

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**APROXIMACIÓN PROTEÓMICA DE METALOPROTEASAS A
PARTIR DEL VENENO TOTAL DE *Bothrops andianus*:
BIOPROSPECCIÓN TERAPÉUTICA POR ANÁLISIS
BIOINFORMÁTICO - 2018**

TESIS

PRESENTADA POR:

Br. FRANKLIN LUIS PACCO RIVAS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**

**APROXIMACIÓN PROTEÓMICA DE METALOPROTEASAS A PARTIR DEL
VENENO TOTAL DE *Bothrops andianus*: BIOPROSPECCIÓN TERAPÉUTICA
POR ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO - 2018.**

TESIS

PRESENTADA POR:

Br. FRANKLIN LUIS PACCO RIVAS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:



PRESIDENTE

:

.....
Dr. DANTE JONI CHOQUEHUANCA PANCLAS

PRIMER MIEMBRO

:

.....
Blgo. M.Sc. EVA LAURA CHAUCA DE MEZA

SEGUNDO MIEMBRO

:

.....
Mg. DANTE MAMANI SAIRITUPAC

DIRECTOR / ASESOR

:

.....
Mg. CIRIA IVONNE TRIGOS RONDON

ÁREA : Ciencias Biomédicas

TEMA: Biología Molecular

FECHA DE SUSTENTACION: 21 DE DICIEMBRE DEL 2018

DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado el privilegio de la vida: por tomarme de la mano en momentos difíciles; por ayudarme a superar cada obstáculo que se me presento en el momento recorrido, por la fe, esperanza y amor que deposita en mi vida cada día.

A mis padres Aurelio y Daniela, quienes me dieron la vida, protección que hoy es sustento de mi vida, reflejo de amor, comprensión, sabiduría como ejemplo de perseverancia, honestidad y amor.

Al Ph.D. Luis Alberto Ponce Soto, maestro de maestros, por darme el apoyo, asesoría, enseñanza, orientación en este trabajo de investigación.

A la Mg. Ciria Ivonne Trigos Rondón, quien nunca dejo de apoyarme permanentemente con su apoyo incondicional, que hizo posible el desarrollo y culminación del presente estudio.

AGRADECIMIENTOS

- *A muestra alma mater, **Universidad Nacional del Altiplano Puno**, por ser institución formadora de grandes profesionales y por haberme acogido durante mi formación profesional.*
- *A mi presidente de tesis **Dr. Dante Joni Choquehuanca Panclas**, y a los miembros del jurado **Blgo. M.Sc. Eva Laura Chauca de Meza**, **Mg. Dante Mamani Sairitupac**, por sus sugerencias y aportes en la mejora de este trabajo.*
- *Con especial gratitud a la directora de investigación **Mg. Ciria Ivonne Trigos Rondón**, por su comprensión y colaboración para la realización de este trabajo de investigación.*
- *Al **Ph.D Luis Alberto Ponce soto**, Director de investigación de la Universidad de Católica Santa María de Arequipa, Por abrirme el laboratorio de química de proteínas junto con la UNICAMP, Campinas, Sao Paulo, Brasil. Su apoyo fue fundamental en la finalización de este trabajo, su orientación y enseñanza de proteínas ha sido suficiente para dimensionar aún más la investigación.*

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	9
ABSTRACT.....	10
I. INTRODUCCIÓN	11
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
1.1. ANTECEDENTES.....	14
1.2. MARCO TEÓRICO.....	17
2.3. MARCO CONCEPTUAL.....	41
III. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1. ÁREA DE ESTUDIO.	43
3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN.	43
3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA.....	43
3.4. METODOLOGÍA.	44
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
V. CONCLUSIONES.....	73
VI. RECOMENDACIONES.....	74
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	75
ANEXOS	85

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Desenvolvimiento de los efectos locales inducidos por venenos de las serpientes de la familia Viperidae. (Gutiérrez y Lomonte, 2003).....	24
Figura 2: Resumen de los diversos efectos ejercidos por las metaloproteasas de veneno de serpiente. Algunos de los efectos son debido a la acción derecha de las SVMP's, pero otros son efectos secundarios como resultado de la acción de estas enzimas. (Gutiérrez et al., 2005).....	27
Figura 3: Clases y subclases de las metaloproteasas de veneno de serpiente. (Fox & Serrano, 2008).	33
Figura 4: Cromatografía de intercambio iónico en SP-Sephadex C-50, del veneno total de <i>Bothrops andianus</i> , monitoreado a 280 nm. Laboratorio Thomson de espectrometría de masas del Instituto de Química UNICAMP - São Paulo, Brasil (junio - septiembre 2018).	53
Figura 5: Medida de la actividad hemorrágica de la metaloproteasa de veneno total de <i>Bothrops andianus</i> , a través del método de Kondo modificado. El pico 2 fue el que exhibió la mayor actividad hemorrágica con un DMH (dosis mínima hemorrágica) de 39 mm. Los valores fueron expresados por la media y \pm SEM (error estándar) (n = 3). * Diferencia significativa (p < 0,05). Laboratorio de Química de Proteínas UCSM – Arequipa (junio - septiembre 2018).....	55
Figura 6: Medida de la actividad catalítica de la metaloproteasa de veneno total de <i>Bothrops andianus</i> . El pico 2 fue el que exhibió la mayor actividad catalítica de la metaloproteasa frente al sustrato N α -p-Tirosil-L-Arginina metil éster (TAME). Los valores fueron expresados por la media y \pm SEM (error estándar) (n = 3). * Diferencia significativa (p < 0,05). Laboratorio de Química de Proteínas UCSM – Arequipa (junio - septiembre 2018).....	57
Figura 7: Electroforesis bidimensional (2D). Ba-MP aislada a partir de <i>Bothrops andianus</i> muestra el peso molecular de 33 KDa en relación con el punto isoeléctrico de 7.1, coloreado con comassie blue. Laboratorio Thomson de espectrometría de masas del Instituto de Química UNICAMP - São Paulo, Brasil (junio - septiembre 2018).	59
Figura 8: Espectro de masa (MS) reflectron de la región N-terminal de la metaloproteasa Ba-MP obtenida a partir del veneno de <i>Bothrops andianus</i> . Laboratorio Thomson de espectrometría de masas del Instituto de Química UNICAMP - São Paulo, Brasil (junio - septiembre 2018).....	61
Figura 9: Estudio comparativo de homología secuencial de la región N-terminal de la fracción metaloproteasa Ba-MP de <i>Bothrops andianus</i> con otras proteínas homologas provenientes de venenos de serpientes. Laboratorio de Química de Proteínas UCSM – Arequipa (junio - septiembre 2018).	63

- Figura 10: Árbol filogenético de las homologías secuenciales con respecto la metaloproteasa Ba-MP obtenida a partir del veneno de *Bothrops andianus*. Laboratorio de Química de Proteínas UCSM – Arequipa (junio - septiembre 2018)..... 68
- Figura 11: Perfil hidropático según la escala de Kyte-Doolittle de la secuencia de aminoácidos de la región N-terminal de la metaloproteasa Ba-MP obtenida a partir del veneno de *Bothrops andianus*. Laboratorio de Química de Proteínas UCSM – Arequipa (junio - septiembre 2018)..... 69
- Figura 12: Análisis del punto isoeléctrico a través de la bioinformática de Ba-MP del veneno de *Bothrops andianus*. Laboratorio de Química de Proteínas UCSM – Arequipa (junio - septiembre 2018)..... 72
- Figura 13: Realización de la actividad hemorrágica modificada. Laboratorio de química de proteínas UCSM – Arequipa (junio - septiembre 2018). 86
- Figura 14: Procedimiento de espectrometría de masa MALDI (TOF/TOF) y análisis Bioinformático con gran colaboración del laboratorio Thomson de espectrometría de masas del Instituto de Química de la Universidad del estado de Campinas-SP Brasil, bajo la colaboración del Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D. (junio - septiembre 2018) 87
- Figura 15: Laboratorio de Química de Proteínas de la Universidad Católica de Santa María – Arequipa. Bajo la gran colaboración del Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D. (junio - septiembre 2018)..... 88

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Distribución geográfica de las serpientes venenosas en el Perú. (Campbell y Lamar, 2004; Carrillo e Icochea, 1995; Pesante, 2000 y Yarleque, 2000).	18
Tabla 2: Identidad porcentual en relación con la divergencia de Ba-MP con las otras metaloproteasas homologas. Laboratorio de Química de Proteínas UCSM – Arequipa (junio - septiembre 2018).....	66
Tabla 3: Análisis bioinformático de la composición global de aminoácidos de la fracción N-terminal de Ba-MP del veneno de <i>Bothrops andianus</i> . Laboratorio de Química de Proteínas UCSM – Arequipa (junio - septiembre 2018).....	70

RESUMEN

El estudio se realizó en el Laboratorio de Química de Proteínas, de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa; en colaboración con el Laboratorio Thomson de espectrometría de masas del Instituto de Química de la Universidad del Estado de Campinas - São Paulo, Brasil, desde junio a septiembre del 2018. El empleo de metaloproteasas de serpientes, podría tener en el futuro la perspectiva como agente antitrombótico. El objetivo principal fue obtener por aproximación proteómica la presencia de metaloproteasas a partir del veneno total de *Bothrops andianus* y analizar por un análisis bioinformático, la bioprospección futura terapéutica. La metodología fue: purificación del veneno de *B. andianus* mediante cromatografía de intercambio iónico SP-Sephadex C-50; actividad biológica y bioquímica mediante el método Kondo modificado y TAME; identificación del peso molecular y punto isoeléctrico mediante electroforesis bidimensional; identificación de la fracción peptídica mediante espectrometría de masa (MALDI TOF/TOF); secuenciamiento y análisis bioinformático mediante el sistema Swissprot (NCBI-BLAST), y el Software DNASTar; con la estadística descriptiva y experimental, representados por la medida de experimentos error padrón. ANOVA, la significancia fue obtenida a través del test no-pareado t-Student considerando $p < 0,05$. Resultados: se obtuvo una metaloproteasa denominado Ba-MP, el cual mostró actividad hemorrágica leve (DHM = 39 mm), con acción catalítica fuerte (17.65 nmoles/min); presentó un peso molecular 33 KDa y un punto isoeléctrico de 7.1; se obtuvo la fracción N-terminal presentando la secuencia QNLPQRYIQLVVADH. Presentó gran homología con otras metaloproteasas como HT-D 93.8%, HT-B 93.8%, HT-C 93.8%, BmHF-1 81.3%, adamalysin II 87.5% y atroxase 87.5%. En conclusión, se logró obtener una metaloproteasa Ba-MP del veneno de *B. andianus* con una actividad hemorrágica leve y una actividad catalítica fuerte y bajo el análisis bioinformático muestra una perspectiva no terapéutica debido a su actividad hemorrágica.

Palabras clave: Análisis bioinformático, *Bothrops andianus*, electroforesis bidimensional, espectrometría de masas y metaloproteasa Ba-MP.

ABSTRACT

The study was conducted at the Protein Chemistry Laboratory of the Catholic University of Santa María de Arequipa; in collaboration with the Thomson Mass Spectrometry Laboratory of the Chemistry Institute of the State University of Campinas - São Paulo, Brazil, from June to September 2018. The use of snake metalloproteases, could have in the future the perspective as agent antithrombotic. The main objective was to obtain, by proteomic approach, the presence of metalloproteases from the Bothrops total venom and a bioinformatic analysis, the future therapeutic bioprospecting. The methodology was: purification of *B. andianus* venom by SP-Sephadex C-50 ion exchange chromatography; biological and biochemical activity by the modified Kondo method and TAME; Identification of the molecular weight and isoelectric point by two-dimensional electrophoresis; identification of the peptide fraction by mass spectrometry (MALDI TOF / TOF); sequencing and bioinformatic analysis using the Swissprot system (NCBI-BLAST), and the DNASTar software; with descriptive and experimental statistics, represented by the measurement of standard error experiments. ANOVA, the significance was obtained through the unpaired t-Student test to obtain $p < 0.05$. Results: a metalloprotease called Ba-MP was obtained, which showed mild hemorrhagic activity (DHM = 39 mm), with strong catalytic action (17.65 nmol / min); It presented a molecular weight of 33 KDa and an isoelectric point of 7.1; the N-terminal fraction was obtained by presenting the sequence QNLPQRYIQLVVVADH. It presented great homology with other metalloproteases such as HT-D 93.8%, HT-B 93.8%, HT-C 93.8%, BmHF-1 81.3%, adamalysin II 87.5% and atroxase 87.5%. In conclusion, it is recommended to obtain a Ba-MP metalloprotease from the venom of *B. andianus* with a mild hemorrhagic activity and a low bioinformatic analysis shows a non-therapeutic perspective due to its hemorrhagic activity.

Keywords: *Bothrops andianus*, Ba-MP metalloprotease, two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry and bioinformatic analysis.

