
Area: CE - Cs. Exactas y Naturales

Título del Trabajo: EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL PH EN LA AUTÓLISIS DE BALTERGINA

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

E-mail de Contacto: andrevdev@hotmail.com

Teléfono: 0379-154650063

Tipo de Beca: Cofinanciadas Tipo I

Resolución Nº: 484

Período: 01/04/2013 - 31/03/2016

Proyecto Acreditado: P.I. B013-2010. Nuevas formulaciones de inmunobiológicos para el tratamiento de la intoxicación ofídica. SGCyT-UNNE. Período 01/01/2010- 31/12/2013.

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

Palabras Claves: Autoproteólisis, actividad caseinolítica, metaloproteinasa.

Resumen:

Bothrops alternatus (yará grande) es una de las especies de importancia médica en la región noreste de Argentina. La intoxicación por esta especie provoca trastornos en la coagulación, hemorragia y necrosis de tejidos. De este veneno ha sido purificada una metaloproteinasa nombrada baltergina con actividad proteolítica, hemorrágica y fibrinogenolítica, la cual pertenece a la clase P-IIIb de las metaloproteinasas de venenos de serpientes (MPVS) con capacidad de autolisarse *in vitro*, generando productos de degradación estables y biológicamente activos. Previamente se demostró que baltergina es capaz de generar productos de autólisis de entre 45 y 14 kDa, manteniéndose un fragmento de 28 kDa estable en función del tiempo el cual es capaz de inhibir la adhesión celular.

En el presente trabajo se realizó el estudio de la estabilidad de baltergina a la autólisis bajo diferentes condiciones experimentales, con el objeto de conocer el comportamiento de la enzima tanto para el manejo óptimo de las condiciones durante su purificación, como para el rendimiento en la obtención de fragmentos de autólisis.

Para ello, se realizó la incubación de baltergina durante 18 h variando las condiciones de temperatura y pH, y luego de este periodo se determinó la actividad caseinolítica residual de la enzima, tomando como control una solución de enzima sin previa incubación. Se ensayaron las siguientes temperaturas: 4°C, 25°C, 37 °C y 45 °C. Las actividades caseinolíticas residuales fueron 94,8%; 68,1%; 35,3% y 3,33%, respectivamente. Así, a medida que aumenta la temperatura de incubación, se incrementa la capacidad autoproteolítica, respecto al control no incubado. Por su parte, los pH ensayados fueron: 3, 5, 7, 8 y 9, manteniendo constante la temperatura de incubación a 37 °C. Los resultados mostraron que la actividad caseinolítica residual a pH 3 se anula, probablemente por desnaturalización de la enzima a este pH. Para los valores de pH alcalinos, 8 y 9, se observa una actividad caseinolítica residual de 11,8% y 0,33%, respectivamente, lo que hace suponer que la autoproteólisis en estos casos fue intensa. Se ensayó además, la influencia del pH a 4°C para descartar inactivación de la enzima por autoproteólisis. Se comprobó que la enzima se desnaturaliza a pH bajo (3) al no detectarse actividad proteolítica residual en el ensayo con azocaseína.

Estos ensayos preliminares permiten concluir que la enzima sufre un elevado grado de autoproteólisis entre 37-45 °C y a pH alcalino, condiciones que exaltan su capacidad catalítica y resultan apropiadas para la obtención de un alto rendimiento del fragmento de degradación de 28 kDa, con el fin de ensayar sus actividades biológicas. Sin embargo, resulta una complicación al momento de la purificación de baltergina debiendo extremar los cuidados, de manera de disminuir el fenómeno de autólisis.