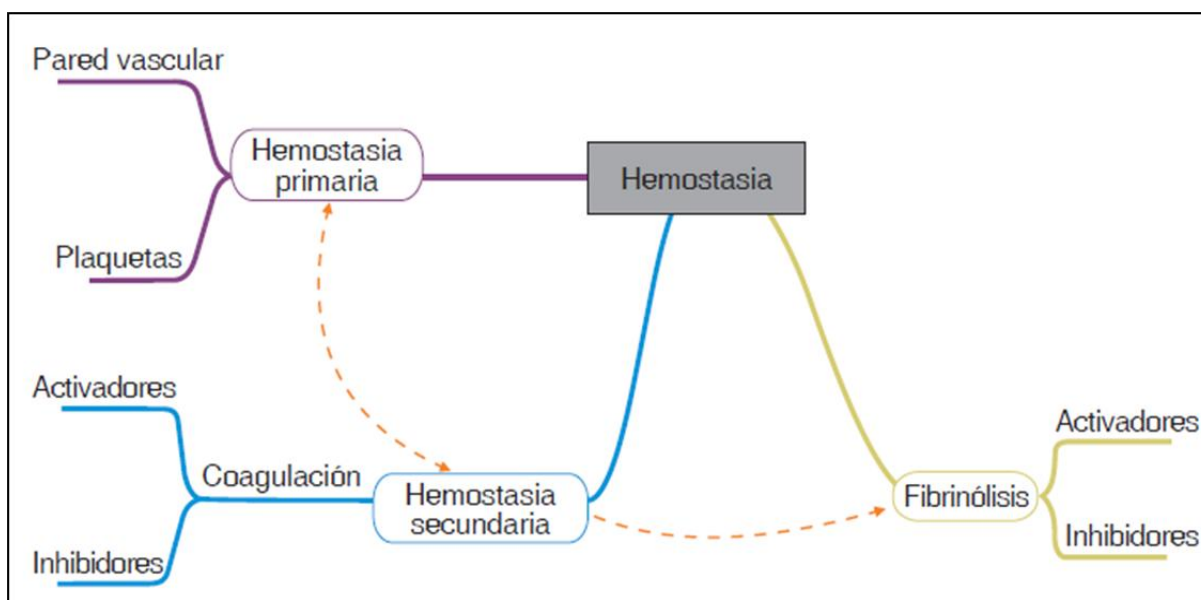
Las IgGs anti-baltergina, obtenidas por inmunización de conejos fueron efectivas en la neutralización de las actividades hemorrágica y miotóxica del veneno de *B. alternatus* y redujeron la extensión global del daño tisular local, impidiendo la acción de los otros componentes presentes en el mismo (Gay *et al.*, 2013). Estos anticuerpos toxino-específicos fueron utilizados como herramienta en esta tesis, para dilucidar la contribución de las

SVMPs en las alteraciones de la hemostasia. Con el mismo propósito, se empleó luego de caracterizarlo, el fragmento-DC.

### 1.7. Hemostasia

La sangre ha sido considerada sagrada desde la antigüedad. Los chinos denominaron la palabra sangre con el símbolo jeroglífico 血 (xuè) que significa “un sacrificio ubicado en los vasos” (Tanaka et al., 2009). En condiciones normales la sangre circula en fase líquida en todo el organismo, después de una lesión vascular ésta coagula sólo en el sitio de la injuria para sellar el área lesionada. La transformación de sangre líquida en coágulo sólido está regulada por una red de activación e inhibición enzimática y depende de una interacción compleja entre la sangre, que contiene las células, y los factores que intervienen en la coagulación y pared vascular, donde el endotelio tiene un papel fundamental (Páramo et al., 2017).

El fenómeno que detiene el sangrado se conoce como hemostasia. Este proceso fisiológico es un mecanismo de defensa que, junto con la respuesta inflamatoria y de reparación, ayudan a proteger la integridad de un sistema circulatorio cerrado y de alta presión después de una lesión tisular (Flores-Rivera et al., 2014). Las consecuencias de una



**Figura 1.14.** Etapas de la respuesta hemostática. Descripción del mecanismo de la coagulación se divide en diferentes fases, todas ellas guardan relación entre sí (Grimaldo-Gómez, 2017).

“falla” en este sistema son evidentes, trombosis o hemorragia. Para su estudio, se clasifica la respuesta hemostática en tres procesos: *la hemostasia primaria, la hemostasia secundaria o coagulación y la fibrinólisis*, existiendo siempre una interacción entre la pared vascular y la sangre (Fig. 1.14.) (Dalmau, 2011; Grimaldo-Gómez, 2017).

### 1.7.1. Hemostasia primaria

Se inicia a los pocos segundos de producirse la lesión, participan fundamentalmente las plaquetas y el endotelio. La membrana plaquetaria tiene muchos receptores en su superficie, algunos de estos son esenciales para el papel que cumplen las plaquetas en la hemostasia: receptores activados por proteasas (PARs) como PAR1 y PAR 4, receptores purinérgicos del tipo nucleotídico como  $P_2Y_1$  y  $P_2Y_{12}$  e integrinas. Estos últimos son glicoproteínas transmembranas heterodiméricas formadas por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) unidas no covalentemente. Hay cinco tipos de subunidades  $\alpha$  ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_{IIb}$ ,  $\alpha_V$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ) y dos tipos de subunidades  $\beta$  ( $\beta_1$  y  $\beta_3$ ). Las integrinas plaquetarias más estudiadas son:  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ó llamada GPII<sub>b</sub>/III<sub>a</sub> es el receptor de fibrinógeno, vitronectina y factor de von Willebrand (sus siglas en inglés, vWF) que representa el 15% del total de proteínas de superficie, lo que lo convierte en el más abundante;  $\alpha_V\beta_3$  (receptor de vitronectina),  $\alpha_2\beta_1$  ó GPI<sub>a</sub>II<sub>a</sub> (receptor de colágeno),  $\alpha_5\beta_1$  ó GPI<sub>c</sub>II<sub>a</sub> (receptor de fibronectina) y  $\alpha_6\beta_1$  (receptor de laminina) (Fig. 1.15.) (Klinger, 1996; Butt and Walter, 1997; Mesa and Alfonso, 2000; de Queiroz *et al.*, 2017).

Normalmente las plaquetas circulan en forma inactiva y no se adhieren al vaso sanguíneo; esto sólo ocurre cuando existe una lesión y se expone el colágeno del subendotelio, permitiendo así la activación de las mismas y la unión al sitio lesionado. Las plaquetas interaccionan con la pared vascular para detener la salida de sangre en los capilares, arteriolas pequeñas y vénulas, producen vasoconstricción derivando la sangre fuera del área lesionada (Dalmau, 2011; Páramo *et al.*, 2017). En la hemostasia primaria existe una serie de mecanismos para la formación del tapón hemostático plaquetario “inicial”, que se repiten potenciados a lo largo de todo el proceso hemostático. Se los ordena en las siguientes fases: adhesión, activación y agregación plaquetaria (Flores-Rivera *et al.*, 2014; de Queiroz *et al.*, 2017).

#### 1.1.1.1. Adhesión

Aunque el endotelio tiene múltiples proteínas adhesivas como laminina y fibronectina, la más importante para la adhesión plaquetaria es el colágeno. El reclutamiento inicial de plaquetas al subendotelio expuesto está mediado por la interacción del vWF con el receptor GPIb del complejo glicoproteína GPIb-V-IX. La unión entre este receptor y el vWF, es

esencial para la captura e inmovilización de plaquetas. Hemostáticamente, vWF es el principal determinante de la adhesión y agregación plaquetaria ya que tiene varios sitios de unión que pueden interactuar con la pared vascular, la matriz subendotelial y receptores de plaquetas.

Por otro lado, las plaquetas son capaces de unirse al colágeno a través de la glicoproteína VI (GPVI) y de la integrina  $\alpha_2\beta_1$  (GPIa-IIa). GPVI es el principal receptor de colágeno en las membranas plaquetarias, que actúa como mediador de la activación. La interacción colágeno-GPVI desencadena señales que conducen a la activación y liberación de mediadores, tales como el tromboxano  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>) y el adenosín-difosfato (ADP) que contribuyen a la activación de las plaquetas (de Queiroz *et al.*, 2017).

Los tres principales receptores implicados en la adhesión plaquetaria (GPIb-V-IX,  $\alpha_2\beta_1$  y GPVI) mediante señalización interna activan a la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GPIIb-IIIa), que se une al fibrinógeno o a la fibrina polimerizada (Fig. 1.16.) (Emsley *et al.*, 2000).

#### 1.1.1.2. Activación

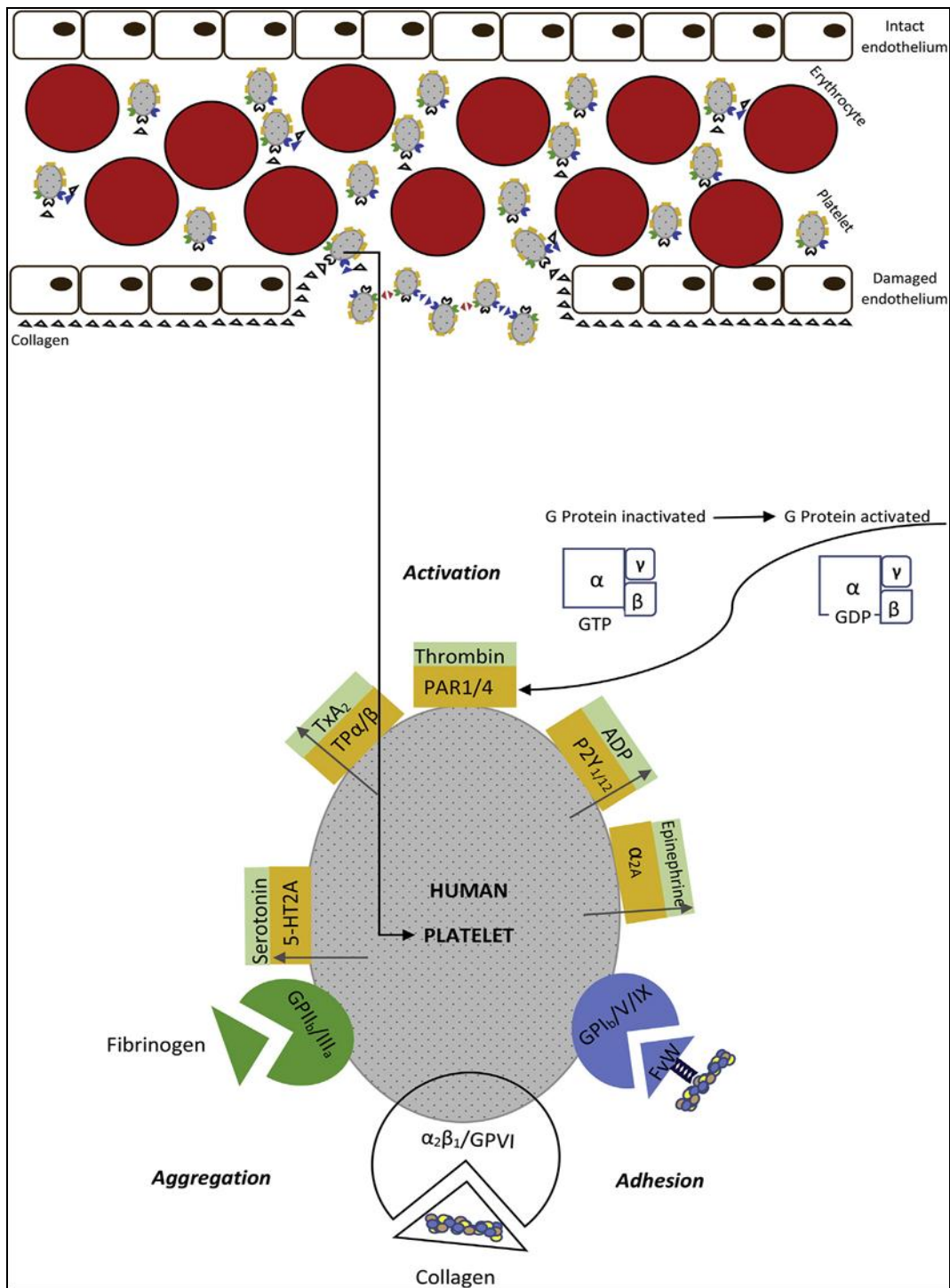
Al activarse las plaquetas, las proteínas que forman el citoesqueleto sufren cambios de organización generando la formación de múltiples proyecciones citoplasmáticas que facilitan la adhesión de las mismas a la pared del vaso dañada. Simultáneamente segregan el contenido de sus gránulos tales como ADP, serotonina, TXA<sub>2</sub>, fibrinógeno, vWf, los factores V, XI y XIII, entre otros, que actúan con receptores específicos en la superficie plaquetaria (Flores-Rivera *et al.*, 2014; de Queiroz *et al.*, 2017).

Los receptores de ADP, junto con los receptores de trombina y de TXA<sub>2</sub>, activan una cascada de señalización específica vinculada a la movilización de calcio de las reservas intracelulares, lo que culmina en la activación de la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Fig. 1.16.) (Jackson and Schoenwaelder, 2003).

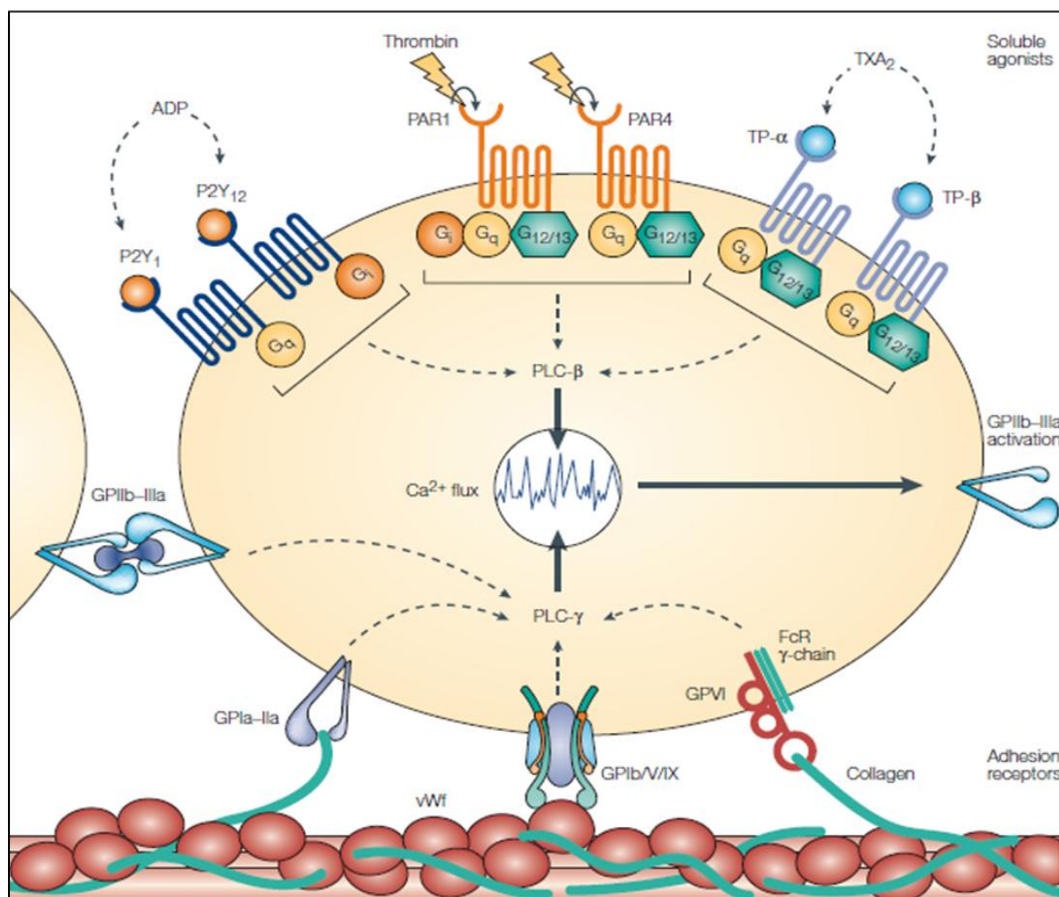
#### 1.1.1.3. Agregación

El cambio conformacional de las plaquetas ya activadas genera el reclutamiento de más plaquetas que interaccionan entre sí, provocando el crecimiento del tapón plaquetario. Esta etapa de agregación plaquetaria exhibe dos tipos de señales, la primera o agregación primaria que es de tipo reversible, y una segunda generalmente irreversible, conocida como agregación secundaria, que ocurre cuando las plaquetas secretan su granulado (de Queiroz *et al.*, 2017). Por otro lado, las plaquetas participan en la activación del sistema de la coagulación proporcionando la superficie sobre la cual se van a ensamblar los complejos enzimáticos que intervienen en dicha fase (Dalmau, 2011).





**Figura 1.15.** Esquema de los receptores de plaquetas involucrados en la hemostasia (de Queiroz *et al.*, 2017).

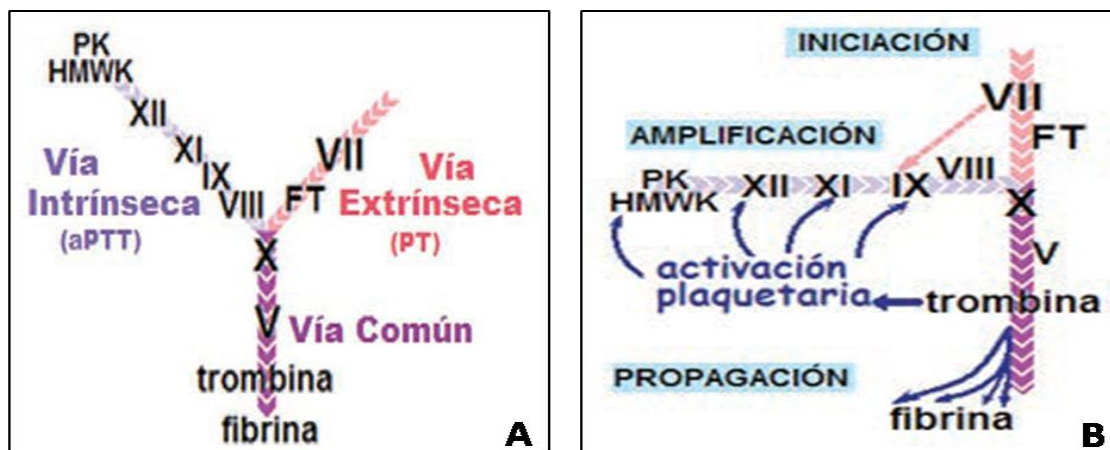


**Figura 1.16.** Representación esquemática de la adhesión de la plaqueta y los principales receptores involucrados. GPIa-IIa corresponde a la integrina  $\alpha_2\beta_1$ , y GPIIb-IIIa a  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Jackson and Schoenwaelder, 2003).

### 1.7.2. Hemostasia secundaria o coagulación

Comprende la activación del sistema de coagulación. Originalmente, en 1964 fue propuesto un modelo que contemplaba una “cascada” enzimática compuesta por una serie de etapas secuenciales en las que la activación de un factor de coagulación activa al siguiente. Esto desencadenaba la generación de trombina, que convierte el fibrinógeno (proteína soluble del plasma) en fibrina (insoluble), quien es el componente estructural del coágulo (Davie and Ratnoff, 1964). Según el modelo clásico, existirían dos vías de activación, intrínseca y extrínseca, iniciadas por el factor XII y el complejo factor tisular (FT)/factor VII respectivamente (Fig. 1.17. A.), que convergen en una vía común, a nivel del factor X activo (Xa), culminando en la generación de trombina y la formación de fibrina. Sin embargo, pronto se comprobó que ambas vías no operan de forma independiente.

Actualmente se demostró la importancia del componente celular en el proceso de coagulación y de esta forma el modelo se ha perfeccionado, describiendo una compleja red



**Figura 1.17.** Modelos de coagulación. **A.** Modelo clásico de la cascada **B.** Modelo celular o molecular. (Alvarado Arteaga, 2013).

de varios elementos de coagulación (Fig. 1.17. B.) al que se denominó “modelo celular o molecular” que cuenta con tres fases: iniciación, amplificación y propagación (Hoffman and Monroe, 2001; Tanaka *et al.*, 2009; Páramo *et al.*, 2017). Para una mejor comprensión, se representa en la Figura 1.15. un corte longitudinal de un vaso sanguíneo lesionado, en el que se detallan las fases del proceso hemostático y a la vez se integran los eventos moleculares a la contribución celular en la hemostasia (Alvarado Arteaga, 2013).

#### 1.1.2.1. Iniciación. Exposición de Factor Tisular

El factor tisular (FT), también conocido como tromboplastina o factor III, es sintetizado por diferentes tipos celulares y expresado en la membrana celular. Aunque el FT se encuentra localizado en la membrana de las células donde se ha formado, éste se puede expresar en una gran variedad de células extravasculares en condiciones normales, además de expresarse en monocitos y células endoteliales en estados inflamatorios. Evidencia reciente sugiere que las vesículas de membrana que contienen factor tisular, pueden unirse a la superficie plaquetaria de un trombo en evolución. La fuente y el papel de dichas vesículas permanecen sin aclararse, sin embargo, es claro que las plaquetas normales circulantes no activadas, no contienen ni expresan FT (Hoffman and Monroe, 2001; Flores-Rivera *et al.*, 2014).

El factor VII es una serinoproteasa que se encuentra permanentemente patrullando la circulación en búsqueda de pared vascular dañada con FT expuesto. Cuando el FT se une al FVII, este último se activa (FVIIa). (Tanaka *et al.*, 2009; Alvarado Arteaga, 2013). La cercanía del complejo FT/VIIa a la superficie de las plaquetas activadas es un paso clave en

la iniciación efectiva de la coagulación hemostática o trombosis. El complejo FT/VIII activa los factores IX y X. Si el factor Xa deja el ambiente protegido de la superficie celular es inhibido por ATIII o TFPI (antitrombina III e inhibidor de la vía del factor tisular, respectivamente) sin embargo, si el factor Xa permanece en la superficie celular puede combinarse con el factor Va para producir pequeñas cantidades de trombina, que jugarán un papel importante en la activación de plaquetas y factor VIII durante la fase de amplificación.

La ATIII y el TFPI tienen además funciones anti-coagulantes ya que la primera actúa inhibiendo todos los factores de coagulación con acción de serinproteasas (IX, X, XI, XII y trombina), mientras que TFPI es responsable de inhibir la formación del complejo FT/VIIIa (Hoffman and Monroe, 2001; Páramo et al., 2017).

#### 1.1.2.2. Amplificación. Generación de trombina por células

Cuando las pequeñas cantidades de trombina formadas en la iniciación superan cierto umbral, desencadenan la activación plaquetaria (Fig. 1.18). Dicha activación sucede principalmente en la población de plaquetas que ya se encuentran adheridas a la matriz de colágeno expuesta, ya sea directamente a través del receptor glicoproteico GPIV e integrina  $\alpha_2\beta_1$  o a través del complejo vWF-GPIb, antes mencionado. Al ser activadas por estas dos vías, se las llama plaquetas activadas por colágeno y trombina (plaquetas COAT) (Kempton *et al.*, 2005). La activación plaquetaria genera un cambio rotacional en algunos lípidos de membrana, que al exterior expresan residuos de fosfatidilserina generando una superficie cargada negativamente. Por medio del calcio, esta superficie adhiere y activa los factores de coagulación lo que facilita una cadena de reacciones y la retroalimentación positiva. De este modo, cada factor puede ser activado por su antecesor en la cadena de reacciones y también, de manera alterna, por la superficie de la plaqueta activada (Alvarado Arteaga, 2013).

El principal de estos ciclos de retroalimentación positiva es activado por el factor IX y la trombina, liberados a la circulación durante la fase previa de iniciación. La trombina activa la superficie plaquetaria, que adhiere y activa el factor IX y su cofactor, el VIII, previamente separado del vWF. Estos factores en conjunto son llamados complejo “*tenasa*” y activan el factor X, este último ayudado de su cofactor, el factor V (liberado de los gránulos alfa de la plaqueta activada) genera más trombina, la cual a su vez reiniciará el proceso anterior activando más factor IX en la superficie plaquetaria. Este ciclo se repite de manera auto-sostenida sin requerir nuevas secuencias de iniciación y genera más moléculas de trombina en cada ciclo, hasta producirla en grandes cantidades (Hoffman and Monroe, 2001; Flores-Rivera *et al.*, 2014).

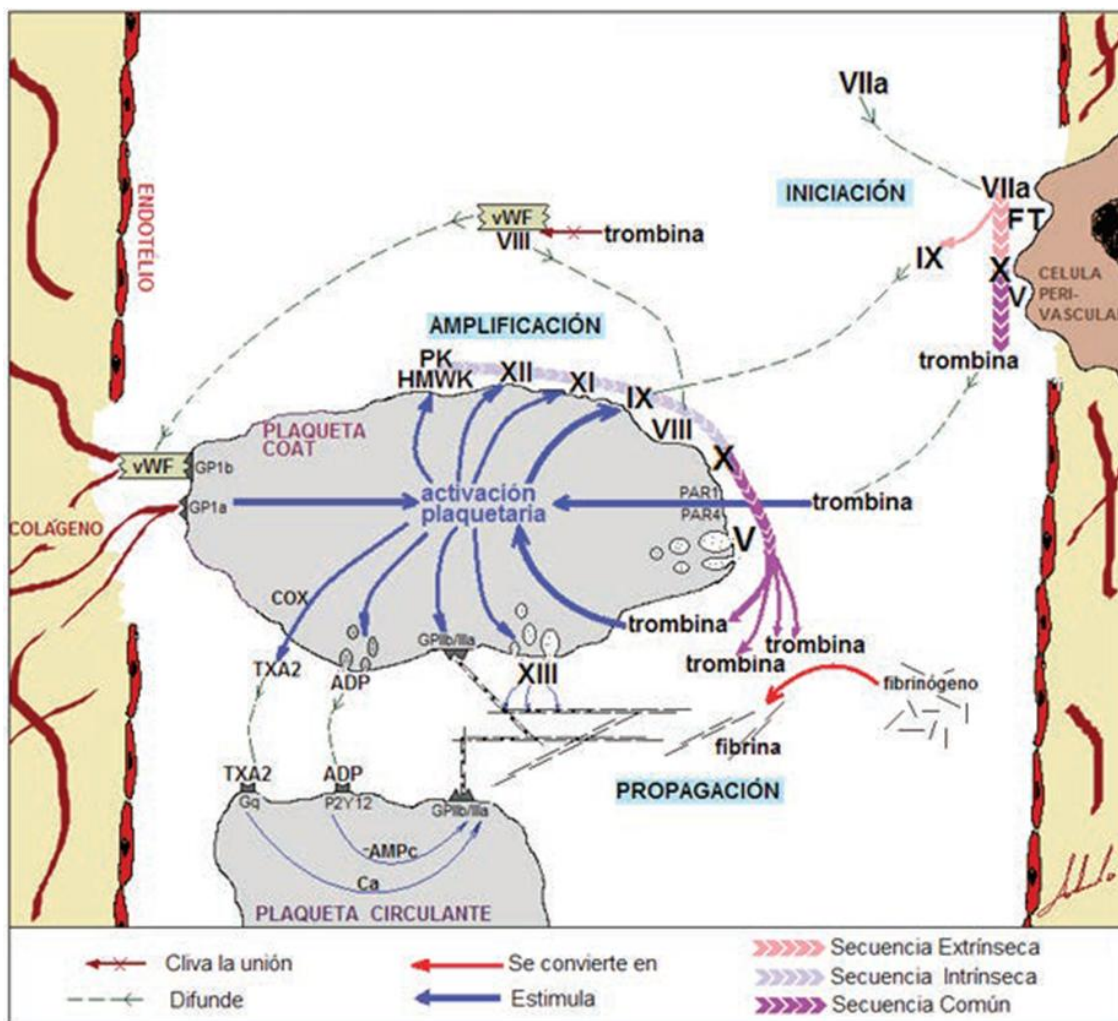


Figura 1.18. Fisiología molecular y celular de la coagulación (Alvarado Arteaga, 2013).

En la Figura 1.18 se representan los factores de coagulación como si actuaran de forma aislada, sin embargo en una secuencia lineal de activaciones, éstos se agrupan en complejos moleculares sobre la superficie plaquetaria, lo que facilita su interacción y aumenta la velocidad de las reacciones. Uno de éstos es el complejo “tenasa”, que activa el factor X y el otro es el llamado complejo “protrombinasa”, que agrupa al factor Xa y su cofactor, el Va, para formar trombina. (Alvarado Arteaga, 2013).

### 1.1.2.3. Propagación

Durante esta fase, el complejo *tenasa* (VIIIa, IXa, Ca<sup>2+</sup> y fospolípidos) cataliza la conversión de factor X a su forma activa Xa; la mayor parte de este factor se forma fisiológicamente a través de esta reacción la cual se cree es 50 veces más eficiente que la activación por medio del complejo FT/VIIa (Flores-Rivera *et al.*, 2014). El complejo

“protrombinasa” (Xa, Va,  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfolípidos) por su parte, cataliza a nivel de la superficie plaquetaria la conversión de protrombina en grandes cantidades de trombina (“explosión de trombina”) responsable de la transformación final del fibrinógeno a fibrina.

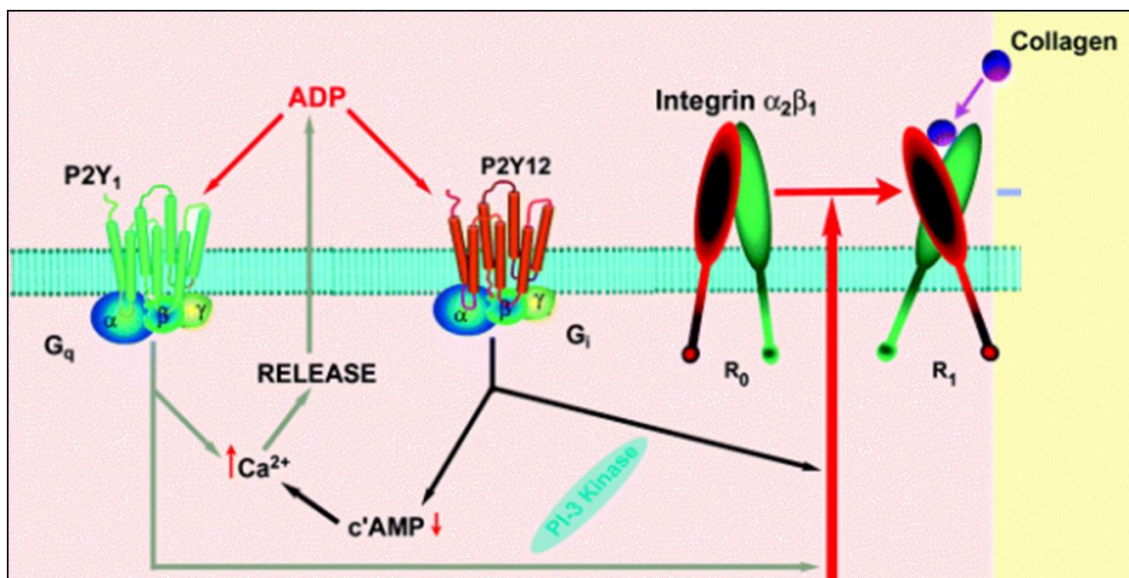
Inicialmente, la trombina cliva cuatro enlaces arginina-glicina específicos de los extremos amino-terminales de las cadenas  $\text{A}\alpha$  y  $\text{B}\beta$  del fibrinógeno, y así se liberan los fibrinopéptidos A y B y se producen cadenas que se ensamblan espontáneamente por enlaces no covalentes. El factor XIII, liberado de los gránulos alfa de las plaquetas y activado por trombina, es responsable de convertir estos enlaces a covalentes, añadiendo estabilidad al coágulo de fibrina (Alvarado Arteaga, 2013).

