

# Evaluación de las Actividades Enzimáticas del Veneno de *Bothrops diporus* Tratado con EDTA-Na<sub>2</sub>.

Área del Conocimiento: CS. NATURALES y EXACTAS

Becario/a: LÓPEZ, Gisela Lumila

Director/a: LEIVA, Laura

Facultad: Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura.

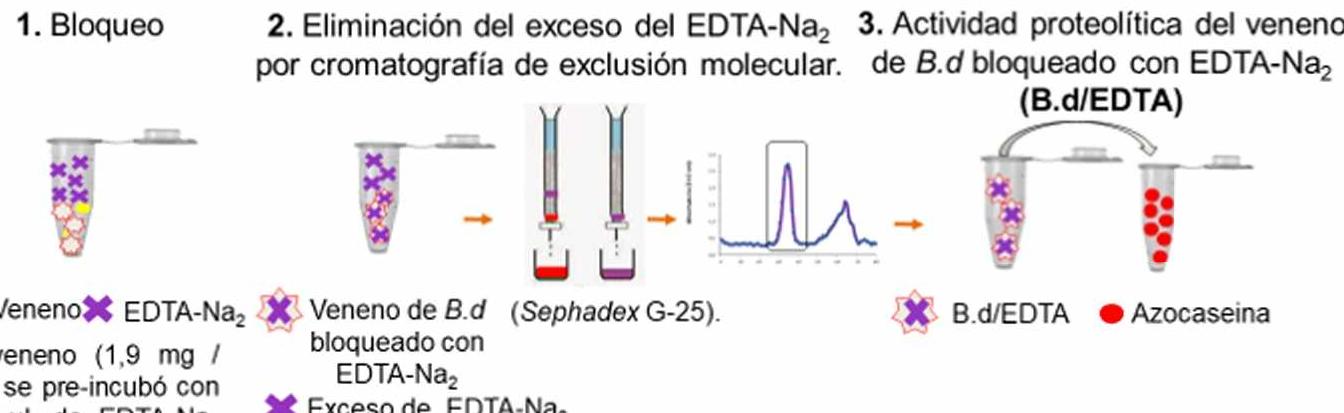
E-mail: giselopezaccuzzi@gmail.com

## Objetivos

- ✓ Bloquear el veneno de *B.diporus*, con el agente quelante EDTA-Na<sub>2</sub> y eliminar el excedente del mismo por cromatografía de exclusión molecular, con el fin de reducir al máximo los efectos deletéreos.
- ✓ Evaluar el efecto inhibidor del EDTA-Na<sub>2</sub> sobre las enzimas presentes en el veneno de *B.diporus*, incluyendo las SVMPs.
- ✓ Determinar la capacidad bloqueante del EDTA-Na<sub>2</sub> sobre actividades biológicas del veneno.

## Materiales y Métodos

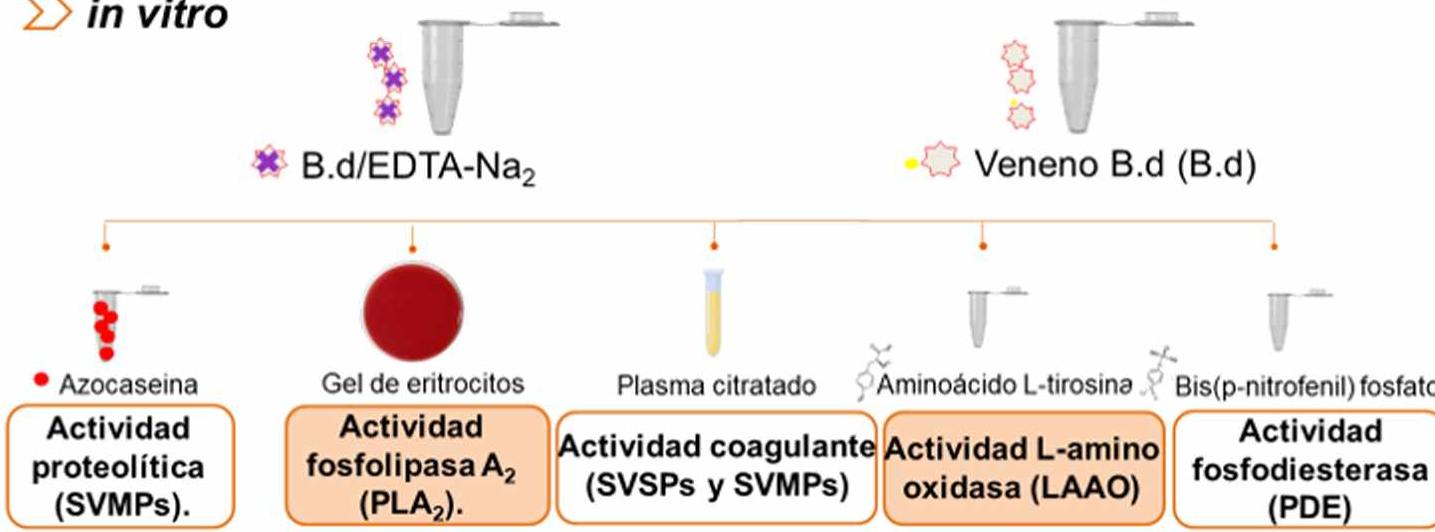
### Obtención del veneno de *B.diporus* neutralizado con EDTA-Na<sub>2</sub>



