

Area de Beca: CE - Cs. Exactas y Naturales

Título del Trabajo: PROTEASAS DE BAJO PESO MOLECULAR EN EL VENENO DE BOTRHOPS ALTERNATUS

Autores: VAN DE VELDE, ANDREA C.- GAY, CLAUDIA C.- LEIVA, LAURAC.

E-mail de Contacto: andrevdev@hotmail.com

Teléfono: 379 4457996 Int. 112

Tipo de Beca: Cofinanciadas Tipo I

Resolución N°: 484 C.S

Período: 01/04/2013 - 31/03/2016

Proyecto Acreditado: CF01-2013 Proteínas de venenos ofídicos con potencial aplicación farmacológica.

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

Palabras Claves: Metaloproteasas; Serinoproteasas, zimografía, yarará grande

**Resumen:**

*Bothrops alternatus* conocida como yarará grande o víbora de la cruz es una especie ampliamente distribuida en Sudamérica; abunda en Paraguay, Uruguay, sur de Brasil y Noroeste de Argentina. Publicaciones previas difieren en la composición de su veneno, específicamente en lo referido a proteasas. Así, mientras que Costa *et. al.* (2007) aseguran haber purificado una metaloproteasa (SVMP) de bajo peso molecular del tipo PI, con actividad fibrinolítica y anticoagulante, trabajos más recientes, de alta fidelidad molecular como son los estudios proteómicos, realizados Ohler *et. al.* (2010) no detectaron MPVS del tipo PI en el veneno de *B. alternatus*. Las MPVS junto con las serinoproteinasas (SPVS) son las principales responsables de la actividad proteolítica característica del veneno, causante de la mayoría de los efectos locales y sistémicos observados durante el envenenamiento por esta serpiente. Investigaciones propias, realizadas sobre esta secreción demostraron la existencia de una MPVS del tipo PIII, denominada Baltergina, con actividad proteolítica, hemorrágica y capacidad de afectar la hemostasia, como así también comprobaron la presencia de SPVS. Es de interés en este trabajo discernir si existen en el veneno de *B. alternatus* de especímenes de la región, además éstas, otras proteasas, de bajo peso molecular, las cuales tendrían un potencial farmacológico por su actividades enzimáticas, comunes a las PIII, pero carentes de daño hemorrágico.

Para ello se llevaron a cabo estudios del veneno *in vivo*, para detectar actividad hemorrágica en piel de ratones, e *in vitro*, sobre diferentes sustratos (azocaseína, gelatina y BAPNA), en presencia de inhibidores químicos de proteasas (EDTA, de metaloproteasas, y PMSF, de serinoproteasas) y de anticuerpos específicos (anti-baltergina). Mediante un test espectrofotométrico se midió la actividad proteolítica residual del veneno sobre azocaseína (5mg/mL) en presencia de inhibidores: EDTA-Na<sub>2</sub> (5 mM) ó de PMSF (5 mM). La neutralización por anticuerpos se realizó mediante preincubación con diferentes concentraciones de IgG antibaltergina (relación mg veneno/mg IgG: 1/14, 1/25 y 1/50). La acción sobre gelatina (0,1 mg/ml) se evaluó mediante zimografía en un gel 9% de acrilamida, en presencia de SDS, y pos tinción del sustrato con Coomassie Blue.

La actividad proteolítica del veneno de *B. alternatus* sobre azocaseína (5 mg/ml) fue completamente inhibida por el EDTA-Na<sub>2</sub>, y la actividad serinoproteasa, evaluada sobre BAPNA (7,8 mM), fue anulada por el PMSF a las concentraciones ensayadas, mientras que el EDTA no afectó la actividad serinoproteasa. La actividad hemorrágica del veneno fue bloqueada por el EDTA y por los anticuerpos anti-baltergina (relación mg veneno/mg IgGs: 1/20). Sin embargo, estos últimos, preincubados con veneno indujeron a una reducción en la actividad proteolítica sin llegar a bloquearla, así para relación mg veneno/mg IgG: 1/14, 1/25 y 1/50, se obtuvo 42 %, 31 % y 32% de actividad residual, demostrando la existencia de proteasas no hemorrágicas, que no son reconocidas por anticuerpos específicos para proteasas del tipo PIII. Los ensayos mediante zimografía permitieron constatar la presencia de poblaciones de proteasas de diferente tamaño molecular, compatibles con proteasas del tipo PI y PIII.

Los resultados demuestran la presencia de más de un tipo de metaloproteasa, mientras que las del tipo PIII, hemorrágicas, son responsables del 70 % de la actividad enzimática sobre caseína exhibida por el veneno, el 30% se debería a la presencia de metaloproteasas del tipo PI. Tales evidencias abren un abanico de posibilidades, tanto en la búsqueda de aislarlas y purificarlas como en su caracterización para potencial empleo farmacológico en el campo de la hemostasia.

Becario  
(Firma)Co-Autor  
(Firma)Co-Autor  
(Firma)Director de Beca  
(Firma y Aclaración)Director de Proyecto  
(Firma y Aclaración)

Control: 23qe78mfr