El complejo protrombinasa es 300.000 veces más activo que el factor Xa en catalizar la activación de protrombina (Páramo *et al.*, 2017). A su vez, cada plaqueta activada por trombina expresa en su superficie hasta 12.000 copias del receptor glicoproteico GPIIb/IIIa, responsable de adherir los polímeros de fibrina a la superficie plaquetaria. La activación plaquetaria induce la síntesis y secreción de sustancias que estimulan la agregación de otras plaquetas circulantes; en este sentido,  $\text{TXA}_2$  y ADP actúan de manera sinérgica. El tromboxano  $\text{A}_2$  tiene propiedades vasoconstrictoras que favorecen la formación del trombo debido a la disminución del flujo sanguíneo. El ADP actúa sobre los receptores  $\text{P}_2\text{Y}_1$  y  $\text{P}_2\text{Y}_{12}$  bloqueando la síntesis de adenosín-monofosfato cíclico (AMPC) y sintetiza otros mediadores intracelulares que, junto con el calcio (Murugappa and Kunapuli, 2006; Offermanns, 2006; Davì and Patrono, 2007), producen un cambio conformacional en el receptor  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  (GPIIb/IIIa) de las plaquetas circulantes, estimulando la unión de éstas a los polímeros de fibrina y la agregación plaquetaria (Alvarado Arteaga, 2013; de Queiroz *et al.*, 2017).

La activación de los receptores de ADP conduce, además a la activación de la integrina  $\alpha_2\beta_1$  mediante mecanismos de señalización interna (Jung and Moroi, 2001). Al activar a  $\alpha_2\beta_1$ , este efecto potencia la activación de la integrina  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  responsable de la agregación entre plaquetas (Fig 1.19.) (Broos *et al.*, 2011).

### 1.7.3. Fibrinólisis

La fibrinólisis es el último proceso de la hemostasia en el que se elimina la fibrina remanente con la finalidad de reparar el vaso y restablecer el flujo vascular (Dalmau, 2011). La eficiencia de la fibrinólisis es altamente influenciada por la estructura del coágulo, las isoformas del fibrinógeno, los polimorfismos, el grado de generación de trombina y el ambiente bioquímico en el que se desarrolla. En el estado fisiológico normal se establece un equilibrio, es decir, a la tendencia profibrinolítica se le opone una actividad antifibrinolítica,



**Figura 1.19.** Mecanismo propuesto para la activación de integrina  $\alpha_2\beta_1$  a través de la señalización interna de los receptores de ADP (Jung and Moroi, 2001).

de tal modo que sólo un adecuado balance entre ambas fuerzas dará lugar a un correcto funcionamiento del sistema fibrinolítico (Flores-Rivera *et al.*, 2014; Grimaldo-Gómez, 2017).

El efector final de la fibrinólisis es la plasmina, la cual digiere la fibrina dando lugar a los productos de degradación (PDF) y dímero D (DD). La plasmina es producida a partir de un precursor inactivo, el plasminógeno, por acción de dos activadores del plasminógeno: activador tisular (t-PA) y activador tipo urocinasa (u-PA). La regulación de los activadores tiene lugar por la acción de los Inhibidores del Activador del Plasminógeno (PAI), de los cuales el más relevante es el tipo 1 o PAI-1 (sintetizado en el endotelio vascular y en el hígado), mientras que la plasmina circulante es rápidamente inhibida por la  $\alpha_2$ -antiplasmina, ambos procesos evitan de este modo que ocurra una fibrinólisis sistémica (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005; Fay *et al.*, 2007; Rijken and Lijnen, 2009).

La fibrinólisis se inicia por el t-PA secretado desde el endotelio en respuesta a diversos estímulos (trombina, oclusión venosa, ejercicio físico, etc). Una vez liberado se une a los residuos de los aminoácidos básicos exhibidos en la superficie de la fibrina parcialmente degradada. Cuando el plasminógeno y el t-PA coinciden en la superficie del coágulo, se produce la conversión de plasminógeno a plasmina, y ésta degrada la fibrina (Fig .1.20.) (Rijken and Lijnen, 2009; Páramo *et al.*, 2017).

La trombina puede además activar otro inhibidor fibrinolítico, el inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI), el cual elimina residuos de lisina y arginina de la superficie de la fibrina y revierte la polimerización. Esta acción convierte la fibrina en PDF y DD, lo que

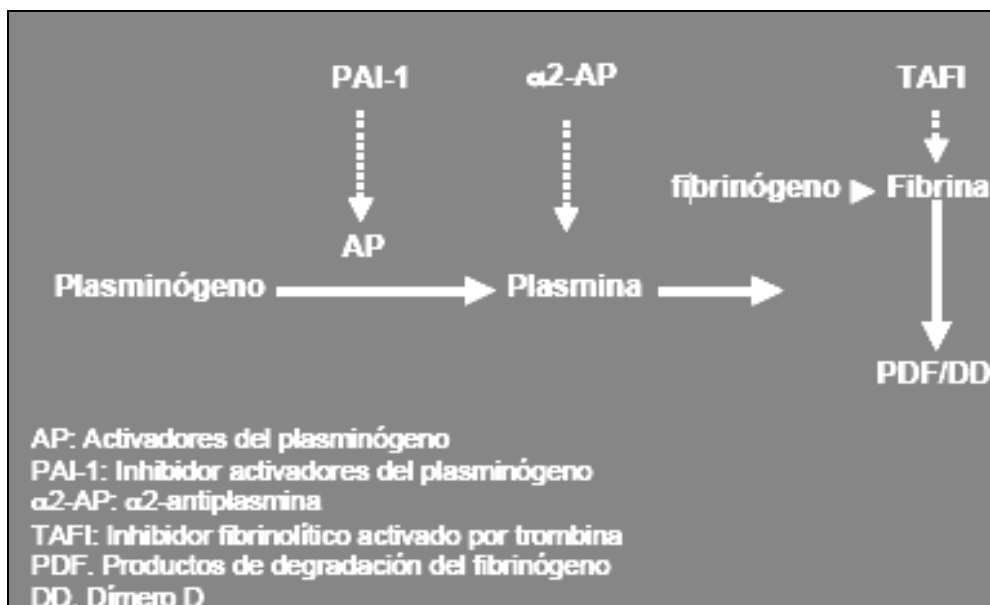


Figura 1.20. Fibrinólisis (Páramo *et al.*, 2017)

impide la unión del plasminógeno y ulterior degradación del coágulo (Fig .1.20.) (Nesheim and Bajzar, 2005; Grimaldo-Gómez, 2017; Páramo *et al.*, 2017). La fibrinólisis es esencial para deshacer los coágulos durante el proceso de cicatrización de heridas y remover los coágulos intravasculares que se pueden manifestar como trombosis (Flores-Rivera *et al.*, 2014).

### 1.8. Alteraciones de la hemostasia producto del envenenamiento ofídico

Con el propósito de controlar, inmovilizar y digerir sus presas muchas especies de animales han desarrollado la capacidad de inyectar o liberar secreciones venenosas. Cuando las personas están involucradas accidentalmente, los resultados pueden ser debilitantes o fatales. Los venenos de serpiente contienen una amplia gama de componentes que tienen efectos fisiopatológicos sobre tejidos, el sistema cardiovascular, la permeabilidad vascular y sobre las funciones renal y hemostática (Hutton and Warrell, 1993; Marsh and Williams, 2005).

En los últimos años, ha cobrado importancia el conocimiento acerca de la manera en que las toxinas, tanto enzimáticas como no enzimáticas, afectan el sistema hemostático. La hemorragia fue reconocida como una manifestación temprana, frecuente y relevante en la descripción de las principales características clínicas de los envenenamientos por mordedura de serpientes, principalmente de la familia *Viperidae*, identificándose al sangrado sistémico como una de las consecuencias más graves (Gutiérrez *et al.*, 2016). Estas toxinas



actúan sobre la cascada de la coagulación, la función plaquetaria y la fibrinólisis, sin olvidar el daño directo que provocan algunas enzimas sobre los componentes estructurales de los vasos sanguíneos. Esto deriva en trastornos de la coagulación cuya magnitud y gravedad están estrechamente relacionados con la diversidad de la composición del veneno entre las especies de serpientes (Sartim *et al.*, 2017).

Los componentes de los venenos de serpientes que afectan la hemostasia se han clasificado en virtud del efecto global que producen en: proteasas pro-coagulantes, enzimas fibrinolíticas, activadores de la agregación de plaquetas, activadores de la agregación de plaquetas, inhibidores de la agregación de plaquetas y componentes que afectan el endotelio vascular, los cuales se describen a continuación en detalle (Kamiguti and Sano-Martins, 1995; Gutiérrez *et al.*, 2005)

### 1.8.1. Proteasas pro-coagulantes

Como se mencionó anteriormente, los factores de la coagulación sanguínea circulan inactivos (como zimógenos) y se activan luego de la ruptura de un vaso sanguíneo. La activación se produce a través de clivajes proteolíticos específicos de una manera secuencial que conduce finalmente a la formación de la malla de fibrina, la cual detiene la fuga de sangre. Todos los componentes pro-coagulantes de los venenos de serpientes caracterizados hasta la fecha son proteasas. Las metaloproteinasas de veneno de serpiente activan zimógenos específicos, como ser el precursor del factor VII, el factor X, el factor V y la protrombina (McCleary and Kini, 2013) (Fig. 1.21.). Las serinoproteasas activan varios zimógenos de forma inespecífica (Kamiguti and Sano-Martins, 1995; Marsh and Williams, 2005; Kini and Koh, 2016).

En el caso particular de la activación de la protrombina, se observó que aquellos componentes del veneno capaces de clivar a la protrombina pueden dividirse en cuatro grupos según la naturaleza de la enzima y la dependencia de factores: Grupos A, B, C y D (Joseph and Kini, 2001; Kini, 2005). Los grupos A y B son metaloproteinasas. Pertenecen al primer grupo aquellas SVMPs que no requieren cofactores para la activación de protrombina, como calcio, fosfolípidos u otras proteínas, mientras que el grupo B está constituido por activadores de protrombina factor dependiente. Los grupos C y D son SVSPs. Los activadores de protrombina del grupo C se asemejan al complejo protrombinasa (Xa-Va), mientras que los activadores del Grupo D son estructuralmente y funcionalmente similares al factor Xa (Kini, 2005).



naturaleza serinoproteasa) poseen un modo de acción similar a la trombina pero no comparten todas sus propiedades. Según como actúan pueden clasificarse en tres categorías: *SVTLEs-AB*, enzimas que, como la trombina, desencadenan la coagulación del fibrinógeno liberación hidrolítica de ambos fibrinopéptidos A y B (Bell, 1997); *SVTLEs-A*, caracterizadas por escindir solo la cadena  $A\alpha$  generando fibrinopéptido A y *SVTLEs-B* que actúan solo sobre la cadena  $B\beta$  induciendo la formación del fibrinopéptido B (Castro *et al.*, 2004). Las SVTLEs no activan el factor XIII, al contrario, tienden a degradarlo (McCleary and Kini, 2013), por lo que los coágulos formados producidos *in vitro* son friables, translúcidos y fácilmente degradados. El fracaso en la formación de un coágulo estabilizado por el factor XIII conduce fácilmente a su destrucción por parte del sistema fibrinolítico y la eliminación efectiva del fibrinógeno del plasma. Aunque los inhibidores clásicos de las serinoproteasas inhiben las enzimas tipo trombina, éstas no son inhibidas por los inhibidores de trombina como la ATIII (Pirkle and Stocker, 1991; Bell, 1997; Kini and Koh, 2016).

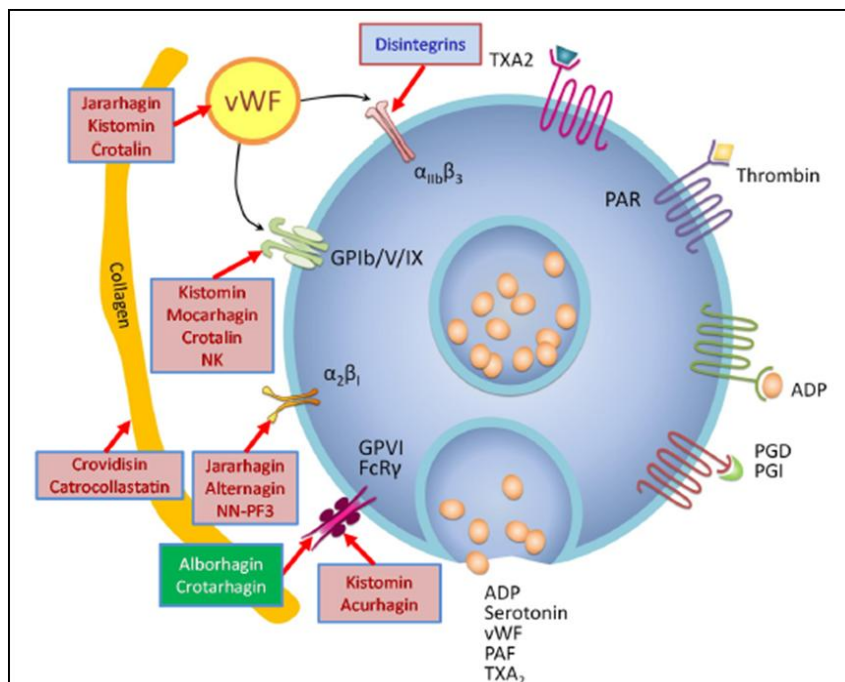
### 1.8.3. Activadores de la agregación de plaquetas

Un pequeño número de componentes tienen efectos agregante sobre las plaquetas. Algunas SVSPs inducen la agregación plaquetaria dependiente del calcio, debido a que estimulan la liberación de ADP de plaquetas. Algunas SVTLEs también son capaces de estimular la agregación, sólo que requieren la presencia de fibrinógeno. Las fosfolipasas  $A_2$  de veneno de serpientes ( $PLA_2$ ) son un grupo de enzimas que hidrolizan específicamente fosfolípidos en la posición sn-2 liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos. Estas enzimas pueden activar la agregación de plaquetas mediante el clivaje de los fosfolípidos presentes en la membrana de las plaquetas, liberando ácido araquidónico y sus metabolitos tales como  $TXA_2$  (Kini and Koh, 2016; de Queiroz *et al.*, 2017).

Por último otros componentes de los venenos de serpientes, L-aminooxidasas (LAAOs) y las Lecitinas tipo-C (CTL), son capaces de agregar a las plaquetas, pero aún se desconocen sus mecanismos de acción. Asimismo, algunas enzimas de este tipo ejercen un efecto contrario, es decir, inhiben la agregación plaquetaria (Kini and Koh, 2016; de Queiroz *et al.*, 2017).

### 1.8.4. Inhibidores de la agregación plaquetaria

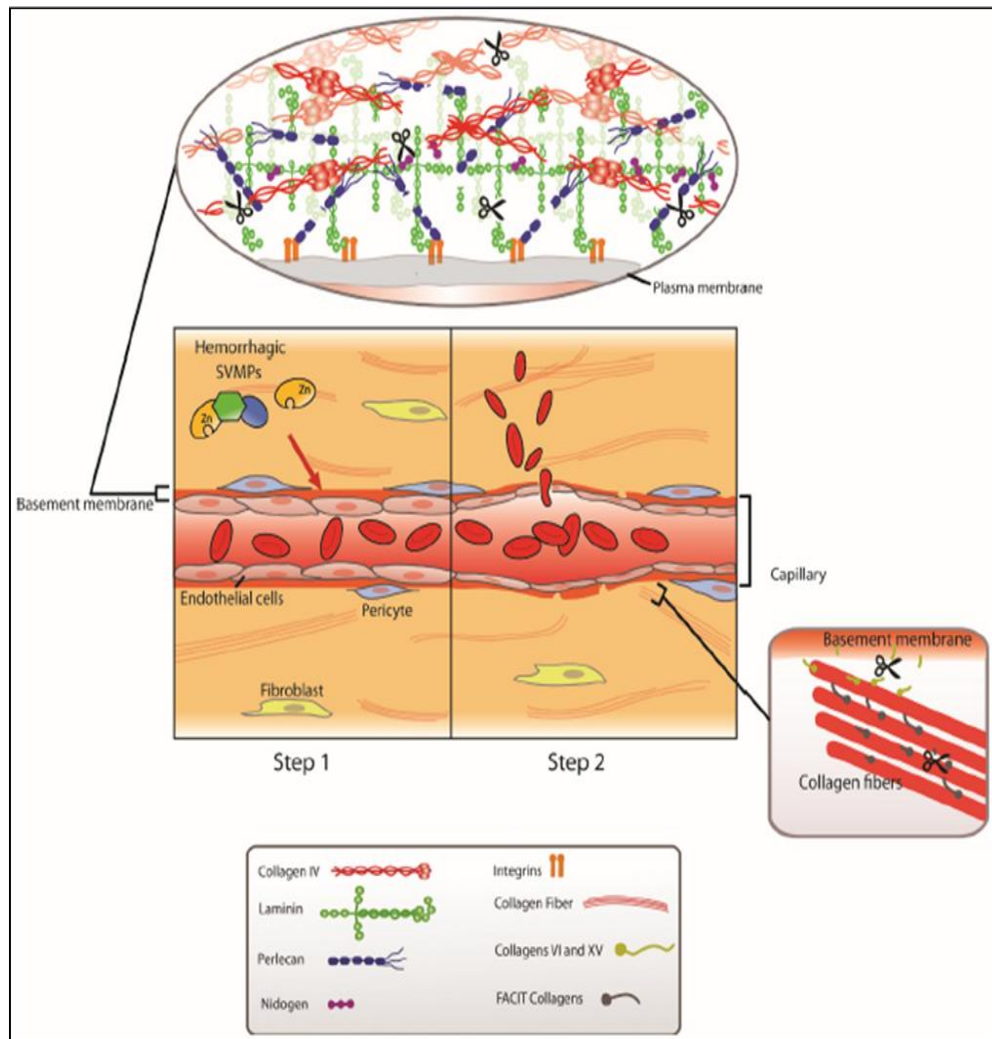
Existe un grupo de  $PLA_2$  que son capaces de inhibir la agregación de plaquetas mediante mecanismos independientes de catálisis, o clivando el ácido araquidónico liberado luego de su acción sobre fosfolípidos de la membrana plaquetaria.



**Figura 1.22.** SVMPs que afectan la agregación plaquetaria. La activación o inhibición de la agregación plaquetaria se muestra en recuadros verdes o rojos, respectivamente. El recuadro azul corresponde a desintegrinas, que tiene una función antiagregante plaquetario (Kini and Koh, 2016).

Las SVMPs por su parte, afectan la función de las plaquetas mediante una variedad de mecanismos de acción. Pueden actuar a través de su acción proteolítica sobre receptores específicos de plaquetas o sobre integrinas implicadas en la hemostasia, activando o inhibiendo agregación de plaquetas. Algunas SVMPs son fuertes inhibidores debido a su acción hidrolítica sobre el vWF y sobre la subunidad  $\beta$  de la integrina  $\alpha_2\beta_1$  (Fig 1.22.) (Markland, 1998; Kamiguti, 2005; Pinyachat *et al.*, 2011; Sajevic *et al.*, 2011).

Sin embargo, es el dominio similar a desintegrina/rico en cisteína (dominio-DC, del inglés *disintegrin-like/cystein rich*) presente en algunas SVMPs (clase P-III, clasificación de SVMPs 1.4.1.) el que interactúa principalmente con las plaquetas. El dominio-DC formando parte tanto de la estructura o como moléculas individuales generadas por autoproteólisis de las SVMPs y miembros de la familia de las desintegrinas de los venenos de serpientes, son fuertes antagonistas de la agregación plaquetaria. En general, la inhibición de la agregación plaquetaria causada por desintegrinas, con motivo RGD, depende de su capacidad para bloquear la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  e impedir la unión del fibrinógeno/fibrina. Las proteínas-DC obtenidas por autoproteólisis de SVMPs P-III presentan un motivo “no-RGD”, el que no es capaz de unirse a la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , pero si a la cadena  $\alpha_2A$  de la integrina  $\alpha_2\beta_1$ , responsable



**Figura 1.23.** Modelo de dos pasos para explicar el mecanismo de acción de las SVMPs hemorrágicas. En el primer paso (Step 1), las SVMPs se unen e hidrolizan componentes estructurales de la membrana basal de los vasos capilares, particularmente el colágeno tipo IV. En la segunda etapa (Step 2), las fuerzas hemodinámicas normales inducen una distensión de la pared debilitada, hasta que el capilar se interrumpe con la extravasación de sangre. (Escalante *et al.*, 2011).

de mediar la adhesión al colágeno, y de esta forma interferir en la agregación de las plaquetas (Kamiguti *et al.*, 1996).

### 1.8.5. Componentes que afectan el endotelio vascular

Diversos estudios han demostrado que las células diana de las SVMPs son los componentes de la membrana basal (Fox and Serrano, 2010). Las metaloproteinasas hemorrágicas son las principales responsables de generar el sangrado característico de los

accidentes ofídicos ocasionados por el género *Bothrops* (“yaranás”), ya sea por su efecto catalítico como por su dominio desintegrina-rico en cisteína.

Respecto a su efecto hemorrágico, las SVMPs especialmente las de la clase PIII, hidrolizan los componentes sostén de la membrana de los capilares, como laminina, perlecan, particularmente colágeno tipo IV, entre otros, causando debilitamiento de la estabilidad mecánica de los microvasos (Kamiguti and Sano-Martins, 1995; Escalante *et al.*, 2011). Como consecuencia de ello, las fuerzas que operan en el sistema hemodinámico causan distensión y, eventualmente, la ruptura de la pared capilar, resultando en la extravasación de la sangre (Fig. 1.23) (Escalante *et al.*, 2011; Gutiérrez *et al.*, 2016). Éste fenómeno no sólo se observa a nivel local, sino que las SVMPs P-III son capaces de producir alteraciones hemorrágicas a nivel sistémico (resisten la inhibición por parte de la  $\alpha$ -2-macroglobulina, no así la clase P-I) (Kamiguti *et al.*, 1991; Escalante *et al.*, 2003; Gay *et al.*, 2009), que puede progresar a shock cardiovascular e hipovolemia con alteración de la función renal (Warrell, 2010).

Las desintegrinas, por su parte, interactúan con las integrinas de membrana desencadenando la inhibición de la adhesión celular a componentes de la matriz extracelular (Souza *et al.*, 2000; McLane *et al.*, 2004; Selistre-de-Araujo *et al.*, 2010; Macedo *et al.*, 2015).

### 1.9. Importancia del tema abordado en esta tesis

Dado el grado de afectación que inducen los venenos botrópicos en la hemostasia, ha cobrado interés el conocimiento acerca de la manera en que las toxinas afectan el adecuado funcionamiento de la circulación sanguínea y el sistema vascular. Teniendo en cuenta su modo de acción y a partir de la información reunida de otros venenos, es de prever que las proteinasas del veneno de *B. alternatus* sean las principales involucradas en las alteraciones hemostáticas.

Este veneno está constituido mayoritariamente por enzimas con actividad proteolítica (43% SVMPs y 24% SVSPs) ampliamente caracterizadas, sin embargo, poco se sabe de la fisiopatología de la hemostasia que desencadenan, bajo una visión integrada. Así resultó atractivo, y a la vez necesario, conocer la contribución de cada familia de proteinasas en los trastornos hemostáticos inducidos por el envenenamiento de esta especie, para un mejor abordaje del tratamiento y control de la intoxicación, como de sus secuelas.

Paralelamente, discernir el rol de cada una de ellas, proporcionaría información útil en el campo de la farmacología experimental, y, en particular, en la medicina terapéutica, ya que contribuirían al mejoramiento de los sueros antiofídicos a través de la reducción en la carga proteica.

*Capítulo 2*  
*Objetivos*



## **Objetivos**

### **Objetivo general**

✓ Conocer el rol de las metaloproteinasas en la acción del veneno de *Bothrops alternatus* sobre la hemostasia a fin de reunir información destinada a mejorar las formulaciones de inmunoterápicos a través de la reducción de la carga proteica de los sueros convencionales.

### **Objetivos específicos**

✓ Comprender el rol de las metaloproteinasas en la alteración de la hemostasia desarrollada durante el envenenamiento botrópico y la acción sinérgica con los otros componentes tóxicos presentes en el veneno, a través del empleo de anticuerpos obtenidos contra una metaloproteinasa hemorrágica (baltergina).

✓ Evaluar la acción de una metaloproteinasa hemorrágica y de su fragmento de autólisis sobre la agregación plaquetaria y la adhesión celular.

*Capítulo 3*  
*Materiales y Métodos*

## **Materiales y Métodos**

### **3.1. Ensayos preliminares**

#### **3.1.1. Extracción de veneno de *Bothrops alternatus***

#### **3.1.2. Obtención y caracterización de baltergina**

3.1.2.1. Purificación de baltergina

3.1.2.2. Análisis 2D PAGE

3.1.2.3. Identificación de secuencias parciales mediante digestión trípica y técnicas de análisis proteómicos.

#### **3.1.3. Obtención y caracterización de baltergina-DC**

3.1.3.1. Autoproteólisis de baltergina

3.1.3.2. Purificación del fragmento baltergina-DC

3.1.3.3. Estimación de la masa molecular por SDS-PAGE

3.1.3.4. Determinación de la secuencia aminoterminal

#### **3.1.4. Obtención de Inmunoglobulinas G anti-baltergina**

3.1.4.1. Protocolo de inmunización

3.1.4.2. Purificación de la fracción IgG del suero de conejo

### **3.2. Naturaleza de las proteasas presentes en el veneno de *B. alternatus***

#### **3.2.1. Actividad proteolítica sobre azocaseína**

#### **3.2.2. Actividad proteolítica sobre BapNa**

### **3.3. Participación de las proteasas en la hemorragia exhibida por el veneno**

#### **3.3.1. Estudios de la hemorragia en presencia de anticuerpos e inhibidores**

#### **3.3.2. Estudios de la interacción de proteasas del veneno de *B. alternatus* sobre células endoteliales**

3.3.2.1. Estudio de la actividad citotóxica

3.3.2.2. Estudio de adhesión celular

### **3.4. Hemostasia primaria**

#### **3.4.1. Recuento de plaquetas**

#### **3.4.2. Inhibición de la agregación plaquetaria**

#### **3.4.3. Tiempo de sangría**

### **3.5. Hemostasia secundaria**

#### **3.5.1. Determinación del TC sobre plasma y fibrinógeno**

#### **3.5.2. Determinación de fibrinógeno plasmático**

### **3.6. Análisis estadístico**

### 3.1. Ensayos preliminares

#### 3.1.1. Extracción de veneno de *B. alternatus*

El pool de veneno se obtuvo a partir de varios especímenes adultos de *Bothrops alternatus* capturados en la región nordeste de Argentina y mantenidos en el Serpentario del “Parque Aguará” (San Cosme, Corrientes). Inmediatamente después de la extracción se desecó y conservó a -20° C hasta el momento de ser utilizado. Para la realización de los ensayos el veneno se disolvió en el tampón correspondiente. El material insoluble se separó por centrifugación, obteniéndose un sobrenadante límpido que se destinó a los ensayos.

#### 3.1.2. Obtención y caracterización de baltergina

##### 3.1.2.1. Purificación de baltergina

El aislamiento de la enzima se llevó a cabo en dos etapas cromatográficas según técnica descrita previamente (Gay *et al.*, 2005). La primera etapa consistió en una cromatografía de intercambio iónico, donde se empleó una columna de DEAE-Celulosa de 1 x 5 cm previamente equilibrada con tampón de fosfatos 10 mM, pH 7,2. Treinta mg de veneno se resuspendieron en 1 mL del tampón y se centrifugaron para remover material insoluble. El sobrenadante fue cargado en la columna y la elución de los componentes básicos se llevó a cabo con el mismo tampón; se colectaron fracciones de 1 mL. Luego, se realizó una elución en gradiente en etapas utilizando el mismo tampón con el agregado de 0,1 y 0,2 M de NaCl, para aumentar la fuerza iónica; se recogieron fracciones de 5 mL y 1 mL, respectivamente. Se reunieron las fracciones de interés y se concentraron en un tubo AMICON de 30 kDa hasta un volumen final de 200 µL en centrífuga refrigerada, una alícuota (conteniendo 10 µg de proteína) fue tratada con *buffer* de muestra 2x conteniendo 2-mercaptoetanol (2-ME) y luego sometido a electroforesis SDS-PAGE. El resto del concentrado fue sometido a una cromatografía de filtración por gel utilizando una columna de Sephadex G75 de 0,9 x 80 cm. Con *buffer* de fosfatos 10 mM, pH 7,2 fue realizada la elución y se recolectaron fracciones de 0,60 mL. A cada fracción se midió la absorbancia a 280 nm para detección de proteínas. Las fracciones que presentaron actividad proteolítica y hemorrágica y nula actividad hemolítica indirecta se estudiaron mediante SDS-PAGE y luego se concentraron para los ensayos posteriores.

##### 3.1.2.2. Análisis 2D-PAGE

La electroforesis bidimensional se llevó a cabo según técnica descrita por (Carnielli *et al.*, 2017) en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular Aplicada (LBBM) de la Universidad Federal de San Carlos (UFSCar), SP, Brasil. En resumen, 50 µg de baltergina

fueron mezcladas con 50  $\mu$ L de una solución que contiene 8 M de urea, 2% de Triton X - 100, 2% de CHAPS, 0,5% gel de gradiente de pH inmovilizado (IPG) pH 3-10 no lineal (NL, (GE Healthcare), 65 mM de ditiotreitól (DTT) y azul de bromofenol al 0,01%. La mezcla se agitó durante 10 min. a temperatura ambiente. Luego se agregó 300  $\mu$ L de una solución rehidratante (8 M urea, Triton X- 100 al 2%, IPG al 0,5% pH 3 - 10 NL, DTT 65 mM y 0,01%, azul de bromofenol) y se llevó a agitación por 5 minutos. Para eliminar los precipitados, se centrifugó la solución durante 30 min a 13.000 rpm. Doscientos diez  $\mu$ L del sobrenadante fueron cargados en 13 cm de *IPG-strips* pH 3-10 NL (GE Healthcare). En la primera dimensión, las proteínas fueron separadas en una cuba para isoelectroenfoque IPGphore (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) durante toda la noche a 100v. Luego las tiras se equilibraron en dos etapas consecutivas durante 15 minutos cada una, primero en *buffer* de equilibrio (Tris / HCl 0,05 M, pH 8,8, glicerol al 30%, 6 M urea, SDS al 4%) conteniendo DTT al 2% y posteriormente en *buffer* de equilibrio con 2,5% de iodoacetamida. Se cortaron 1 cm los extremos de las tiras de isoelectroenfoque y se almacenaron a -20°C hasta que se utilizaron para la electroforesis de segunda dimensión. Para ésta segunda dimensión se realizó una SDS-PAGE 12% (160 x 160 x 1,0 mm) usando Hoefer™ SE600 system (GE Healthcare) siguiendo las siguientes condiciones de funcionamiento: 20 mA por gel durante 10 min y 40 mA por gel durante 4-5 h a 12°C. Posteriormente los geles fueron sometidos a tinción argéntica.

### 3.1.2.3. Identificación de secuencias parciales mediante digestión trípica y técnicas de análisis proteómicos

Este ensayo se realizó mediante modificaciones de la técnica descrita por (Shevchenko *et al.*, 1996). Las muestras se prepararon en el LBBM según el protocolo de digestión en solución del Laboratorio de Espectrometría de Masas perteneciente al Laboratorio Central de Biología Molecular Estructural (CeBIME) de la UFSCar, Brasil. El tratamiento previo de las muestras (100 $\mu$ g/200 $\mu$ L) se llevó a cabo en una serie de pasos. En primer lugar se sometió a baltergina a reducción por media hora con una solución de DTT (10 mM). Posteriormente se adicionó una solución de iodoacetamida (IAA) 50 mM y se dejó reaccionar por 30 min al resguardo de la luz. Una vez cumplido el tiempo de incubación se agregó la tripsina (20 $\mu$ g/1000 $\mu$ L en bicarbonato de amonio 50 mM) en una proporción 1:50 (tripsina:metaloproteinasas) y se dejó reaccionar durante 16 h a 37°C. La reacción se detuvo con el agregado de ácido fórmico (concentración final 1%). Las muestras digeridas fueron conservadas en frío y trasladadas a las instalaciones del CeBIME para que puedan ser procesadas (espectrómetro: micrOTOF-QII- Bruker Daltonics). El análisis de los datos se

hizo en comparación con las secuencias aminoacídicas ya conocidas de jararagina (Paine *et al.*, 1992) y botropasina (Assakura *et al.*, 2003) y por último se sometieron las mismas a un estudio de alineamiento mediante el programa *Clustal O*.