I. INTRODUCCIÓN

La investigación se refiere al estudio de metaloproteasas en el veneno de la serpiente *Bothrops andianus* (amantita), el cual es una especie de víbora venenosa endémica de los andes en América del Sur, específicamente en las montañas del sur del Perú, en los departamentos de Cusco y Puno. Las metaloproteasas son enzimas proteolíticas con importantes funciones biológicas en seres procariontes y eucariontes, incluyendo al hombre. Las metaloproteasas, aisladas del veneno de serpientes, son importantes objetos de estudio debido a la complejidad funcional y estructural. Las serpientes del género *Bothrops*, son importantes fuentes de esta clase de enzimas y reciben especial atención en virtud de los aspectos clínicos y epidemiológicos.

El estudio de metaloproteasas en veneno de serpiente es muy importante ya que estas enzimas pueden tener actividades específicas (terapéuticas) contra algunas enfermedades las cuales tienen un tratamiento complejo. El estudio de su estructura y su complejidad funcional muestra que estas enzimas tienen efectos sobre los componentes de la coagulación, esto podría darnos a conocer nuevas herramientas terapéuticas no solamente en el uso hacia animales sino también hacia el hombre. Muchos investigadores ponen énfasis no solamente en este tipo de enzimas si no en la variedad de proteínas en venenos de serpientes, solo con el fin de encontrar nuevas herramientas terapéuticas para combatir enfermedades de padecimiento grave como el cáncer, etc.

Hasta el presente se tiene en consideraciones varias terapias muchas veces ineficientes en los tratamientos de trombosis a nivel del sistema vascular en los mamíferos. La gran dificultad radica fundamentalmente en la localización de la microvasculatura, donde muchas veces se localiza el coágulo al cual es difícil de acceder, a fin de aplicar una hidrólisis efectiva del mismo. En ese sentido, se levantó una

alternativa en el uso de un agente antitrombótico presente en el veneno de serpiente procedente de la familia Viperidae la cual podría contribuir enormemente desde la bioprospección en la utilización como agente terapéutico.

El empleo de metaloproteasas procedentes del veneno de serpientes del género *Bothrops* en nuestra región, se torna de vital importancia desde que muestra una eficiencia enzimática frente a una ausencia hemorrágica, conocida para esta familia de enzimas. La contribución de este estudio es encontrar nuevas herramientas terapéuticas los cuales puedan ayudar al mejor tratamiento de enfermedades, en este caso a pacientes que sufran de trombosis. En este sentido, el presente trabajo de investigación tuvo como perspectiva la purificación y caracterización fisicoquímica y biológica de metaloproteasas con la visión en el futuro de ser posible agente terapéutico desde su caracterización bajo una plataforma de aproximación proteómica. En tal sentido, se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general

Determinar por una aproximación proteómica la presencia de metaloproteasas a partir del veneno total de *Bothrops andianus* y analizar bajo una perspectiva por análisis bioinformático, la bioprospección futura terapéutica.

Objetivos específicos

- Purificar a partir de veneno total de *Bothrops andianus* metaloproteasas a través de la plataforma Proteómica.
- Caracterizar bioquímica y biológicamente (actividad hemorrágica) la metaloproteasa purificada de *Bothrops andianus* e identificar su actividad biológica por ensayos de inducción hemorrágica.

- Identificar su relación masa y punto isoeléctrico por electroforesis bidimensional (2D) y secuenciar las metaloproteasas, por espectrometría de masa MALDI TOF/TOF y electrospray.
- Realizar un análisis bioinformático de las secuencias encontradas en el contexto de la bioprospección como agente terapéutico.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

Las metaloproteasas de veneno de serpiente, afecta a diversas funciones fisiológicas al escindir proteínas específicas. Es la razón por la que se realizan varios estudios como el de (Kini y Cho, 2016), que investigo las metaloproteasas que afectan la coagulación de la sangre, la fibrinólisis y la agregación plaquetaria, además menciona que las metaloproteasas son útiles como herramientas de investigación en el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades tromboticas y hemostáticas.

Estas enzimas son potencialmente útiles como reactivos para el subdiagnostico de trastorno plaquetario o enfermedad de von Willebrand, así como para la investigación clínica y básica de trombosis y hemostasia (Matsui *et al.*, 2010). Las metaloproteasas de veneno se serpiente (SVMP) se encuentran ampliamente distribuidas en los venenos de serpientes y son toxinas versátiles, dirigidas a muchos elementos importantes involucrados en la hemostasia, como en las proteínas de la membrana basal, las proteínas de la coagulación, las plaquetas, las células endoteliales e inflamatorias (Moura *et al.*, 2011).

Las metaloproteasas de veneno de serpiente (SVMP) se subdividieron en P-I, clases de proteína P-II y P-III. La característica notable se distinguió a las diferentes clases fue su tamaño (peso molecular) las diferencias y la estructura del dominio: la clase I (P-I), los pequeños SVMP, tienen masas moleculares de 20 – 30 KDa, contienen solo un domino pro y el dominio proteinasa; clase II (P-II), los SVMP de tamaño medio, masas moleculares de 30 – 60 KDa, contienen el dominio pro, el dominio proteinasa y el dominio desintegrina; clase III (P-III), los SVMP grandes, tienen masas moleculares de

60 – 100 KDa, contienen estructura de dominio pro, proteinasa, desintegrina y rica en cisteína (Markland y Swenson, 2013).

La purificación de una metaloproteasa como la BmooMP α – II del veneno de *Bothrops moojeni* (De Queiroz *et al.*, 2014) se lleva a cabo a través de pasos cromatograficos. En su trabajo indica que la proteína enzimáticamente activa inhibe la agregación de plaquetas inducida por colágeno, ADP y ristocetina de una manera dependiente de la concentración. Así también, (De Moráis *et al.*, 2012) halló también de la misma serpiente otra metaloproteasa llamada moojenin la cual hizo que la sangre fuera descoagulante cuando se administró intraperitonealmente en ratones. Indica que esta metaloproteasa puede ser de interés médico debido a su actividad anticoagulante.

La BJ-PI2, una metaloproteasa no hemorrágica del veneno de serpiente *Bothrops jararacá*, descubierta por (Da Silva *et al.*, 2012), en su exposición de resultados señala que la BJ-PI2 tiene un peso molecular de 23.08 KDa. BJ-PI2 aumento la permeabilidad vascular de la piel dorsal de rata (inhibida por 1,10-fenantrolina). BJ-PI2 no fue hemorrágico o mionecrotico, pero causó la migración de células inflamatorias.

Las colombienasas son metaloproteasas ácidas de bajo peso molecular (23,074.31 Da colombienase-1 y 23,078.80 Da colombienase-2) aisladas del veneno de serpientes *Bothrops colombiensis* por (Girón *et al.*, 2013), Ambas colombienasas presentan actividad lítica fibrinosa (genética), pero no mostraron actividad hemorrágica, amidolítica, activadora de plasminogeno o coagulante, y ningún efecto de agregación plaquetaria inducida por colágeno o ADP. Las características biológicas de las colombienasas confieren un potencial terapéutico, ya que contienen una alta actividad fibrina, desprovista de actividad hemorrágica. Estas metaloproteasas pueden explorarse

como agentes tromboticos dado que disuelve los coágulos de fibrina o impiden su formación.

La leucurolysin-a (Leuc-a) es una clase de metaloproteasa de serpiente de clase P-I aislada del veneno de la serpiente sudamericana *Bothrops leucurus* (jararacá de cola blanca) (Ferreira *et al.*, 2009), sus estudios *In vitro* revelaron que Leuc-a disuelve los coágulos hechos a partir del fibrinógeno purificado o sangre completa. A diferencia de otras metaloproteasas fibrinolíticas del veneno, Leuc-a no tiene actividad hemorrágica.

La metaloproteasa olítica fibrina (ogen) no hemorrágica del veneno de *Agkistrodon acutus* descubierta por (Hou *et al.*, 2005), menciona que esta metaloproteasa no hemorrágica han llamado la atención de muchos investigadores como posible agentes tromboticos. Su acción directa característica sobre la fibrina produce menos complicaciones que los agentes tromboticos disponibles actualmente en uso clínico, como el activador del plasminogeno tisular recombinante (t-PA), la uroquinasa y la estreptoquinasa, que actúan sobre el trombo indirectamente a través de la activación del plasminogeno.

La jararhagina es una metaloproteasa hemorrágica de masa molecular alta 52 KDa del veneno de *Bothrops jararacá* y un miembro de la familia de proteínas metaloproteasas/desintegrina/cisteína descubierta por (Kamiguti *et al.*, 1996), los autores indican que el dominio desintegrina de jararhagina ha sido implicado en la inhibición de las respuestas plaquetarias al colágeno por mecanismo que no se conoce del todo.

2.2. MARCO TEÓRICO

2.1.1. Principales serpientes venenosas del Perú

Las serpientes forman el suborden Ophidia o Serpentes pertenecientes al orden Squamata de los vertebrados de la superclase Reptilia. Se han reconocido en el mundo unas 3300 especies y se han clasificado en 11 familias, aunque solamente cuatro de ellas son productoras de secreciones toxicas. Las serpientes constituyen más del 66% de todas las especies vivientes (Navarrete *et al.*, 2010). En la actualidad son reconocidas cerca de 3000 especies de serpientes, siendo 500 especies consideradas venenosas y de estas solamente 200 pueden provocar envenenamientos en humanos (Fry *et al.*, 2006). Considerando la extensa región de selva que comprende nuestro territorio, superando los 600 mil Km², son muchas las serpientes que se han ido registrando en esta región, además de aquellas registradas en los valles interandinos y la costa del pacifico (Carrillo e Icochea, 1995).

En el Perú, se pueden encontrar 9 de las 15 familias de serpientes que se conocen y 33 especies ponzoñosas, de las cuales 9 son autóctonas y las 24 restantes son comunes a países vecinos (Carrillo e Icochea, 1995). El Perú ocupa el segundo lugar en Latinoamérica por su variedad de serpientes. Las dos principales familias de serpientes venenosas que habitan en el país son Viperidae y Elapidae (Pesante, 2000 y Yarleque, 2000).

En el Perú las serpientes venenosas de la familia Viperidae están representadas por los géneros: *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothriechis*, *Crotalus* y *Lachesis* (Yarleque, 2000). La distribución geográfica de las serpientes venenosas más importantes en el Perú pueden observarse en el tabla 1, basado en los aportes realizados

por (Campbell y Lamar, 2004); (Carrillo e Icochea, 1995); (Pesante, 2000 y Yarleque, 2000).

Tabla 1: Distribución geográfica de las serpientes venenosas en el Perú. (Campbell y Lamar, 2004; Carrillo e Icochea, 1995; Pesante, 2000 y Yarleque, 2000).

REGIÓN	ESPECIE	NOMBRES POPULARES
COSTA	<i>Bothrops barnetti</i> .	Macanche, Doble X, Cascabel
	<i>Bothrops pictus</i> .	Víbora, Jergón de la costa,
	<i>Bothrops roedingeri</i> .	Víbora, Jergón de la costa
	<i>Micrurus mertensi</i> .	Chaquira, Coral, Coralillo,
	<i>Micrurus tschudii</i> .	Coral, Coralillo
SIERRA	<i>Bothrops neuwiedi</i> .	Upachilla, Dormilona
	<i>Micrurus peruvianus</i> .	Naca naca
	<i>Crotalus durissus</i> .	Cascabel, Pallacatari
SELVA	<i>Bothrops andianus</i> .	Jergona, Amantita, Marianito
	<i>Bothrops atrox</i> .	Jergón, Jergona, Catari.
	<i>Bothrops brazili</i> .	Jergón, Jergona, Shushupe
	<i>Bothrops neuwiedi</i> .	Upachilla, Dormilona
	<i>Bothriopsis Taeniata</i> .	
	<i>Bothriopsis bilineata</i> .	Loro machaco
	<i>Bothriopsis chloromelas</i> .	Lamón, Achujergon
	<i>Bothriopsis peruviana</i> .	Jergón negro
	<i>Bothrocophias Hyoprora</i> .	Jergón pudridora
	<i>Bothrocophias microphthalmus</i> .	Jergón pudridora
	<i>Lachesis muta</i> .	Shushupe, Yamongsse
	<i>Crotalus durissus</i> .	Cascabel, Pallacatari
	<i>Micrurus Anellatus</i> .	Naca naca
	<i>Micrurus filiformis</i> .	Naca naca
	<i>Micrurus margantiferus</i> .	
<i>Micrurus putumayensis</i> .		
<i>Micrurus spixii</i> .	Naca naca, Chaquira, Itinkia	
<i>Micrurus surimanensis</i> .	Naca naca, Itinkia	
<i>Micrurus mertensi</i> .	Chaquira, Coral, Coralillo.	

2.1.2. Aspectos generales de los componentes de venenos de serpientes

El veneno de las serpientes es básicamente saliva modificada constituido por una serie de péptidos y proteínas tóxicas de peso molecular elevado, tales como miotoxinas, hemorraginas, nefrotoxinas, neurotoxinas y toxinas coagulantes, que cumplen una función digestiva y defensiva (Lévano y Fernández, 2004). Así también (Pérez *et al.*, 2008), indica que el veneno de serpientes está compuesto por una mezcla heterogénea de sustancias simples y complejas. Dentro de los compuestos simples tenemos varias moléculas orgánicas como aminoácidos libres, péptidos, nucleótidos, carbohidratos, lípidos y aminas biogénicas así como constituyentes inorgánicos referidos básicamente a cationes y aniones. El magnesio y el zinc son importantes cofactores de metaloproteasas de veneno.