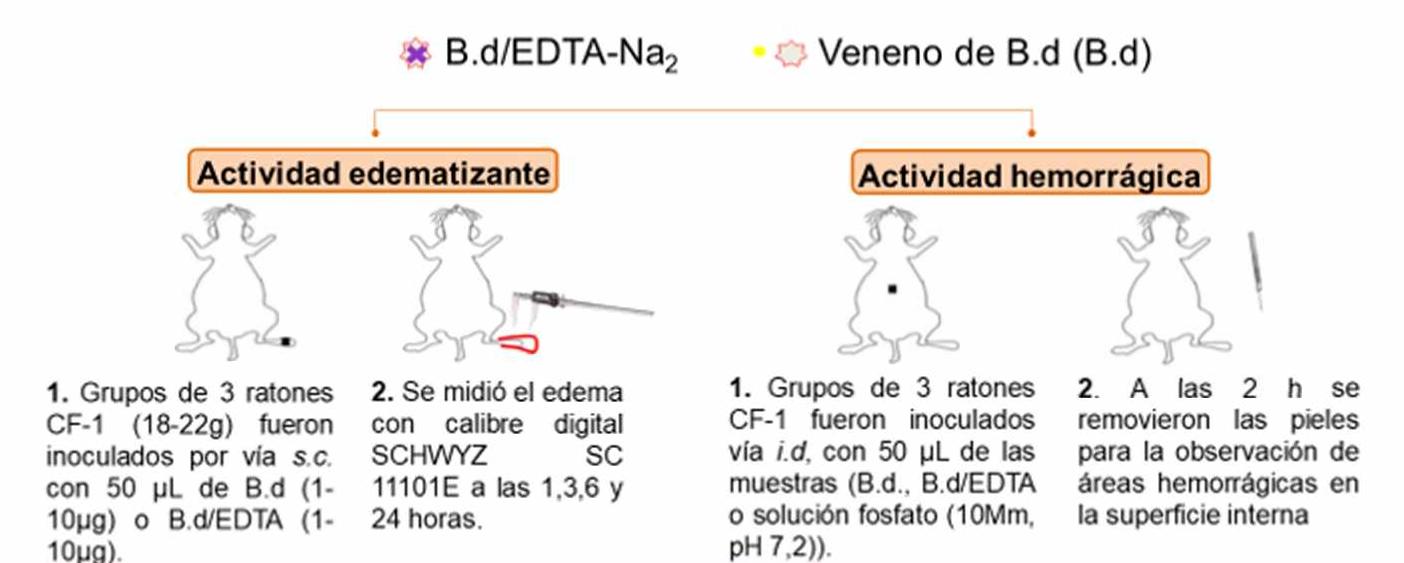
El veneno (1,9 mg / mL) se pre-incubó con 190  $\mu$ L de EDTA-Na<sub>2</sub> (200 mM) por 1.30 h a 37°C.