### 3.1.3. Obtención y caracterización de baltergina-DC

#### 3.1.3.1. Autoproteólisis de baltergina

##### - Autoproteólisis en función del pH.

Para realizar el estudio de autoproteólisis de baltergina en función del pH se realizó la incubación a 37°C a diferentes pHs (3.0, 5.0, 7.0, 8.0 y 9.0) por 18 h. Inmediatamente después de la incubación alícuotas de las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE 10%, previo agregado de *buffer* de muestra conteniendo 2-ME. Se determinó además la actividad proteolítica residual sobre azocaseína de la mezcla de reacción, luego de la incubación. Para los valores de pHs extremos, 3 y 9, adicionalmente se ensayó la Autoproteólisis a una temperatura de incubación de 4°C por el mismo período de tiempo.

##### - Autoproteólisis en función de la temperatura

Baltergina en tampón de fosfatos 10 mM pH 7,2 fue sometida a autoproteólisis por 18 h variando la temperatura de incubación. Las temperaturas ensayadas fueron las siguientes: 4, 25, 37 y 45 °C. Inmediatamente después de la incubación, las muestras fueron tratadas y analizadas como se describe en el ítem anterior.

##### - Autoproteólisis en función del tiempo

La enzima se incubó a 37°C y pH 7,2 a diferentes tiempos: 5 y 30 min, 2, 4, 6, 18, 24, 48 y 96 h. Luego de cada periodo de incubación las muestras recibieron el mismo tratamiento que las demás muestras.

#### 3.1.3.2. Purificación del fragmento baltergina-DC

El aislamiento de baltergina-DC (fragmento estable y principal producto obtenido por la autoproteólisis de baltergina) se llevó a cabo mediante una cromatografía de exclusión molecular usando un ÄKTA Explorer 10 (Pharmacia). Este ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular (LBBM, UFSCar, San Carlos, San Pablo, Brasil). La mezcla de autoproteólisis se cargó en una columna de Superdex 75 (HE), previamente equilibrada y eluída con *buffer* de fosfatos 10 mM pH 7,2. Se recolectaron fracciones de 250 uL. Para detectar aquellas fracciones que contenían componentes proteicos fue medida la absorbancia a 280 nm y luego, fue realizado un análisis

electroforético por SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras. Con el fin de verificar la ausencia de actividad del fragmento de autoproteólisis, se llevó a cabo la determinación de la actividad proteolítica residual sobre azocaseína.

#### 3.1.3.3. Estimación de la masa molecular por SDS-PAGE

Se llevó a cabo según el método de Laemmli usando geles de poliacrilamida al 12% (m/v) (Laemmli, 1970). Los mismos fueron teñidos con solución de *Coomassie Blue* R-250 al 0,1% en solución de metanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) y posteriormente desteñidos con solución decolorante (ácido acético 10%).

#### 3.1.3.4. Determinación de la secuencia aminoterminal

Este ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular (LBBM, UFSCar, San Carlos, San Pablo, Brasil). Una vez aislada baltergina-DC, la misma se sometió a una SDS-PAGE para luego ser transferida a una membrana de polivinildifluoruro (PVDF). Se determinó la secuencia amino-terminal (N-terminal) por secuenciación proteica utilizando el método de Edman en un secuenciador PPSQ-33A (*Shimadzu*). Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias disponibles en el banco de datos del NCBI, mediante el programa *Clustal O*.

### 3.1.4. Obtención de inmunoglobulinas G anti-baltergina (anti-balt)

#### 3.1.4.1. Protocolo de inmunización

Baltergina, en una cantidad de 0,1 a 0,5 mg, se emulsificó con adyuvante completo de Freud y se inoculó en conejos hembras (2–2.5 kg) por vías intramuscular (i.m.) y subcutánea (s.c.). A los 15 y 30 días se administraron refuerzos de la enzima, utilizando esta vez el adyuvante incompleto de Freud. La presencia de anticuerpos anti-proteasas se testeó por el test de inmunodifusión. El sangrado se realizó a los 45 días, se separó el suero por centrifugación y alícuotas se conservaron a -20 °C. En total, las 3 inoculaciones realizadas cada 15 días sumado al sangrado a los 45 días, constituye un ciclo de inmunización.

#### 3.1.4.2. Purificación de la fracción IgGs del suero de conejo

A partir del suero hiperimmune obtenido de conejos se purificaron las inmunoglobulinas correspondientes a la fracción IgGs. En primer lugar se disolvió 0,5 mL de suero en 3,5 ml de *buffer* de unión (fosfato de sodio 20 mM, pH 7,00) y se sometió a filtración (membrana PVDF, poro 0,45  $\mu$ m, Millipore). La disolución de suero filtrada se centrifugó en un tubo concentrador con filtro de 100 kDa (Amicon® 4 mL, Millipore) hasta el volumen original de

suero, y se descartó el filtrado. El suero concentrado fue centrifugado por 5 min a 10.000 rpm. Se utilizó el sobrenadante para sembrar a la columna de afinidad Hitrap Protein G HP (GE Healthcare) previamente equilibrada con *buffer* de fosfatos 10 mM pH 7,0 en un sistema ÄKTAprime plus (GE Healthcare). La elución se llevó a cabo con el mismo *buffer* y las proteínas IgG pegadas a la columna fueron eluidas posteriormente con *buffer* de glicina-HCl 0,1M pH 2,5 e inmediatamente neutralizadas con *buffer* Tris 1M pH 9,0. La pureza y homogeneidad se constató mediante SDS-PAGE 10%, con y sin el agente reductor 2-ME. La concentración proteica de la fracción IgGs se determinó mediante el método de Biuret. La calidad de los mismos se testeó mediante Western blot donde se ensayaron veneno de *B. alternatus* y la fracción de baltergina previamente incubada 2 hs a 37°C en *buffer* de fosfatos 10 mM pH 7,2 a fin de ensayar si el anticuerpo específico era capaz de reconocer además a los productos de autoproteólisis

### 3.2. Naturaleza de las proteasas presentes en el veneno de *B. alternatus*

Aquellas muestras que fueron pre-incubadas con inhibidores (veneno o baltergina-EDTA-Na<sub>2</sub>, veneno-PMSF y veneno-EDTA-Na<sub>2</sub>-PMSF) debieron ser sometidas a un proceso que permita la eliminación del exceso de inhibidor con el propósito que no interfiera en los ensayos. Para ello, el veneno o baltergina fueron incubados con el inhibidor de interés por 1 h a 37°C. El exceso del agente neutralizante fue eliminado mediante una cromatografía de exclusión molecular (*Sephadex G-25*) y se recolectaron las fracciones correspondientes a la muestra proteica, parte de las cuales estaba unida al inhibidor, que eluye en primera instancia. Se descartaron las fracciones subsiguientes que contenían el inhibidor libre. Posteriormente se ensayó la actividad proteolítica sobre azocaseína o BApNa a fin de comprobar el bloqueo de la proteasa de interés.

#### 3.2.1. Actividad proteolítica sobre azocaseína

##### 3.2.1.1. Neutralización con IgG anti-balt.

Se pre-incubó el veneno (1 mg/mL) con IgGs (relación mg veneno/mg IgG: 1/20) a 37°C por 30 min. Se determinó la actividad proteolítica sobre azocaseína según técnica descrita previamente (Wang and Huang, 2002), empleando como control de 100% de actividad veneno disuelto en PBS (veneno/PBS). Se agregaron 25 µL de las mezclas pre-incubadas (veneno/IgG; veneno/PBS) a 142 µL de solución de azocaseína (5 mg/mL) disuelta en tampón A (Tris-HCl 0,1 M; CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM; NaN<sub>3</sub> 0,02% (m/v); pH 8,0). La mezcla se incubó a 37°C durante 90 min, y la reacción se detuvo mediante la adición de 355 µL de ácido tricloroacético al 5% (m/v). Luego de 30 min a Temperatura ambiente, se centrifugó a 13.100



g por 5 min, se tomaron 100  $\mu$ L del sobrenadante y se agregó igual volumen de NaOH 0,5 M. Finalmente, se midió la absorbancia a 450 nm en lectora de microplacas (Go-Multiskan Thermo UV-visible).

#### 3.2.1.2. Neutralización con inhibidores.

Se realizó el mismo ensayo descrito en el ítem anterior sólo que pre-incubando el veneno con un inhibidor de metaloproteinasas ácido etilendiaminotetraacético disódico (EDTA- $\text{Na}_2$ ) 5mM y un inhibidor de serinoproteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 5mM, en lugar de los anticuerpos.

### 3.2.2. Actividad proteolítica sobre BApNA

#### 3.2.2.1. Neutralización con IgG anti-balt.

La actividad serinoproteinasa fue ensayada sobre el sustrato cromogénico N-benzoil-arginina-p-nitroanilida (BApNA) según modificaciones de la técnica descrita por Sant'Ana *et al.*, 2008. El veneno (2mg/mL) fue pre-incubado 30 min a 37°C con IgGs (relación mg veneno/mg IgG: 1/20) empleando como control 100% de actividad veneno disuelto en PBS. Brevemente, 10  $\mu$ l de cada muestra pre-incubada se enfrentó a 200  $\mu$ l de BAPNA 7,8 mM (en 13% de dimetilsulfoxido, concentración final 1 mM) a 30°C, y se midió la absorbancia a 410 nm a diferentes tiempos durante 50 min.

#### 3.2.2.2. Neutralización con inhibidores.

Se realizó el mismo ensayo descrito en el ítem anterior sólo que pre-incubando el veneno con un inhibidor de SVMPs, EDTA- $\text{Na}_2$  (5mM) y un inhibidor de SVSPs, PMSF (5mM), en lugar de los anticuerpos.

## 3.3. Participación de las proteasas en la hemorragia exhibida por el veneno

### 3.3.1. Estudios de la hemorrágica en presencia de anticuerpos e inhibidores

#### 3.3.1.1. Neutralización con IgG anti-baltegrina.

Se evaluó la capacidad neutralizante de los anticuerpos toxino-especificos sobre la actividad hemorrágica exhibida por el veneno entero. Para ello se pre-incubó veneno con IgGs en una relación 1/20 ( $\mu$ g veneno/  $\mu$ g IgG) durante 30 min a 37°C empleando como control de hemorragia veneno disuelto en PBS. La cantidad de veneno empleada fue dos veces la dosis hemorrágica mínima (DHM: cantidad de veneno que induce un halo hemorrágico de 10 mm de diámetro). La actividad hemorrágica se determinó mediante el método reportado por Gutiérrez *et al.*, 1985. Se inyectaron 100  $\mu$ L de la muestra (o control)

por vía intradérmica en la región abdominal de ratones macho de la cepa CF-1 ( $20 \pm 2$  g de peso corporal). A las 2 h se removieron las pieles y se observaron las áreas hemorrágicas sobre la superficie interna de la piel.

#### 3.3.1.2. Neutralización con inhibidor.

Se realizó un ensayo equivalente al descrito en el ítem anterior incubando las muestras previamente con EDTA- $\text{Na}_2$  y PMSF, ambas en una concentración 5 mM.

### 3.3.2. Estudios *in vitro* de la interacción de proteasas del veneno de *B. alternatus* sobre células endoteliales

#### 3.3.2.1. Línea Celular t-End

La línea celular t-End es una línea establecida de células endoteliales de origen capilar murino transformadas por poliomavirus (Bussolino *et al.*, 1991). Las células se mantuvieron de rutina en Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) (GIBCO-Invitrogen) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (Natocor) con el agregado de 5% de suero fetal bovino, L-Glutamina (29,2 mg/mL), Penicilina (10,000 unidades/mL) y Estreptomina (10,000 dg/mL) (GIBCO-Invitrogen) como antibióticos.

#### 3.3.2.2. Ensayos de citotoxicidad

Las células resuspendidas se sembraron en placas de 96 pocillos, aproximadamente  $2 \times 10^4$  células por pocillo, en el mismo medio de crecimiento (DMEM-SFB 5). En los ensayos realizados, al alcanzar la monocapa un 80% de confluencia, se retiró el medio de cultivo y se adicionó a las células veneno (100ug/mL) y veneno-EDTA- $\text{Na}_2$  previa eliminación del exceso de agente quelante por medio de una columna *Sephadex* G-25. Luego de tres horas de incubación a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$  en atmosfera húmeda, la viabilidad celular fue cuantificada por tinción con el colorante Cristal violeta midiendo la absorbancia a 620 nm con lector de (Go-Multiskan Thermo UV-visible). La citotoxicidad se evaluó por comparación de las absorbancias resultantes de los pocillos con las muestras, con la absorbancia promedio de los pocillos utilizados como control (sin veneno/veneno inhibido, considerados como 100% de viabilidad) y fueron expresados como porcentaje de viabilidad celular. Además en el sobrenadante de cada pocillo, se realizó la cuantificación de la enzima citosólica láctato deshidrogenasa (LDH) a través del método cinético UV (Wiener Lab) con el fin de conocer si hubo lisis celular. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado.

### 3.3.2.3. Estudios de la adhesión celular.

Se utilizó una modificación de la técnica descrita anteriormente por Paludo y colaboradores (2006). Brevemente, placas de 96 pocillos se cubrieron con 200  $\mu\text{L}$ /pocillo de mezcla SFB: PBS (1:4) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego los pocillos se bloquearon con albumina sérica bovina (ASB) (Sigma) 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se eliminó el excedente. Se incubaron previamente 100  $\mu\text{L}$  de una mezcla (1:1) de suspensión de las células de la línea endotelial t-End en DMEM suplementado con 5% SFB ( $2.5\text{-}3 \times 10^4$ ) y la muestra a ensayar (veneno, veneno-EDTA- $\text{Na}_2$ , baltergina y baltergina-EDTA- $\text{Na}_2$ ) durante 30 minutos a 37°C. Luego se agregaron estas mezclas a la placa de 96 pocillos. Se incubaron 90 min a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$ , se retiró el sobrenadante por lavado suave con PBS para eliminar las células no adheridas. Se evaluaron las células adheridas por tinción con el colorante cristal violeta según técnica descrita en el ítem anterior. Se ensayó SFB más ASB en ausencia de las muestras como control, considerado como 100% de adherencia. Se calcularon los porcentajes de adherencia celular y se graficaron en función de las muestras ensayadas. (Paludo *et al.*, 2006)

## 3.4. Hemostasia primaria

### 3.4.1. Recuento de plaquetas

Grupos de cuatro ratones adultos machos CF-1 (18–22 g), suministrados por los bioterios de la Facultad de Medicina y de Ciencias Veterinarias de la UNNE, fueron inoculados por vía intravenosa (i.v.) con 100  $\mu\text{L}$  de veneno y veneno-IgG anti-balt. Los controles recibieron sólo PBS. Luego de 1 h, se anestesiaron con ketamina (50mg/Kg), y se llevó a cabo el sangrado de los ratones por punción de la vena cava inferior, la sangre se recolectó en recipientes conteniendo anticoagulante EDTA- $\text{Na}_2$  (0,342 mol/L), y se realizó el recuento de plaquetas por método manual, en cámara de Neubauer (Brecher and Cronkite, 1950; Lewis *et al.*, 1979)

### 3.4.2. Inhibición de la agregación plaquetaria

La actividad anti-agregante de baltergina-DC se midió a partir de un plasma rico en plaquetas (PRP), por método turbidimétrico. El PRP se obtuvo mediante el protocolo de única centrifugación descrita previamente (Beca *et al.*, 2007). Para ello, 150  $\mu\text{L}$  de PRP se pre-incubaron con 25  $\mu\text{L}$  de baltergina-DC durante 15 min a 37°C, luego se adicionó 25  $\mu\text{L}$  de ADP 2 mM (agonista plaquetario) y se agitó por 5 min. Con el fin de separar los agregados plaquetarios formados, se dejó sedimentar durante 10 min y se realizó la lectura

espectofotométrica del sobrenadante a 410 nm con lectora de microplacas (Go-Multiskan Thermo UV-visible). Como control negativo de agregación se utilizó plasma pobre en plaquetas (PPP), el mismo se obtuvo por centrifugación del PRP a altas revoluciones (10.000 rpm).

### 3.4.3. Tiempo de sangría

Grupos de cuatro ratones adultos machos CF-1 (18–22 g) se inocularon por vía intravenosa (i.v.) con 100  $\mu$ L de las muestras: PBS como grupo control, veneno (20  $\mu$ g), veneno pre-incubado con anticuerpos anti-balt (relación 1/30) y una SVMP (5  $\mu$ g) purificada del veneno de *B. alternatus*. Luego de 2 h, los ratones se anestesiaron con la dosis detallada en 3.4.1., posteriormente se realizó un corte en la punta de la cola (3 mm) y se colocaron en tubos de ensayo conteniendo PBS previamente calentado a 37°C. Se registró el tiempo una vez que el sangrado se detuvo por más de 30 s. Tiempos de sangrado superiores a 60 min se consideraron incoagulables.

## 3.5. Hemostasia secundaria

### 3.5.1. Determinación del tiempo de coagulación (TC) sobre plasma

Cien  $\mu$ L del veneno previamente bloqueado con EDTA- $\text{Na}_2$  y PMSF se agregaron a 200  $\mu$ L de plasma citratado pobre en plaquetas, registrándose los tiempos de coagulación a 37 °C en coagulómetro Fibrintimer (Wiener). El veneno entero sin inhibir fue utilizado como control positivo y PBS como control de referencia de tiempo de coagulación (o TC normal). Valores superiores a 600 s, determinado en coagulómetro Fibrintimer (Wiener), se consideraron incoagulables.

### 3.5.2. Determinación del TC sobre fibrinógeno

Este ensayo fue realizado como el ítem 3.5.1., reemplazando el plasma citratado pobre en plaquetas por fibrinógeno humano (Sigma-Aldrich, USA) 200 mg/dL.

### 3.5.3. Determinación de fibrinógeno plasmático

Este ensayo fue realizado como el ítem 3.4.1., sólo que la sangre se recolectó en tubos con citrato de sodio (relación sangre / anticoagulante 9+1). Los animales fueron expuestos a PBS (controles), veneno (en dos dosis, 20 y 40  $\mu$ g), veneno/IgG anti-balt (relación veneno/IgG 1/30: 20 $\mu$ g/600  $\mu$ g y 40 $\mu$ g/1200  $\mu$ g). Posterior al sangrado, el fibrinógeno plasmático se determinó según la técnica de Clauss (Clauss, 1957) en coagulómetro.

### 3.6. Análisis Estadístico

Todos los experimentos fueron repetidos al menos tres veces. La significancia de las diferencias entre las medias fue evaluada mediante ANOVA siguiendo el test de Dunnett para comparaciones múltiples entre grupos. Los valores de  $p$  menores a 0,05 fueron considerados significativos estadísticamente.

*Capítulo 4*  
*Resultados y Discusión*

## **Resultados y Discusión**

### **4.1. Ensayos preliminares**

#### **4.1.1. Extracción de veneno de *B. alternatus***

#### **4.1.2. Obtención y caracterización de baltergina**

##### 4.1.2.1. Purificación de baltergina

##### 4.1.2.2. Análisis 2D-PAGE

##### 4.1.2.3. Identificación de secuencias parciales mediante digestión trípica y técnicas de análisis proteómicos.

#### **4.1.3. Obtención y caracterización de baltergina-DC**

##### 4.1.3.1. Autoproteólisis de baltergina

##### 4.1.3.2. Purificación del fragmento baltergina-DC

##### 4.1.3.3. Estimación de la masa molecular por SDS-PAGE

##### 4.1.3.4. Determinación de la secuencia aminoterminal

#### **4.1.4. Obtención de Inmunoglobulinas G anti-baltergina**

#### **4.1.5. Conclusiones de esta sección**

### **4.2. Naturaleza de las proteasas presentes en el veneno de *B. alternatus***

#### **4.2.1. Actividad proteolítica sobre azocaseína en presencia de anticuerpos e inhibidores**

#### **4.2.2. Actividad proteolítica sobre BApNa en presencia de anticuerpos e inhibidores**

#### **4.2.3. Conclusiones de la sección**

### **4.3. Participación de las proteasas en la hemorragia exhibida por el veneno de *B. alternatus***

#### **4.3.1. Estudios de la hemorragia en presencia de anticuerpos e inhibidores.**

#### **4.3.2. Estudios de la interacción de proteasas del veneno *B. alternatus* sobre células endoteliales**

##### 4.3.2.1. Estudio de la actividad citotóxica

##### 4.3.2.2. Estudios de adhesión celular

#### **4.3.3. Conclusiones de la sección**

### **4.4. Hemostasia primaria**

#### **4.4.1. Recuento de plaquetas**

#### **4.4.2. Inhibición de la agregación plaquetaria**

#### **4.4.3. Tiempo de sangría**

#### **4.4.4. Conclusiones de la sección**

### **4.5. Hemostasia secundaria**

#### **4.5.1. Determinación del TC sobre plasma y fibrinógeno**

#### **4.5.2. Determinación de fibrinógeno plasmático**

#### **4.5.3. Conclusiones de la sección**

## 4.1. Ensayos preliminares

En esta sección se llevaron a cabo ensayos en los cuales se obtuvieron las herramientas moleculares, parte de ellos mediante procedimientos descritos en trabajos previos, que luego fueron empleadas para los estudios propios del efecto del veneno en la hemostasia.

Adicionalmente fue posible profundizar en lo que respecta a la estructura de baltergina y baltergina-DC.

### 4.1.1. Extracción del veneno de *B. alternatus*

El pool veneno, extraído por personal idóneo de especímenes adultos de la serpiente *B. alternatus* (Figura 4.1) en cautiverio, ayuno de dos semanas, alojadas en el Serpentario del “Parque Aguará” (San Cosme, Corrientes), arrojó una concentración proteica media de 340 mg/mL y un volumen medio de veneno, obtenido por espécimen, de 0,8 mL.

Estos valores pueden variar debido a que la cantidad de veneno que se puede obtener por ordeño de las serpientes está relacionado a diversos factores. Entre éstos, el tamaño de la serpiente es uno de los más importantes (de Roodt *et al.*, 1998; Menezes *et al.*, 2006; McCleary and Heard, 2010), su longitud y condición corporal (De Roodt, 2002; Mackessy *et al.*, 2003; McCue, 2006), como así también el tamaño de la cabeza (Mirtschin *et al.*, 2002) y la distancia entre colmillos (de Roodt *et al.*, 2012).



Figura 4.1. Extracción de veneno de un espécimen de *B. alternatus*



#### 4.1.2. Obtención y caracterización de baltergina

Se purificó a baltergina del veneno de *B. alternatus* mediante técnicas cromatográficas descritas previamente. Posteriormente se realizó un estudio 2D-PAGE de la hemorragina y la identificación de secuencias parciales mediante digestión triptica y técnicas de análisis proteómicos, con el fin de profundizar en la estructura de la misma y comprobar que se trata de una SVMP perteneciente a la clase P-III.

##### 4.1.2.1. Purificación de baltergina

La purificación de baltergina se llevó a cabo según la técnica descrita por Gay y colaboradores (2005). La Figura 4.2. muestra el cromatograma correspondiente a la primera etapa de purificación (DEAE-Celulosa), resolviéndose en 4 picos, eluyendo la enzima de interés en el último (IV).

Las fracciones correspondientes al pico IV fueron concentradas y sometidas a la segunda etapa consistente en separación por tamiz molecular. El perfil de elución presentó 2 picos: IVa corresponden a una proteína de 55 kDa, que constituye la enzima de interés, baltergina; y IVb, que reúne proteínas de menor peso molecular (Figura 4.3). La pureza de la enzima aislada se testeó mediante SDS-PAGE 12% (inserto de la Fig. 4.3).

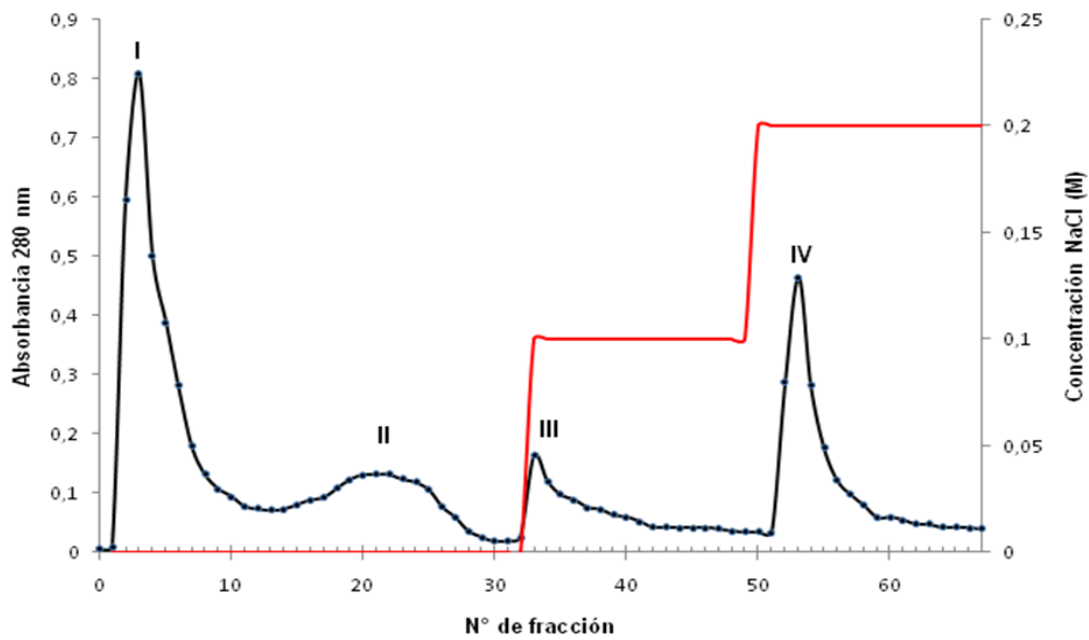
Los perfiles obtenidos fueron similares a los reportados por Gay y colaboradores (2005). Si bien uno de los cromatogramas presenta pequeñas variantes, se pudo reproducir la obtención de la enzima.

Con el fin de avanzar en la caracterización de baltergina y sub-clasificarla dentro del grupo de las SVMPs, y en razón a la disponibilidad de la tecnología a la cual se tuvo acceso se profundizó en el conocimiento de algunos aspectos estructurales, estudios no previstos inicialmente en el plan de tesis y que se describen a continuación.

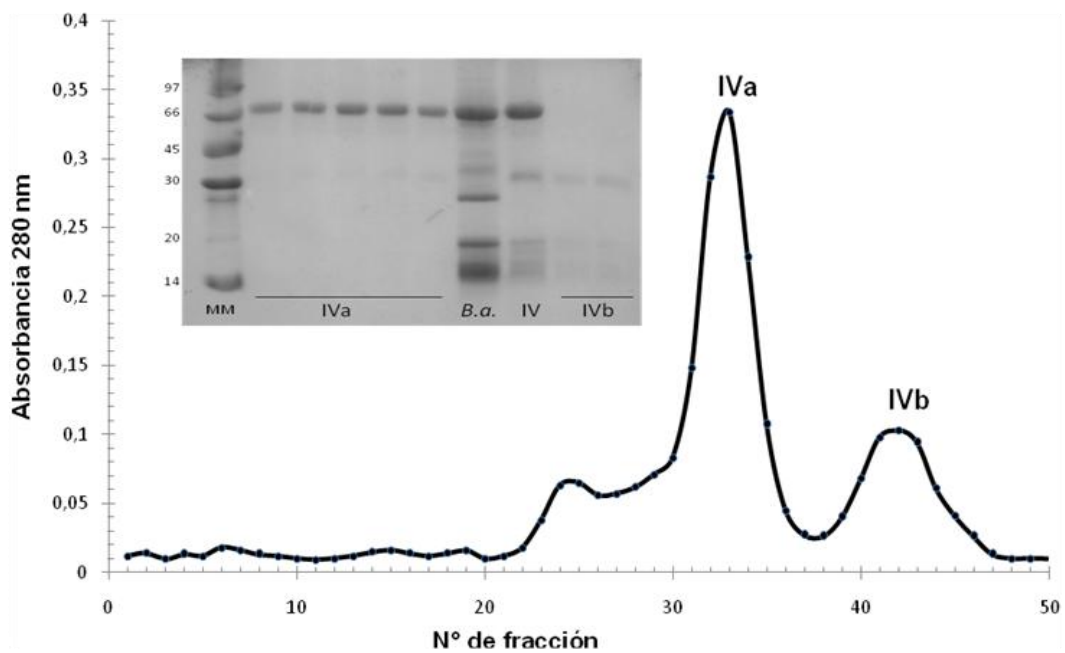
##### 4.1.2.2. Análisis 2D-PAGE

Una vez purificada baltergina del veneno de *B. alternatus* se realizó un estudio en 2D electroforesis para evaluar pI y presencia de isoformas. La Figura 4.4. muestra el perfil electroforético, donde se observó la presencia de 9 isoformas ácidas (rango de pI= 4,8 - 5,7). Estas isoformas co-eluyen juntas y no se pueden resolver por los métodos cromatográficos convencionales.

En los últimos años, el estudio de la composición global de los venenos de serpientes ha avanzado drásticamente con la incorporación de los análisis transcriptómicos y proteómicos, ya que los mismos arrojan información valiosa sobre los genes expresados en el veneno de las glándulas y la composición proteica de estas secreciones.



**Figura 4.2.** Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa del veneno. (—●—) Perfil de elución del veneno. (—) Aumento de la fuerza iónica en etapas.



**Figura 4.3.** Cromatografía de filtración por gel en Sephadex® G-75 del pico IV proveniente de DEAE-celulosa. Inserto: Electroforesis SDS-PAGE 12% para constatar pureza de baltergina purificada. MM: fosforilasa b (97 kDa); albúmina de suero bovino (66 kDa); ovoalbúmina (45 kDa); anhidrasa carbónica (30 kDa); inhibidor de tripsina (20,1 kDa). IVa corresponde a las fracciones 30-35 y IVb a las fracciones 41 y 42. B.a.: veneno entero de *B. alternatus*. IV: corresponde al *pool* concentrado proveniente de la etapa cromatográfica anterior.

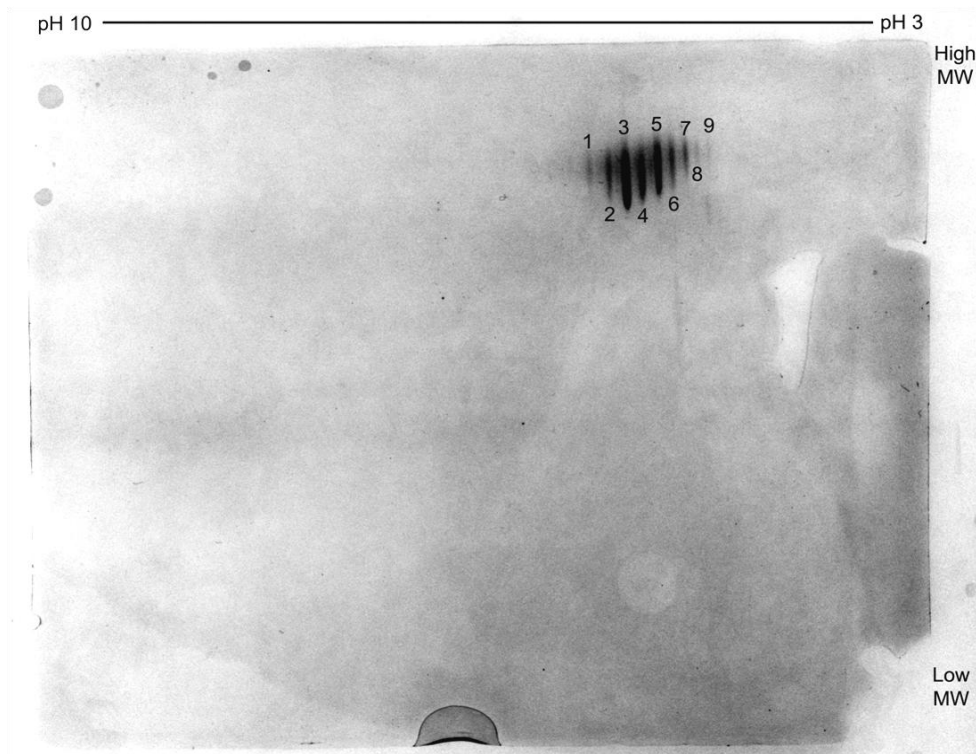
El estudio proteómico del veneno entero de *B. alternatus* lo realizaron Öhler y colaboradores en el año 2010, donde demostraron la presencia de múltiples *spots* en un gel sometido a electroforesis bidimensional, las cuales correspondieron a unas 100 proteínas con un tamaño molecular de 10-100 kDa identificadas por espectrometría de masas. El análisis de los resultados mostró que las SVMPs presentan puntos isoeléctricos en un rango de pH ácido (pls en la región 4,5 - 5,6) son las toxinas más abundantes y representan el 43% de los componentes identificados del veneno. Además, estas proteasas pertenecen casi exclusivamente a la clase P-III, las cuales están formadas por un dominio metaloproteinasas, un dominio tipo desintegrina y un dominio rico en cisteína (Öhler *et al.*, 2010).