Dentro de los compuestos complejos de origen orgánico, se encuentran las proteínas (90 – 95% del peso seco del veneno), carbohidratos, aminas biogénicas, aminoácidos y nucleótidos. En la composición proteica de las serpientes venenosas, podemos encontrar componentes enzimáticos como acetilcolinesterasas (inhibición del sistema nervioso central), adenosinadifosfatasa, fosfolipasas (relacionadas con la miotoxicidad y neurotoxicidad), hialuronidasas. L-aminoácido oxidasas, metaloproteasas, serinoproteasas y componentes no enzimáticos como desintegrina, lectinas tipo C y péptidos potenciadores de la bradicinina (Braud *et al.*, 2000; Markland, 1998; Suhr y Kim, 1996; Tu, 1996). En seguida serán descritas las principales clases de enzimas que constituyen los venenos de serpiente.

2.1.2.1. Oxidoreductasas

El veneno total de las serpientes posee unas enzimas llamadas oxidoreductasa, las L-aminoácido oxidasas (LAO) y el lactato deshidrogenasa. Muchos venenos de

serpientes poseen LAO muy activas, debido a la presencia de su cofactor, la riboflavina, las LAO son capaces de en determinadas condiciones de laboratorio, inducir agregación plaquetaria (Li *et al.*, 2008) y apoptosis en determinadas células (Shur y Kim, 1996).

2.1.2.2. Hidrolasas

En los venenos de serpientes las más conocidas son las fosfatasas, fosfodiesterasas, endonucleasas, y 5-nucleotidasas. Las fosfatasas son hidrolasas que hidrolizan como sustrato fosfomonoesteres, estas enzimas son clasificadas como fosfatasas no específicas, y pueden ser divididas en fosfatasas acidas y fosfatasas alcalinas, basándose en el pH óptimo para la catálisis y el mecanismo de reacción (Tu y Chua, 1996). La importancia de las proteínas fosfatasas se debe a su participación en los procesos de crecimiento, diferenciación y proliferación celular, regulan la actividad de otras enzimas por desfosforilización, también produce alteración en el metabolismo de carbohidratos, así como en eventos carcinogénicos (Sales y Santoro, 2008).

2.1.2.3. Glucosidasas

Las glucosidasas (también conocidas como glucósido hidrolasas) catalizan la hidrolisis de enlaces glucosídicos para generar glúcidos menores (Lehninger, 2005). La hialuronidasa, es la enzima más representativa, y cataliza la reacción de hidrolisis del ácido hialurónico, que es un mucopolisacárido presente en la piel, en los tejidos conectivos y tendones. Estas enzimas tendrían la función de facilitar la difusión de las toxinas del veneno hacia el tejido de la víctima (Tu, 1996).

2.1.2.4. Lipasas

Las fosfolipasas, las acetilcolinesterasas y las fosfodiesterasas, son enzimas más comúnmente encontradas en los venenos de las serpientes, siendo las fosfolipasas A₂ las

más estudiadas, no solamente por sus propiedades químicas, sino por su importancia biológica (Toyama, *et al.*, 2000).

2.1.2.5. Proteasas

Las enzimas proteolíticas o proteinasas son enzimas que catalizan el clivaje de uniones peptídicas de proteínas (Lehninger, 2005). Muchos procesos biológicos son regulados por la acción de proteinasas, por ejemplo, coagulación sanguínea y fibrinólisis, liberación de proteínas secretoras a través de la membrana, activación del sistema de complemento, fertilización, germinación y control de la digestión proteolítica (Declerck e Imren, 1994).

Las proteasas no son responsables de la acción letal de los venenos, pero causan otros tipos de efectos dañinos, tales como la hemorragia. Los venenos de las serpientes de las familias Crotalidae y Viperidae contienen uno o más factores hemorrágicos llamados hemorraginas. Estas moléculas son caracterizadas como metaloproteasas, estas proteasas hacen degradación de proteínas que componen la membrana basal subyacente de las células endoteliales de los capilares (Gutiérrez, *et al.*, 2005). Las proteasas del veneno de serpiente se clasifican en serinoproteasas y metaloproteasas, son los principales grupos de enzimas que llevan al desequilibrio hemostático (Braud *et al.*, 2000; Matsui *et al.*, 2000).

2.1.2.6. Otras enzimas de importancia

El veneno total también presenta otras moléculas proteicas sin actividad enzimática, como las desintegrinas y las lectinas. Las desintegrinas, son un grupo de proteínas con bajo peso molecular, ricas en residuos de cisteína. Ellas contienen una secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp responsables de su actividad inhibidora de la interacción del fibrinógeno, ocasionando hemorragias (Kamiguti *et al.*, 1998). Las

lectinas constituyen un grupo de proteínas o glicoproteínas, que poseen la capacidad de aglutinar células, precipitar polisacáridos y glicoproteínas, por el hecho que se ligan específica y reversiblemente a determinados carbohidratos (Carvalho *et al.*, 1998).

2.2.3. El veneno botrópico

Las serpientes del genero *Bothrops* habitan una extensa región de América que abarca desde México hasta Argentina. En nuestro país, se pueden encontrar 9 de las 15 familias de serpientes que se conocen y 33 especies ponzoñosas, de las cuales 9 son autóctonas y las 24 restantes son comunes a países vecinos (Carrillo e Icochea, 1995). Debido a la amplia distribución y número de ejemplares de este género, se le atribuye el mayor porcentaje de accidentes ofídicos. Los efectos asintomáticos son similares en todos los casos, y la intensidad de los efectos locales depende de la cantidad de veneno inoculado y de la localización de la mordedura (Aguirre, 2006). De modo didáctico son descritas para el veneno botrópico, tres actividades fisiopatológicas.

2.2.3.1. Acción proteolítica

La llamada acción proteolítica se refiere a un conjunto de fracciones del veneno botrópico, con especificidades diversas, y que son responsables de los fenómenos locales (Aguirre, 2006). La actividad de enzimas proteolíticas del veneno de sustratos diversos pueden causar lesión en el tejido (acción directa) y provocar la liberación de sustancias de los tejidos lesionados que, siendo mediadores del proceso inflamatorio, amplían estas mismas lesiones (acción indirecta) (Aguirre, 2006). Así mismo, (Teng y Wang, 1988) demostraron que en la patogénesis del edema causado por la serpiente con veneno de actividad proteolítica hay participación de mastocitos, neutrófilos, Cinas plasmáticas, PAF, y de los metabolitos de ácido araquidónico.

2.2.3.2. Acción coagulante

Las alteraciones en la coagulación sanguínea constituyen una de las principales características de los envenenamientos por serpientes del género *Bothrops*, estos venenos presentan enzimas coagulantes y procoagulantes, tales como serina proteinasas “tipo trombina” y metaloproteasas que activan los factores X y II de la cascada de coagulación (Markland, 1998). Estos componentes, de fuerte acción coagulante *in vitro*, consumen el fibrinógeno *in vivo*, induciendo desfibrinación y alteraciones en las pruebas de coagulación (Gutiérrez, 2002).

Algunas de estas proteínas se utilizan en terapia antitrombótica en la clínica, tales como la serina proteinasa “batroxobina” del veneno de *Bothrops atrox*, en tanto otros se emplean en procedimientos diagnósticos, como es el caso de la “botrocetina”, utilizada en el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand y del síndrome de Bernard-Soulier (Braud *et al.*, 2000).

2.2.3.3. Acción hemorrágica

La acción hemorrágica del veneno botrópico es atribuida a componentes específicos denominados hemorraginas, son metaloproteasas, representan cerca del 1% del veneno total, y son distintas de las fracciones coagulantes. Las hemorraginas ejercerían acción lesiva sobre la membrana basal y posterior del endotelio capilar (Aguirre, 2006).

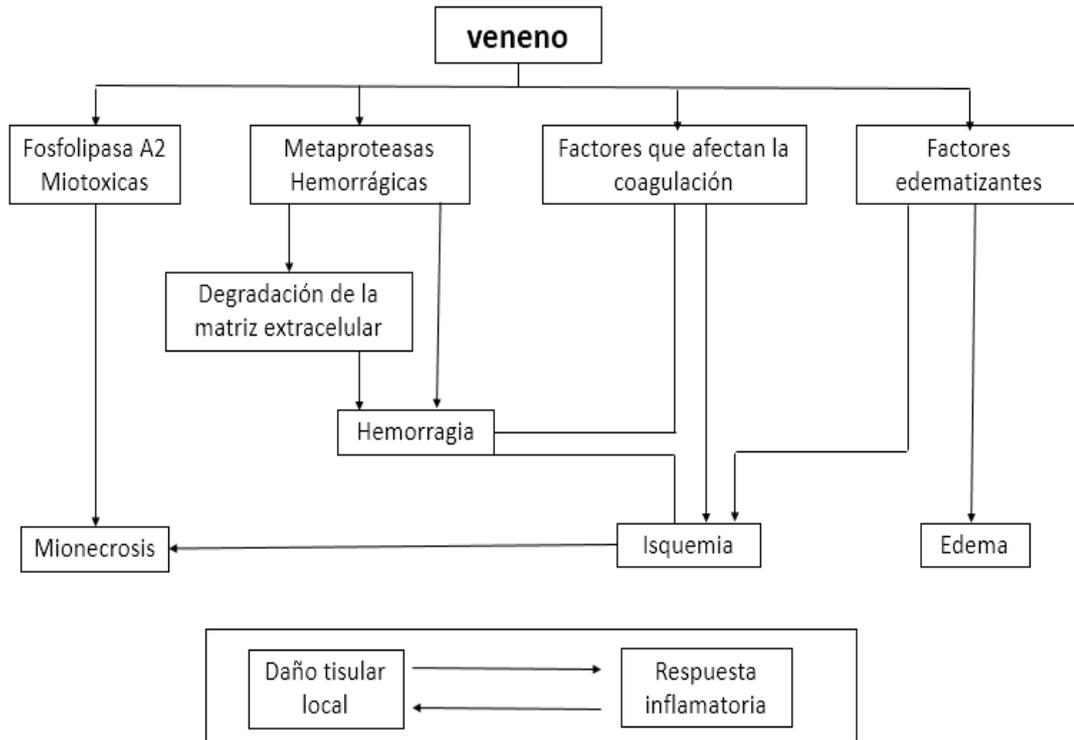


Figura 1: Desenvolvimiento de los efectos locales inducidos por venenos de las serpientes de la familia Viperidae. (Gutiérrez y Lomonte, 2003).

2.2.4. *Bothrops andianus*

Bothrops andianus (amantita), es una especie de víbora venenosa endémica de los andes en América del Sur (McDiarmid *et al.*, 1999). Es una especie terrestre, los adultos generalmente crecen a 60 – 70 cm (aproximadamente 24- 28 pulgadas) de longitud total como un máximo de 125.8 cm (Campbell y Lamar, 2004).

2.2.4.1. Distribución geográfica

Se encuentra en América del Sur, en las montañas del sur de Perú, en los departamentos de Cusco y Puno, a altitudes de 1800 – 3300 msnm. La localidad tipo dada es “Machu Picchu”, departamento de Cusco, Perú, a unos 2743 - 3048 msnm (McDiarmid *et al.*, 1999). Esta serpiente llamada también Amantita por los oriundos de la zona, se encuentra en zonas de selva baja como en Puno, específicamente en el provincia de Sandia (Carrillo e Icochea, 1995).

2.2.4.2. Taxonomía

Reino:	Animalia
Filo:	Chordata
Clase:	Reptilia
Orden:	Squamata
Suborden:	Serpentes
Familia:	Viperidae
Género:	Bothrops
Especie:	<i>Bothrops andianus</i> (amantita), (Amaral, 1923).

2.2.5. Metaloproteasas en veneno de serpientes

2.2.5.1. Aspectos funcionales

Las SVMP's (metaloproteasas del veneno de serpiente) son enzimas proteolíticas con importantes funciones biológicas, aisladas del veneno de varias serpientes, son importantes objetos de estudio debido a la complejidad funcional y estructural. Las serpientes del género *Bothrops*, son importantes fuentes de esta clase de enzimas, reciben especial atención en virtud de los aspectos clínicos y epidemiológicos (Gutiérrez, 2002). El efecto sobre los componentes de la coagulación tales como el fibrinógeno, fibrina y las plaquetas, ha sido uno de los más probables mecanismos de acción de las SVMP (Braud *et al.*, 2000). Así, con algunas excepciones, se pueden clasificar en α - o β -fibrinogenasas y, al contrario de las serinoproteasas, degradan preferentemente la cadena α del fibrinógeno y con menor intensidad la cadena β (Markland & Swenson, 2013).