### Evaluación del efecto del EDTA-Na<sub>2</sub> sobre el veneno de *B.diporus*.

#### in vitro



#### in vivo



### Cromatografía de exclusión molecular

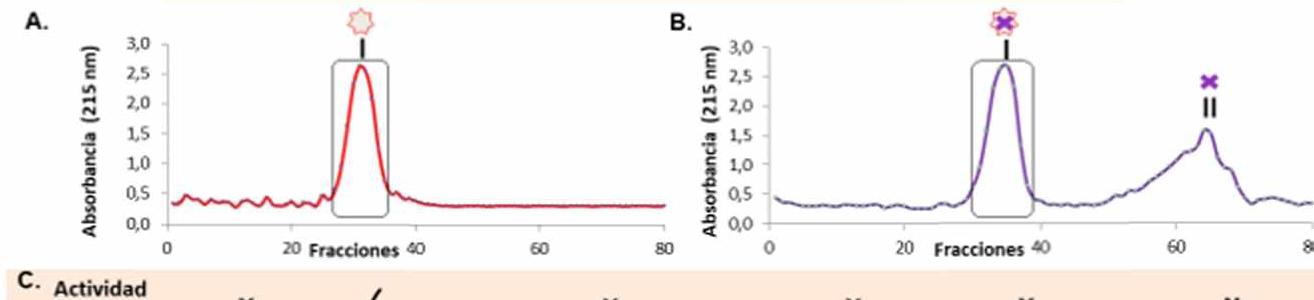


Figura 1. Perfil de elución A. veneno (fracción I: B.d) B.veneno tratado con EDTA-Na<sub>2</sub> (fracción B-I: B.d/EDTA) en cromatografía de exclusión molecular G-25 C. Actividad proteolítica de las fracciones.

### Evaluación del efecto del EDTA-Na<sub>2</sub> sobre el veneno de *B.diporus*.

#### in vitro

Muestras	B.d (0,5 mg/mL)	B.d/EDTA (0,5 mg/mL)
% Act. LAAO	100	16,28
% Act. PDE	100	16,83
Act. Coagulante (seg)	18,9	44,73

Tabla 1. % Actividades enzimáticas de B.d y B.d/EDTA.

#### in vivo

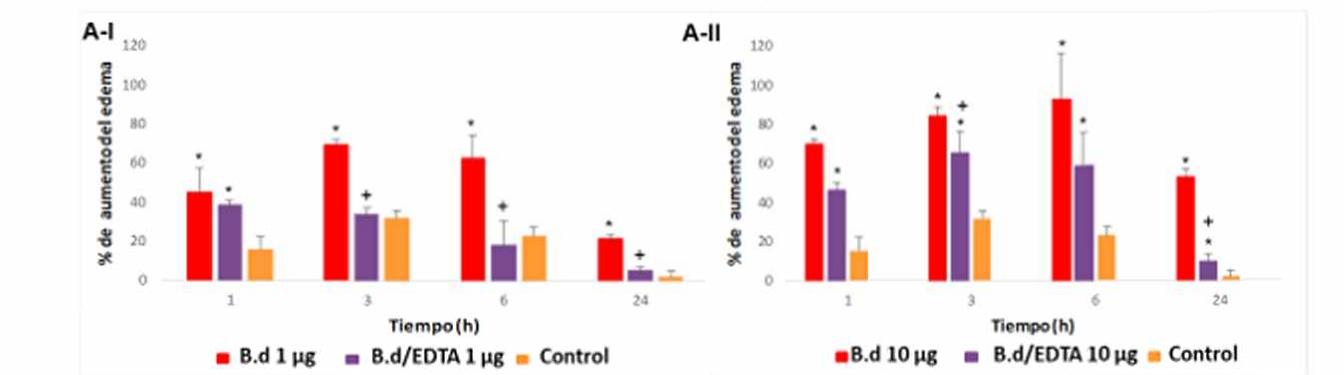


Figura 2. Actividad fosfolipasa A<sub>2</sub>: representación logarítmica de los diámetros de los halos de hemólisis en función de la dosis de la muestra.