Las SVMPs P-III identificadas pertenecen a dos grupos, uno que incluye 30 *spots* de proteínas con masas moleculares entre 70 y 100 kDa, y el segundo consiste en SVMPs de 55-60 kDa correspondiente a 9 *spots* en el 2D-SDS-PAGE. El primer grupo de metaloproteinasas P-III son homólogos a berythactivase enzima carente de actividad hemorrágica capaz de alterar el sistema de la coagulación (Moura-da-Silva *et al.*, 2008; Öhler *et al.*, 2010). El segundo grupo comprende los homólogos de jararagina, toxina aislada del veneno de *B. jararaca* que presenta actividad hemorrágica, edematizante y es capaz de inhibir la agregación plaquetaria (Kamiguti *et al.*, 1996; Laing and Moura-da-Silva, 2005). Baltergina, corresponde a éste último grupo ya que posee una masa molecular de 55 kDa (Gay *et al.*, 2005) y está formada por 9 isoformas compatible con los resultados mostrados por Öhler.

En esta tesis, se pudo entonces constatar que baltergina purificada por metodología cromatográfica convencional, comprende un grupo de isoformas que co-eluyen juntas debido a la proximidad en sus masas moleculares (MM) y sus puntos isoeléctricos (pI). El estudio de la secuencia de cada una de estas isoformas podría dilucidar si se está en presencia de proteínas con pequeñas variaciones en su secuencia aminoacídica u otro procesamiento post-traducciona, como por ejemplo diferencia en el grado de glicosilación de las mismas.

#### 4.1.2.3. Identificación de secuencias parciales mediante digestión trípica y técnicas de análisis proteómicos

Baltergina fue sometida a la acción de tripsina y los péptidos resultantes de la digestión se analizaron por espectrometría de masas. Los péptidos tríplicos fueron comparados con las secuencias de jararagina y del precursor de botropasina (Fig. 4.5 y 4.6. respectivamente.),



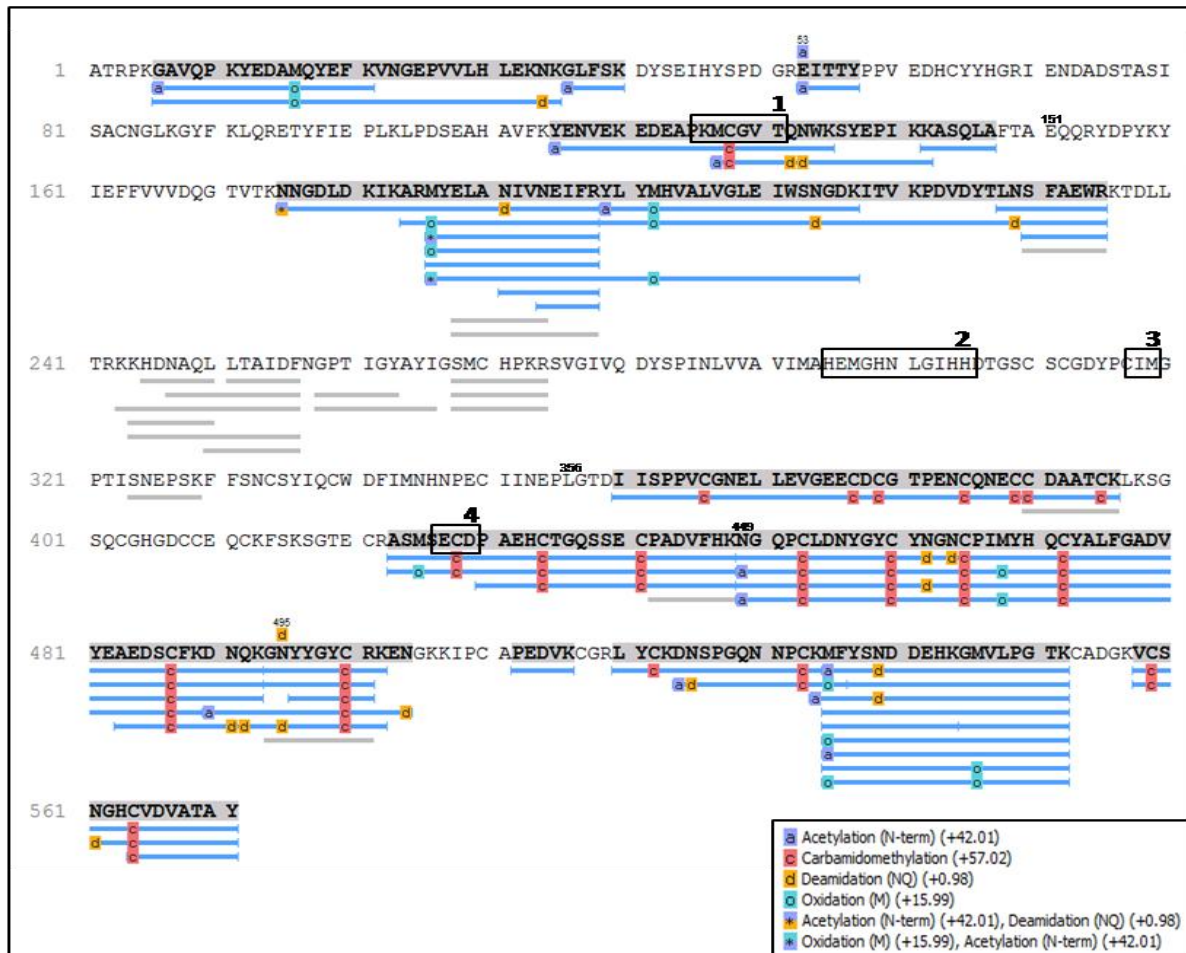
**Figura 4.4.** 2D-electroforesis baltergina.

dos SVMPs P-III aisladas del veneno de *B. jararaca* (Paine *et al.*, 1992; Assakura *et al.*, 2003). En ambas figuras las zonas sombreadas sobre la secuencia aminoacídica representan homología entre baltergina y cada SVMP P-III comparada.

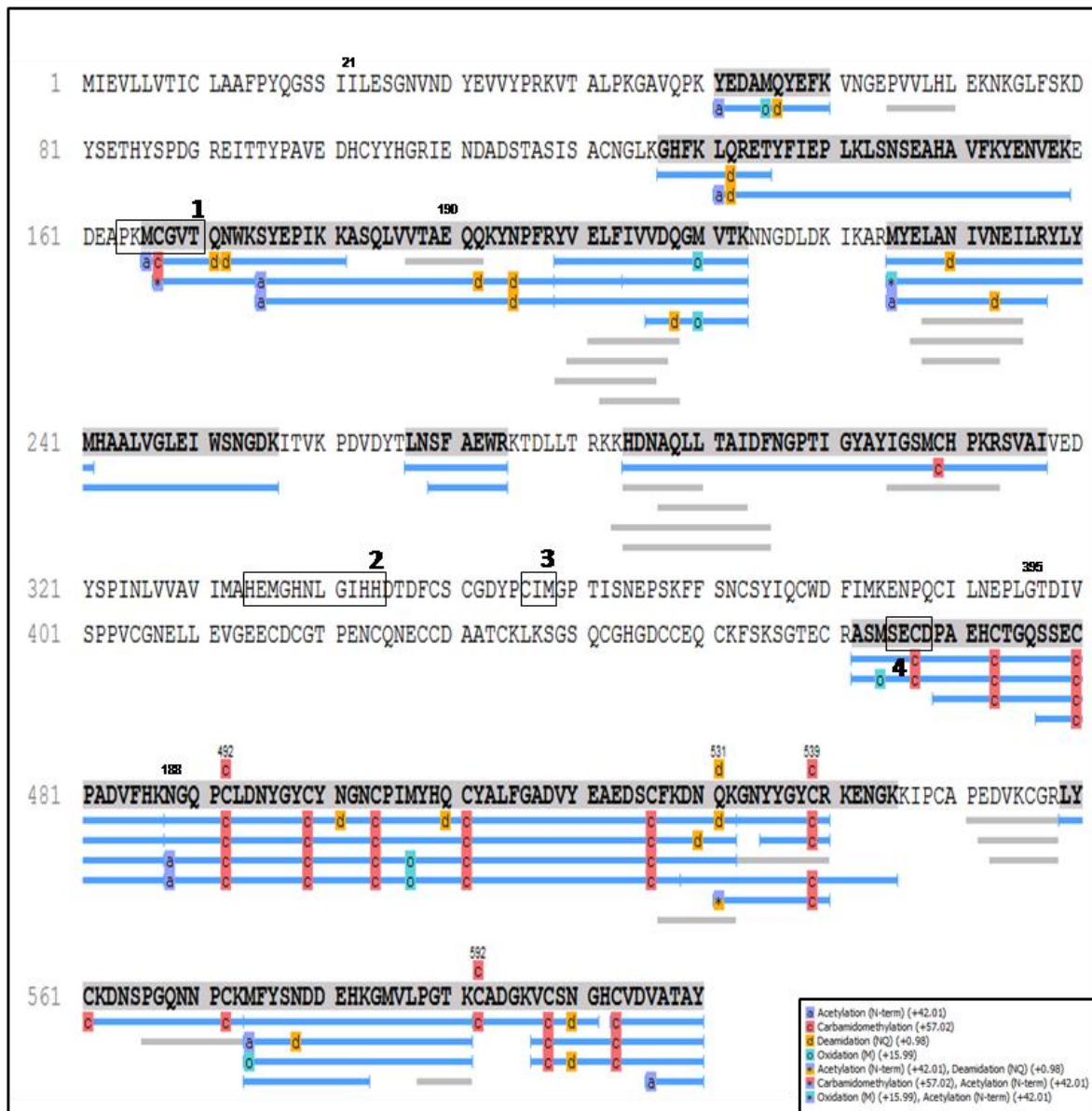
En el análisis comparativo se identificaron péptidos presentes en todos los dominios característicos de las SVMPs P-III. Particularmente llamó la atención el reconocimiento de péptidos en el pro-dominio incluso el motivo *Cys-switch*. Se observó además la presencia del motivo símil desintegrina correspondiente a la secuencia “SECD” (Fig 4.5 y 4.6.).

Una vez reunidas las secuencias identificadas se realizó un alineamiento mediante el uso del programa *clustal O*. A fines prácticos se denominó balterginA a las secuencias provenientes de la comparación con jararagina, mientras que balterginB las obtenidas luego de comparar con el precursor de botropasina (Fig. 4.7.). Las zonas sombreadas representan el alineamiento con los péptidos trípticos de baltergina, y los colores corresponden a los diferentes dominios. Del análisis se logró identificar un 68% de identidad con la secuencia de botropasina, teniendo en cuenta desde el inicio del pro-dominio al extremo carboxilo terminal del dominio rico en cisteína. En cuanto al pro-dominio, se abarcó un 61% de la secuencia, mientras que del dominio catalítico, aún sin ser reconocidos los motivos de unión

al Zn y giro de metionina, se cubrió un 56%. Los dominios *símil desintegrina* y rico en cisteína, en un 96% y 68%, respectivamente.



**Figura 4.5.** Comparación de la secuencia de digestos trópticos de baltergina con jararagina (571 aminoácidos). Los dominios característicos de las SVMPs P-III son: pro-dominio (1-150), dominio catalítico (151-355), dominio *símil desintegrina* (356-448) y dominio rico en cisteína (449-571) (Paine *et al.*, 1992). Motivos con recuadro: 1. Cys-switch 2. De unión al Zn 3. Giro de metionina 4. Desintegrina. Barras azules: péptidos identificados por base de datos. Barras grises: péptidos secuenciados de novo.



**Figura 4.6.** Comparación de la secuencia de digestos tripticos de baltergina con el precursor de botropasina (610 aminoácidos). Los dominios característicos de las SVMPs P-III son: péptido señal (1-20), pro-dominio (21-189), dominio catalítico (190-394), dominio símil desintegrina (395-489) y dominio rico en cisteína (488-610) (Assakura *et al.*, 2003). Motivos con recuadro: **1.** Cys-switch **2.** De unión al Zn **3.** Giro de metionina **4.** Desintegrina. Barras azules: péptidos identificados por base de datos. Barras grises: péptidos secuenciados de novo.



**Figura 4.7.** Alineamiento comparativo entre jararagina, botropasina, y baltergina usando el programa *Clustal O*. BalterginB corresponde a la secuencia producto de la comparación de los productos trípticos con botropasina, mientras que BalterginA es resultado del análisis con jararagina. Las zonas sombreadas representan las secuencias conocidas de baltergina por dominio. Verde: pro-dominio, rosa: dominio catalítico, marrón: dominio similar desintegrina y amarillo: dominio rico en cisteína.

El análisis de secuencias de ácidos nucleicos que codifican a las SVMPs indica que se sintetizan como zimógenos inactivos en las glándulas del veneno, que posteriormente experimentan diferentes procesamientos pos-traduccionales hasta la formación de la proteína madura (Paine *et al.*, 1992; Bjarnason and Fox, 1994; Selistre-de-Araujo and Ownby, 1995; Kini and Koh, 2016). El péptido señal es responsable de conducir las SVMPs nacies al retículo endoplásmico donde tienen lugar la mayoría de las modificaciones proteicas, una de ellas es la eliminación de este pequeño péptido mediante peptidasas señal (Moura-da-Silva *et al.*, 2009). En este estado la proteína aún no es activa, para que esto suceda es necesario la hidrólisis del pro-dominio. En la secuencia conservada "PKMCGVT" del motivo *Cys-switch* la cisteína libre es el factor clave, ya que bloquea el sitio catalítico de la enzima, impidiendo la formación del complejo enzima-sustrato (Grams *et al.*, 1993). Esta hidrólisis / activación de la metaloproteinasa ocurre por la acción catalítica de proteasas presentes en el veneno crudo (Shimokawa *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 2003).

Con el fin de descubrir donde se lleva a cabo este procesamiento para la formación de la enzima madura, Portes-Junior y colaboradores (2014) realizaron análisis proteómicos de extractos de veneno y glándulas venenosas de *B. jararaca* en diferentes etapas del ciclo de producción del veneno, y además usaron anticuerpos contra el pro-dominio recombinante de jararagina y anticuerpos anti-jararagina. Los autores encontraron que las SVMPs son principalmente activadas en la luz de las glándulas. (Moura-da-Silva *et al.*, 2009; Portes-Junior *et al.*, 2014). En un trabajo más reciente de Nicolau y colaboradores (2017), donde estudiaron el peptidoma y proteoma (proteopeptidoma) del mismo veneno se detectaron péptidos del pro-dominio para diferentes SVMPs P-III, como HF3 y jararagina (con masas moleculares que llegaron hasta los 7 kDa). Estos hallazgos les permitieron concluir que el *pool* de SVMPs en el veneno de *B. jararaca*, es una mezcla de metaloproteinasas completa (activas) y parcialmente procesadas, como así también zimógenos no procesados (Nicolau *et al.*, 2017).

El hecho que el estudio de espectrometría de masas reconozca secuencias de aminoácidos correspondientes al motivo *Cys-switch* nos hace suponer que baltergina purificada del veneno de *B. alternatus* es un *pool* de isoformas principalmente constituido por la proteína madura y catalíticamente activa (masa molecular de 55 kDa). Además se encuentran, en menor proporción, precursores catalíticamente inactivos con una masa molecular mayor indetectables/no visibles por SDS-PAGE.



### 4.1.3. Obtención y caracterización de baltergina-DC

En esta sección se discute la optimización de las condiciones de autoproteólisis de baltergina para luego purificar baltergina-DC entre los productos de autoproteólisis. Una vez purificado el fragmento estable se logró estimar su masa molecular y la secuencia amino terminal del mismo.

#### 4.1.3.1. Autoproteólisis de baltergina

La autoproteólisis de baltergina se estudió en función de diferentes factores: pH, temperatura y tiempo, con el fin de seleccionar y fijar aquellos donde el proceso autoproteolítico era óptimo para la generación de baltergina-DC.

##### - Autoproteólisis en función del pH

Luego de incubar a baltergina en *bufferes* de pH diferentes por 18 h, se realizó una SDS-PAGE 12% revelado por tinción argéntica y la determinación de la actividad proteolítica residual sobre sustrato azocaseína (Fig. 4.8.). En la corrida electroforética se observó que a pH 7 y 8 la banda de 55 kDa correspondiente a baltergina disminuyó en intensidad, mientras que aumentó la presencia de una banda de aproximadamente 30 kDa, compatible con el dominio disintegrina-rico en cisteína, denominada baltergin-DC (DC: símil desintegrina-rico en cisteína). A pH 3 incubado a 37°C y a 4°C no hubo modificaciones, en ambos casos se destaca la presencia de una única banda correspondiente a la enzima nativa. A pH 9 a 37°C y 4°C se observó principalmente la banda correspondiente a baltergina lo que indica que en estas condiciones la enzima no sufrió procesamiento autoproteolítico (Fig. 4.8. A).

Para evaluar si la misma continuó activa luego de la incubación a diferentes pHs, se realizó la determinación de actividad remanente sobre azocaseína (Fig. 4.8. B). La menor actividad residual se observó cuando la enzima se incubó en un rango de pH de 7 a 8 (Fig. 4.8. B). Por otro lado, se determinaron las actividades a pH 3 y 9 a 4°C y en ambos casos baltergina no presentó actividad proteolítica, lo que indica que en estas condiciones la enzima se desnaturaliza.

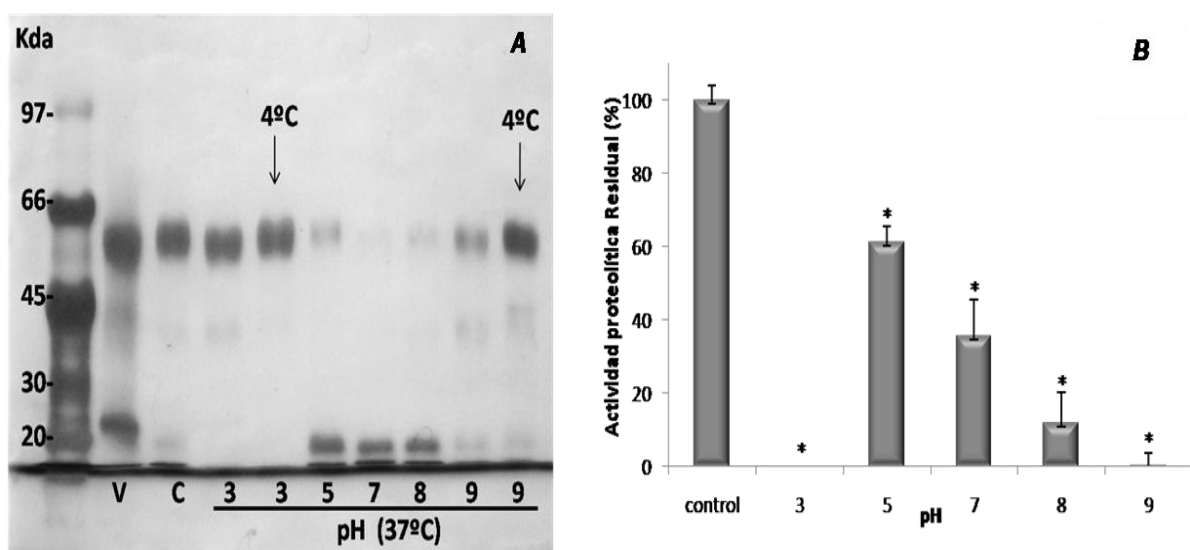
##### - Autoproteólisis en función de la temperatura

Luego de incubar baltergina a diferentes temperaturas por 18 h, se realizó un SDS-PAGE 10%. En la corrida electroforética se observó que a 37°C la banda de 55 kDa correspondiente a baltergina disminuyó marcadamente en intensidad, mientras que aumentó la presencia de la banda de 30 kDa, correspondiente a baltergina-DC (Figura 4.9. A).

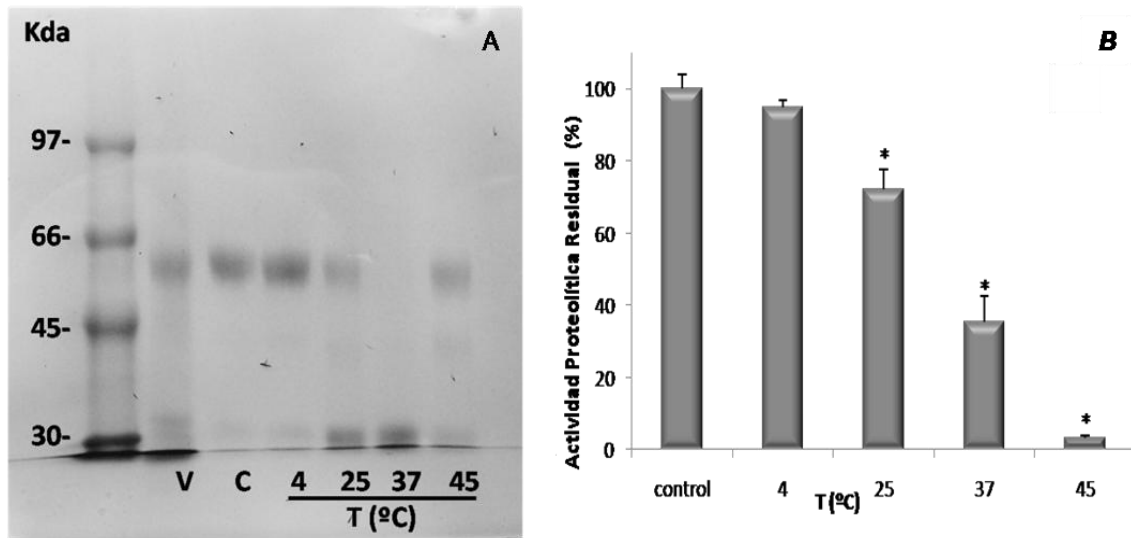
El efecto de la temperatura sobre la autoproteólisis de baltergina también se evaluó a través de la medición de la actividad azocaseinolítica residual. La menor actividad se observó a 37°C y a 45°C la actividad se anuló completamente (Fig. 4.9. B). A la mayor temperatura aún se observa la banda correspondiente a baltergina (Fig. 4.9. A), por lo que la ausencia de actividad no se debe a la mayor formación de baltergina-DC, sino a la desnaturalización de la enzima nativa.

*- Autoproteólisis en función del tiempo*

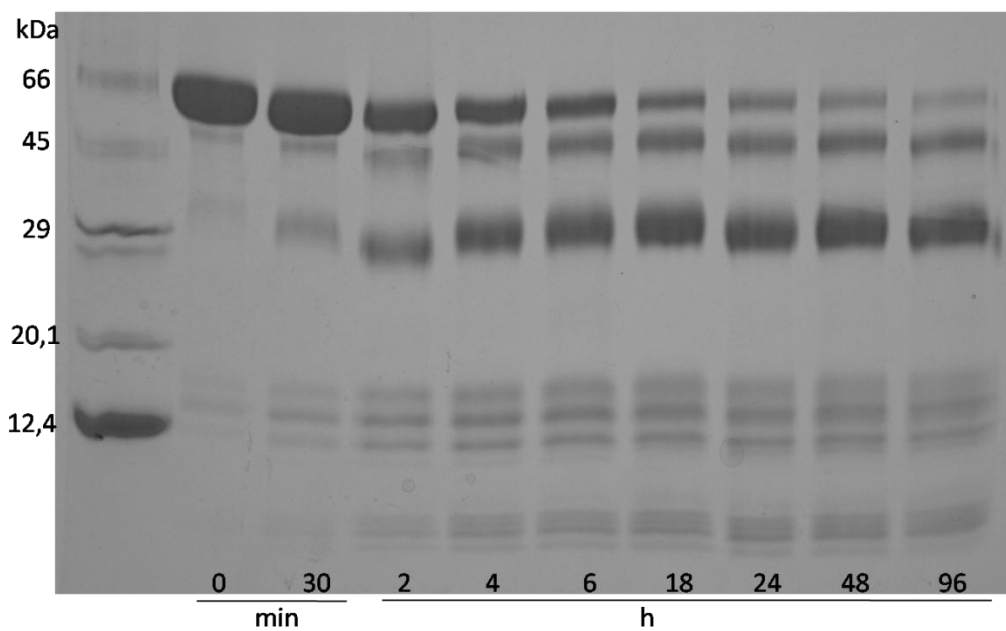
Una vez establecido el pH y temperatura óptimas, la autoproteólisis de baltergina fue evaluada a lo largo del tiempo hasta llegar a las 96 h de incubación. La Figura 4.10. muestra el comportamiento autoproteolítico de la enzima, claramente se observó la disminución de la banda de 55 kDa con el consecuente aumento de intensidad en las bandas comprendidas entre 5 y 45 kDa, con predominio de la banda de ~ 30 kDa, correspondiente a baltergina-DC.



**Figura 4.8.** Autoproteólisis de baltergina en función del pH. **A.** SDS-PAGE 12% tinción argéntica. MM: fosforilasa b (97 kDa); albúmina de suero bovino (66 kDa); ovoalbúmina (45 kDa); anhidrasa carbónica (30 kDa); inhibidor de tripsina (20,1 kDa). **B.** Actividad proteolítica residual sobre azocaseína.



**Figura 4.9.** Autoproteólisis de baltergina en función de la temperatura. **A.** SDS-PAGE 10% tinción con azul brillante de *Coomassie*. MM: fosforilasa b (97 kDa); albúmina de suero bovino (66 kDa); ovoalbúmina (45 kDa); anhidrasa carbónica (30 kDa). **B.** Actividad proteolítica residual sobre azocaseína.



**Figura 4.10.** Autoproteólisis de baltergina en función del tiempo. SDS-PAGE 12% tinción con azul brillante de *Coomassie*. MM: albúmina de suero bovino (66 kDa); ovoalbúmina (45 kDa); anhidrasa carbónica (29 kDa); inhibidor de tripsina (20,1 kDa), citocromo C (12.4 kDa).

Las SVMPs de alto peso molecular, correspondientes a las toxinas de la clase PIII, bajo determinadas condiciones son capaces de sufrir autoproteólisis, dando lugar a productos de degradación inestables y a un dominio desintegrina estable (Fox and Serrano, 2008). Estudios previos demostraron que baltergina es capaz de autolizarse y liberar un fragmento estable (Gay *et al.*, 2005). En el presente estudio, las condiciones de autólisis de baltergina se ajustaron para mejorar la obtención de dicho fragmento. El análisis electroforético de los productos de degradación en diferentes tiempos mostró una desaparición progresiva de la banda correspondiente a la hemorragina y un aumento de bandas de menor masa molecular, con predominio de una banda de ~30 kDa (baltergina-DC) a tiempos de incubación prolongados. La desaparición de la banda de la proteína nativa y la visualización de baltergina-DC por SDS-PAGE fue máxima a 37°C y a un rango de pH comprendido entre 7 y 8. Para jararagina, un modelo muy estudiado de SVMPs P-III purificada del veneno de *B. jararaca*, el principal fragmento obtenido por autólisis de la proteína nativa fue jararagina-C (28 kDa). La visualización del fragmento de 28 kDa fue en condiciones de pH básico y sólo en presencia de agente reductor 2-ME, lo que indica que el sitio de autoproteólisis en jararagina debe estar dentro de regiones del dominio catalítico conectadas por puentes disulfuro (Moura-da-Silva *et al.*, 2003).

Cuando se analizó la autoproteólisis de baltergina a 25 °C, 45 °C o a pH 9.0, se observó una banda de 45 kDa. Esta proteína es un producto intermedio que desaparece cuando la autólisis se lleva a cabo a temperatura y pH óptimos y a tiempos de incubación prolongados, dando lugar a péptidos menor tamaño. La presencia del fragmento de 45 kDa es similar a lo reportado para la autólisis de jararagina (Moura-da-Silva *et al.*, 2003) y corresponde a la enzima nativa procesada que liberó una porción del extremo amino terminal del dominio catalítico debido a la autólisis. Por otro lado, la autólisis de brevilysin H6 (un PIII-SVMP aislado del veneno de *Gloydus halis brevicaudus*) a 37 °C durante 6 o 24 h libera fragmentos de 45 y 29 kDa (p29K) (Fujimura *et al.*, 2000). Sin embargo, cuando el tiempo de incubación aumenta a las 60 h, solo se generaron p29K y varios fragmentos de péptidos pequeños.

#### 4.1.3.2. Purificación del fragmento baltergina-DC

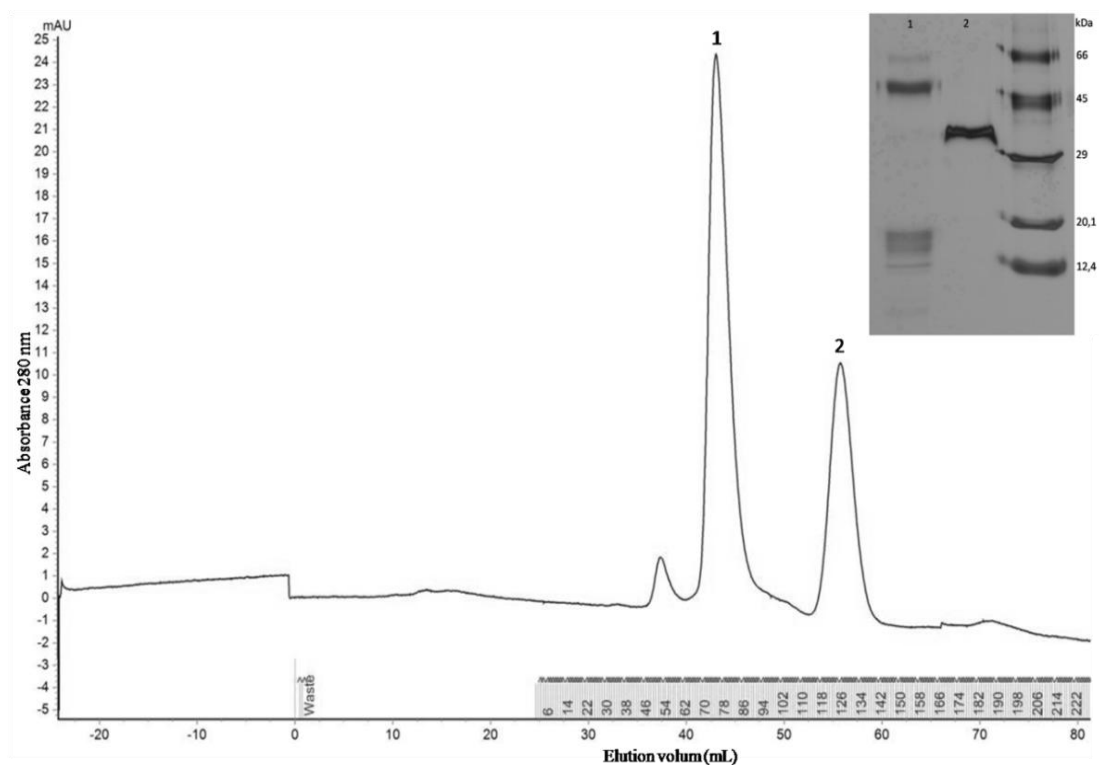
Para caracterizar a baltergina-DC, se llevó a cabo en primer lugar su purificación. Se fijaron las condiciones en que baltergina tiene una óptima autoproteólisis y se sometió la misma a pH 7 y a 37°C por 96 h. Luego de este período de incubación la mezcla de autoproteólisis se cargó a una columna Superdex 75 y el perfil de elusión reveló la presencia de dos grandes picos (Fig. 4.11.). Cada fracción se analizó por SDS-PAGE al 12% en condiciones

reductoras (inserto de la Fig. 4.11.). El perfil electroforético muestra que el pico 1 corresponde a la banda de baltergina (que no sufrió autoproteólisis), la banda de 45 kDa y fragmentos de autólisis de bajo peso molecular que probablemente eluyen asociados no covalentemente. El pico 2, por su parte, está constituido por una única banda con una masa molecular de ~30 kDa, correspondiente a baltergina-DC.