La hemorragia ocurre principalmente debido al complejo mecanismo de acción de las SVMP's, involucrando cambios morfológicos de las células endoteliales y la participación de aspectos biomecánicos del torrente sanguíneo; pero es la degradación de las proteínas de la membrana basal (MB) de los capilares y vénulas el paso clave en el proceso (Gutiérrez *et al.*, 2005). Las SVMP's presentan otros efectos patológicos además de la hemorragia, algunos efectos como la miotoxicidad. El estudio de la actividad miotóxica de las SVMP se inició con la metaloproteasa de baja masa molecular BaH1 aislada del veneno total de *B. asper* (Gutiérrez *et al.*, 1995). Los autores demostraron que la miotoxicidad producida por la BaH1 es un proceso secundario a la hemorragia, el daño muscular es producido por la isquemia que ocurre después de la hemorragia.

Debido a que en general, el efecto miotóxico estaría restringido sólo a las SVMP's hemorrágicas (Rodríguez *et al.*, 2001) estudio los efectos de la neuwiedasa aislada a partir del veneno crudo de *B. neuwiedi*, demostró que las metaloproteasa no hemorrágicas poseen actividad miotóxica a altas dosis, aunque no observaron hemorragia. La mionecrosis presentada por la neuwiedasa se caracterizó por la reacción de inflamación y la infiltración de leucocitos polimorfonucleares. De acuerdo con lo observado en la histología, observaron aumentos moderados de los niveles de creatinina kinasa (CK) plasmático presentando los mayores datos a las 3 horas. Estos estudios demuestran la complejidad presente en las patologías del tejido muscular debido a las SVMP hemorrágicas y no hemorrágicas.

Las SVMP's producen trastornos inflamatorios al inducir la formación de edema y la liberación de citocinas inflamatorias, al ser inyectadas al tejido muscular y cuando son incubadas con macrófagos *in vitro* (Gutiérrez & Rucavado, 2000). La metaloproteasa BaP1 induce rápidamente la formación de burbujas después de la inyección intramuscular en ratones, las características histológicas presentadas en la formación de

las burbujas sugieren la degradación de componentes clave de la unión dermo-epidermal, como la laminina o la integrina $\alpha 6\beta 4$, en parte de los hemidesmosomas (Rucavado *et al*, 1995).



Figura 2: Resumen de los diversos efectos ejercidos por las metaloproteasas de veneno de serpiente. Algunos de los efectos son debido a la acción directa de las SVMP's, pero otros son efectos secundarios como resultado de la acción de estas enzimas. (Gutiérrez et al., 2005).

2.2.5.2. Aspectos estructurales

Las metaloproteasas de veneno de serpiente forman parte del subgrupo de las “reprolisinas” junto con las ADAM. Las SVMP's son proteínas modulares de forma elipsoidal y depende de zinc para realizar su función enzimática (Stocker y Bode, 1995), formadas por uno o más dominios en el C-terminal. Todas las metaloproteasas de veneno de serpiente presentan el dominio metaloproteasa el cual es conservado. La síntesis de las SVMP's en forma de zimógenos los cuales son procesados, de su secuencia señal y la secuencia pro-enzimática, por otras metaloproteasas o por autólisis (Fox & Serrano, 2005).

Las SVMP's son enzimas de entre 20 y 100 KDa, dependientes de Zn^{2+} y que están relacionadas con síntomas hemorrágicos mediante la degradación de componentes de la matriz extracelular de células endoteliales en los capilares provocando la salida de la sangre al exterior de estos (Bjarnason y Fox, 1994). Existen algunas metaloproteasas del veneno de serpiente (SVMP) que no poseen actividad hemorrágica, no obstante, actúa a través de diversos mecanismos como la inhibición de la agregación plaquetaria, apoptosis o inflamación, para producir un desequilibrio homeostático en la presa (Markland y Swenson, 2013). Estas enzimas son muy abundantes en los venenos de las serpientes de la familia Viperidae, tanto es así, que componen el 11 % y el 65 % de las proteínas totales presentes en las serpientes viperas (Takeda *et al.*, 2012, Escalante *et al.*, 2011).

Las metaloproteasas de veneno de serpientes son producidas como zimógenos. El dominio principal que compone estas enzimas es el dominio metaloproteasa. En seguida se describe los dominios que representan a la SVMP (Escalante *et al.*, 2011).

2.2.5.2.1. Pre-secuencia

Hite *et al.*, (1992), fueron los primeros en demostrar que las SVMP son traducidas como zimógenos y representan la secuencia señal altamente conservada. En la atrolisina esta secuencia está conformada por 18 residuos de aminoácidos. En esta toxina la ruptura de la pre-secuencia acontece entre los aminoácidos Gly18 y Ser19 (Bjarnason y Fox, 1994; Hati *et al.*, 1999).

2.2.5.2.2. Pro-secuencia

En los estudios de los cDNA de las SVMP se observó la presencia de un dominio llamado pro-secuencia, la cual fue encontrada entre la pre-secuencia y el dominio metaloproteasa. El dominio pro-secuencia es altamente conservado y presenta una

secuencia de 7 residuos de aminoácidos (PKMCGVT) cerca del inicio de la región N-terminal, (Hati *et al.*, 1999), la función propuesta para esta secuencia es similar en las metaloproteasas de la matriz (MMP), el cual es de un cambio de cisteína que inactiva el dominio metaloproteasa (Grams *et al.*, 1993).

2.2.5.2.3. Dominio metaloproteasa

El dominio metaloproteasa es clasificado topológicamente, como una proteína α/β , compuesta por sucesión de elementos estructurales secundarios fijos: 5 hojas β (en la cual la hoja 4 es antiparalela) y 5 estructuras α hélice (donde la hélice α_1 contiene de 4 a 6 residuos siendo la menor, y la hélice α_2 es la mayor con 16 a 21 residuos) (Ramos y Selistre de Araujo, 2006), el sitio activo divide el dominio metaloproteasa en dos subdominios: el mayor N-terminal y el menor C-terminal, los cuales son ligados por 2 o 3 puentes disulfuro, localizados en la región N-terminal, son responsables de la estabilidad de la estructura globular de la enzima (Fox y Serrano, 2005).

El dominio metaloproteasa es menos conservado que el pro-dominio, lo que sugiere que las SVMP evolucionarían por medio de la duplicación de genes a partir de una ancestro común y que este dominio sufre un proceso de aceleración acelerada (Ramos y Selistre de Araujo, 2006).

2.2.5.2.4. Péptido o segmento espaciador

En un primer momento fue definido como un segmento entre los dominios metaloproteasa y desintegrina-Like (Bjarnason y Fox, 1994). El péptido presenta 13 – 15 residuos de aminoácidos de longitud. En el caso de las SVMP el péptido posiblemente esté relacionado con la resistencia al procesamiento proteolítico de la proteína (Fox y Serrano, 2005; Ramos y Selistre de Araujo, 2006),

Kini *et al.*, (1997) sintetizaron un péptido basado en este segmento y validaron la toxicidad y la actividad biológica. El segmento espaciador no presentó actividad letal, anticoagulante o efecto sobre las plaquetas.

2.2.5.2.5. Dominio desintegrina

Las desintegrinas son una familia de péptidos que presenta baja masa molecular, de 41 a 100 aminoácidos, contienen varios residuos de cisteína los cuales configuran variados patrones de puentes disulfuro (Ramos y Selistre de Araujo, 2006). Estos péptidos son encontrados en serpientes venenosas y la mayoría pertenece a la clase – II de las SVMP. La secuencia RGD es la responsable de la actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria que estos péptidos, interactúan con el complejo glicoproteína IIb/IIIa (integrina $\alpha_{IIb}\beta_{III}$) inhibiendo la agregación plaquetaria inducida por el fibrinógeno como la Trigamin aislada del veneno bruto de *Trimeresurus flaviridis* (Kamiguti *et al.*, 1998; Hati *et al.*, 1999; Ramos y Selistre de Araujo, 2006).

2.2.5.2.6. Dominio rico en cisteína

Este dominio se presenta en las SVMP de alta masa molecular (clase P-III) en el sentido C-terminal del dominio desintegrina-Like (Bjarnason y Fox, 1994). Este dominio es caracterizado por el alto número de residuos de cisteína, las cuales se ligan para formar los puentes disulfuro (Hati *et al.*, 1999).

En las SVMP's de alta masa molecular (P-III) la función observada es el aumento de la potencia hemorrágica por la interacción de este dominio con receptores de células endoteliales o proteínas de la membrana basal de los capilares (Bjarnason y Fox, 1994; Escalante *et al.*, 2006; Moura da Silva, 2008). Otras actividades biológicas fueron descritas para el dominio rico en cisteína. (Jia *et al.*, 1997) demostró que este dominio inhibe la agregación plaquetaria ($IC_{50} = 456$ nM) inducida por el colágeno, más allá de

inhibir la adición de células MG-43 al colágeno, las inhibiciones fueron en dosis dependientes, pero no presentó inhibición de la agregación plaquetaria dependiente del ADP (Bjarnason y Fox, 1994; Ramos y Selistre de Araujo, 2006).

2.2.5.2.7. Unidad similar a la lectina tipo C

Este dominio fue descrito únicamente para las metaloproteasas RVV-X (*Vipera russelli*) y VLFXA (*Vipera libetina*) y cada una posee dos sub unidades proteicas adicionales C-tipo Lectina-Like unidas a la cadena principal por puentes disulfuro en los dominios ricos en cisteína (Bjarnason y Fox, 1994; Ramos y Selistre de Araujo, 2006).

2.2.5.3. Clasificación de las metaloproteasas en veneno de serpientes

Las metaloproteasas fueron clasificadas al inicio solo en base a sus pesos moleculares indicándose, alto y bajo. La clasificación de las SVMP's es hecha de acuerdo con la adición de dominios estructurales, proporcionando informaciones esenciales para comprender los mecanismos de acción de esas enzimas. Las SVMP inicialmente fueron clasificadas en cuatro clases (Bjarnason y Fox, 1994; Fox y Serrano, 2005), más esta clasificación fue alterada recientemente (Fox y Serrano, 2008). Actualmente las metaloproteasas de veneno de serpiente son clasificadas en 3 clases:

SVMP Clase P- I: Esta clase presenta la estructura de las SVMP's, basado en el cDNA, compuestos por el pre-dominios, pro-dominio y dominio proteasa. Todas las SVMP-.PI presentaron la razón HEXXHXXGXXH, que es el sitio activo y de unión al zinc, más allá de eso, presenta la secuencia CI/VM conocida como "Met-Turn". Todos los miembros de esta clase poseen actividad proteolítica y actividad hemorrágica débil. Atrolisina B, C, D, LHF-II, fibrolase, atroxase son algunos miembros (Bjarnason y Fox, 1994; Fox y Serrano, 2005; Fox y Serrano, 2008).

SVMP Clase P-II: Presenta la misma estructura básica de las P-I pero tiene la adición de un dominio “desintegrina-like” en la región C-terminal. Este dominio presenta la razón RGD que hace como un bloqueador de integrinas responsables de la agregación plaquetaria. En general las P-II presentan una acción hemorrágica más fuerte que las P-I. En las recientes revisiones (Fox & Serrano, 2008) propone la sub-clasificación en P-IIa y P-IIb de acuerdo a su modificación postraducional de estas enzimas. La P-II son subclasificadas: P-IIa, las cuales comprenden estructuras que sufren la quiebra en el segmento espaciador liberando el dominio metaloproteasa y desintegrina similar los cuales son funcionales, ejemplo de esta sub clase son: atrolisina E (*Crotalus atrox*) y trigamin (*Trimeresurus gramineus*); P-IIb y P-IIc, pertenecen a esta clase de metaloproteasas las metaloproteasa P-II son: jerdonitina (*T. jerdonii*) y stejnitin (*T. stejneri*); ejemplos de P-IIc son BaG (*Bothrops alternatus*) y bilitoxin-1 (*Angkistrodon bilineatus*). P-IId, son las metaloproteasas P-II que sufren procesamiento proteolítico liberando desintegrinas funcionales, en cuanto el dominio metaloproteasa es degradado. Ejemplo de esta sub clase forman estructuras diméricas, (*Vipera russelli*) (Bjarnason y Fox, 1994; Fox y Serrano, 2005; Fox y Serrano, 2008).

SVMP Clase P-III: Las toxinas que pertenecen a esta clase presentan estructura básica (P-I), con la presencia del dominio desintegrina-Like y agregado después de este un dominio “cisteína-ricos”, que se caracteriza por la presencia de varios residuos de cisteína; además de eso, se presenta la mayor actividad hemorrágica de las SVMP junto con otros efectos en la hemostasia. De la misma manera que la anterior clase, las P-III se sub-clasificadas en P-IIIa, comprenden estructuras completas de cadena única, como por ejemplo atrolisina A (*C. atrox*) o daborhagin (*Daboia russelli*). P-IIIb, estas son susceptibles de quebrar proteolíticamente liberando el dominio metaloproteasa y el dominio desintegrina-similar rico en cisteína, ejemplos de esta sub clase son la

jararhagina (*B. jararaca*) y baltergina (*B. alternatus*); P-IIIc, son las metaloproteasas P-III que forman estructuras diméricas, ejemplo de esta sub clase es la VAP1 (*V. russelli*) (Bjarnason y Fox, 1994; Fox y Serrano, 2005; Fox y Serrano, 2008).