#### in vivo

Figura 3.A. Representación porcentual del edema en almohadilla plantar de los diferentes grupos de ratones.\*p<0,05 con respecto al grupo control. \*p<0,05 con respecto al grupo B.d. Grupos: B.d: ratones inoculados con la muestra B.d (1 $\mu$ g o 10 $\mu$ g), B.d/EDTA: ratones inoculados con la muestra B.d/EDTA (1 $\mu$ g o 10 $\mu$ g), Control: ratones inoculados con solución fosfato (10Mm, pH 7,2).



Figura 3. A-I: Representación porcentual del edema en almohadilla plantar de los diferentes grupos de ratones.\*p<0,05 con respecto al grupo control. \*p<0,05 con respecto al grupo B.d. Grupos: B.d: ratones inoculados con la muestra B.d (1 $\mu$ g o 10 $\mu$ g), B.d/EDTA: ratones inoculados con la muestra B.d/EDTA (1 $\mu$ g o 10 $\mu$ g), Control: ratones inoculados con solución fosfato (10Mm, pH 7,2).



Figura 3. B-II: Representación porcentual del edema en almohadilla plantar de los diferentes grupos de ratones.\*p<0,05 con respecto al grupo control. \*p<0,05 con respecto al grupo B.d. Grupos: B.d: ratones inoculados con la muestra B.d (1 $\mu$ g o 10 $\mu$ g), B.d/EDTA: ratones inoculados con la muestra B.d/EDTA (1 $\mu$ g o 10 $\mu$ g), Control: ratones inoculados con solución fosfato (10Mm, pH 7,2).



Figura 3. B-I: Ratón inoculado con B.d (10  $\mu$ g). B-II: Ratón inoculado con B.d/EDTA (10  $\mu$ g).

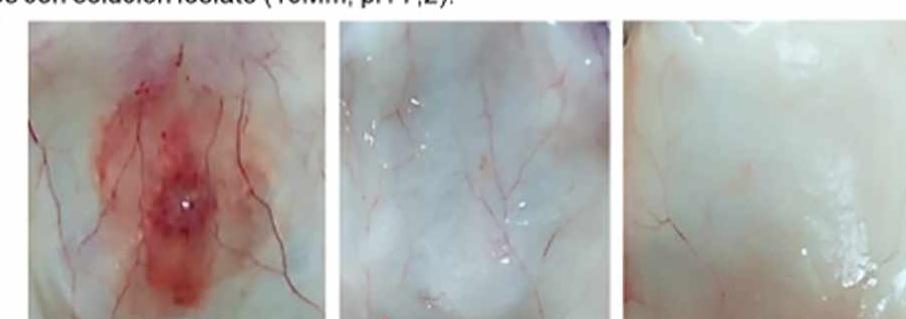


Figura 4. Actividad hemorrágica in vivo. A: B.d (7 $\mu$ g) B: B.d/EDTA (7 $\mu$ g) C: Solución fosfato.

## Resultados y Discusión

Los resultados de los ensayos *in vitro* demuestran que el EDTA-Na<sub>2</sub> no afecta la acción catalítica de las fosfolipasas A<sub>2</sub> (Fig. 2). Sin embargo, bloquea parcialmente tanto las actividades PDE y LAAO, al quitar el magnesio requerido para la catálisis de las mismas, como la actividad coagulante, al inhibir la actividad de las SVMPs procoagulantes, ya que las SVSPs conservan su capacidad de coagulación (Tabla 1).

Por otra parte, los resultados de los ensayos *in vivo* reflejan que, los animales inoculados con B.d/EDTA han desarrollado un edema significativamente menor ( $p<0,05$ ) respecto a los animales inoculados con veneno de B.d (Fig. 3.A-B). Además, el EDTA-Na<sub>2</sub> inhibió completamente la actividad hemorrágica de las SVMPs (Fig. 4.B). Estos resultados dejan en evidencia que el EDTA-Na<sub>2</sub> no solo neutraliza eficazmente la actividad hemorrágica de las SVMPs, sino que también bloquea otras enzimas (al menos parcialmente), reduciéndose así el impacto que genera el veneno de *B.diporus* cuando es utilizado como inmunógeno para la producción de suero antiofídico.