A diferencia de las condiciones reportadas para la obtención de jararagina-C (Moura-da-Silva *et al.*, 2003), para baltergina-DC no fue necesario el agregado del agente reductor 2-ME.

#### 4.1.3.3. Estimación de la masa molecular por SDS-PAGE

Se estimó la masa molecular relativa de baltergina-DC por SDS-PAGE (12%) en condiciones reductoras. En la imagen del gel se observa una única banda electroforética, correspondiente a baltergina-DC (Fig. 4.12.). La masa molecular fue estimada mediante interpolación del logaritmo lineal de la masa molecular versus la distancia de migración, obteniéndose un valor de 30 kDa.



**Figura 4.11.** Cromatografía de filtración por gel en Seperdex® 75 de la mezcla de autoproteólisis. Inserto: Electroforesis SDS-PAGE 12% de picos 1 y 2. Se realizó tinción argéntica. MM: albúmina de suero bovino (66 kDa); ovoalbúmina (45 kDa); anhidrasa carbónica (29 kDa); inhibidor de tripsina (20,1 kDa), citocromo C (12.4 kDa).

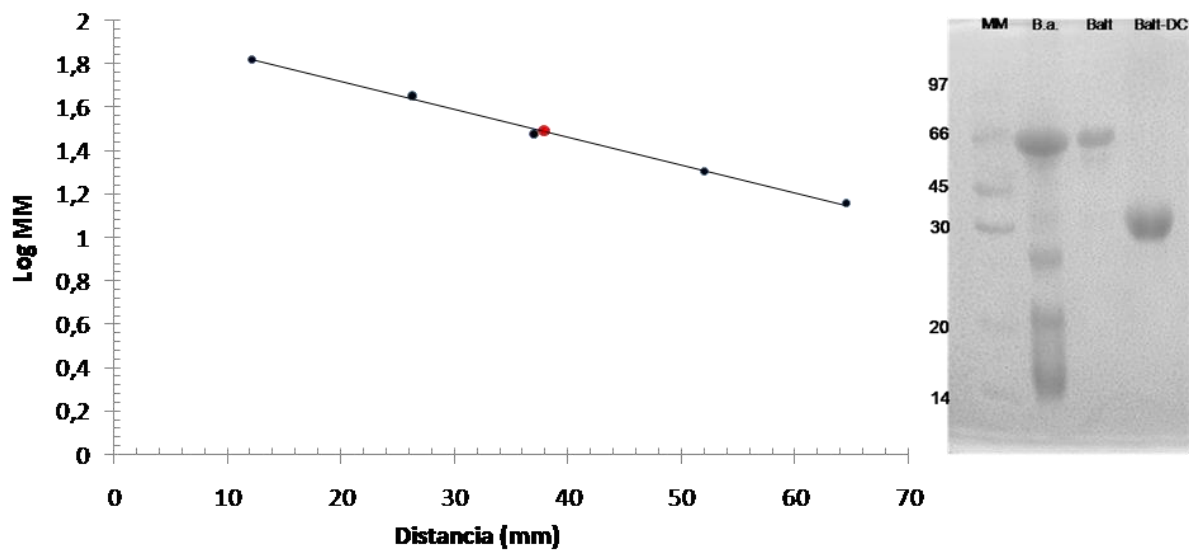
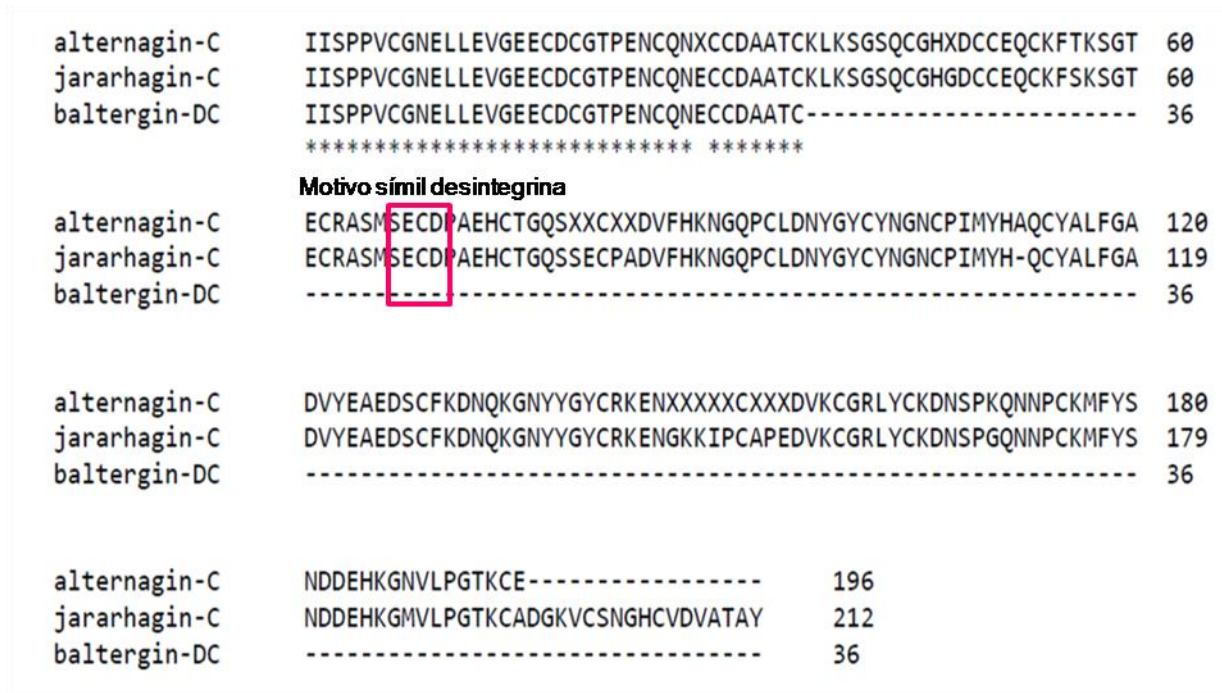


Figura 4.12. Estimación de la masa molecular de baltergina-DC.

#### 4.1.3.4. Determinación de la secuencia aminoterminal

Dependiendo del tipo SVMPs y el procesamiento que sufren, se originan diferentes desintegrinas. Las SVMPs de la clase P-III dan lugar a las proteínas similares a desintegrina (el motivo RGD de las desintegrinas es reemplazado por el ECD), formado por el dominio símil desintegrina unido covalentemente al dominio rico en cisteína, con masas moleculares alrededor de 30 kDa (Calvete *et al.*, 2005; Fox and Serrano, 2008).

La banda electroforética correspondiente a baltergina-DC se transfirió a una membrana de PVDF y se determinó la secuencia del extremo amino-terminal, obteniéndose una secuencia de 36 aminoácidos que comienza con el residuo isoleucina (I), que es similar al N-terminal hallado en los dominios DC de otras especies vipéridicas. Se realizó el análisis de alineamiento múltiple (Fig. 4.13.) de la secuencia aminoacídica parcial de baltergina-DC con las secuencias de dos proteínas que contienen la secuencia ECD (sitio de unión a integrinas) en el dominio símil desintegrina: jararagina-C (Moura-da-Silva *et al.*, 2003) y alternagina-C, fragmento de 28 kDa purificado directamente del veneno de *B. alternatus* de la región de San Pablo, Brasil (Souza *et al.*, 2000). El extremo amino terminal de baltergina-DC comienza con los aminoácidos IISPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDAATC- que es idéntico al de ambas proteínas, sin embargo solo las secuencias completas darían información de la SVMPs nativas que dieron origen a los respectivos fragmentos.

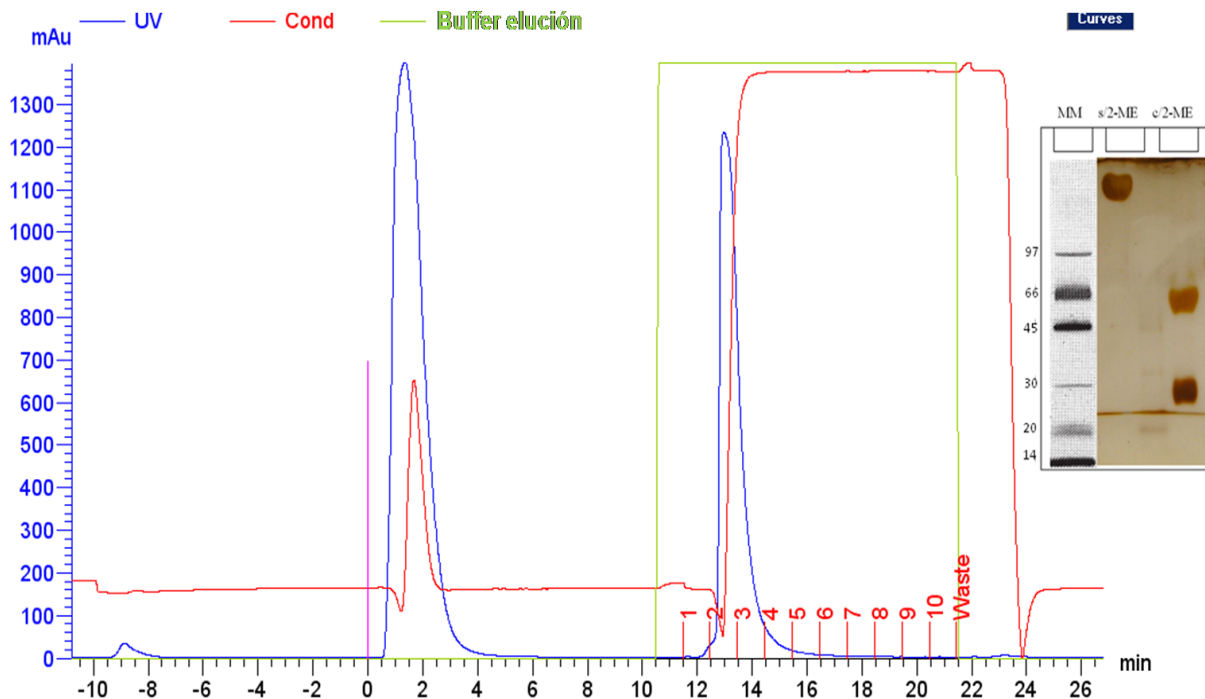


**Figura 4.13.** Alineamiento de las secuencias N-terminales de alternagina-C, jararhagin-C y baltergina-DC usando el programa *Clustal O*.

#### 4.1.4. Obtención de Inmunoglobulinas G anti-baltergina

La fracción IgGs anti-balt se purificó por cromatografía de afinidad (Gay *et al.*, 2013). La Figura 4.14. muestra el perfil de elución de las IgGs del suero de conejo inmunizado mediante utilizando una columna de afinidad que tiene proteína G, la cual se une a la fracción constante de las IgGs. Se midió la absorbancia a 280 nm para detección de proteínas en las fracciones colectadas y la homogeneidad de las mismas se constató por SDS-PAGE 10% (Inserto Fig 4.14.). Con el fin de testear la capacidad de los mismos para reconocer a baltergina se llevó a cabo un Western Blot (Fig. 4.15.). Primero se corrieron muestras de veneno (I) y de baltergina sometida parcialmente a autólisis (II) en un gel 12,5% de poliacrilamida bajo condiciones reductora (Fig. 4.15.A). Luego, las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa y se utilizó la fracción de IgGs anti-balt como anticuerpo primario (Fig. 4.15.B).

Mediante el ensayo de Western Blot se comprobó que dichos anticuerpos fueron capaces de reconocer a baltergina y a proteínas comprendidas entre los 30 y 45 kDa, rango de masas moleculares correspondiente a productos de autoproteólisis de las SVMPs P-III, que probablemente comparten antígenos con la hemorragina.



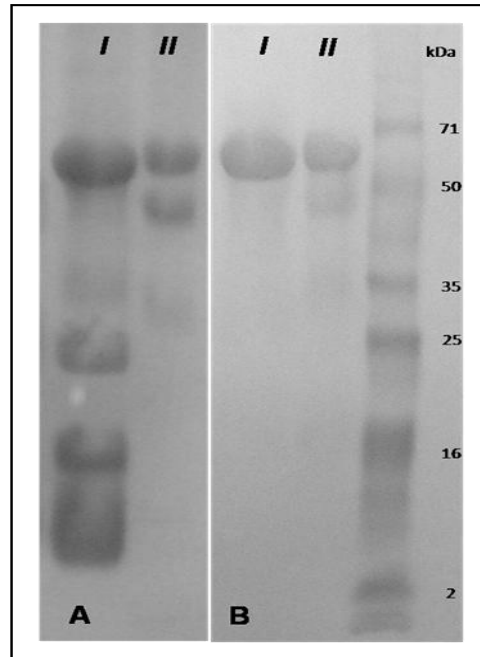
**Figura 4.14.** Purificación de IgGs anti-baltergina. Cromatografía de afinidad. Sefarosa-proteína G recombinante. **Inserto:** SDS-PAGE 10% en presencia (c2-ME) y ausencia (s2-ME) del agente reductor. MM: fosforilasa b (97 kDa); albúmina de suero bovino (66 kDa); ovoalbúmina (45 kDa); anhidrasa carbónica (30 kDa); inhibidor de tripsina (20,1 kDa), citocromo C (14 kDa).

Los anticuerpos anti-balt aquí purificados fueron luego empleados como herramientas para estudios de neutralización, a fin de conocer cuál es el rol de las hemorraginas/SVMPs en las alteraciones hemostáticas.

Como se describe en la próxima sección, en primer lugar se realizaron estudios previos para evaluar la calidad de las IgGs anti-balt y distinguir la capacidad de neutralización de estos anticuerpos (si se restringe a poblaciones parciales de metaloproteinasas, a todas las SVMPs ó si llega a neutralizar todas las proteasas del veneno).

La técnica estándar de elección para evaluar la producción de antivenenos es la neutralización de las actividades características del veneno en cuestión. La tendencia mundial actual es reemplazar los ensayos *in vivo* por pruebas *in vitro*, si bien se han sustituido alguno de ellos, es imprescindible en algunos casos el uso de animales (Meier and Theakston, 1986; Sells, 2003; WHO and Organization, 2007; León *et al.*, 2011).





**Figura 4.15.** **A.** SDS-PAGE 12,5 %: **I** corresponde a veneno de *B. alternatus* y **II** a baltergina purificada. Tinción azul brillante de *Coomassie*. **B.** Western blot: **I** corresponde a veneno de *B. alternatus* y **II** a baltergina purificada.

#### 4.1.5. Conclusiones de esta sección

Se pudieron obtener las *herramientas moleculares* necesarias para luego llevar a cabo el estudio de la contribución de las SVMPs en las alteraciones hemostáticas. Ellas son:

- *baltergina*, constituida por 9 isoformas, con alta homología en su secuencia a otras SVMP P-III
- *baltergina-DC*, obtenida por autoproteólisis (óptima a pH 7 y a 37°C por 96 h) de baltergina. El secuenciamiento del extremo amino terminal la posiciona dentro de la familia de proteínas símil desintegrina;
- *inmunoglobulinas G anti-baltergina (anti-balt)*, capaces de reconocer a baltergina y, conforme se verá en la próxima sección, a otras SVMPs del veneno de *B. alternatus*

## 4.2. Naturaleza de las proteasas presentes en el veneno de *B. alternatus*

Tal como se describió en la INTRODUCCION, el veneno de *B. alternatus* reúne un alto porcentaje de proteasas en su composición. Gracias a los estudios proteómicos realizados por Öhler y col (2010) sobre esta secreción, hoy se sabe que un 43,1% de la composición proteica corresponde a metaloproteinasas y un 24,1% a serinoproteasas.

Estos grupos de proteínas ofídicas vienen siendo estudiados desde hace décadas. Es sabido entonces, e.g., que las SVMPs se inactivan al ser tratadas con EDTA (Maeno *et al.*, 1960; OHSAKA, 1960; OHSAKA *et al.*, 1960), mientras que las SVSPs son bloqueadas en su actividad catalítica cuando se las incuban con PMSF (Sant'Ana *et al.*, 2008). Por otro lado, se conocen muchos de los sustratos sobre los cuales actúan, generando un clivaje, que puede ser altamente específico ó en múltiples sitios, de las proteínas sobre las cuales actúan. También se han identificado sustratos sintéticos sobre los cuales son capaces de hidrolizar la unión liberando un cromógeno permitiendo su análisis cinético (Zaganelli *et al.*, 1996).

A pesar de la cuantiosa información reunida hasta el presente, las particularidades estructurales de las toxinas en cada especie de ofidio, incluso variaciones intra-especie de diferentes aéreas geográficas, ameritan un estudio individual sobre los sustratos e inhibidores sobre los cuales estas enzimas son capaces de actuar. Por ello, en esta sección se incluyen ensayos dirigidos a reconocer el comportamiento propio de las proteasas del veneno de *B. alternatus* frente a inhibidores y anticuerpos específicos. Estos resultados, junto a datos obtenidos por Gay (2010) en su tesis doctoral, constituyen valiosa información a ser tenida en cuenta en estudios descriptos en próximos ítems, con el fin de distinguir sus roles en la alteración de la hemostasia que induce el veneno de la *B. alternatus* que habita el nordeste argentino.

### 4.2.1. Actividad proteolítica sobre azocaseína en presencia de anticuerpos e inhibidores

Se evaluó la actividad proteolítica del veneno (1 mg/mL) de *B. alternatus* y del veneno pre-incubado con PMSF (5mM), EDTA- $\text{Na}_2$  (5mM) e IgG anti-balt (relación mg veneno/mg IgG: 1/20) midiendo la capacidad de cada una de las mezclas de hidrolizar la azocaseína. Se observó una neutralización total de la actividad proteolítica del veneno entero por parte del EDTA- $\text{Na}_2$  y de las IgGs anti-balt a la dosis ensayadas (Fig. 4.16). En cambio, la actividad proteolítica del veneno en presencia de PMSF no mostró cambios respecto a la actividad de la muestra con veneno entero.

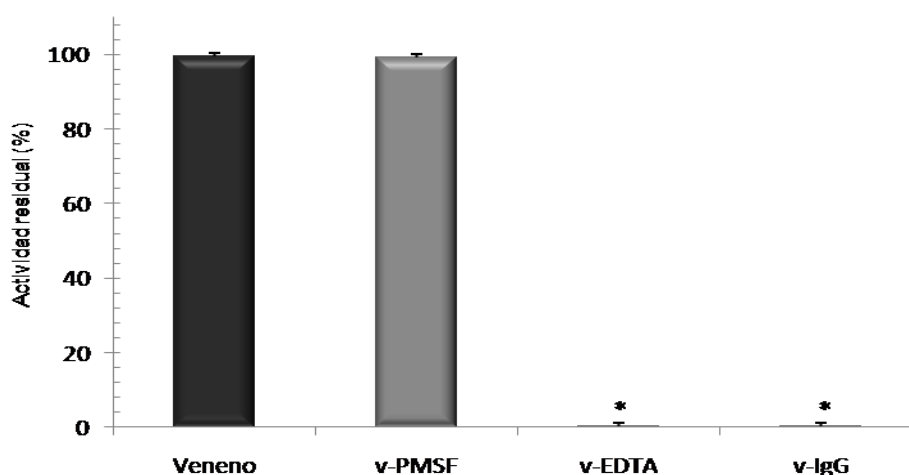
Los cambios exhibidos por la mezcla que contiene EDTA- $\text{Na}_2$ , demuestra que el veneno contiene proteasas sensibles a quelantes de metales, a la vez que, estas metaloproteasas son las responsables en hidrolizar la caseína. De reunir el veneno serinoproteinasas sensibles al PMSF (ver ítem 4.2.2), estas enzimas dependientes de serina no son capaces de degradar el sustrato proteico empleado.

Por otro lado, los anticuerpos anti-balt lograron bloquear la acción hidrolítica del veneno sobre caseína. Este resultado, conjuntamente con los descriptos en el próximo apartado, permiten discernir el grado de especificidad/capacidad bloqueante de estos anticuerpos, usados como herramienta analítica en esta tesis.

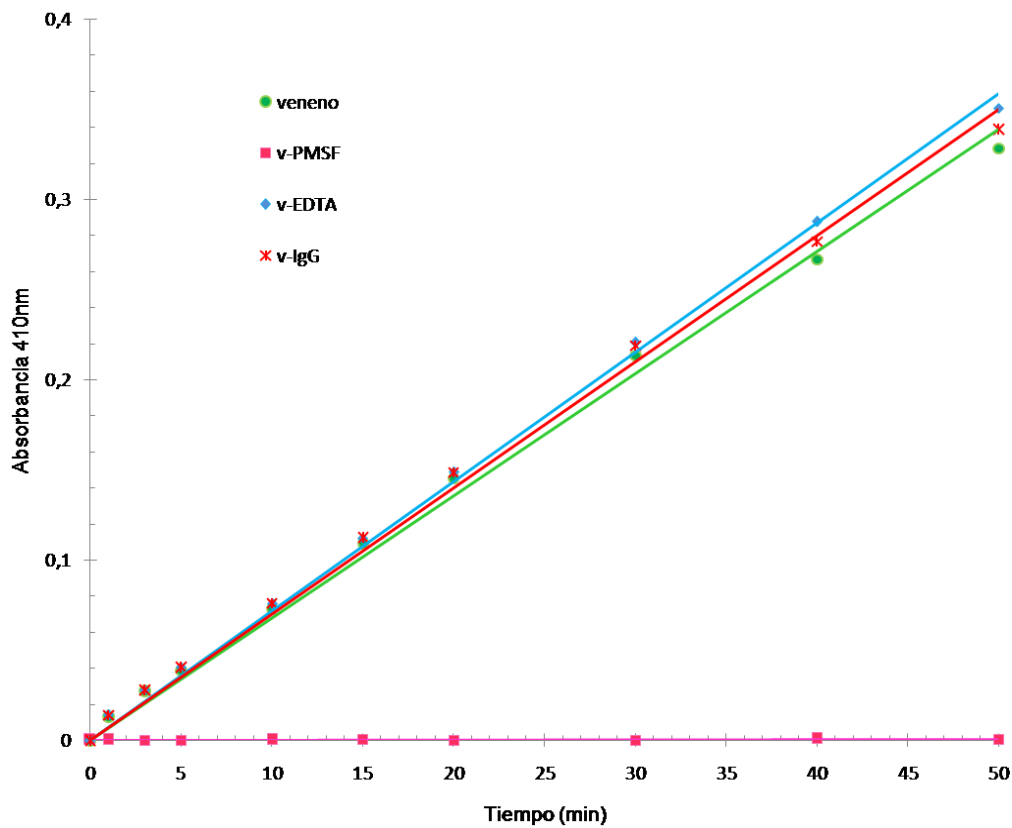
#### 4.2.2. Actividad proteolítica sobre BApNA en presencia de anticuerpos e inhibidores

La presencia de serinoproteinasas en el veneno de *B. alternatus* se evaluó a través de su capacidad de hidrolizar BApNA. Se empleó un test cinético sobre las mismas muestras utilizadas en el ítem anterior.

La Figura 4.17. ilustra los cambios en la absorbancia producidos por la acción enzimática en un lapso de 50 min. Se observa que el veneno, en presencia de PMSF, pierde la capacidad de degradar al BApNA, mientras que el EDTA- $\text{Na}_2$  y los anticuerpos anti-balt no inducen cambios en la actividad catalítica que exhibe el veneno sobre este sustrato cromogénico. Estos resultados permiten constatar que el veneno de *B.alternatus*. de serpientes del NEA presenta serinoproteinasas, sensibles al PMSF, y que esta familia de proteasa es la única con capacidad de actuar sobre BApNA.



**Figura 4.16.** Actividad proteolítica residual sobre azocaseína de veneno entero (veneno), veneno pre-incubado con PMSF (v-PMSF), con EDTA- $\text{Na}_2$  (v-EDTA) y con IgG anti-balt (v-IgG).



**Figura 4.17.** Actividad proteolítica residual sobre sustrato específico BApNA de veneno entero (veneno), veneno pre-incubado con PMSF (v-PMSF), con EDTA- $\text{Na}_2$  (v-EDTA) y con IgG anti-balt (v-IgG).

#### 4.2.3. Conclusiones de esta sección

El veneno de *B. alternatus* que habita el NEA posee metalo (SVMPs) y serinoproteinasas (SVSPs). Ambas poblaciones son claramente distinguibles en su acción cuando se emplea como sustrato caseína (apropiado para SVMPs) y BapNA (específico para SVSPs).

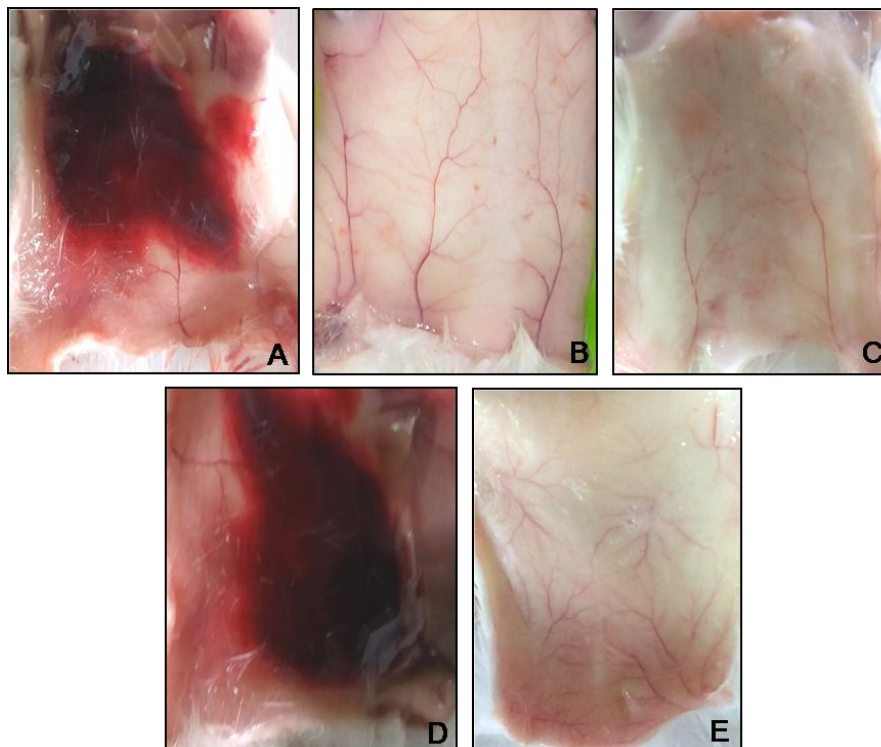
Resulta útil el empleo de EDTA, como así también de anticuerpos anti-batergina, cuando es necesario bloquear las SVMPs en un ensayo que requiere trabajar con veneno entero. De igual modo, el empleo de PMSF asegura la neutralización de las SVSPs presentes en la secreción.

### 4.3. Participación de las proteasas en la hemorragia exhibida por el veneno de *B. alternatus*

Se realizaron estudios con el propósito de evaluar la contribución de las familias de proteasas más importantes del veneno en la inducción de la hemorragia. También se abordaron estudios *in vitro* sobre células endoteliales, principal tipo celular involucrado en la extravasación sanguínea.

#### 4.3.1. Estudios de la hemorragia en presencia de anticuerpos e inhibidores

Se observó la parte interna de la piel de ratones (cepa CF01) inoculados con PBS (control), veneno y veneno pre-incubado con EDTA- $\text{Na}_2$  (5mM), PMSF (5mM) e IgG anti-balt (relación 1/20), luego de 2 h de exposición. Mientras que el veneno produjo un marcado halo hemorrágico (Fig 4.18.A), la piel de ratones inoculados con el veneno-EDTA- $\text{Na}_2$  (Fig 4.18.B) y con veneno-anticuerpos anti-balt (Fig 4.18. C), mostró conservación de la integridad vascular (ausencia de halo hemorrágico), al igual que los ratones del grupo control (Fig 4.18. E). Sin embargo, la piel de ratones inoculados con veneno-PMSF (Fig. 1.18. D) mostraron halos hemorrágicos de iguales dimensiones a aquellos inoculados con veneno entero.



**Figura 4.18.** Inhibición de la actividad hemorrágica del veneno entero. **A.** Veneno **B.** Veneno-EDTA- $\text{Na}_2$  **C.** V-IgG anti-balt (1/20). **D.** Veneno-PMSF **E.** PBS

Estos resultados confirmaron que las toxinas causantes de la hemorragia pertenecen exclusivamente a la familia de las metaloproteinasas, dado que el quelante empleado bloqueó completamente la misma al complejar el  $Zn^{2+}$  presente en el sitio activo de este tipo de metaloenzimas (Maeno *et al.*, 1960; OHSAKA, 1960; OHSAKA *et al.*, 1960). Asimismo la extensa actividad hemorrágica detectada luego de la inoculación del veneno pre-incubado con PMSF pone en evidencia que las SVSPs no participan del daño vascular. En los venenos vipéridos existen otros componentes como las LAAOs (L-aminoácido oxidasas) que pueden inducir hemorragia (Stabeli *et al.*, 2004; Izidoro *et al.*, 2014) sin embargo, en esta secreción, a la vista de los resultados obtenidos, no presentan un rol relevante.

La neutralización de la actividad hemorrágica lograda por las inmunoglobulinas G anti-balt corroboró las evidencias descriptas por Gay y colaboradores (2013), esto es, la capacidad de estos anticuerpos toxino-específicos en bloquear todas las toxinas responsables de inducir hemorragia .

Se ha propuesto, mediante hallazgos experimentales, un “modelo de dos pasos” que explica el mecanismo de acción de las SVMPs hemorrágicas (Gutiérrez *et al.*, 2016). Interviene la acción catalítica de estas enzimas sobre el colágeno tipo IV de la membrana basal de los capilares sanguíneos, como así también contribuyen los dominios símil desintegrina y rico en cisteína al unirse a las integrinas, proteínas de la membrana de las células endoteliales, impidiendo la unión a componentes de la lámina basal, debilitando la integridad del vaso capilar con la concomitante extravasación sanguínea. Esto explica una marcada hemorragia inducida por las SVMPs de la clase P-II y P-III, comparada con la causada por las P-I (Baldo *et al.*, 2010; Herrera *et al.*, 2015).

En concordancia con lo mencionado en el párrafo anterior, estudios previos de Gay y colaboradores (2009) demostraron que baltergina es capaz de actuar sobre el colágeno tipo IV. Para dilucidar si las SVMPs de este veneno tienen su accionar bajo el “modelo de dos pasos”, se realizaron ensayos celulares correspondientes a citotoxicidad y adhesión sobre células endoteliales, cuyos resultados se describen a continuación.