Recientemente fue incluida la clase P-IIIId la cual incluye los miembros de la clase P-IV. (Fox y Serrano, 2008) se basaron en estudios hechos usando cDNA, los cuales mostraron que la estructura P-III y Lectina-Like tipo C, son codificadas por diferentes genes (VLFXA, *Vipera libetina*) sugiriendo que los miembros de esta clase son producto de modificaciones post-traduccionales. Esta sub clase se caracteriza por la presencia de la cadena principal que es estructura similar a la P-III y más dos dominios “Lectina-Like tipo-C” que se presentaron unidas por puentes disulfuro a la cadena principal. Actualmente se tiene dos representantes: RVV-X (Russelysin) y VLFXA (VL factor -X activador) (Fox y Serrano, 2008).

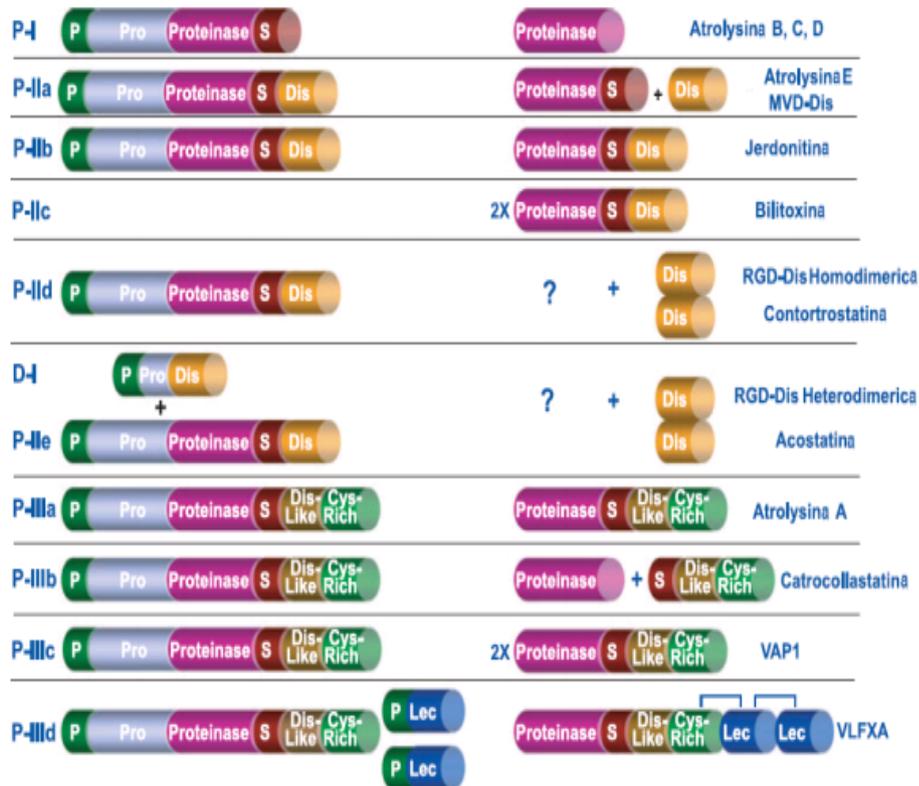


Figura 3: Clases y subclases de las metaloproteasas de veneno de serpiente. (Fox & Serrano, 2008).

2.2.5.4. Importancia de las metaloproteasas de serpiente como un futuro agente terapéutico

Hasta la actualidad se tiene en consideraciones varias terapias muchas veces ineficientes en los tratamientos de trombosis a nivel del sistema vascular en los mamíferos. La gran dificultad radica fundamentalmente en la localización de las microvasculaturas, donde muchas veces se localiza el coagulo el cual es difícil de acceder, a fin de aplicar una hidrolisis efectiva del mismo. En este sentido los investigadores vieron en las metaloproteasas (con eficiencia enzimática catalítica frente a la ausencia de la actividad hemorrágica) del veneno de serpientes una alternativa como agente antitrombótico.

De Queiroz *et al.* (2014), aisló una metaloproteasa de P-I de *Bothrops moojeni* llamada BmooMP α -II, esta enzima inhibió la agregación plaquetaria, el cual puede contribuir de los trastornos tromboticos. De igual manera (De Moráis *et al.*, 2012), aisló una metaloproteasa llamada moojenin el cual hizo que la sangre fuera descoagulante, este descubrimiento puede ser de interés medico debido a su actividad anticoagulante. (Da Silva *et al.*, 2012), aisló BJ-PI2 una metaloproteasa el cual no producía hemorragia en el veneno de *Bothrops jararaca*.

Por su parte Girón *et al.* (2013). Descubrió las colombienasas unas metaloproteasas, las cuales presentaban actividad lítica fibrinosa, pero no mostraron actividad hemorrágica o coagulante. Las características biológicas de las colombienasas confieren un potencial terapéutico, ya que contienen una alta actividad en la fibrina, desprovista de actividad hemorrágica. Estas metaloproteasas pueden explotarse como agentes tromboticos dado que disuelve los coágulos de fibrina o impiden su formación. En su parte (Ferreira *et al.*, 2009), estudio una metaloproteasa de *Bothrops leucurus*, la

Leuc-a una clase de metaloproteasa P-I, *in vitro* los estudios revelaron que Leuc-a disuelve los coágulos hechos a partir del fibrinógeno purificado o sangre completa, a diferencia de otras metaloproteasas fibrinolíticas del veneno, Leuc-a no tiene actividad hemorrágica. (Huo *et al.*, 2005), estudio una metaloproteasa olítica fibrina (ogen) no hemorrágica el veneno *Agkistrodon acutus* este tipo de metaloproteasa ha llamado mucho la atención de muchos investigadores como posible agente trombotico.

Las metaloproteasas con actividad fibrinogenolítica son aplicables en los tratamientos médicos para bajar el nivel de fibrinógeno en el plasma o solubilizar los coágulos plasmáticos en individuos trombóticos (Matsui y Hamako, 2005). Así hay varios estudios los cuales sobre la importancia que pueden tener estas enzimas como agentes antitrombóticos.

2.2.6. Tecnología de la proteómica

El desarrollo de la proteómica se debe en parte a los avances importantes realizados en la tecnología de proteínas, esta metodología disponible tiene sus limitaciones y actualmente todavía no es posible realizar muchos tipos de proteómica. Por lo que es necesario mejorar algunas de estas limitaciones y desarrollar nuevas tecnologías (Aebersold y Mann, 2003).

2.2.6.1. Separación de proteínas

La tecnología más usada para la separación de proteínas es la electroforesis en geles de poliacrilamida, esta técnica es la más eficaz para resolver mezclas complejas de proteínas (Alegre, 2015). La técnica más usada para la separación de proteínas es la electroforesis en geles de poliacrilamida, esta técnica es la más eficaz para resolver mezclas complejas de proteínas por tamaño y carga. SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) es un detergente que desnaturaliza las estructuras terciarias y secundarias, con una carga

negativa que se correlaciona con su longitud, permitiendo estimar pesos moleculares (Westermeier, 2002).

El sistema SDS-PAGE de Laemmli (1970), es un gel discontinuo con un gel de apilamiento superior (stacking gel) y gel de resolución inferior (runing gel) que tienen diferentes concentraciones de poliacrilamida. El gel de apilamiento superior tiene un menor porcentaje de poliacrilamida permitiendo que las proteínas se muevan a través de forma rápida y se apilen en una banda estrecha antes de entrar en un alto porcentaje de poliacrilamida se moverán a través del gel de resolución para la separación. Las proteínas pequeñas se moverán a través del gel de resolución más rápidamente que las proteínas grandes.

2.2.6.2. Electroforesis bidimensional (2D)

La electroforesis 2D (IEF+SDS-PAGE) es la herramienta más empleada para el análisis global y la separación de los componentes del proteoma (conjunto de proteínas que se expresan a partir de un genoma en un momento dado) (Lehninger, 2005). Dicha técnica pasa por las siguientes etapas:

- **Preparación de la muestra:** En este paso se emplean agentes caotrópicos, surfactantes y agentes reductores. Los agentes caotrópicos, como la urea, provocan la desnaturalización de las proteínas por ruptura de puentes de hidrógeno, dejando expuestos los residuos hidrofóbicos que son solubilizados por los agentes surfactantes. Los agentes reductores, como el DTT completan la desnaturalización proteica por ruptura de puentes disulfuro (Lehninger, 2005).
- **2. Separación en la 1ª dimensión (Isoelectroenfoque):** En esta dimensión, las proteínas se separan de acuerdo a su punto isoeléctrico. En la tira existe un gradiente de pH, que se aumenta de forma paulatina desde el ánodo hacia el

cátodo. La proteína migrará hasta alcanzar su punto isoelectrico, incluso si se difunde, al variar su carga neta, volverá otra vez al $\text{pH} = \text{punto isoelectrico}$. Este efecto se denomina Isoelectroenfoque (Lehninger, 2005).

- **Separación en la 2ª dimensión (SDS-PAGE):** Las proteínas se separan en función de su peso molecular. La segunda dimensión se realiza con geles de SDS-poliacrilamida “tradicionales”, en los que la tira reactiva se pone en contacto con la parte superior del gel. En esta segunda separación, las proteínas se separan de acuerdo a su peso (Lehninger, 2005).
- **Revelado:** Los métodos más usados son la tinción con azul comassie que se fija a las proteínas pero no al gel, La tinción de azul comassie clásica puede detectar normalmente bandas de proteína de 50 ng, mientras que la tinción con plata incrementa este límite de sensibilidad en unas 50 veces. En el gel resultante se obtienen una serie de puntos, cada uno de los cuales es una proteína de la muestra (Lehninger, 2005).
- **Análisis de imágenes.** Antes de que los geles donde hemos separado las proteínas puedan ser analizados con un sistema de evaluación de imágenes, éstos deben ser digitalizados. Todos ellos funcionan con softwars de análisis diseñados para detectar y cuantificar “spots” en las imágenes digitales así como para comparar y analizar estadísticamente los geles de interés (Lehninger, 2005).

2.2.6.3. Identificación y caracterización de proteínas

Las proteínas pueden ser identificadas por diversos procedimientos, entre los que se incluyen la secuenciación del N-terminal, detección con anticuerpos específicos, composición de aminoácidos, co-migración con proteínas conocidas, sobre expresión y delección de genes. Todos estos métodos generalmente son lentos, laboriosos o caros, y

por lo tanto no resultan apropiados para la utilización como estrategias a gran escala (Simpson, 2003). Es por este motivo que, debido a su rapidez y elevada sensibilidad, la espectrometría de masa se ha convertido en el método de detección para la identificación de proteínas a gran escala (Alegre, 2015).

Los espectrómetros de masa están formados al menos por una fuente de iones, un analizador de masas y un detector que mide la relación masa/carga (m/z) de los iones en fase gaseosa (Alegre, 2015). Esta técnica robusta implica:

- La conversión de los péptidos en iones de fase gaseosa mediante técnicas de ionización suave, como ionización/desorción, asistida con láser en matriz (MALDI) a partir de una muestra en estado sólido, o la ionización mediante electro-spray (ESI) de una muestra en solución.
- Separación de los iones según su m/z en un analizador de masas (por ejemplo un analizador tipo T o F (time of flight), cuádruplo, trampa iónica, etc.)
- Fragmentación opcional de los iones peptídicos.
- Medida de las masas en un detector obteniendo un espectro de masas que refleja la abundancia de los iones frente a su valor m/z .

2.2.6.4. Espectrometría de masas

Mediante espectrometría de masa es posible obtener información estructural de las proteínas tal como la secuencia de aminoácidos y la masa de los péptidos. Esta información puede utilizarse para identificar proteínas comprando los resultados con diferentes bases de datos (Westermeier, 2002).

2.2.6.5. Análisis de masa

Después de la conversión de las proteínas o péptidos en iones moleculares, estos son acelerados desde la fuente de iones hacia el analizador de masa. En el analizador de masa los iones son separados de acuerdo a su relación carga-masa (m/z) en el vacío (Alegre, 2015).

2.2.6.5.1. Analizador del tiempo de vuelo (TOF)

Este es uno de los analizadores más simples. Mide la relación m/z de un ion determinado. El ion es impulsado con una velocidad inicial, la cual depende directamente de su masa. El tiempo de vuelo requerido para recorrer la longitud de un tubo desde que el ion abandona la fuente de iones, es proporcional a la raíz cuadrada de su relación m/z dada una aceleración constante provocada por el voltaje (Alegre, 2015).

$$\text{Tiempo de vuelo} = K \frac{\sqrt{m}}{z}$$

2.2.7. Análisis bioinformático en la era post-genómica

Los datos generados en un espectrómetro de masas, son visualizados en forma de picos; a la representación gráfica de los datos se le denomina espectro de masas. Cada uno de los picos de un espectro de masas, representa valores de m/z y la intensidad de cada señal (Alegre, 2015).

Alegre (2015), así mismo define que la identidad o secuencia de una proteína a partir de su espectro de masa, es un procedimiento común en estudios de proteómica. Utilizando la información contenida en las bases de datos, es posible identificar rápidamente un gran número de proteínas con gran precisión. La identificación exitosa de proteínas depende de la calidad de los datos generados en el espectrómetro de masas, de los datos contenidos en la base y del método empleado en la búsqueda de datos.

