

Area: CE - Cs. Exactas y Naturales

Título del Trabajo: **COMPORTAMIENTO DEL VENENO DE BOTHROPS ALTERNATUS EN LA CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA**

Autores: GOMEZ, GABRIELA N. - NERLI, BIBIANA B. - LEIVA, LAURA C.

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

Teléfono: 0379-4457996 int. 112

Tipo de Beca: UNNE Perfec. Tipo B

Resolución Nº: 974/11 C.S

Período: 01/03/2012 - 28/02/2014

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

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

Palabras Claves: Interacción hidrofóbica - Sistemas bifásicos acuosos - polielectrolitos

Resumen:

Antecedentes. La cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC) permite separar proteínas en base a su hidrofobicidad superficial, y se caracteriza por la adsorción de las biomoléculas a la superficie hidrofóbica de la resina en una solución fuertemente salina y su posterior elución mediante un gradiente salino negativo. Es de interés combinar la separación de proteínas por este principio con otros métodos no convencionales como es la extracción líquido-líquido con sistemas bifásicos acuosos (SBA) y la precipitación con polielectrolitos insolubles (previamente aplicados con éxito a la purificación de toxinas ofídicas específicamente fosfolipasas) para aumentar el número de proteínas a purificar y a la vez mejorar la calidad de las previamente aisladas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la separación de componentes proteicos del veneno de *Bothrops alternatus*, mediante cromatografía de interacción hidrofóbica de proteínas con el fin de reunir conocimiento de la distribución global de sus componentes en este tipo de columna, y compararlo con el perfil que genera un extracto pre-purificado de toxinas de este veneno proveniente de la combinación de tamiz molecular, SBA y precipitación mediante adsorción con DEAE-celulosa.

Materiales y métodos. El veneno de *B. alternatus* (15 mg/ml, 1ml) se eluyó en una columna HiTrap Butyl FF, en buffer Sulfato de amonio 1M, para luego ser expuesto a un gradiente discontinuo decreciente en fuerza iónica (0.75 M, 0.50 M, 0.25 M, agua destilada). Se testearon en cada fracción las actividades relacionadas con las toxinas principalmente responsables de la intoxicación: *proteolítica* (sobre azocaseína), *fosfolipásica* (en placa de agar sangre enriquecida con lecitina de huevo) y *coagulante* (sobre plasma citratado). El contenido proteico se estimó por técnica de Bradford y se controló por SDS-PAGE el perfil electroforético de cada pico resultante de la elución con cada solución salina. Este mismo procedimiento se llevó a cabo sobre una muestra obtenida de la combinación de: 1° *etapa tamiz molecular* (100 mg veneno/ml, 500 uL, aplicado a columna de Sephadex G-75), 2° *etapa reparto por SBA* (pool de pico 2 del Seph. G-75 aplicado al sistema bifásico PEG3350/Pi 30% pH7) y 3° *etapa Precipitación con Polielectrolitos insolubles* (fase superior incubada en batch con DEAE celulosa y luego eluida con buffer Pi 10mM 1M NaCl).

Resultados. El perfil cromatografico de elución para el veneno por HIC entero mostró a través de los 5 picos resultantes, la posibilidad de recoger de modo selectivo los diferentes componentes, así, a las mayores fuerzas iónicas eluyeron principalmente las enzimas del tipo trombina, con hidrofobicidad intermedia eluyeron las proteolíticas mientras que las fosfolipasas mostraron la mayor hidrofobicidad eluyendo a la menor fuerza iónica (con 0,25 M y con agua destilada). El ensayo por SDS-PAGE mostró la presencia de varias bandas aunque una predominante. El perfil de elución del extracto proteico, libre de metaloproteasas y resultante de 3 procesos separativos previos, fue comparable al del veneno, permitió obtener a una fuerza iónica de 0,75M enzimas con actividad coagulante y a 0,25M, aquellas con actividad fosfolipásica, que por SDS-PAGE se resolvió en una banda homogénea.

Conclusiones. La utilización de la columna de interacción hidrofóbica permite una adecuada separación de componentes del veneno botrópico según su hidrofobicidad relativa, mostrando ser una herramienta apropiada para combinar con otros procesos separativos tales como el reparto líquido-líquido (SBA) y la precipitación con polielectrolitos insolubles (DEAE celulosa), para el aislamiento y purificación de proteínas ofídicas.