#### **4.3.2. Estudios de la interacción de proteasas del veneno *B. alternatus* sobre células endoteliales**

##### 4.3.2.1. Estudios de la actividad citotóxica

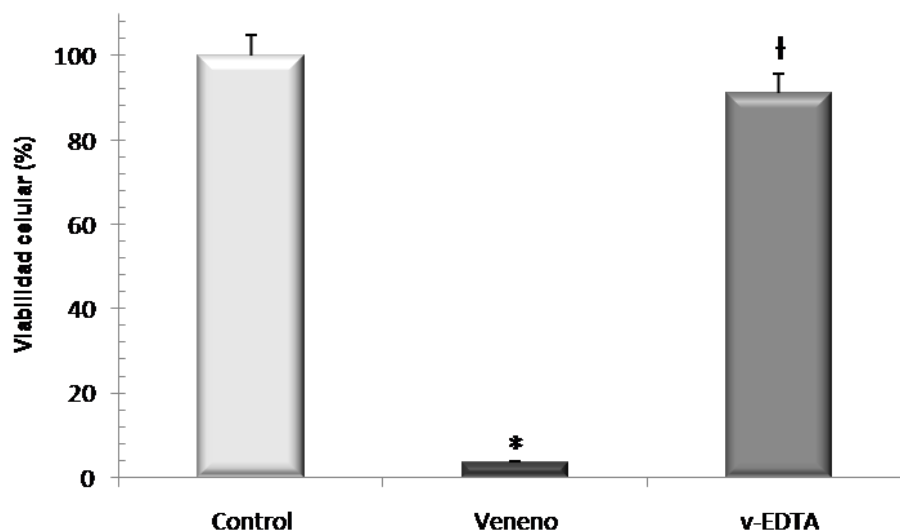
La citotoxicidad del veneno de *B.alternatus* con y sin el inhibidor EDTA- $Na_2$  fue ensayada cuantitativamente sobre las células endoteliales de la línea t-End. Luego de tres horas de incubación, el veneno indujo una disminución significativa en la viabilidad celular con respecto al control ( $p<0.05$ ). Por el contrario, en los ensayos realizados con veneno pre-

incubado con el inhibidor no se observaron diferencias significativas con respecto a los ensayos control, siendo la viabilidad celular reducida sólo en un ~8% (Fig. 4.19).

Además, al analizar el sobrenadante celular se constató ausencia de la enzima citoplasmática LDH tanto en las células tratadas con veneno solo como con veneno inhibido. Por ende no hubo actividad citolítica directa sobre las células endoteliales, incluso con la concentración más alta ensayada de 100 µg/mL.

Al no haber ruptura de la membrana celular, se deduce que las células sufren un efecto citotóxico basado principalmente en el desprendimiento del sustrato de las mismas y no en un efecto tóxico directo del veneno que produzca su lisis. Por ende, analizando la diferencia entre el desprendimiento celular observado con el veneno y prácticamente no evidenciado con el veneno inhibido, podemos concluir que las SVMPs serían las principales responsables de este efecto y que además depende del efecto proteolítico de las mismas.

Estudios previos realizados por la tesista y el grupo de investigación al que pertenece demuestran que el mecanismo de muerte celular *in vitro* desencadenado por baltergina es un tipo de apoptosis, denominado *anoikis* (Bustillo *et al.*, 2015; Bustillo *et al.*, 2017). Este mecanismo de muerte celular programada no es otra cosa que la apoptosis desencadenada por la falta de adhesión o adhesión inapropiada de la célula con la matriz extracelular (Valentijn *et al.*, 2004).



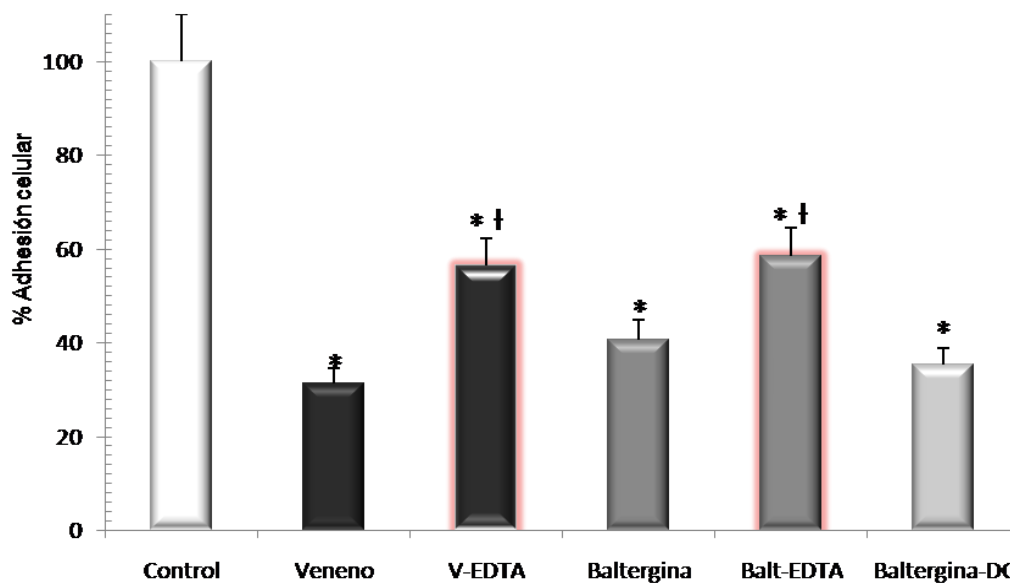
**Figura 4.19.** Efecto del veneno y veneno-EDTA- $\text{Na}_2$  sobre la viabilidad celular de la línea t-End. Las barras representan la media  $\pm$  DS ( $n=4$ ). \* $p<0,05$  con respecto al control. †  $p<0,05$  del veneno-EDTA- $\text{Na}_2$  con respecto al veneno.

Efectos similares fueron observados con otras SVMPs hemorrágicas, como BaH-1y BaP1 purificadas del veneno de *B. asper* (Lomonte *et al.*, 1994; Rucavado *et al.*, 1995; Díaz *et al.*, 2005) y jararagina, SVMP P-III aislada de *B. jararaca* (Tanjoni *et al.*, 2005).

#### 4.3.2.2. Estudios de adhesión celular

Para evaluar la contribución de las SVMPs en la inhibición de la adhesión celular se realizó un ensayo sobre células endoteliales con baltergina-DC, baltergina y veneno entero, estos dos últimos además fueron tratados con EDTA- $\text{Na}_2$  para inhibir la capacidad hidrolítica de las metaloproteinasas.

A las dosis ensayadas, se observó que tanto el veneno como la enzima inhiben significativamente la adhesión de las células (60-70% de inhibición celular). Sin embargo, los ensayos realizados con veneno y baltergina tratados con el agente quelante EDTA- $\text{Na}_2$  evidenciaron una mayor adhesión celular registrándose solo un  $40 \pm 1,8\%$  de este efecto inhibitorio. En cuanto a las células incubadas con baltergina-DC, sólo se adhirieron un  $38,5 \pm 1,2\%$  (Fig. 4.20).



**Figura 4.20.** Adhesión celular. Efecto del veneno, veneno inhibido con EDTA- $\text{Na}_2$  (v-EDTA), baltergina, baltergina-inhibidor (balt-EDTA) y baltergina-DC en la adhesión de células t-End. Las barras representan la media  $\pm$  DS (n=3). \* $p < 0,05$  con respecto al control. †  $p < 0,05$  del veneno o baltergina con EDTA- $\text{Na}_2$  con respecto al veneno o la enzima sin inhibidor, respectivamente.



Estos resultados dejaron en evidencia el papel parcial de la actividad catalítica de las SVMPS en el efecto de la inhibición celular y la participación de factores no hidrolíticos de estas enzimas, particularmente el dominio-DC.

Las integrinas juegan un papel crucial en la adhesión, migración, invasión y angiogénesis celular. Son esenciales, no sólo mediando la adhesión e interacción de las células a la matriz extracelular, sino también regulando vías de señalización intracelular como la supervivencia celular (Hood and Cheresh, 2002; Macedo *et al.*, 2015). Por esta razón, es posible que el efecto de baltergina-DC en la inhibición de la adhesión celular, se debiera a la unión específica o interacción con las integrinas  $\alpha\beta$  y sus subtipos. Estudios previos de Wang y colaboradores han demostrado que el motivo ECD, característico del dominio similar desintegrina está implicado en la interacción con integrinas. Acurhagin es una SVMP P-III purificada del veneno de *Agkistrodon acutu*, que por autoproteólisis da lugar a un fragmento-DC con motivo ECD, llamado acurhagin-C, éste desencadena anoikis en células endoteliales. Acurhagin-C actúa mediante la inhibición de la adhesión por bloqueo de la integrina  $\alpha_v\beta_3$ , esencial para el crecimiento y la supervivencia de las células endoteliales (Wang and Huang, 2002; Erdreich-Epstein *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Wang, 2010). Por otro lado, alternagina-C, purificada del veneno de *B. alternatus* de especímenes de la región de Brasil, no actúa a nivel de la integrina  $\alpha_v\beta_3$ , pero si es capaz de unirse a las  $\alpha_2\beta_1$  inhibiendo la adhesión de células endoteliales (Souza *et al.*, 2000; Cominetti *et al.*, 2004).

Estudios recientes del efecto de baltergina y baltergina-DC sobre la adhesión de una línea celular de mioblastos murinos (C2C12) han demostrado que ambas son capaces de inhibir la adhesión de las células C2C12. Además, se evidenció que el efecto inhibitorio de baltergina-DC fue significativamente mayor que el exhibido por baltergina. (Van de Velde *et al.*, 2017).

Los estudios estructurales llevados a cabo en esta tesis sobre baltergina-DC (ítem 4.1.3.4.) permiten prever la presencia del motivo ECD, lo cual explica su capacidad de unión a los receptores tipo integrinas presentes en las membranas celulares y con ellos inhibir la adhesión celular.

Estos resultados refuerzan el “modelo de dos pasos” mencionado anteriormente, propuesto por Gutiérrez (2016) para explicar el mecanismo de acción de las SVMP hemorrágicas.

### **4.3.3. Conclusiones de esta sección**

Los resultados presentados en esta sección, demuestran que las metaloproteinasas y no así las serinoproteinasas, son las responsables de alterar la integridad vascular provocando la hemorragia.

La extravasación sanguínea sería entonces el resultado de la acción de las metaloenzimas mediante un mecanismo de “dos pasos”, por degradación del colágeno de la lámina basal y por acción desintegrina, al interactuar la cadena proteica de la enzima con proteínas de membrana de endotelio capilar.

#### 4.4. Hemostasia primaria

En el apartado anterior se ha demostrado que las SVMPs son las responsables de provocar la extravasación sanguínea que induce el veneno en la intoxicación por *B. alternatus*. Cabe ahora dilucidar si estas enzimas, junto a las SVSPs, actúan sobre los componentes involucrados en el sistema hemostático, responsables de detener el sangrado.

Para ello se realizaron estudios sobre recuento de plaquetas y agregación plaquetaria como así también el tiempo de sangría, un ensayo ampliamente utilizado para evaluar la hemostasia primaria (Day *et al.*, 2004).

##### 4.4.1. Recuento de plaquetas

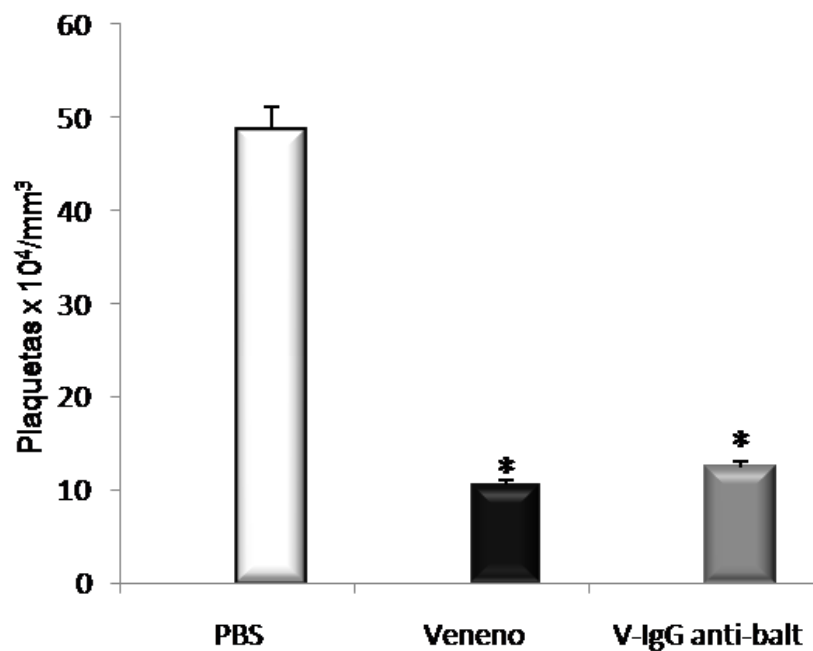
La función principal de las plaquetas es detener la hemorragia luego de una lesión vascular, para ello las mismas se adhieren a la matriz extracelular mediante receptores que presentan en su superficie. Para un correcto funcionamiento es imprescindible una determinada cantidad de plaquetas en circulación.

En este ensayo se realizó el recuento de plaquetas por método manual, en cámara de Neubauer, a partir de muestras sanguíneas anticoaguladas con EDTA- $\text{Na}_2$ , de grupos de ratones inoculados con PBS (control), veneno y veneno pre-incubado con anticuerpos toxino-específicos.

Se registró trombocitopenia (valores menores a  $15 \times 10^4$  plaquetas/mL) en aquellos ratones inoculados con veneno y veneno-IgG anti-balt, respecto a los grupos de ratones inoculados con solución salina (Fig. 4.21.). Los resultados no exhiben diferencias significativas en el recuento de plaquetas entre los animales tratados con veneno y veneno neutralizado.

Estos resultados dejan en evidencia que las metaloproteinasas no serían responsables de disminuir el número de plaquetas en circulación, a la dosis y tiempo ensayados, dado que el veneno que contiene las SVMPs bloqueadas (por la presencia de anticuerpos toxino-específico) ejerce un efecto comparable al veneno entero.

Según estudios de Serrano, la trombocitopenia inducida por el veneno de *B. jararaca*, sería atribuida a la capacidad de las serinoproteinasas de agregar las plaquetas a través de ensayos realizados *ex vivo* (Serrano, 2013). Esta propuesta, se basa en trabajos de Santos y colaboradores, quienes demostraron que PA-BJ y trombocitina, SVSPs purificadas de los venenos de *B. jararaca* y *B. atrox*, respectivamente, activan la agregación plaquetaria mediante un mecanismo similar al de la trombina. Ellas son capaces de actuar sobre el receptor PAR, especialmente PAR1 y PAR4, que se encuentran en plaquetas humanas (Santos *et al.*, 2000).



**Figura 4.21.** Recuento de plaquetas en muestras de ratones tratados con PBS (control), veneno y veneno pre-incubado con anticuerpos anti-baltergina (V-IgG anti-balt). \* $p < 0,05$  con respecto al control.

A partir de estas evidencias podría postularse que las SVSPs y no las SVMPS del veneno de *B. alternatus*, inducirían una agregación plaquetaria intravascular que conlleva a la formación de trombos circulantes que conducen a la trombocitopenia observada.

#### 4.4.2. Inhibición de la agregación plaquetaria

Dado que las interacciones plaqueta-plaqueta y plaqueta-endotelio están mediadas por receptores del tipo integrinas, se llevó a cabo el estudio de la acción de la región desintegrina de las SVMPS sobre la agregación plaquetaria. Para los ensayos se utilizó baltergina-DC, el fragmento estable obtenido por autólisis de baltergina, al cual no cuenta con el dominio catalítico de la enzima nativa.

La actividad anti-agregante de baltergina-DC se midió a partir de un plasma rico en plaquetas (PRP), por método turbidimétrico, con ADP como agente agregante de plaquetas. Como resultado, a partir de las absorbancias medidas y usando como control de *100% de agregación* la turbidez provocada por el agregado de PBS y *100% de inhibición* la turbidez del plasma pobre en plaquetas (PPP), se calculó el porcentaje de inhibición inducido por las soluciones de baltergina-DC (Tabla 4.1.). Se comprobó que el fragmento-DC es capaz de

**Tabla 4.1.** Efecto de la inhibición de agregación plaquetaria de baltergina-DC.

	<b>Abs<sub>410nm</sub></b>	<b>Abs-Abs<sub>PPP</sub></b>	<b>Abs<sub>PRP</sub>-Abs</b>	<b>% Agreg</b>	<b>%Inhib</b>
<b>PPP</b>	0,109±0,010	0±0,010			
<b>PRP</b>	0,415±0,016	0,306±0,006	0±0,009		
<b>ADP/PBS</b>	0,234±0,012	0,125±0,002	0,181±0,004	100±9	
<b>ADP/balt-DC 50µg</b>	0,313±0,015	0,204±0,008	0,102±0,008	56 ±5	<b>44±5</b>
<b>ADP/balt-DC 18µg</b>	0,281±0,013	0,172±0,004	0,134±0,007	74±6	<b>26±3</b>

inducir la inhibición de la agregación plaquetaria de manera dosis dependiente, observándose una disminución en la capacidad agregante del 44% con la dosis más alta ensayada (50 µg/ml).

El hecho que baltergina-DC interfiera de una manera dosis dependiente en la agregación plaquetaria, hace referencia a que es capaz de interactuar con los receptores en la superficie de las plaquetas, disminuyendo la respuesta y por ende retrasando la agregación de las mismas.

Estudios realizados por otros autores han demostrado que jararagina-C y catrocollastatin-C, fragmentos-DC derivados de SVMP hemorrágicas de los venenos de *Bothrops jararaca* y *Crotalus atrox* respectivamente, son capaces de inhibir la agregación plaquetaria. Tanto jararagina-C como catrocollastatin-C contienen la secuencia ECD que se une con alta afinidad a la subunidad  $\beta$  extracelular de los receptores del tipo integrina. En el caso particular de las proteínas-DC con motivo ECD, se unen a la integrina  $\alpha_2\beta_1$ , bloqueando su unión al colágeno (Zhou *et al.*, 1995; Shimokawa *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 2000; Moura-da-Silva *et al.*, 2001).

Bajo este modelo, el efecto antiagregante observado, luego de pre-incubar las plaquetas con baltergina-DC y adicionar ADP, puede explicarse por la presencia del fragmento-DC unido a  $\alpha_2\beta_1$ . Este complejo integrina/fragmento-DC interfiere en la unión de la proteína de membrana al colágeno expuesto en el sitio de injuria, y con ello impide la adhesión de la plaqueta a la proteína de la lámina basal. El hecho que  $\alpha_2\beta_1$  se encuentre bloqueada por el baltergina-DC, evita además la activación  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , integrina que se une al fibrinógeno/ fibrina para una adecuada agregación plaquetaria.

Los estudios estructurales llevados a cabo en esta tesis sobre baltergina-DC (ítem 4.1.3.4.) permiten prever una similitud molecular con otras desintegrinas secuenciadas. Por lo tanto ha de contener el motivo ECD perteneciente al dominio símil desintegrina lo cual explica su capacidad de unión a los receptores tipo integrinas (principalmente  $\alpha_2\beta_1$ ) de la membrana plaquetaria y con ello inhibir su agregación.

Este efecto anti-agregante plaquetario, puede explicarse también según propuesta de Sánchez y colaboradores quienes sugieren la existencia de una acción directa, donde la simple unión del fragmento-DC a los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub> (Fig. 1.16) impiden la acción del ADP y con ello la activación de la plaqueta (Sánchez *et al.*, 2010).

#### 4.4.3. Tiempo de sangría

El tiempo de sangría (TS) representa el tiempo que tarda en detenerse la hemorragia provocada por la injuria en los pequeños vasos. Es un test global que evalúa la formación del tapón plaquetario que se forma como resultado de la adhesión de las plaquetas a la pared de los vasos y la subsiguiente agregación.

En esta tesis, se midió el TS en ratones expuestos a veneno, veneno-anti-balt, como así también a una serinoproteinasa aislada del veneno de *B. alternatus* que fue provista por uno de los integrantes del laboratorio. Los resultados obtenidos a los 15 y 120 min. posteriores a la inoculación se muestran en la Figura 4.22.

Se observó que, aquellos animales cuya incisión en la cola se realizó a los 15 min posteriores a la inoculación, el tiempo de sangrado fue más corto ( $3,00 \pm 0,15$  min) en todos los grupos de animales con respecto al lote control ( $7,50 \pm 0,20$  min).

Dado que el test de TS depende de

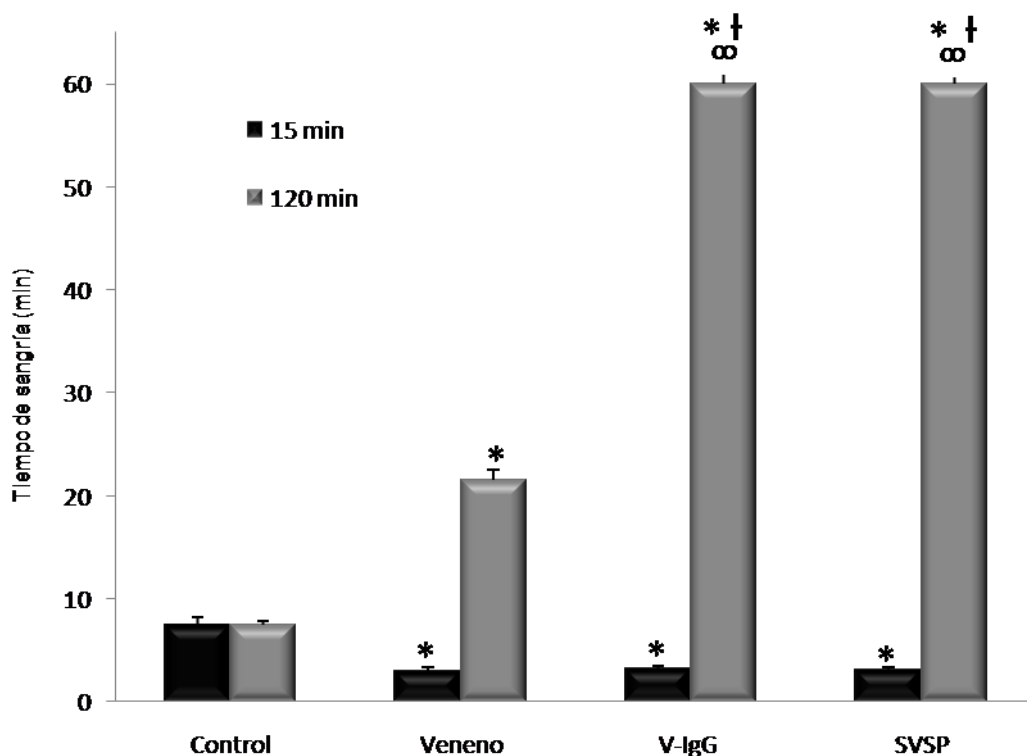
- de la función plaquetaria,
- del adecuado número de plaquetas funcionalmente intactas
- de la presencia de proteínas plasmáticas adhesivas que permiten la adhesión de las plaquetas a la pared vascular lesionada y la agregación plaquetaria,

los resultados dejan en evidencia que las metaloproteinasas no serían responsables de afectar el tiempo de sangría en los primeros minutos del envenenamiento, debido a que el veneno y el veneno-anti-balt no muestra diferencia significativa. Sin embargo, las SVSPs estarían directamente implicadas, ya que aquellos ratones que fueron inoculados con serinoproteinasa detuvieron su sangrado en corto tiempo, comportándose de igual modo el veneno y el veneno conteniendo sus metaloproteinasas neutralizadas.

El efecto de hipercoagulabilidad observado puede ser explicado considerando que a los primeros minutos de la intoxicación hay elevado nivel de toxinas circulantes; entre ellas las

SVSPs que, por un lado promueven la formación de fibrina a partir de fibrinógeno, actuando como enzimas tipo trombina (Mackessy, 2010) y por otro, agregando las plaquetas mediante un mecanismo similar al de la trombina (Santos *et al.*, 2000; de Queiroz *et al.*, 2017). Bothrombin, una SVSPs aislada del veneno de *B. jararaca* presenta este comportamiento propuesto para serinoproteinasas del veneno de *B. alternatus*, ya que es capaz de clivar el fibrinógeno, generando fibrinopéptido A, además de agregar las plaquetas (Watanabe *et al.*, 2002).

En cambio, la medición del TS llevada a cabo en ratones mediante un corte en su cola a los 120 min de la inoculación mostró otro comportamiento. Los ratones que fueron inoculados con veneno, reportaron un tiempo de cese de sangrado de ~ 21 min, mientras que los tratados con veneno-anticuerpos toxino-especificos y con SVSP, se volvieron incoagulables al tiempo ensayado (Fig. 4.22.).



**Figura 4. 22.** Tiempo de sangría de ratones tratados con PBS (control), veneno, veneno preincubado con anticuerpos específicos anti-balt (V-IgG) y una serinoproteinasas aislada del veneno de *B. alternatus* (SVSP) a los 15 y 120 min luego de la inoculación. ).\*p<0,05 con respecto al control. † p<0,05 del veneno con anticuerpos o la SVSP respecto al veneno. ∞: Incoagulable para el tiempo determinado.

Las proteasas de los venenos del género *Bothrops* promueven la formación de fibrina a partir de fibrinógeno, que desencadena un estado de hipercoagulabilidad al poco tiempo de la inoculación (Santoro and Sano-Martins, 1993; Mackessy, 2010). En la medida en que se transforma más fibrinógeno en fibrina, ésta se vuelve más lábil y susceptible de lisis por el sistema fibrinolítico natural, a la vez que se consume el fibrinógeno en grandes cantidades, lo que finalmente se manifiesta como incapacidad de la sangre para coagular (coagulopatía de consumo) (Freja and Martínez, 2014).

La incoagulabilidad de los ratones inoculados con el veneno previamente neutralizado con los anticuerpos toxino-específicos, indicaría que las serinoproteinasas con acción coagulante y agregante de plaquetas son las principales responsables de provocar las alteraciones en esta etapa “primaria” de la hemostasia por parte de esta secreción. Debe tenerse en cuenta además el efecto anti-agregante que presenta el dominio-DC de las SVMPs. La interacción desintegrina-integrinas de membrana conlleva a una imposibilidad por parte de las plaquetas de unirse a la superficie dañada, lo que contribuye a la incapacidad de detener el sangrado luego de dos horas de haber sido inoculado el ratón.

Por otro lado, el bloqueo de las SVMPs, hace que estas proteasas pierdan completamente la capacidad de degradar los componentes de la matriz extracelular y particularmente los que constituyen la membrana basal de los capilares, como así también su acción sobre las células endoteliales, impidiendo la extravasación de la sangre.

La ausencia de hemorragia aumenta la concentración efectiva de las SVSPs con actividad coagulante en el torrente sanguíneo, que provoca una depleción de fibrinógeno circulante volviendo incoagulable la sangre.

Se realizó la observación macroscópica de los pulmones de los diferentes grupos de ratones tratados y sólo aquellos que fueron inoculados con veneno entero presentaron petequias (no se dispone de registro fotográfico), demostrando así la efectividad de los anticuerpos anti-balt en neutralizar la hemorragia sistémica.

Un estudio realizado por Anai y colaboradores (2002) demostró que las alteraciones de la coagulación causada por la inyección subcutánea del veneno de *B. jararaca* fueron completamente prevenidas por la neutralización previa utilizando un anticuerpo específico dirigido contra una P-III hemorrágica (jararafibrase I). En este veneno la coagulopatía es debido a las enzimas tipo trombina, sin embargo las mismas no pueden ingresar al sistema circulatorio cuando las SVMPs están neutralizadas, demostrando así el importante rol de las metaloproteinasas en el esparcimiento de los componentes del veneno desde el sitio de inyección (Anai *et al.*, 2002).



#### 4.4.4. Conclusiones de la sección

Estos estudios ponen en evidencia la contribución de ambas familias de proteasas en las alteraciones hemostáticas primarias que tienen lugar en la intoxicación por veneno de *B. alternatus*.

En los primeros minutos posteriores a la intoxicación experimental del ratón con veneno de *B. alternatus*, se acorta el tiempo de sangrado por la participación de las SVSPs que, por su capacidad tipo trombina, aporta fibrina, molécula adhesiva necesaria para la formación del trombo plaquetario.

A las dos horas posteriores a la intoxicación experimental del ratón con veneno de *B. alternatus*, el tiempo de sangrado se prolonga. Por un lado, la acción de las serinoproteinasas en los primeros minutos lleva a una trombocitopenia y disminución del fibrinógeno por consumo. A este efecto, se suma el efecto de las SVMPs a través de su dominio-DC que interactúa con las integrinas de membrana de la superficie plaquetaria, lo que conlleva a la dificultad en formar el trombo plaquetario.

## 4.5. Hemostasia secundaria

Los resultados expuestos en la sección anterior demostraron la contribución de ambas poblaciones de proteasas (SVSPs y SVMPS) en las alteraciones que el veneno induce durante la respuesta hemostática primaria.

Para conocer la participación de estas enzimas en las alteraciones de la hemostasia secundaria o de la coagulación propiamente dicha, se llevaron a cabo estudios de determinación del tiempo de coagulación del plasma citratado pobre en plaquetas como del fibrinógeno, y la determinación de fibrinógeno plasmático en animales luego de ser sometidos al veneno neutralizado parcialmente con inhibidores o anticuerpos.

### 4.5.1. Determinación del TC sobre plasma y fibrinógeno

Las muestras ensayadas en este estudio fueron: veneno entero (270 µg/mL), veneno-IgG anti-balt (relación 1/20), veneno-EDTA-Na<sub>2</sub>, veneno-PMSF ó veneno-PMSF-EDTA-Na<sub>2</sub>. Para esta determinación se emplearon como sustratos de las enzimas que posee el veneno las siguientes biomoléculas/muestras:

- fibrinógeno, el cual, ante la presencia de enzimas con actividad tipo trombina es convertido en fibrina, observándose la formación de coágulo blanquecino (malla de fibrina).

- plasma citratado pobre en plaquetas, el cual reúne todos los factores, los que, mediante un proceso en cascada, concluyen en la activación de la trombina, y con ello la conversión del fibrinógeno en fibrina.

#### *Determinación de TC sobre fibrinógeno*

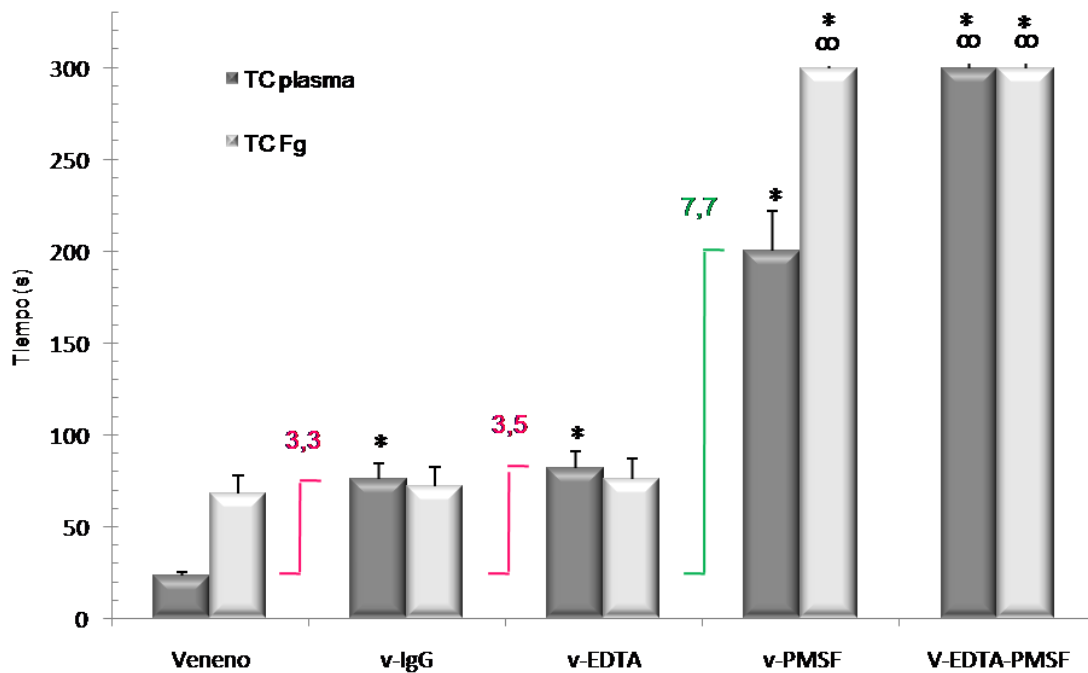
Los estudios sobre fibrinógeno mostraron que la adición de veneno sobre una solución de fibrinógeno induce la formación de fibrina en  $68 \pm 8$  s, mientras que si el veneno está bloqueado en sus serinoproteinasas, por la presencia de PMSF, este proceso no ocurre.