2.2.8. Software y herramientas bioinformáticas

Las tecnologías de la información y las comunicaciones son cruciales para posibilitar el almacenamiento e interpretación de estos datos en los centros de investigación de un modo eficiente y robusto (Alegre, 2015), se crean numerosas bases de datos y herramientas de análisis tanto en software como hardware.

2.2.8.1. DNASTar

DNASTar (2018) es un software que proporciona lo necesario para la información genómica y proteómica de la biología estructural, y la investigación de la biología evolutiva y está disponible con herramientas individuales para satisfacer mejor sus necesidades:

- **EditSeq:** Es una aplicación principalmente como una utilidad para importar y editar algunos formatos de archivo menos comunes. Con EditSeq, puede modificar manualmente la secuencia (DNASTar, 2018).
- **MegAlign:** Software de alineación de secuencias, tanto para secuencias de ADN y secuencias de proteínas, usando una gama de pairwise y múltiples modelos de alineación. Pantallas gráficas Rich le permiten ajustar la alineación de su acabado, así como analizar la filogenia, las diferencias de la química, estructural o funcionales (DNASTar, 2018).
- **Protean:** Ayuda a predecir patrones de visualización, composición de aminoácidos, las características estructurales secundarias y las propiedades fisicoquímicas de las secuencias de proteínas a través de su completo conjunto de herramientas de análisis de proteínas (DNASTar, 2018).

2.2.8.2. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Es una herramienta para la búsqueda de homólogos según su alineamiento básico local, donde encuentra las regiones de similitud local entre secuencias. El programa compara nucleótidos o secuencias de proteína en bases de datos y calcula la significación estadística de los partidos. (BLAST, 2018) puede utilizarse para inferir las relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, así como ayudar a identificar a los miembros de las familias de genes.

- **BLAST NCBI:** (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pertenece al centro nacional de información biotecnológica (NCBI), mediante el podemos acceder a la información biomédica y genómica (BLAST, 2018).

2.3. MARCO CONCEPTUAL

Bioinformática. Es la aplicación de tecnologías computacionales y la estadística a la gestión y análisis de datos (Lehninger, 2005).

Electroforesis bidimensional. Es una forma de electroforesis en gel comúnmente utilizada para analizar proteínas (Lehninger, 2005).

Enzima. Son moléculas proteicas que catalizan reacciones químicas (Lehninger, 2005).

Espectrometría de masa. Es una técnica de análisis que permite determinar la distribución de las moléculas de una sustancia en función de su masa (Westermeier, 2002).

Isoelectroenfoque. Habitualmente denominada electroenfoque, se emplea ampliamente en bioquímica para separar moléculas cargadas. Se trata de un tipo de electroforesis (Lehninger, 2005).

Metaloproteasas. Es una enzima que genera proteólisis (proteasas), y que en su funcionamiento es necesaria la presencia de metales como átomos de zinc o cobalto (Gutiérrez, 2002).

Proteolítica. Que descompone la proteína en aminoácidos. Las enzimas proteolíticas facilitan la digestión de las proteínas y son inhibidoras de inflamaciones (Lehninger, 2005).

Serpiente. U ofidios son un tipo de reptiles que se caracterizan principalmente por la carencia de patas. Su anatomía, caracterizada por un cuerpo alargado, está preparada para permitir un desplazamiento sin necesidad de extremidades: pueden moverse cómodamente tanto por tierra como por agua (Yarleque, 2000).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDIO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Química de Proteínas de la Universidad Católica Santa María de Arequipa, que contiene convenio con el Laboratorio Thomson de espectrometría de masas del Instituto de Química de la Universidad del estado de Campinas-SP Brasil.

3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El estudio de investigación es de tipo experimental y descriptivo.

3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

El veneno de *Bothrops andianus*, de procedencia de américa del sur, en las montañas del sur de Perú, en los departamentos de Cusco y Puno, altitudes de 1800 – 3300 msnm, fue cedido por el Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D. (Director del área de investigación de la Universidad Católica Santa María de Arequipa).

Fueron utilizados quince ratones Swiss machos (20 ± 2 g), con protocolos de experimentación establecida por el comité de ética animal.

3.4. METODOLOGÍA

3.4.1. Purificación de la metaloproteasa a partir del veneno total de *Bothrops andianus*

a) Cromatografía de intercambio iónico SP-Sephadex C-50.

Fundamento

El principio básico de la cromatografía de intercambio iónico es que las moléculas cargadas se adhieren a los intercambiadores de forma reversible de modo que dichas moléculas pueden ser asociadas o disociadas cambiando el ambiente iónico. La separación mediante intercambiadores iónicos se realiza por lo general, en dos fases: en la primera las sustancias a separar se unen al intercambiador utilizando condiciones que originan una unión fuerte y estable; a continuación, se eluye de la columna con buffers de diferentes pH o diferente fuerza iónica, compitiendo los componentes del buffer con el material por los sitios de unión (Lehninger, 2005)

Procedimiento

Se empleó 20 miligramos del veneno total de *Bothrops andianus* disueltos en 100 μ l de buffer bicarbonato de amonio 1M, los cuales se aplicaron en una columna de intercambio iónico Sulfopropil Sephadex C-50 (SP-Sephadex C-50). La columna SP-Sephadex C-50 (1.2 x 6.5 cm) previamente fue equilibrada con el tampón acetato de sodio 0.01 M pH 5.0 con un flujo de 1.2 ml/min. La elución de la muestra se realizó con una gradiente lineal discontinuo de buffer NH_4HCO_3 0.05M a 1.00M, cuyas concentraciones variaron entre 0,05 a 1 M; se colectaron fracciones de 5.0 ml en un tubo colector de fracciones (Tipo DE808, modelo

82197), a las que se les determinó actividad metaloproteasa. Las fracciones que presentaron mayor actividad fueron utilizadas para las posteriores caracterizaciones funcionales y estructurales. Las fracciones que mostraron mayor actividad proteica se utilizaron para la obtención del “pool” y fueron guardados a 0°C (Bonfim, *et al.*, 2001).

3.4.2. Caracterización bioquímica y biológica (actividad hemorrágica) de la metaloproteasa purificada de *Bothrops andianus* e identificación de su actividad biológica por ensayos de inducción hemorrágica

a) Actividad hemorrágica de las metaloproteasas

Fundamento

La actividad hemorrágica puede ser cuantificada por la determinación de la dosis mínima hemorrágica (DMH), definida como la cantidad mínima de enzima necesaria para producir un halo hemorrágico de 1 cm de diámetro en la piel del animal, como ratones o ratas, dos horas después de la inyección. El método original fue presentado por (Kondo *et al.*, 1960).

En este trabajo de investigación se modificó el método original (Ponce, 2018), para la observación de la actividad hemorrágica; como también para este trabajo de investigación se utilizaron ratas Swiss de laboratorio.

Procedimiento

Primero se realiza la aplicación intradérmica de 10 µg de las fracciones obtenidas por la cromatografía de intercambio iónico SP-Sephadex C-50, junto con el blanco el tampón fosfato salino (PBS) estéril. Los animales de aproximadamente de 25 g, fueron anestesiados, no habiendo la necesidad de

depilar el dorso. Cada animal puede recibir hasta 2 inyecciones en sitios distintos. Dos horas después de la inyección, los animales se sacrificaron y los pelos fueron removidos para determinar el diámetro del halo hemorrágico en mm (milímetros), para la documentación, lo ideal es una fotografía digital o convencional.

De manera general las metaloproteasas de venenos son clasificadas como hemorraginas fuertes, medias y débiles, como así mismo, no hemorrágicas, dependiendo de la DMH. Toxinas fuertemente hemorrágicas fueron caracterizadas por DMH menor que 1 μg , las mediamente hemorrágicas, de 1 μg a 10 μg , las débiles o no hemorrágicas, encima de 10 μg .

Cabe recalcar que se utilizó 10 μg de la fracción del veneno porque esta medida es estándar, porque si esta cantidad de 10 μg no produce una halo hemorrágico indica que no hay una actividad hemorrágica o es muy baja por parte de la enzimas; por lo contrario si es en igual o menor a esta cantidad indica que si produce una actividad hemorrágica (Ponce, 2018). Vale la pena resaltar que la actividad hemorrágica se desenvuelve de forma extremadamente rápida y, dependiendo de la enzima, acontece algunos minutos después de su administración. Este procedimiento se realizó en triplicada.

Variables analizadas

La producción de la actividad hemorrágica se observó en la inyección intradérmica de los diferentes picos en tres ratones Swiss (R1, R2 y R3) y lo que se comprobó es que pico produce igual o diferente media del halo hemorrágico.

- $H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$. (La medida del halo hemorrágico producido por el pico 1, pico 2, pico 3 y veneno total es igual en los tres ratones Swiss). (Hipótesis del trabajo).

- $H_1 \neq \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$. (La medida del halo hemorrágico producido por el pico 1, pico 2, pico 3 y veneno total es deferente en los tres ratones Swiss). (Hipótesis del investigador).

Aplicación bioestadística

Los resultados fueron expresados por el promedio y el \pm error estándar. ANOVA seguido por la prueba no pareado t-student. El análisis estadístico se realizó utilizando las funciones estadísticas del programa Origin Pro SR2 versión 8.0891 (OriginLab Corporation, MA, USA). El valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

b) Actividad catalítica (método TAME)

Fundamento

La determinación de la actividad metaloproteasa se realizó según el método descrito por (Erlanger *et al*, 1960) utilizando como sustrato $N\alpha$ -p-Tyrosil-L-Arginina metil éster (TAME).

Procedimiento

Primero en un tubo de ensayo se colocó 1 ml de TAME con 20 μ l de las fracciones obtenidas de la cromatografía, estas se incuban por 20 minutos a una temperatura de 37°C y agregando luego 0.5 ml de ácido acético al 30%. Posteriormente se mide la absorbancia a 425 nm (Fotómetro semiautomático STAT FAX 3300, USA). Se calculó la actividad catalítica de la enzima en nanomoles de p-nitroanilina liberada por minuto por miligramo de proteína. Cabe recalcar que este método es cromogénico, se puede observar en muestra positivas

un color amarillo pálido, en cambio las muestra negativas son transparentes. Este procedimiento se realizó en triplicada.

Variables analizadas

La producción de la actividad catalítica se observó en tres lecturas (L1, L2 y L3) y lo que se comprobó es que pico produce igual o diferente resultado.

- $H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$. (La lectura de la actividad catalítica es igual en los pico 1, pico 2, pico 3 y veneno total). (Hipótesis del trabajo).
- $H_1 \neq \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$. (La lectura de la actividad catalítica es diferente en los pico 1, pico 2, pico 3 y veneno total). (Hipótesis del investigador).

Aplicación bioestadística

Los resultados fueron expresados por el promedio y el \pm error estándar. ANOVA seguido por la prueba no pareado t-student, utilizado para la comparación estadística de los datos (análisis de importancia). El análisis estadístico se realizó utilizando las funciones estadísticas del programa Origin Pro SR2 versión 8.0891 (OriginLab Corporation, MA, USA). El valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

3.4.3. Identificación de su relación masa y punto isoelectrico por electroforesis bidimensional (2D) y secuenciación de las metaloproteasas, por espectrometría de masa MALDI TOF/TOF y electrospray

a) Electroforesis bidimensionales (2D) (Lehninger, 2005)

Fundamento

La electroforesis es un método de separación de moléculas biológicas que se basa en la migración de las mismas según su carga en un campo eléctrico. Luego se desarrolló la electroforesis bidimensional, que es una combinación secuencial del enfoque isoelectrico y la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

Procedimiento

Para la primera dimensión se utilizaron tiras de gradiente de pH IpG de (General Electric, USA), con un rango de pH distribuido linealmente entre 3 y 10, de siete centímetros de longitud. El protocolo para el uso de estas tiras comprende tres pasos:

- Rehidratación: 18 horas en una solución buffer DeStreak™ (Azure Biosystems) que contiene: urea, tiourea, CHAPS y 1% de anfolitos con rango lineal de pH 3 a 10; en esta solución se disolvieron los extractos proteicos de los endospermos. En cada caso se colocó un volumen de extracto que correspondía aproximadamente a 15 µg de proteínas.
- Equilibración: dos incubaciones de 15 minutos cada una con ditiotreitól al 1% en buffer de equilibrio (úrea, Tris-HCl, glicerol, SDS y azul de

bromofenol) y otra con una solución de iodoacetamida al 4% en buffer de equilibrio.

- Enfoque: Finalmente las tiras se colocaron en una cámara de isoelectroenfoque utilizando el equipo Ettan IPGphor (GE Health Care Amersham Biosciences) y las especificaciones del fabricante.

Para la segunda dimensión, las tiras fueron acopladas a geles de poliacrilamida al 12% y de 1 mm de espesor (según indicaciones antes mencionadas) con agarosa 0,5% y se realizará la electroforesis (Thermo scientific, USA). Utilizando buffer Tris-glycine-SDS a 200V. Los spots de proteínas fueron visualizados con tinción de Coomassie Brilliant Blue.

Análisis de imágenes

Una vez teñidos los geles, se llevó a cabo un análisis comparativo de los mismos, para ello se fotografiaron con un equipo Perkin Elmer (Waltham MA, Estados Unidos). Las imágenes digitales obtenidas fueron analizadas empleando el programa Phoretix 2D versión 2004. Este programa, mediante la comparación de imágenes digitales de los diversos geles, permitió analizar los geles de electroforesis bidimensionales de los granos y determinar la presencia de manchas o spots comunes. Estos criterios permitieron ubicar las zonas de las imágenes de los geles donde se ubicaron las proteínas de interés, el resultado del inmuno-ensayo también fue digitalizado e introducido como referencia en el análisis de los geles, y se utilizaron valores teóricos de punto isoelectrico y masa molecular para calibrar todo el experimento.

b) Caracterización de la proteína por espectrometría de masa MALDI TOF/TOF (Westermeier, 2002)

Fundamento

Mediante espectrometría de masa es posible obtener información estructural de las proteínas tal como la secuencia de aminoácidos y la masa de los péptidos. Esta información puede utilizarse para identificar proteínas comprando los resultados con diferentes bases de datos. La caracterización molecular de una de las metaloproteasas en *Bothrops andianus* estuvo basado en protocolos establecidos para estudios de aproximación Proteómica.

Procedimiento

Las fracciones de péptidos obtenidos, fueron mezcladas con solución matriz (10 mg/ml de α CHCA (ácido alfa -cyano-4-hidroxycinnamico) disueltos en 30% de acetonitrilo con 0.01% de ácido acético) en una proporción de 1/1 (v/v). Se depositó 1 μ l de la mezcla en los pozos de la muestra de la placa MALDI (OptiPlate-384 well Micropalte, ABsciex, USA). Después de evaporarse el solvente de la mezcla se observaron los cristales formados de péptidos/matriz. Posteriormente la placa MALDI ingreso al analizador 4800 MALDI TOF/TOF (ABsciex, USA), con los parámetros optimizados del equipo. Se empleó el modo de operación reflectron para la detección de masa de los diferentes péptidos, obteniendo un espectro de masa de la filtración. Posteriormente se realizó un análisis de fragmentación de péptidos denominado decaimiento post fuente, para ello se seleccionó los péptidos de mayor abundancia y se determinó las masas de todos sus fragmentados generados. Esta información espectral fue luego analizada por paquetes bioinformáticos con la finalidad de obtener la secuencia

de aminoácidos de los péptidos encontrados así como la identificación de las proteínas presentes en las metaloproteasas de *Bothrops andianus*.

3.4.4. Realización de un análisis bioinformático de las secuencias encontradas en el contexto de la bioprospección como agente terapéutico

a) Estudio de homología y secuenciamiento secuencial de la región N-terminal de la metaloproteasa

Fundamento

La búsqueda de homólogos se realizó en la base de UniProtKB/Swiss-Prot (Swissprot) un banco de datos exclusivo de proteínas del NCBI, (centro nacional de información biotecnológica), donde se analizó las secuencias, mediante el BLAST Estándar Protein (Basic Local Alignment Search Tool – herramienta de búsqueda según alineamiento básico local para proteínas según su secuencia de aminoácidos presentes (BLAST, 2018).

Procedimiento

De las proteínas homologas encontradas se escogieron los que presentaron mayor porcentaje de identidad y así poder ser alineadas, en base a las secuencias obtenidas anteriormente, haciendo uso del software DNASTar (Software que proporciona información genómica y Proteómica). con las herramientas EditSeq (importa y edita secuencias). MegAlin (alineamiento múltiple de secuencias). Protean (herramienta de análisis de proteínas). Como también se introdujo al BLAST (herramienta para la búsqueda de homólogos de alineamiento).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PURIFICACIÓN DE LAS METALOPROTEASAS A PARTIR DEL VENENO TOTAL DE *Bothrops andianus*

4.1.1. Cromatografía de intercambio iónico en SP-SEPHADEX C-50

Del veneno total de *Bothrops andianus*, 200 mg fue aplicado en la columna de intercambio iónico catiónico sulfo propil sephadex C-50. El perfil de elusión fue monitoreado a 280 nm y reveló la presencia de 3 picos (Figura 4).

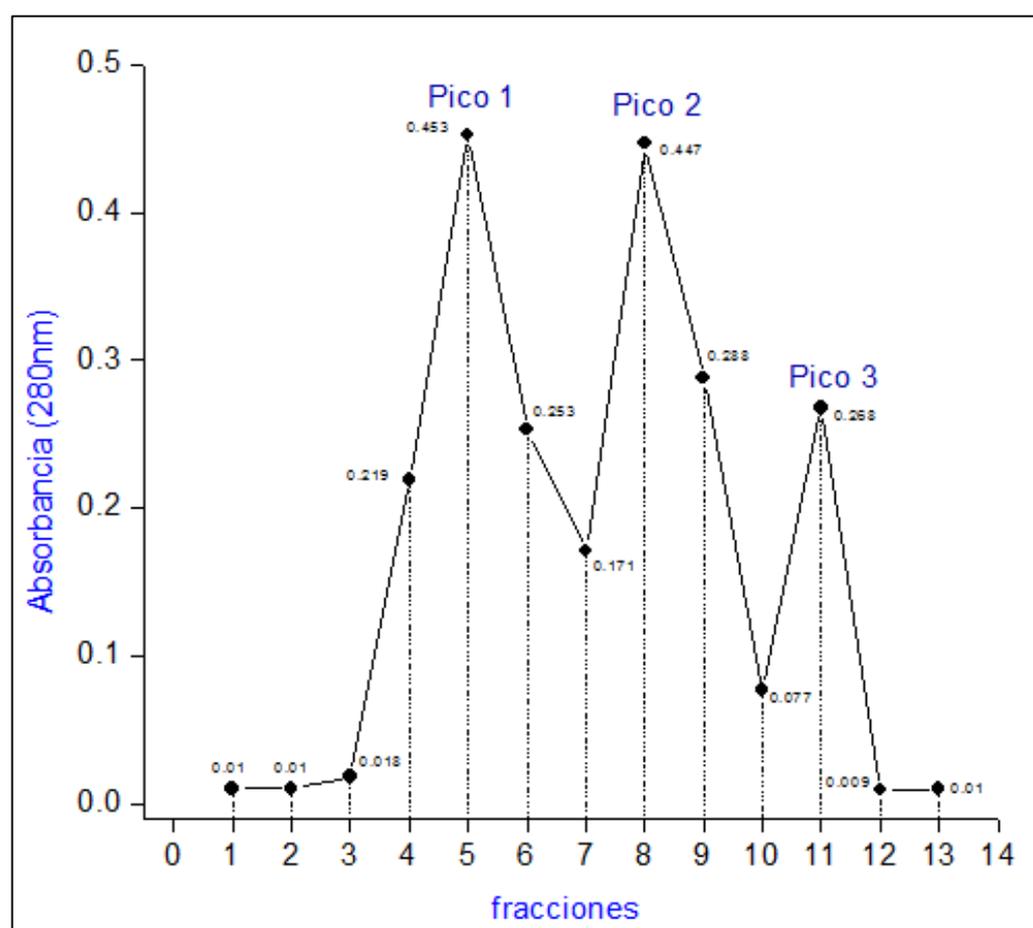


Figura 4: Cromatografía de intercambio iónico en SP-Sephadex C-50, del veneno total de *Bothrops andianus*, monitoreado a 280 nm. Laboratorio Thomson de espectrometría de masas del Instituto de Química UNICAMP - São Paulo, Brasil (junio - septiembre 2018).

En el trabajo de investigación se utilizó la cromatografía de intercambio iónico SP Sephadex C-50 para poder purificar el veneno total de *Bothrops andianus*, el cual mostró 3 picos (pico 1: fracciones del 4 al 6) (Pico 2: fracciones del 7 al 9) y (Pico 3: fracciones de 10 al 13) las proteínas que poseía el veneno. La actividad proteínica se detectó en las fracciones 4 al 12.

La actividad proteínica más alta se observó en las fracciones 5, 8 y 11, los cuales presentaron una absorbancia de 0.453, 0.447 y 0.268 leídas a 280 nm respectivamente, los cuales dieron indicios que podría ser una enzima metaloproteasa. Las fracciones 1, 2, 3 y 13 mostraron una mínima cantidad de proteínas. (De Moráis *et al*, 2012) de igual manera utilizó la cromatografía de intercambio iónico en una columna DEAE-Sephacel para obtener una metaloproteasa del veneno crudo de *Bothrops moojeni*, el cual produjo 8 picos de proteínas principales denominados D1 a D8. De estas la fracción D7 tuvo una actividad enzimática fibrinogenolítica, al cual le denominó metaloproteasa moojenina.

Fueron varios investigadores los cuales utilizaron la cromatografía de sus diferentes formas para poder obtener proteínas, aminoácidos etc., como (Girón *et al*, 2013) que utilizó la cromatografía RP-HPLC para el aislamiento de una metaloproteasa no hemorrágica (Colombienase 1-2) en el veneno de *Bothrops colombiensis*. Además, existe otras formas de purificación de enzimas metaloproteasas (Ferreira *et al*, 2009) utilizo la difracción de rayos X en la obtención de una metaloproteasa no hemorrágica denominada leucurolysin-a (Leuc-a).

4.2. ACTIVIDAD HEMORRÁGICA DE LA METALOPROTEASA PURIFICADA DE *Bothrops andianus* E Identificación De Su Actividad Catalítica Por Ensayos De Inducción Hemorrágica

4.2.1. Actividad hemorrágica de las metaloproteasas

Se observó la presencia hemorrágica en todos los picos obtenidos, excepto en el cual se aplicó la solución blanco (FBS). Siendo el pico 2 el cual dio un halo de hemorragia grande (véase, anexo A) el cual sirvió para la evaluación y comprobación sobre su actividad catalítica (Figura 5).

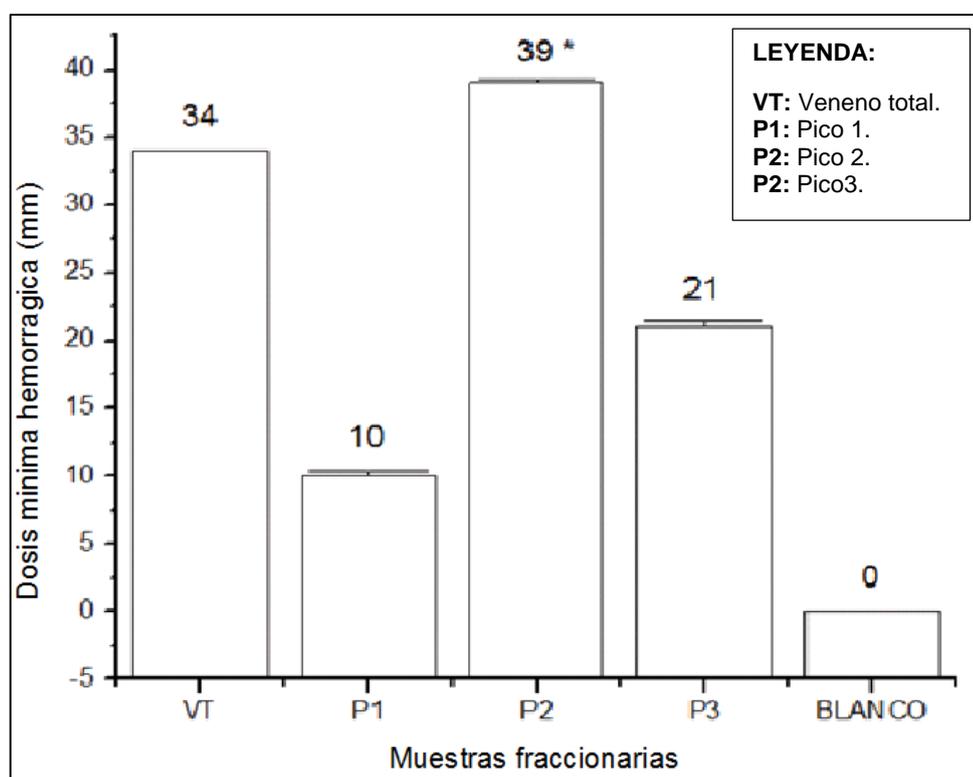


Figura 5: Medida de la actividad hemorrágica de la metaloproteasa de veneno total de *Bothrops andianus*, a través del método de Kondo modificado. El pico 2 fue el que exhibió la mayor actividad hemorrágica con un DMH (dosis mínima hemorrágica) de 39 mm. Los valores fueron expresados por la media y \pm SEM (error estándar) ($n = 3$). * Diferencia significativa ($p < 0,05$). Laboratorio de Química de Proteínas UCSM – Arequipa (junio - septiembre 2018).