Por otro lado, si se bloquean sus metaloproteinasas, tanto por EDTA-Na<sub>2</sub> como por anti-balt, el TC del fibrinógeno no se modifica respecto al que exhibe el veneno entero.

#### *Determinación de TC sobre plasma*

Los estudios sobre plasma mostraron que la adición de veneno bloqueado en sus SVMPS, sea por anti-balt o por EDTA-Na<sub>2</sub>, induce una prolongación del TC, llegando a triplicar el tiempo que demora en coagular el veneno entero ( $23 \pm 3$  s) (Fig. 4.23.).

En cambio el veneno que contiene sus SVSPs inhibidas por el PMSF induce una prolongación significativa del TC (200 s), llegando a superar en casi 8 veces el tiempo que demora en coagular el veneno entero ( $23 \pm 3$  s) (Fig. 4.23.).



**Figura 4.23.** Tiempo de coagulación sobre plasma citratado y fibrinógeno \* $p < 0,05$  con respecto al veneno  $\infty$ : incoagulable al tiempo medido (600 s).

Por el contrario, resultó incoagulable el plasma que fue enfrentado al veneno previamente bloqueado con ambos inhibidores, PMSF y EDTA- $\text{Na}_2$ .

Los ensayos sobre fibrinógeno permitieron constatar que las SVSPs son las únicas responsables en convertir el fibrinógeno en fibrina, exhibiendo un comportamiento similar trombina (*thrombin like*), dado que al bloquearlas con el inhibidor específico no se observó la formación de la malla de fibrina (Fig. 4.23. estudio v-PMSF barra gris clara).

A la vez, los estudios sobre plasma citratado pobre en plaquetas, mostraron la participación de ambas proteasas en la cascada de la coagulación, propiciando así la conversión del fibrinógeno en fibrina durante el tiempo que demora el ensayo. Esta afirmación resulta de constatar el bloqueo con inhibidores específicos (Fig. 4.23. estudio v-EDTA ó v-IgG barra gris oscura, para inhibición de SVMPS, y v-PMSF barra gris oscura, para inhibición de SVSPs) en ambos casos el veneno mostró un alargamiento del TC. Por ello fue necesario bloquear el veneno con ambos inhibidores para evitar la formación del coágulo.

Cabe analizar también, comparativamente los valores del TC que exhibe el veneno inhibido por EDTA- $\text{Na}_2$  o por anticuerpos, sobre la solución de fibrinógeno y sobre el plasma.

Llamativamente arrojan valores que no son significativamente distintos (Fig. 4.23. estudio v-EDTA ó v-IgG barra gris oscura y gris clara). Si se tiene en cuenta que la concentración de Fg en solución es similar a la presente en el plasma empleado (~200 mg/dL), y que esta cuagulación es producto de las SVSPs (puesto que las SVMPs están bloqueadas), el resultado de este ensayo permite predecir que toda la población de serinoproteinasas de este veneno, actuarían como símil trombina (SVTL), y no habría SVSPs con acción pro-coagulante (C o D, según clasificación descrita en la INTRODUCCIÓN). De haber serinoproteinasas C o D, se esperaría un acortamiento en el TC del plasma citratado.

Hasta el presente, se han aislado de la secreción de *B. alternatus* serinoproteinasas tales como Bhalternin, Balterobin y SPBA, todas con actividad tipo trombina (Smolka *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2010; de Oliveira *et al.*, 2013), no habiendo registro sobre una capacidad pro-coagulante. Estas evidencias experimentales y los estudios proteómicos de *B. alternatus* realizados por Öhler y colaboradores (2010) respaldan lo concluido en el párrafo anterior.

Con respecto a las metaloproteinasas los resultados del estudio sobre plasma permiten constatar que las SVMPs, si bien no pueden convertir *per se* el fibrinógeno en fibrina, presentarían una actividad pro-coagulante. Estas activan, mediante clivaje específico, a los factores involucrados en la cascada de la coagulación, induciendo de un modo indirecto la activación de la trombina propia del plasma para llevar a cabo la formación del coágulo.

Las SVMPs pro-coagulantes son capaces de activar a los factores de la coagulación, principalmente la protrombina, el factor X y/o el factor V (Mackessy, 2010). Las metaloproteinasas de la clase P-III pertenecen al grupo A de las proteinasas pro-coagulantes. Ecarina, es una SVMP P-III aislada del veneno de *Echis carinatus* (Kornalik and Blombäck, 1975), la cual presenta el 64 % de identidad aminoacídica con la cadena pesada del factor X de la coagulación (Nishida *et al.*, 1995). Esta enzima es capaz de clivar la protrombina a meizotrombina, que por autoproteólisis se convierte en  $\alpha$ -trombina (Kini, 2005). Se han aislado enzimas del venenos de especímenes del género *Bothrops* con función activadora de protrombina, similar a eucarina, es decir capaces de generar meizotrombina (Govers-Riemslog *et al.*, 1987; Hofmann and Bon, 1987; Loría *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003; Sartim *et al.*, 2017).

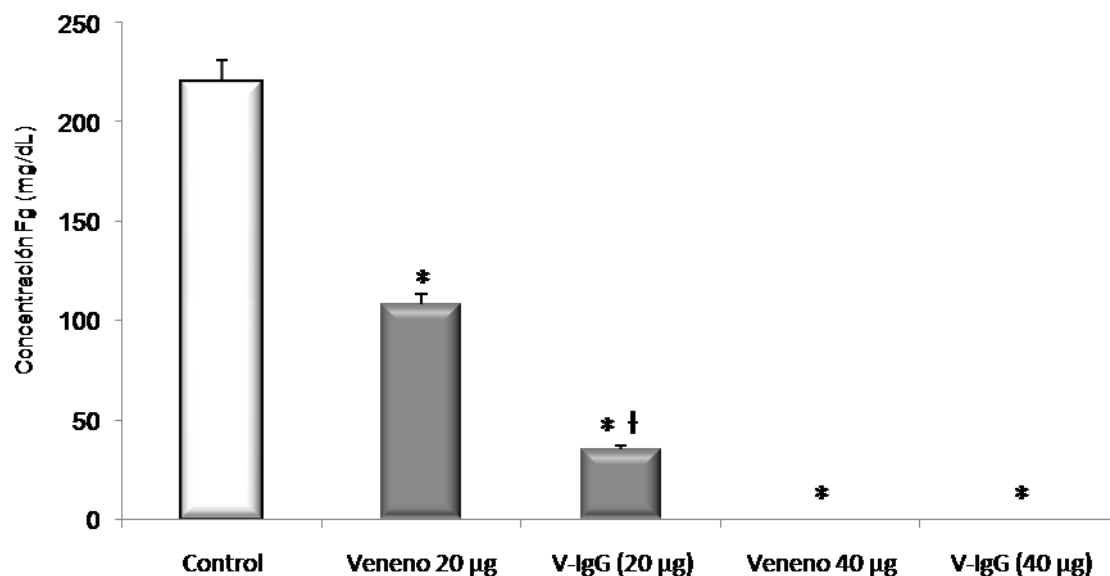
En resumen, el veneno de *B. alternatus* muestra una capacidad de alterar la coagulación debida principalmente a una actividad coagulante directa sobre el fibrinógeno por acción de SVSPs, y una acción pro-coagulante de menor magnitud debida a las SVMPs, que podrían activar protrombina o FX. Estas metaloproteinasas son reconocidas por los anticuerpos anti-balt y bloquean su acción pro-coagulante.

Se concluye con estos estudios que ambas poblaciones de proteinasas contribuyen a la conversión de fibrinógeno en fibrina. Es de prever que esta acción impartida por ambas poblaciones de proteasas conlleve a una depleción del fibrinógeno plasmático y con ellos a una alteración en la hemostasia secundaria. Dado que el fibrinógeno/fibrina es una molécula adhesiva clave en la formación del trombo plaquetario. Estas cuestiones se dilucidaron mediante los estudios descriptos en el próximo ítem.

#### 4.5.2. Determinación de fibrinógeno plasmático

La concentración de fibrinógeno es crucial para una adecuada formación del coágulo. Para evaluar el grado de afectación que provoca el veneno y sus componentes a nivel de ésta biomolécula, se llevó a cabo la determinación de fibrinógeno plasmático en muestras de plasma citratado pobre en plaquetas, obtenido a las 2 h, de animales que fueron expuestos por vía i.v a PBS (controles), veneno (en dos dosis, 20 y 40  $\mu\text{g}$ ), veneno/IgG anti-balt (relación veneno/IgG 20 $\mu\text{g}$ /600  $\mu\text{g}$  y 40 $\mu\text{g}$ /1200  $\mu\text{g}$ ).

A partir de los tiempos de coagulación resultantes de la adición de trombina comercial a las muestras de plasma, se determinó la concentración de fibrinógeno, resultados que se representan en la figura 4.24.



**Figura 4.24.** Determinación de fibrinógeno en plasma extraído de ratones inoculados con PBS (control), veneno (20 y 40  $\mu\text{g}$ ), veneno pre-incubado con anticuerpos anti-balt (relación 1/30). \* $p < 0,05$  con respecto al control. †  $p < 0,05$  del veneno con anticuerpos respecto al veneno solo.

Los ratones inoculados con 20  $\mu\text{g}$  de veneno presentaron una concentración de fibrinógeno en plasma ( $100\pm 13$  mg/dL) significativamente menor que la de los ratones control ( $220\pm 24$  mg/dL). Los ratones que recibieron el veneno pre-incubado con anticuerpos anti-balt (20 $\mu\text{g}$ /600  $\mu\text{g}$ ), mostraron una depleción de fibrinógeno mayor, con valores por debajo de 30 mg/dL.

Por otro lado, a los grupos de ratones que se les ensayó una dosis doble de veneno (40  $\mu\text{g}$ ) y veneno-IgG anti-balt (40 $\mu\text{g}$ /1200  $\mu\text{g}$ ), no fue posible determinar la concentración de fibrinógeno plasmático, es decir el plasma no coaguló al agregar la trombina, debido a una concentración indetectable de fibrinógeno o a la ausencia del mismo.

Los resultados ponen en evidencia que, si bien el consumo de fibrinógeno es el resultado de la acción de ambas proteasas, las serinoproteinasas tendrían un rol clave debido a su actividad tipo trombina. Esto se concluye a partir de los estudios realizados con anticuerpos anti-balt, ya que los mismos neutralizan la actividad pro-coagulante de las SVMPs y la acción proteolítica de estas sobre el endotelio, evitando de esta forma el sangrado con la pérdida concomitante de moléculas SVSPs. Este efecto aumentaría la concentración efectiva de las serinoproteinasas con actividad coagulante en circulación y por ende una mayor depleción de Fg.

Solo cuando se ensayó una dosis mayor, la cantidad de SVSPs y SVMPs presentes en el veneno fueron suficientes para provocar, a las dos horas, una desfibrinogénesis por consumo e incoagulabilidad sanguínea, ya sea por acción tipo trombina de las serinoproteinasas o pro-coagulantes de las metaloproteinasas.

Estos resultados coinciden con lo observado en la determinación del tiempo de sangría y el recuento de plaquetas. La incapacidad de detener el sangrado por parte de los ratones expuestos a veneno, es producto de una depleción de fibrinógeno causada por una coagulación intravascular diseminada en los primeros minutos del envenenamiento. Esta formación anormal de coágulos consume tanto el Fg soluble como a las plaquetas que se encuentran en circulación.

Los anticuerpos anti-balt, que tienen la capacidad de bloquear la actividad proteolítica, hemorrágica y pro-coagulante de las SVMPs, no fueron capaces de impedir la depleción de fibrinógeno. Lo que deja en evidencia que las SVSPs son los principales componentes responsables de provocar desfibrinogénesis por consumo en el veneno de *B. alternatus*.

#### **4.5.3. Conclusión de la sección**

Tanto las SVMPs como las SVSPs del veneno de *B. alternatus* contribuyen a la conversión de fibrinógeno en fibrina.

Los resultados ponen en evidencia que las serinoproteinasas inducen la formación de fibrina por una acción del tipo *trhombin like*, mientras que las metaloproteinasas, colaboran con este proceso mediante una acción pro-coagulante.

*Capítulo 5*  
*Conclusiones*



## Conclusiones parciales

- ✓ Se halló que la fracción llamada **baltergina** está constituida por 9 isoformas, con alta homología en su secuencia a otras SVMP P-III, y que **baltergina-DC**, obtenida por autoproteólisis (bajo óptimas condiciones: pH 7 y 37°C por 96 h) de baltergina, se ubica dentro de la familia de proteínas símil desintegrina. Ambas proteínas fueron utilizadas como herramientas moleculares para el estudio del rol de las SVMPs en las alteraciones hemostáticas.
- ✓ El veneno de *B. alternatus* que habita el NEA posee metalo- (SVMPs) y serinoproteinasas (SVSPs). Ambas poblaciones son claramente distinguibles en su acción cuando se emplean como sustratos caseína (apropiado para SVMPs) y BApNA (específico para SVSPs).
- ✓ Resulta útil para bloquear las SVMPs el empleo de EDTA-Na<sub>2</sub>, como así también de anticuerpos anti-balt. De igual modo, el empleo de PMSF asegura la neutralización de las SVSPs presentes en la secreción.
- ✓ Las metaloproteinasas, y no así las serinoproteinasas, son las responsables de alterar la integridad vascular provocando la hemorragia, probablemente mediante un mecanismo de “dos pasos” por degradación del colágeno de la lámina basal y por acción desintegrina.
- ✓ Las SVMPs y las SPSVs contribuyen en las alteraciones de la hemostasia primaria:
  - En los primeros minutos posteriores a la intoxicación experimental del ratón con veneno de *B. alternatus*, se acorta el tiempo de sangrado por la participación de las SVSPs que forman fibrina, por su capacidad tipo trombina, molécula adhesiva necesaria para la formación del trombo plaquetario.
  - A las dos horas posteriores a la intoxicación experimental del ratón con veneno de *B. alternatus*, el tiempo de sangrado se prolonga por una disminución de las plaquetas circulantes y del fibrinógeno por consumo. A este efecto desencadenado por las SVSPs, se suma el efecto de las SVMPs a través de su dominio desintegrina, lo que conlleva a la dificultad en formar el trombo plaquetario.

- ✓ Tanto las SVMPs como las SVSPs del veneno de *B. alternatus* contribuyen a la conversión de fibrinógeno en fibrina. Las serinoproteinasas inducen la formación de fibrina por una acción del tipo trombina, mientras que las metaloproteinasas colaboran con este proceso mediante una acción pro-coagulante.

## Conclusiones finales

El envenenamiento ofídico por *B. alternatus* puede desencadenar la muerte, debida principalmente a la acción hemorrágica característica de este veneno.

En esta tesis se pudo constatar que la extravasación sanguínea, consecuencia de la ruptura vascular y alteración en la hemostasia, es el resultado de la acción de los principales componentes de esta secreción, metalo- y serinoproteinasas, con roles definidos:

- alteración vascular* resultado de la acción de la SVMPs. Por un lado, a la ya conocida capacidad de estas enzimas de hidrolizar los componentes de la lámina basal, se comprobó el efecto anti-adherente a través del dominio desintegrina-rico en cisteína, ya que interactuaría con integrinas de membrana de células endoteliales.

- desfibrinogénación* donde intervienen ambas familias de proteasas. Las metaloproteinasas con acción pro-coagulante y fibrino(geno)lítica, y las serinoproteinasas con funciones del tipo trombina.

- trombocitopenia* probablemente provocadas por las SVSPs, debido a su acción coagulante y agregante plaquetaria.

- anti-agregante* plaquetario, a causa de la interacción del dominio-DC de las SVMPs con las integrinas de membrana, que impedirían la unión de las plaquetas en el sitio de injuria.

El presente estudio permitió reconocer la contribución de ambas familias de proteasas en las alteraciones hemostáticas. Si bien las SVSPs participan con un rol relevante, fundamentalmente por el consumo de fibrinógeno, las SVMPs además de causar daño vascular provocando hemorragia, inhiben la agregación plaquetaria y contribuyen en la depleción del fibrinógeno circulante. De esta forma, las metaloproteinasas se vuelven enzimas con una marcada participación en las alteraciones en la hemostasia inducidas por este veneno botrópico.

Los resultados aquí descritos, conjuntamente a evidencias reunidas de estudios previos, demuestran que los anticuerpos anti-balt serían efectivos neutralizando la hemorragia (tanto local como sistémica), proteólisis de componentes de la matriz extracelular, formación de

trombo plaquetario y en general todos los efectos inducidos por las SVMs. Si se utilizaran potencialmente como terapia, la víctima del accidente ofídico tratada con un anti-suero anti-balt se encontraría en un estado anticoagulado transitorio pero sin extravasación de sangre, evitándose con ello la principal causa de muerte por parte de este veneno. Así esta tesis aporta información que podría ser relevante para el diseño de inmunobiológicos más específicos, de baja carga proteica, tendientes a optimizar la actual seroterapia antiofídica.

*Capitolo 6*  
*Bibliografia*

- Alvarado Arteaga, I.M., 2013. Fisiología de la coagulación: nuevos conceptos aplicados al cuidado perioperatorio. *Universitas Médica* 54.
- Anai, K., Sugiki, M., Yoshida, E., Maruyama, M., 2002. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. *Toxicon* 40, 63-68.
- Assakura, M.T., Silva, C.A., Mentele, R., Camargo, A.C., Serrano, S.M., 2003. Molecular cloning and expression of structural domains of bothropasin, a P-III metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. *Toxicon* 41, 217-227.
- Baldo, C., Jamora, C., Yamanouye, N., Zorn, T.M., Moura-da-Silva, A.M., 2010. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. *PLoS neglected tropical diseases* 4, e727.
- Bazaa, A., Marrakchi, N., El Ayeb, M., Sanz, L., Calvete, J.J., 2005. Snake venomomics: comparative analysis of the venom proteomes of the Tunisian snakes *Cerastes cerastes*, *Cerastes vipera* and *Macrovipera lebetina*. *Proteomics* 5, 4223-4235.
- Beca, T., Hernández, G., Morante, S., Bascones, A., 2007. Plasma rico en plaquetas: Una revisión bibliográfica. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral* 19, 39-52.
- Bell, W.R., 1997. Defibrinogenating enzymes. *Drugs* 54, 18-31.
- Bello, C., Hermogenes, A., Magalhaes, A., Veiga, S., Gremski, L., Richardson, M., Sanchez, E.F., 2006. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. *Biochimie* 88, 189-200.
- Bernardes, C.P., Santos-Filho, N.A., Costa, T.R., Gomes, M.S., Torres, F.S., Costa, J., Borges, M.H., Richardson, M., dos Santos, D.M., de Castro Pimenta, A.M., 2008. Isolation and structural characterization of a new fibrin (ogen) olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 51, 574-584.
- Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacology & therapeutics* 62, 325-372.
- Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1995. Snake venom metalloendopeptidases: Reprolysins. *Methods in enzymology* 248, 345-368.
- Bode, W., Gomis-Rüth, F.-X., Stöckler, W., 1993. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS letters* 331, 134-140.
- Brecher, G., Cronkite, E.P., 1950. Morphology and enumeration of human blood platelets. *Journal of Applied Physiology* 3, 365-377.
- Broos, K., Feys, H.B., De Meyer, S.F., Vanhoorelbeke, K., Deckmyn, H., 2011. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood reviews* 25, 155-167.
- Bussolino, F., Ziche, M., Wang, J.M., Alessi, D., Morbidelli, L., Cremona, O., Bosia, A., Marchisio, P.C., Mantovani, A., 1991. In vitro and in vivo activation of endothelial cells by colony-stimulating factors. *Journal of Clinical Investigation* 87, 986.
- Bustillo, S., García-Denegri, M.E., Gay, C., Van de Velde, A.C., Acosta, O., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Leiva, L., 2015. Phospholipase A 2 enhances the endothelial cell detachment effect of a snake venom metalloproteinase in the absence of catalysis. *Chemico-biological interactions* 240, 30-36.
- Bustillo, S., Gay, C.C., Denegri, M.E.G., Ponce-Soto, L.A., de Kier Joffé, E.B., Acosta, O., Leiva, L.C., 2012. Synergism between baltergin metalloproteinase and Ba SPII RP4 PLA 2 from *Bothrops alternatus* venom on skeletal muscle (C2C12) cells. *Toxicon* 59, 338-343.
- Bustillo, S., Van de Velde, A.C., Perfumo, V.M., Gay, C.C., Leiva, L.C., 2017. Apoptosis induced by a snake venom metalloproteinase from *Bothrops alternatus* venom in C2C12 muscle cells. *Apoptosis* 22, 491-501.

- Butt, E., Walter, U., 1997. Platelet phosphodiesterases. *Platelets and Their Factors*. Springer, pp. 219-230.
- Calvete, J.J., Marcinkiewicz, C., Monleón, D., Esteve, V., Celda, B., Juárez, P., Sanz, L., 2005. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon* 45, 1063-1074.
- Cardoso, J., França, F., Wen, F., Málaque, C., Haddad Jr, V., 2009. Animais peçonhentos no Brasil. *Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. 2ª. ed. São Paulo, Brasil: Ed. Sarvier.
- Cardoso, J.L.C., França, F.O.d.S., Wen, F.H., Malaque, C.M.S.A., Haddad Junior, V., 2003. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Sarvier.
- Cardoso, K.C., Da Silva, M.J., Costa, G.G., Torres, T.T., Del Bem, L.E.V., Vidal, R.O., Menossi, M., Hyslop, S., 2010. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). *BMC genomics* 11, 605.
- Carnielli, C.M., Artier, J., de Oliveira, J.C.F., Novo-Mansur, M.T.M., 2017. Xanthomonas citri subsp. citri surface proteome by 2D-DIGE: ferric enterobactin receptor and other outer membrane proteins potentially involved in citric host interaction. *Journal of proteomics* 151, 251-263.
- Castro, H., Zingali, R., Albuquerque, M., Pujol-Luz, M., Rodrigues, C., 2004. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, 843-856.
- Castro, H.C., Dutra, D.L., Oliveira-Carvalho, A.L., Zingali, R.B., 1998. Bothroaltein, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon* 36, 1903-1912.
- Cei, J.M., 1993. Reptiles del noroeste, nordeste y este de la Argentina: Herpetofauna de las selvas subtropicales, Puna y Pampas.
- Cesarman-Maus, G., Hajjar, K.A., 2005. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British journal of haematology* 129, 307-321.
- Clauss, A., 1957. Gerinnungsphysiologische schnellmethode zur bestimmung des fibrinogens. *Acta haematologica* 17, 237-246.
- Cominetti, M.R., Ribeiro, J.U., Fox, J.W., Selistre-de-Araujo, H.S., 2003. BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the *Bothrops alternatus* snake venom that interacts with  $\alpha 5\beta 1$  integrin. *Arch Biochem Biophys* 416, 171-179.
- Cominetti, M.R., Terruggi, C.H., Ramos, O.H., Fox, J.W., Mariano-Oliveira, A., De Freitas, M.S., Figueiredo, C.C., Morandi, V., Selistre-de-Araujo, H.S., 2004. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 279, 18247-18255.
- Costa, J., Petric, C., Hamaguchi, A., Homsí-Brandeburgo, M., Oliveira, C., Soares, A., Oliveira, F., 2007. Purification and functional characterization of two fibrinogenolytic enzymes from *Bothrops alternatus* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 13, 640-654.
- Costa, J.d.O., Fonseca, K.C., Mamede, C.C.N., Beletti, M.E., Santos-Filho, N.A., Soares, A.M., Arantes, E.C., Hirayama, S.N., Selistre-de-Araujo, H.S., Fonseca, F., 2010. Bhalternin: functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. *Toxicon* 55, 1365-1377.
- Croce, P., 2007. <http://ofidios.blogspot.com/2008/10/accidente-bothropico.html>. Ofidios venenosos.
- Chippaux, J.-P., Goyffon, M., 1998. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon* 36, 823-846.
- Chippaux, J.-P., Williams, V., White, J., 1991. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 29, 1279-1303.
- Dalmáu, A., 2011. Fisiología de la hemostasia. URL disponible en: [http://www.scartd.org/arxius/hemostasia\\_05.pdf](http://www.scartd.org/arxius/hemostasia_05.pdf) Fecha de acceso 23.
- Davì, G., Patrono, C., 2007. Platelet activation and atherothrombosis. *New England Journal of Medicine* 357, 2482-2494.

- Davie, E.W., Ratnoff, O.D., 1964. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 145, 1310-1312.
- Day, S.M., Reeve, J.L., Myers, D.D., Fay, W.P., 2004. Murine thrombosis models. *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART*- 92, 486-494.
- de Araujo, H.S.S., de Souza, D.H., Ownby, C.L., 1997. Analysis of a cDNA sequence encoding a novel member of the snake venom metalloproteinase, disintegrin-like, cysteine-rich (MDC) protein family from *Agkistrodon contortrix laticinctus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1342, 109-115.
- de Lima, D.C., Alvarez Abreu, P., de Freitas, C.C., Santos, D.O., Borges, R.O., Dos Santos, T.C., Mendes Cabral, L., Rodrigues, C.R., Castro, H.C., 2005. Snake Venom: Any Clue for Antibiotics and CAM? *Evid Based Complement Alternat Med* 2, 39-47.
- de Oliveira, L.M.F., Ullah, A., Masood, R., Zelanis, A., Spencer, P.J., Serrano, S.M., Arni, R.K., 2013. Rapid purification of serine proteinases from *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* venoms. *Toxicon* 76, 282-290.
- de Queiroz, M.R., de Sousa, B.B., da Cunha Pereira, D.F., Mamede, C.C.N., Matias, M.S., de Moraes, N.C.G., de Oliveira Costa, J., de Oliveira, F., 2017. The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. *Toxicon*.
- De Roodt, A., 2002. Estudio Inmunobiológico del veneno de serpientes de importancia sanitaria de la Argentina. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.
- de Roodt, A.a.C., N, 2014. Aspectos epidemiológicos del ofidismo en Argentina con énfasis en la región Nordeste. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación, Puerto Iguazú: INMeT.
- de Roodt, A.R., Dolab, J.A., Galarce, P.P., Gould, E., Litwin, S., Dokmetjian, J.C., Segre, L., Vidal, J.C., 1998. A study on the venom yield of venomous snake species from Argentina. *Toxicon* 36, 1949-1957.
- de Roodt, A.R., Lanari, L.C., Laskowicz, R.D., Botassi, S., Rocco, D.M., Costa de Oliveira, V., Regner, P.I., 2012. Comparación de caracteres corporales y del veneno de *Bothrops alternatus* entre poblaciones de las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos, Argentina. *Cuadernos de herpetología* 26, 05-12.
- de Torrent, R., Raquel, M., Ulón, S.N., Sario, H.M., 2004. Epidemiología del accidente ofídico en la provincia de Corrientes.
- Denegri, M.E.G., Acosta, O.C., Huancahuire-Vega, S., Martins-de-Souza, D., Marangoni, S., Maruñak, S.L., Teibler, G.P., Leiva, L.C., Ponce-Soto, L.A., 2010. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA 2 Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. *Toxicon* 56, 64-74.
- Díaz, C., Valverde, L., Brenes, O., Rucavado, A., Gutiérrez, J.M., 2005. Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells. *Journal of cellular biochemistry* 94, 520-528.
- Dolab, J.A., de Roodt, A.R., de Titto, E.H., García, S.I., Funes, R., Salomón, O.D., Chippaux, J.-P., 2014. Epidemiology of snakebite and use of antivenom in Argentina. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 108, 269-276.
- Elifio-Esposito, S.L., Hess, P.L., Moreno, A.N., Lopes-Ferreira, M., Ricart, C.A.O., Souza, M.V., Hasselman-Zielinski, F., Becker, J.A., F., P.L., 2007. A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom can adhere to extracellular matrix proteins and induce the rolling of Leukocytes. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 13, 782-799.
- Erdreich-Epstein, A., Tran, L.B., Cox, Ó.T., Huang, E.Y., Laug, W.E., Shimada, H., Millard, M., 2005. Endothelial apoptosis induced by inhibition of integrins  $\alpha\beta 3$  and  $\alpha\beta 5$  involves ceramide metabolic pathways. *Blood* 105, 4353-4361.
- Escalante, T., Núñez, J., da Silva, A.M.M., Rucavado, A., Theakston, R.D.G., Gutiérrez, J.M., 2003. Pulmonary hemorrhage induced by jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicology and applied pharmacology* 193, 17-28.

- Escalante, T., Rucavado, A., Fox, J.W., Gutiérrez, J.M., 2011. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Journal of proteomics* 74, 1781-1794.
- Esteso, S.C., 1985. Ofidismo en la República Argentina. Argentina.
- Fay, W.P., Garg, N., Sunkar, M., 2007. Vascular functions of the plasminogen activation system. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 1231-1237.
- Florea, G., Andrei, Ș., Gâz Florea, A., Kelemen, H., Muntean, D.-L., 2016. Snake venom metalloproteinases. *Acta Medica Marisiensis* 62, 106-111.
- Flores-Rivera, O.I., Ramírez-Morales, K., Meza-Márquez, J.M., Nava-López, J.A., 2014. Fisiología de la coagulación. *Revista Mexicana de Anestesiología* 37, 382-386.
- Fox, J.W., Serrano, S.M., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45, 969-985.
- Fox, J.W., Serrano, S.M., 2008. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *The FEBS journal* 275, 3016-3030.
- Fox, J.W., Serrano, S.M., 2010. Snake venom metalloproteinases. *Handbook of venoms and toxins of reptiles*, 95-113.
- Freja, A.G., Martínez, G.A., 2014. Insuficiencia renal aguda inducida por mordedura de serpiente bothrops: Reporte de un caso. *Biociencias* 9, 53-58.
- Fujimura, S., Oshikawa, K., Terada, S., Kimoto, E., 2000. Primary structure and autoproteolysis of brevilysin H6 from the venom of *Gloydius halys brevicaudus*. *The Journal of Biochemistry* 128, 167-173.
- Gay, C., Leiva, L., Maruñak, S., Teibler, P., De Pérez, O.A., 2005. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon* 46, 546-554.
- Gay, C., Marunak, S., Teibler, P., Leiva, L., Acosta, O., 2013. Effect of monospecific antibodies against baltergin in myotoxicity induced by *Bothrops alternatus* venom from northeast of Argentina. Role of metalloproteinases in muscle damage. *Toxicon* 63, 104-111.
- Gay, C.C., Marunak, S.L., Teibler, P., Ruiz, R., Acosta de Perez, O.C., Leiva, L.C., 2009. Systemic alterations induced by a *Bothrops alternatus* hemorrhagic metalloproteinase (baltergin) in mice. *Toxicon* 53, 53-59.
- Giraudó, A.R., Arzamendia, V., Bellini, G.P., Bessa, C.A., Calamante, C.C., Cardozo, G., Chiaraviglio, M., Costanzo, M., Etchepare, E.G., Di Cola, V., 2012. Categorización del estado de conservación de las Serpientes de la República Argentina. *Cuadernos de herpetología* 26, 303-326.
- Gomes, M.S.R., De Queiroz, M.R., Mamede, C.C., Mendes, M.M., Hamaguchi, A., Homsí-Brandeburgo, M.I., Sousa, M.V., Aquino, E.N., Castro, M.S., de Oliveira, F., 2011. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 153, 290-300.
- Govers-Riemslog, J.P., Knapen, M.J., Tans, G., Zwaal, R.F., Rosing, J., 1987. Structural and functional characterization of a prothrombin activator from the venom of *Bothrops neuwiedi*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 916, 388-401.
- Grams, F., Huber, R., Kress, L.F., Moroder, L., Bode, W., 1993. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS letters* 335, 76-80.
- Grimaldo-Gómez, F.A., 2017. Fisiología de la hemostasia. *Revista Mexicana de Anestesiología* 40, 398-400.
- Gutiérrez, J.M., 2002. Understanding snake venoms: 50 years of research in Latin America. *Rev Biol Trop* 50, 377-394.
- Gutiérrez, J.M., 2011. Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional.



- Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., Habib, A.G., Harrison, R.A., Williams, D.J., Warrell, D.A., 2017. Snakebite envenoming. *Nature reviews: disease primers* 3, e17063-e17063.
- Gutiérrez, J.M., Escalante, T., Rucavado, A., Herrera, C., 2016. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: a journey of discovery and understanding. *Toxins* 8, 93.
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., 2000. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82, 841-850.
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Díaz, C., 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45, 997-1011.
- Gutiérrez, J.M., Williams, D., Fan, H.W., Warrell, D.A., 2010. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon* 56, 1223-1235.
- Gutiérrez, J.M.a., Ownby, C.L., 2003. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A 2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 42, 915-931.
- Herrera, C., Escalante, T., Voisin, M.-B., Rucavado, A., Morazán, D., Macêdo, J.K.A., Calvete, J.J., Sanz, L., Nourshargh, S., Gutiérrez, J.M., 2015. Tissue localization and extracellular matrix degradation by PI, PII and PIII snake venom metalloproteinases: clues on the mechanisms of venom-induced hemorrhage. *PLoS neglected tropical diseases* 9, e0003731.
- Hite, L., Jia, L.-G., Bjarnason, J., Fox, J., 1994. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 308, 182-191.
- Hoffman, M., Monroe, D.M., 2001. A cell-based model of hemostasis. *Thrombosis and haemostasis* 85, 958-965.
- Hofmann, H., Bon, C., 1987. Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. 1. Identification, purification, and properties of a prothrombin activator. *Biochemistry* 26, 772-780.
- Hood, J.D., Cheresch, D.A., 2002. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature Reviews Cancer* 2, 91-100.
- Hutton, R., Warrell, D., 1993. Action of snake venom components on the haemostatic system. *Blood reviews* 7, 176-189.
- Izidoro, L.F.M., Sobrinho, J.C., Mendes, M.M., Costa, T.R., Grabner, A.N., Rodrigues, V.M., da Silva, S.L., Zanchi, F.B., Zuliani, J.P., Fernandes, C.F., 2014. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. *BioMed research international* 2014.
- Jackson, S.P., Schoenwaelder, S.M., 2003. Antiplatelet therapy: in search of the 'magic bullet'. *Nature Reviews Drug Discovery* 2, 775-789.
- Joseph, J.S., Kini, R.M., 2001. Snake venom prothrombin activators homologous to blood coagulation factor Xa. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 31, 234-240.
- Juarez Gómez, P., 2007. Venómica. Mecanismos moleculares y evolutivos de la diversificación estructural de las familias de las desintegrinas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. UNIVERSITAT DE VALENCIA, Valencia.
- Jung, S.M., Moroi, M., 2001. Platelet collagen receptor integrin  $\alpha 2\beta 1$  activation involves differential participation of ADP-receptor subtypes P2Y1 and P2Y12 but not intracellular calcium change. *The FEBS journal* 268, 3513-3522.
- Kamiguti, A., Theakston, R., Desmond, H., Hutton, R., 1991. Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 29, 1097-1105.
- Kamiguti, A.S., 2005. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 45, 1041-1049.
- Kamiguti, A.S., Gallagher, P., Marcinkiewicz, C., Theakston, R.D.G., Zuzel, M., Fox, J.W., 2003. Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class P-III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. *FEBS letters* 549, 129-134.

- Kamiguti, A.S., Hay, C.R., Zuzel, M., 1996. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha 2 beta 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Biochemical Journal* 320 ( Pt 2), 635-641.
- Kamiguti, A.S., Sano-Martins, I.S., 1995. South American snake venoms affecting haemostasis. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* 14, 359-374.
- Kardong, K.V., 1996. Snake toxins and venoms: an evolutionary perspective. *Herpetologica*, 36-46.
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A.R., de Silva, N., Gunawardena, N.K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Laloo, D.G., de Silva, H.J., 2008. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS medicine* 5, e218.
- Kempton, C.L., Hoffman, M., Roberts, H.R., Monroe, D.M., 2005. Platelet Heterogeneity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, 861-866.
- Kini, R.M., 2005. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. *Toxicon* 45, 1133-1145.
- Kini, R.M., 2006. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *Biochem J* 397, 377-387.
- Kini, R.M., Koh, C.Y., 2016. Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: definition and nomenclature of interaction sites. *Toxins* 8, 284.
- Klinger, M., 1996. The storage lesion of platelets: ultrastructural and functional aspects. *Annals of hematology* 73, 103-112.
- Kornalik, F., Blombäck, B., 1975. Prothrombin activation induced by Ecarin-a prothrombin converting enzyme from *Echis carinatus* venom. *Thrombosis research* 6, 53-63.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* 227, 680-685.
- Laing, G.D., Moura-da-Silva, A.M., 2005. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. *Toxicon* 45, 987-996.
- Lanari, L.C., Rosset, S., González, M.E., Liria, N., de Roodt, A.R., 2010. A study on the venom of *Bothrops alternatus* Dumeril, Bibron and Dumeril, from different regions of Argentina. *Toxicon* 55, 1415-1424.
- Lee, M.S., Scanlon, J.D., 2002. Snake phylogeny based on osteology, soft anatomy and ecology. *Biological Reviews* 77, 333-401.
- León, G., Sánchez, L., Hernández, A., Villalta, M., Herrera, M., Segura, Á., Estrada, R., Maria Gutierrez, J., 2011. Immune response towards snake venoms. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)* 10, 381-398.
- Lewis, S., Wardle, J., Cousins, S., Skelly, J., 1979. Platelet counting-development of a reference method and a reference preparation. *International Journal of Laboratory Hematology* 1, 227-237.
- Li, Z.-Y., Yu, T.-F., Lian, E.C.-Y., 1994. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. *Toxicon* 32, 1349-1358.
- Lomonte, B., Gutiérrez, J., Borkow, G., Ovadia, M., Tarkowski, A., Hanson, L.Å., 1994. Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH-1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells in vitro. *Toxicon* 32, 505-510.
- Loría, G.D., Rucavado, A., Kamiguti, A.S., Theakston, R.D.G., Fox, J.W., Alape, A., Gutiérrez, J.M.a., 2003. Characterization of 'basparin A,' a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 418, 13-24.
- Macedo, J., W Fox, J., de Souza Castro, M., 2015. Disintegrins from snake venoms and their applications in cancer research and therapy. *Current Protein and Peptide Science* 16, 532-548.

- Mackessy, S.P., 2010. Thrombin-like enzymes in snake venoms. *Toxins and Hemostasis*. Springer, pp. 519-557.
- Mackessy, S.P., Williams, K., Ashton, K.G., 2003. Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*: a case of venom paedomorphosis? *Copeia* 2003, 769-782.
- Maeno, H., Mitsuhashi, S., Sato, R., 1960. STUDIES ON HABU SNAKE VENOM. *Microbiology and Immunology* 4, 173-180.
- Marcussi, S., Bernardes, C.P., Santos-Filho, N.A., Mazzi, M.V., Oliveira, C.Z., Izidoro, L.F.M., Fuly, A.L., Magro, A.J., Braz, A.S., Fontes, M.R., 2007. Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. *Peptides* 28, 2328-2339.
- Markland, F.S., 1998. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36, 1749-1800.
- Marsh, N., Williams, V., 2005. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon* 45, 1171-1181.
- Mathews, C.K.V.H., K.E; Ahern, K.G 2003. *Bioquímica*.
- McCleary, R.J., Heard, D.J., 2010. Venom extraction from anesthetized Florida cottonmouths, *Agkistrodon piscivorus conanti*, using a portable nerve stimulator. *Toxicon* 55, 250-255.
- McCleary, R.J., Kini, R.M., 2013. Snake bites and hemostasis/thrombosis. *Thrombosis research* 132, 642-646.
- McCue, M.D., 2006. Cost of producing venom in three North American pitviper species. *Copeia* 2006, 818-825.
- McLane, M.A., Sanchez, E.E., Wong, A., Paquette-Straub, C., Perez, J.C., 2004. Disintegrins. *Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders* 4, 327-355.
- Meier, J., Theakston, R., 1986. Approximate LD50 determinations of snake venoms using eight to ten experimental animals. *Toxicon* 24, 395-401.
- Menezes, M.C., Furtado, M.F., Travaglia-Cardoso, S.R., Camargo, A.C., Serrano, S.M., 2006. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon* 47, 304-312.
- Mesa, M.G., Alfonso, C.C., 2000. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc* 1, 132-141.
- Mirtschin, P., Shine, R., Nias, T., Dunstan, N., Hough, B., Mirtschin, M., 2002. Influences on venom yield in Australian tigersnakes (*Notechis scutatus*) and brownsnakes (*Pseudonaja textilis*: Elapidae, Serpentes). *Toxicon* 40, 1581-1592.
- Moura-da-Silva, A., Della-Casa, M., David, A., Assakura, M., Butera, D., Lebrun, I., Shannon, J., Serrano, S., Fox, J., 2003. Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. *Archives of biochemistry and biophysics* 409, 395-401.
- Moura-da-Silva, A., Ramos, O., Baldo, C., Niland, S., Hansen, U., Ventura, J., Furlan, S., Butera, D., Della-Casa, M., Tanjoni, I., 2008. Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. *Biochimie* 90, 484-492.
- Moura-da-Silva, A., Serrano, S., Fox, J., Gutierrez, J., 2009. Snake venom metalloproteinases. Structure, function and effects on snake bite pathology. *Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology*, 525-546.
- Moura-da-Silva, A.M., Marcinkiewicz, C., Marcinkiewicz, M., Niewiarowski, S., 2001. Selective recognition of  $\alpha 2\beta 1$  integrin by jararhagin, a metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. *Thrombosis research* 102, 153-159.
- Murugappa, S., Kunapuli, S., 2006. The role of ADP receptors in platelet function. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* 11, 1977-1986.
- Navarrete Zamora, M.B., Silva Suárez, W.H., Vargas Mas, E.A., 2010. Las serpientes venenosas de importancia en la salud pública del Perú. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria* 11.

- Nesheim, M., Bajzar, L., 2005. HISTORICAL SKETCH: The discovery of TAFI. *Journal of thrombosis and haemostasis* 3, 2139-2146.
- Nicolau, C.A., Carvalho, P.C., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Teixeira-Ferreira, A., Junqueira, M., Perales, J., Neves-Ferreira, A.G.C., Valente, R.H., 2017. An in-depth snake venom proteopeptidome characterization: Benchmarking Bothrops jararaca. *Journal of proteomics* 151, 214-231.
- Nishida, S., Fujita, T., Kohno, N., Atoda, H., Morita, T., Takeya, H., Kido, I., Paine, M.J., Kawabata, S.-i., Iwanaga, S., 1995. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of prothrombin activator (ecarin) from Kenyan Echis carinatus venom. *Biochemistry* 34, 1771-1778.
- Offermanns, S., 2006. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circulation research* 99, 1293-1304.
- Ogawa, T., Chijiwa, T., Oda-Ueda, N., Ohno, M., 2005. Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. *Toxicon* 45, 1-14.
- Öhler, M., Georgieva, D., Seifert, J., von Bergen, M., Arni, R.K., Genov, N., Betzel, C., 2010. The venomics of Bothrops alternatus is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. *Journal of Proteome Research* 9, 2422-2437.
- OHSAKA, A., 1960. Fractionation of Habu snake venom by chromatography on CM-cellulose with special reference to biological activities. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* 13, 199-205.
- OHSAKA, A., IKEZAWA, H., KONDO, H., KONDO, S., 1960. Two hemorrhagic principles derived from Habu snake venom and their difference in zone electrophoretic mobility. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* 13, 73-76.
- Orduna, T.L., SC; de Roodt, A; Costa de Oliveira, V; García, SI; Haas, AI, 2014. Guía de prevención, diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de los envenenamientos ofídicos. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación.
- Otero-Patiño, R., 2009. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of Bothrops asper bites. *Toxicon* 54, 998-1011.
- Paine, M., Desmond, H., Theakston, R., Crampton, J., 1992. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from Bothrops jararaca venom. Insights into the disintegrin gene family. *Journal of Biological Chemistry* 267, 22869-22876.
- Paludo, K.S., Gremski, L.H., Veiga, S.S., Chaim, O.M., Gremski, W., de Freitas Buchi, D., Nader, H.B., Dietrich, C.P., Franco, C.R.C., 2006. The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures. *Toxicon* 47, 844-853.
- Páramo, J., Panizo, E., Pegenaute, C., Lecumberri, R., 2017. Coagulación 2009: una visión moderna de la hemostasia. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*, 19.
- Pinyachat, A., Rojnuckarin, P., Muanpasitporn, C., Singhamatr, P., Nuchprayoon, S., 2011. Albocollagenase, a novel recombinant P-III snake venom metalloproteinase from green pit viper (*Cryptelytrops albolabris*), digests collagen and inhibits platelet aggregation. *Toxicon* 57, 772-780.
- Pirkle, H., Stocker, K., 1991. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an inventory. For the Subcommittee on Nomenclature of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis and haemostasis* 65, 444.
- Plata, T., 2007. Accidente Ofídico. *Manual de Urgencias en Medicina Interna. Acta Médica Colombiana*, 1033-1044.
- PNGCAM, 2007. Guía de prevención, diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de los envenenamientos ofídicos. Programa Nacional de Garantía de Calidad de la Atención Médica (PNGCAM). Plan Federal de Salud. . In: Nación, M.d.S.d.I. (Ed.), Buenos Aires, Argentina.
- Ponce-Soto, L., Barros, J., Marangoni, S., Hernandez, S., Dal Belo, C., Corrado, A., Hyslop, S., Rodrigues-Simioni, L., 2009. Neuromuscular activity of BaTX, a presynaptic basic PLA 2 isolated

- from *Bothrops alternatus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 150, 291-297.
- Ponce-Soto, L.A., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Rodrigues-Simioni, L., Novello, J.C., Marangoni, S., 2007. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A 2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1770, 585-593.
- Portes-Junior, J.A., Yamanouye, N., Carneiro, S.M., Knittel, P.S., Sant'Anna, S.v.S., Nogueira, F.C., Junqueira, M., Magalhães, G.S., Domont, G.B., Moura-da-Silva, A.M., 2014. Unraveling the processing and activation of snake venom metalloproteinases. *Journal of proteome research* 13, 3338-3348.
- Ramos, O.H., Carmona, A.K., Selistre-de-Araujo, H.S., 2003. Expression, refolding, and in vitro activation of a recombinant snake venom pro-metalloprotease. *Protein expression and purification* 28, 34-41.
- Rijken, D., Lijnen, H., 2009. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. *Journal of thrombosis and haemostasis* 7, 4-13.
- Rosenfeld, G., 1971. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. *Venomous animals and their venoms* 2, 345-384.
- Rucavado, A., Lomonte, B., Ovadia, M., Gutiérrez, J.M.a., 1995. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Experimental and molecular pathology* 63, 186-199.
- Sajevic, T., Leonardi, A., Križaj, I., 2011. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* 57, 627-645.
- Sánchez, E.E., Lucena, S.E., Reyes, S., Soto, J.G., Cantu, E., Lopez-Johnston, J.C., Guerrero, B., Salazar, A.M., Rodríguez-Acosta, A., Galán, J.A., 2010. Cloning, expression, and hemostatic activities of a disintegrin, r-mojastin 1, from the mohave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*). *Thrombosis research* 126, e211-e219.
- Sant'Ana, C.D., Ticli, F.K., Oliveira, L.L., Giglio, J.R., Rechia, C.G., Fuly, A.L., de Araújo, H.S.S., Franco, J.J., Stabeli, R.G., Soares, A.M., 2008. BjuSSU-SP-I: a new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 151, 443-454.
- Santoro, M.L., Sano-Martins, I.S., 1993. Different clotting mechanisms of *Bothrops jararaca* snake venom on human and rabbit plasmas. *Toxicon* 31, 733-742.
- Santos, B.F., Serrano, S.M., Kuliopulos, A., Niewiarowski, S., 2000. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. *FEBS letters* 477, 199-202.
- Sartim, M.A., Cezarette, G.N., Jacob-Ferreira, A.L., Frantz, F.G., Faccioli, L.H., Sampaio, S.V., 2017. Disseminated intravascular coagulation caused by moojenactivase, a procoagulant snake venom metalloprotease. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Scrocchi, G.J., Moreta, J., Kretzschmar, S., 2006. Serpientes del noroeste Argentino. *Fund. Miguel Lillo*.
- Selistre-de-Araujo, H.S., Ownby, C., 1995. Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs for metalloproteinases from broad-banded copperhead *Agkistrodon contortrix laticinctus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 320, 141-148.
- Selistre-de-Araujo, H.S., Pontes, C.L., Montenegro, C.F., Martin, A.C., 2010. Snake venom disintegrins and cell migration. *Toxins* 2, 2606-2621.
- Sells, P.G., 2003. Animal experimentation in snake venom research and in vitro alternatives. *Toxicon* 42, 115-133.
- Serrano, S.M., 2013. The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon* 62, 19-26.

- Shannon, J.D., Baramova, E.N., Bjarnason, J., Fox, J., 1989. Amino acid sequence of a *Crotalus atrox* venom metalloproteinase which cleaves type IV collagen and gelatin. *Journal of Biological Chemistry* 264, 11575-11583.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry* 68, 850-858.
- Shimokawa, K.-i., Jia, L.-G., Wang, X.-M., Fox, J.W., 1996. Expression, activation, and processing of the recombinant snake venom metalloproteinase, pro-atrolysin E. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 335, 283-294.
- Shimokawa, K.-i., Shannon, J.D., Jia, L.-G., Fox, J.W., 1997. Sequence and Biological Activity of Catrocollastatin-C: A Disintegrin-Like/Cysteine-Rich Two-Domain Protein from *Crotalus atrox* Venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 343, 35-43.
- Silva, M.B., Schattner, M., Ramos, C.R., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Guarnieri, M.C., Lazzari, M.A., Sampaio, C.A., Pozner, R.G., Ventura, J.S., CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M., 2003. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. *Biochemical Journal* 369, 129-139.
- Six, D.A., Dennis, E.A., 2000. The expanding superfamily of phospholipase A 2 enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1488, 1-19.
- Smolka, M.B., Marangoni, S., Oliveira, B., Novello, J.C., 1998. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon* 36, 1059-1063.
- Souza, D., Iemma, M., Ferreira, L., Faria, J., Oliva, M., Zingali, R., Niewiarowski, S., Selistre-de-Araujo, H., 2000. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits  $\alpha 2\beta 1$  integrin-mediated cell adhesion. *Archives of biochemistry and biophysics* 384, 341-350.
- Stabeli, R.G., Marcussi, S., Carlos, G.B., Pietro, R.C., Selistre-de-Araujo, H.S., Giglio, J.R., Oliveira, E.B., Soares, A.M., 2004. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorg Med Chem* 12, 2881-2886.
- Suhr, S.-M., Kim, D.-S., 1996. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* 224, 134-139.
- Takahashi, T., Ohsaka, A., 1970. Purification and some properties of two hemorrhagic principles (HR2a and HR2b) in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*; complete separation of the principles from proteolytic activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure* 207, 65-75.
- Takeda, S., Takeya, H., Iwanaga, S., 2012. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1824, 164-176.
- Takeya, H., Nishida, S., Nishino, N., Makinose, Y., Omori-Satoh, T., Nikai, T., Sugihara, H., Iwanaga, S., 1993. Primary Structures of Platelet Aggregation Inhibitors (Disintegrins) Autoproteolytically Released from Snake Venom Hemorrhagic Metalloproteinases and New Fluorogenic Peptide Substrates for These Enzymes. *The Journal of Biochemistry* 113, 473-483.
- Tanaka, K.A., Key, N.S., Levy, J.H., 2009. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesthesia & Analgesia* 108, 1433-1446.
- Tanjoni, I., Weinlich, R., Della-Casa, M., Clissa, P., Saldanha-Gama, R., De Freitas, M., Barja-Fidalgo, C., Amarante-Mendes, G., Moura-da-Silva, A., 2005. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. *Apoptosis* 10, 851-861.
- Torii, S., Yamane, K., Mashima, T., Haga, N., Yamamoto, K., Fox, J.W., Naito, M., Tsuruo, T., 2000. Molecular cloning and functional analysis of apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. *Biochemistry* 39, 3197-3205.
- Tu, A.T., 1977. *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*. Wiley, New York.

- Valentijn, A., Zouq, N., Gilmore, A., 2004. Anokis. Portland Press Limited.
- Valentin, E., Lambeau, G., 2000. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A 2 and their receptors and binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1488, 59-70.
- Vidal, N., 2002. Colubroid systematics: evidence for an early appearance of the venom apparatus followed by extensive evolutionary tinkering. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* 21, 21-41.
- Wang, W.-J., Huang, T.-F., 2002. Purification and Characterization of a Novel Metalloproteinase, Acurhagin, from *Agkistrodon acutus* Venom. *Thrombosis and Haemostasis* 87, 641-650.
- Wang, W.-J., Shih, C.-H., Huang, T.-F., 2005. Primary structure and antiplatelet mechanism of a snake venom metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Biochimie* 87, 1065-1077.
- Wang, W.J., 2010. Acurhagin-C, an ECD disintegrin, inhibits integrin  $\alpha\beta 3$ -mediated human endothelial cell functions by inducing apoptosis via caspase-3 activation. *British journal of pharmacology* 160, 1338-1351.
- Warrell, D., 1996. Clinical features of envenoming from snakebites. *Toxicon* 2, 144.
- Warrell, D.A., 2010. Snake bite. *The Lancet* 375, 77-88.
- Watanabe, L., Vieira, D., Bortoleto, R., Arni, R., 2002. Crystallization of bothrombin, a fibrinogen-converting serine protease isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 58, 1036-1038.
- White, J.M., 2003. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Current opinion in cell biology* 15, 598-606.
- WHO, E.C.o.B.S.M., Organization, W.H., 2007. WHO expert committee on biological standardization: fifty-sixth report. World Health Organization.
- Yarlequé, A., 1992. Investigación en venenos de serpientes. *Alma Mater UNMSM* 2, 61-77.
- Zabaleta, A., 1990. Química y Farmacología del Veneno de Serpientes. *Rev Química*, 4.
- Zaganelli, G.L., Zaganelli, M.G., Magalhães, A., Diniz, C.R., De Lima, M.E., 1996. Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of jararacuçu (*Bothrops jararacussu*). *Toxicon* 34, 807-819.
- Zhou, Q., Smith, J., Grossman, M., 1995. Molecular cloning and expression of catrocollastatin, a snake-venom protein from *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake) which inhibits platelet adhesion to collagen. *Biochemical Journal* 307, 411-417.

# *Resumen*



---

## Resumen

Muchas especies de animales, entre ellos las serpientes, han desarrollado la capacidad de inyectar o liberar secreciones venenosas con el propósito de controlar, inmovilizar y digerir sus presas. Sin embargo su inoculación por motivos de defensa, es la que ocasiona el accidente ofídico, tanto en humanos como en animales, el cual se presenta como un cuadro fisiopatológico que puede ser fatal. Las especies de serpientes de mayor importancia médica responsables de los accidentes en humanos en el Nordeste Argentino, pertenecen a la familia Viperidae, siendo las intoxicaciones por las especies de *Bothrops alternatus* y *Bothrops diporus* las más frecuentes (98%).

El envenenamiento por estas serpientes se caracteriza por manifestaciones locales, que se presentan minutos después de la inyección del veneno, tales como dolor intenso, edema y hemorragia local. Estos signos son seguidos por dermo- y mionecrosis, como así también formación de ampollas que rodean al sitio de mordedura. En casos graves provocan alteraciones sistémicas, caracterizadas por hemorragia en órganos y vísceras, coagulación intravascular diseminada (CID) seguida de desfibrinogénesis y alteraciones hemodinámicas que pueden llevar a shock cardiovascular, insuficiencia renal aguda (IRA) e incluso la muerte.

Entre las manifestaciones, la hemorragia es reconocida como un episodio temprano, frecuente y clave en la clínica del envenenamiento, que conjuntamente a las alteraciones hemostáticas definen la gravedad de la intoxicación.

La hemorragia es el resultado de la alteración en la interacción entre plaquetas, factores de la coagulación y la pared vascular, donde el endotelio cumple un papel fundamental. El fenómeno fisiológico que detiene el sangrado se conoce como hemostasia. La respuesta hemostática ha sido clasificada en tres procesos: *la hemostasia primaria* donde participan fundamentalmente el endotelio y las plaquetas, *la hemostasia secundaria* que comprende la activación del sistema de coagulación y *la fibrinólisis* que involucra la degradación de la malla de fibrina.

Dado el grado de afectación que inducen los venenos botrópicos en la hemostasia ha cobrado importancia el conocimiento acerca de la manera en que las toxinas afectan el adecuado funcionamiento de la circulación sanguínea y el sistema vascular. De todos los componentes, las metaloproteinasas y las serinoproteinasas de veneno de serpientes (SVMPs y SVSPs, respectivamente) dada su capacidad de clivar el enlace peptídico son las principales involucradas en las alteraciones hemostáticas.

*Bothrops alternatus* conocida como yarará grande o víbora de la cruz es la especie de mayor distribución y abundancia en el NEA y su veneno está constituido en un 43% por enzimas de la familia de las SVMPs, que tienen un rol clave en el envenenamiento.

Dado el cuadro de intoxicación inducido por el veneno de *B. alternatus* y la abundancia de las SVMPs en ésta secreción, fue de interés dilucidar su rol en las alteraciones hemostáticas que desencadena este veneno, como así también la acción sinérgica con otras toxinas involucradas en estas alteraciones. Para discernir la participación de las SVMPs se usaron como herramientas: inhibidores de metalo- (EDTA-Na<sub>2</sub>) y de serinoproteinasas (PMSF), baltergina (una SVMP P-III hemorrágica), anticuerpos anti-balt y baltergina-DC (fragmento estable de autoproteólisis de baltergina).

En primera instancia, se debió aislar y purificar del veneno de *B. alternatus* la enzima baltergina. La hemorragina purificada se sometió a autoproteólisis previo ajuste de las condiciones óptimas de pH, temperatura y tiempo, para posteriormente llevar a cabo el aislamiento de baltergina-DC. Por otro lado, baltergina fue utilizada como inmunógeno para la producción de inmunoglobulinas G (IgGs) toxino-específico, que junto con EDTA-Na<sub>2</sub>, fueron empleados para estudios de neutralización del veneno entero. La fracción IgG fue purificada del suero anti-balt por cromatografía de afinidad y estos anticuerpos fueron capaces de neutralizar completamente la actividad hemorrágica y proteolítica (azocaseína) del veneno en una relación 1/20 (veneno/IgGs anti-balt). Como estudios complementarios a los objetivos inicialmente propuestos en esta tesis, fue posible profundizar en la estructura de las toxinas. Mediante estudios de 2D-PAGE de baltergina se observó la presencia de 9 isoformas acídicas (rango de pI= 4,8 - 5,7). Del análisis de espectrometría de masas se logró identificar un 68% de identidad con la secuencia de botropasina, una SVMP P-III aislada del veneno de *B. jararaca*. Se determinó la secuencia parcial de baltergina-DC, obteniéndose 36 aminoácidos del extremo amino-terminal.

Para abordar el efecto de las SVMPs en la **hemostasia primaria** mediante un ensayo de agregación plaquetaria se demostró que baltergina-DC fue capaz de inhibir la agregación de manera dosis dependiente, observándose una inhibición del 43,65% con la dosis más alta ensayada (50 µg/ml), utilizando ADP como agente agregante. A la vez, se determinó el tiempo de sangría (TS), para ello grupos de animales fueron inoculados con PBS, veneno (20 µg) y veneno pre-incubado con IgG anti-balt (relación 1/30). A las dos horas, los resultados mostraron que el TS de animales inoculados con veneno se prolongó tres veces respecto al control, y en los animales tratados con veneno pre-incubado con anticuerpos toxino-específicos la sangre no coaguló al tiempo y dosis ensayados. Se realizó el recuento de plaquetas en el plasma de los diferentes grupos de ratones y se observó una marcada

trombocitopenia en los animales tratados con veneno y veneno pre-incubado con IgG anti-balt.

A partir de estos estudios se comprobó que las SVMPs del veneno de *B. alternatus* intervienen en la alteración que induce esta secreción en la *hemostasia primaria*, específicamente al inhibir la agregación plaquetaria, donde la región símil desintegrina ha de tener un rol clave.

Para evaluar el efecto de las metaloproteinasas sobre la **hemostasia secundaria** se realizaron ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*. El tiempo de coagulación (TC) fue registrado enfrentando plasma citratado a una solución de veneno, como así también a veneno pre-incubado con EDTA-Na<sub>2</sub>, con PMSF y veneno pre-incubado con IgG anti-balt. Los resultados mostraron que el veneno-EDTA-Na<sub>2</sub> y el veneno-IgG anti baltergina alargaron 3,5 y 3,1 veces, respectivamente, el TC respecto al control de veneno, mientras que para el veneno-PMSF se registró un TC 7,7 veces más prolongado respecto al control. Asimismo se registró el TC sobre fibrinógeno utilizando las mismas muestras y no se observó cambios en el registro del TC en el control de veneno y el veneno inhibido por EDTA-Na<sub>2</sub> e IgG anti-balt, sin embargo no se observó la formación de malla de fibrina cuando se expuso el fibrinógeno al veneno-PMSF. Se determinó la concentración de fibrinógeno en plasma citratado de grupos de ratones inoculados por vía i.v. con PBS, veneno (20 y 40 µg) y veneno-IgG anti-balt (relación 1/30). Tanto los ratones inoculados con la dosis más alta de veneno como aquellos inoculados con veneno-IgG anti-balt, presentaron un plasma incoagulable lo cual indicó depleción de fibrinógeno circulante.

Se comprobó así que las SVMPs afectan la *hemostasia secundaria*, bajo una acción conjunta con las serinoproteinasas. El alargamiento en el TC observado sobre plasma, y “no sobre fibrinógeno”, por parte del veneno bloqueado tanto con EDTA-Na<sub>2</sub> como con IgG anti-balt, dejó en evidencia que las SVMPs tienen un rol pro-coagulante. La incapacidad de formar la malla de fibrina por parte del veneno bloqueado con PMSF reflejó el rol exclusivo de las SVSPs con actividad *thrombin like*. Los ensayos *in vivo* refuerzan lo observado *in vitro*. Los anticuerpos no fueron capaces de neutralizar la actividad coagulante del veneno, siendo entonces las SVSPs los principales componentes responsables de provocar depleción de fibrinógeno por consumo.

En conclusión, el presente trabajo permite reconocer a las SVMPs como toxinas claves en las alteraciones hemostáticas que pueden conducir a la muerte en el envenenamiento por *B. alternatus*. Así su responsabilidad directa sobre la hemorragia, sobre la inhibición de la agregación plaquetaria y su contribución en la depleción del fibrinógeno circulante, las vuelve enzimas con una remarcada participación en las alteraciones en la hemostasia

inducidas por este veneno botrópico.

Los resultados aquí descritos, conjuntamente a evidencias reunidas de estudios previos, demuestran que los anticuerpos anti-balt serían efectivos neutralizando la hemorragia (tanto local como sistémica), proteólisis de componentes de la matriz extracelular, formación de trombo plaquetario y en general todos los efectos inducidos por las SVMs. Sin embargo si se utilizaran potencialmente como terapia, la víctima del accidente ofídico tratada con un anti-suero anti-balt se encontraría en un estado anticoagulado transitorio pero sin extravasación de sangre, evitándose con ello la principal causa de muerte por parte de este veneno.

Finalmente esta tesis aporta información que podría ser relevante para el diseño de inmunobiológicos más específicos, de baja carga proteica, tendientes a optimizar la actual seroterapia antiofídica.