Este examen permitió observar la actividad hemorrágica que produce las metaloproteasas. El pico 1 mostro un halo de hemorragia de 10 mm, el pico 2 de 39 mm siendo el más elevado y el pico 3 presento un halo hemorrágico de 21 mm y el veneno total presento un halo de 34 mm. (Kondo *et al*, 1960) nos indica que las metaloproteasas de venenos de serpientes pueden ser clasificadas como hemorraginas fuertes, medias y débiles, como así mismo no hemorrágicas dependiendo de la DMH. Las metaloproteasas fuertemente hemorrágicas son caracterizadas por DMH menor que 1µg, las mediamente hemorrágicas de 1 µg a 10 µg, las débiles o no hemorrágicas encima de 10 µg. En la investigación se modificó este método solo para observar si nuestras proteínas obtenidas de la cromatografía presentan actividad hemorrágica o no presentan actividad hemorrágica. Los resultados obtenidos dieron como positivo (presenta actividad hemorrágica), ya que los 3 picos produjeron hemorragia intradérmicamente en los ratones Swiss. Este resultado con llevo afirmar que el veneno de *Bothrops andianus* presenta efectivamente metaloproteasa pero lamentablemente esta es hemorrágica y no se podrían usar en un tratamiento antitrombótico a pesar que esta tenga una actividad catalítica en coágulos, membranas celulares.

Bellido *et al.* (2006), indica que todas las metaloproteasa hemorrágicas presentes en venenos de serpientes presentan una DMH fuerte, como en su caso aisló una metaloproteasa de *Bothrops pictus* hemorrágica la cual presento un DMH de 0,226 µg. Todas las metaloproteasas no hemorrágicas descubiertas por investigadores como (Silva *et al.*, 2012) descubriendo la BJ-PI2, (Girón *et al.*, 2013) descubriendo las Colombienase-1 y Colombienase-2, (Ferreira, *et al.*, 2009) descubriendo la Leuc-a, (Hou *et al.*, 2005) descubriendo la metaloproteasa olítica fibrina (ogen).

4.2.2. Determinación de la actividad catalítica de la metaloproteasa (método TAME)

La determinación de la actividad metaloproteasa fue realizada según el método descrito por Erlanger, utilizando como sustrato $N\alpha$ -p-Tirosil-L-Arginina metil éster (TAME). La medida de la actividad metaloproteasa para el veneno total de *Bothrops andianus* es de $3,65 \text{ nmoles/min.} \pm 0,05$ Para el caso del pico 1 es: $1.63 \text{ nmoles/min.} \pm 0,356$ pico 2 es: $17.65 \pm 0.201 \text{ nmoles/min}$ y el pico 3 es: $1.26 \pm 0.51 \text{ nmoles/min}$ (Figura 6).

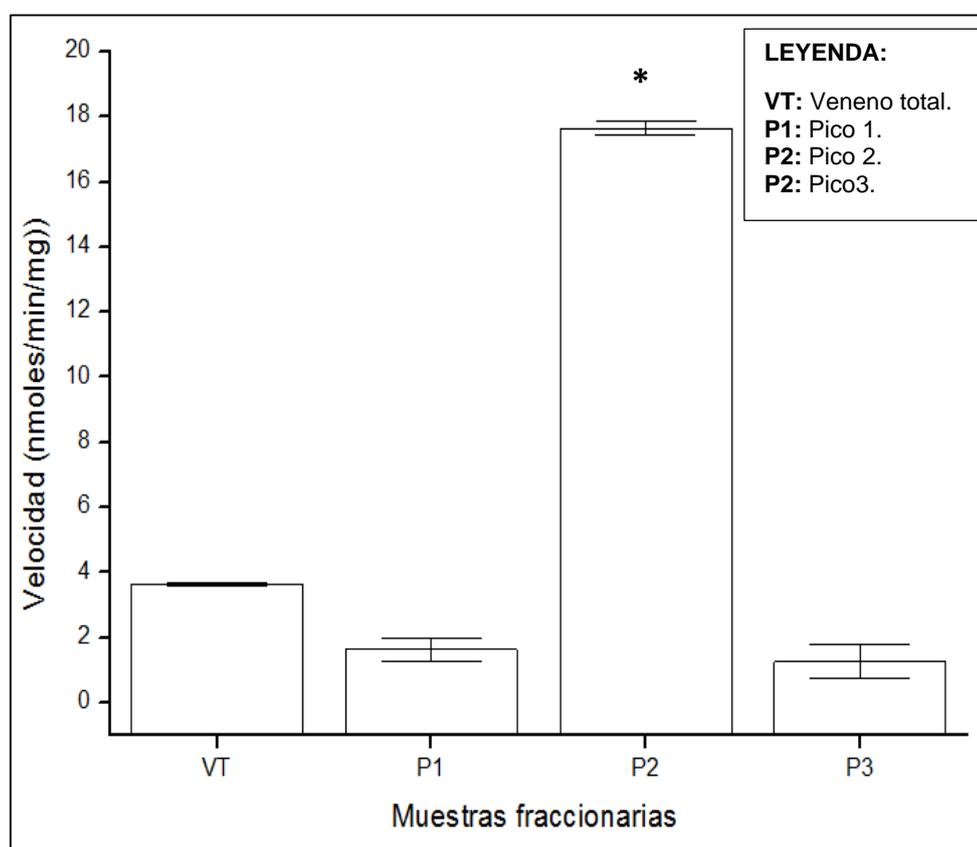


Figura 6: Medida de la actividad catalítica de la metaloproteasa de veneno total de *Bothrops andianus*. El pico 2 fue el que exhibió la mayor actividad catalítica de la metaloproteasa frente al sustrato $N\alpha$ -p-Tirosil-L-Arginina metil éster (TAME). Los valores fueron expresados por la media y \pm SEM (error estándar) ($n = 3$). * Diferencia significativa ($p < 0,05$). Laboratorio de Química de Proteínas UCSM – Arequipa (junio - septiembre 2018).

La medida de la actividad proteolítica de la metaloproteasa para el veneno total de *Bothrops andianus* fue de: 3,65 nmoles/min. Para el pico 1 fue de: 1.63 nmoles/min, el pico 2 fue de: 17.65 nmoles/min y el pico 3 fue de: 1.26 nmoles/min. Estos resultados confirman junto con la actividad hemorrágica la presencia de una metaloproteasa en el veneno de *B. andianus*. El pico 2 mostró un alto valor proteolítico (17.65 nmoles/min) el cual da entender que esta metaloproteasa tiene una fuerte actividad catalítica el cual sería óptimo para uso antitrombótico, pero lamentablemente esta metaloproteasa es hemorrágica (confirmada con el método de Kondo modificado).

Cominetti (2007), indica que la comparación de las actividades proteolíticas de otros venenos y toxinas de diferentes especies de serpientes obtenidas por estos sustratos no pueden ser comparadas debido a las unidades de la actividad proteolítica, como también de los diferentes longitudes de onda leídos por estos. (Torres, 2013) identificó una metaloproteasa BtaHF que no posee una actividad catalítica ya que no poseía una actividad sobre el sustrato BApNA. La inactividad de la metaloproteasa BtaHF sobre el sustrato BApNA es consistente con el comportamiento de otras metaloproteasas de las clases P-I y P-III (Torres-Huaco *et al.*, 2010). Estos resultados obtenidos indican que hay la presencia de metaloproteasas no catalíticas.

Bellido (2014), en comparación con las demás metaloproteasas con actividad proteolítica indica que la mayoría de las metaloproteasas hemorrágicas cumplen una función catalítica y que son pocas metaloproteasas hemorrágicas como no hemorrágicas las cuales carecen de esta actividad.

De Queiroz *et al.* (2014), en comparación con nuestro estudio, obtuvo casi los mismos resultados, halló una metaloproteasa de clases P-I del veneno de *B. moojeni* la BmooMP α -II la cual poseía una actividad antiplaquetaria, pero BmooMP α -II producía

hemorragia. Cabe indicar que para hacer que estas metaloproteasas con fuerte acción catalítica capaces de eliminar coágulos, pero que tienen una actividad hemorrágica es necesario más investigación para la conversión, transformación o pérdida de la actividad hemorrágica, el cual con lleva a seguir investigando.

4.3. RELACIÓN MASA Y PUNTO ISOELÉCTRICO POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2D) Y SECUENCIACIÓN LAS METALOPROTEASAS, POR ESPECTROMETRÍA DE MASA MALDI TOF/TOF Y ELECTROSPRAY

4.3.1. Electroforesis bidimensionales (2D) y análisis de imágenes

El perfil del peso molecular y el punto isoeléctrico, de la fracción del pico 2 denominada Ba-MP (metaloproteasa de *Bothrops andianus*) aislada a partir del veneno total de *Bothrops andianus*, donde la fracción Ba-MP presenta una masa molecular de 33 KDa y un punto isoeléctrico de 7.1 (Figura 7).

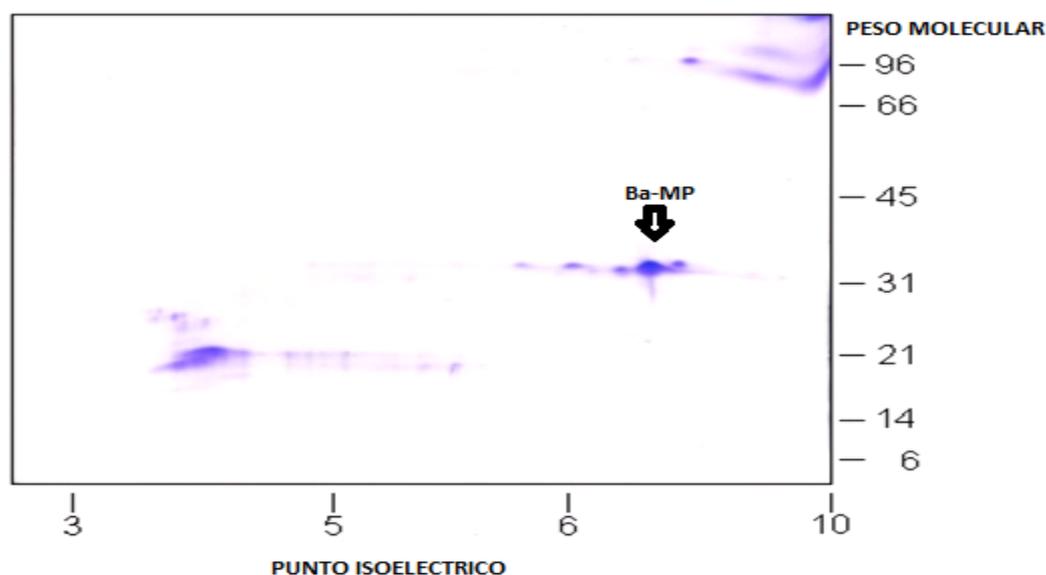


Figura 7: Electroforesis bidimensional (2D). Ba-MP aislada a partir de *Bothrops andianus* muestra el peso molecular de 33 KDa en relación con el punto isoeléctrico de 7.1, coloreado con comassie blue. Laboratorio Thomson de espectrometría de masas del Instituto de Química UNICAMP - São Paulo, Brasil (junio - septiembre 2018).

Ba-MP presentó una masa molecular de 33 KDa con un punto isoeléctrico de 7.1. Las metaloproteasas de los venenos de serpiente se dividen en 3 clases (Markland y Swensen, 2013), PI, PII y PIII la característica notable de esta clasificación se basa en su tamaño (peso molecular) y las diferencias en su estructura del dominio: la clase I (P-I) son pequeñas SVMP, tienen masas moleculares de 20 – 30 KDa, clase II (P-II), las SVMP de tamaño medio, presenta masas moleculares de 30 – 60 KDa, clase III (P-III), las SVMP grandes, tienen masas moleculares de 60 – 100 KDa (Moura *et al.*, 2011).

De acuerdo a esta clasificación nuestra metaloproteasa descubierta de *Bothrops andianus* denominada Ba-MP se clasifica en la clase II (P-II) siendo de tamaño medio. En comparación con la metaloproteasa hemorrágica BmooMP α -II (De Queiroz *et al.*, 2014) la cual está en la clase P-I, como también con la jararhagina (Kamiguti *et al.*, 1996) otra metaloproteasa hemorrágica de 52KDa perteneciente a la clase P-III y nuestra metaloproteasa (Ba-MP) perteneciente a la clase P-II, da entender que las metaloproteasas hemorrágicas pueden pertenecer a las diferentes clases de SVMP.

La Ba-MP en comparación con la BJ-PI2 (Da silva *et al.*, 2012) una metaloproteasa no hemorrágica con un peso molecular de 23.08 KDa, perteneciente a la clase P-I. Junto con las Colombienase-1 (23 KDa aprox.) y Colombienase-2 (23 KDa aprox.) (Girón, *et al.*, 2013) metaloproteasas no hemorrágicas y pertenecientes a la clase P-I y la Leuc-a metaloproteasa no hemorrágica (Ferreira *et al.*, 2009) de clase P-I. Estas metaloproteasas no hemorrágicas hacen suponer que solamente están presentes en la clase P-I, teniendo una masa molecular pequeña de 20 – 30 KDa.

El punto isoeléctrico de la Ba-MP (7.1) es el valor de pH en el cual su carga neta es cero, por lo tanto, su movilidad electroforética es nula. (Torres, 2013) indica que el 99% de la metaloproteasas tanto hemorrágicas como no hemorrágicas presentan un PI de

6 - 7, confirmando de esta manera que la proteína de 33 KDa denominada Ba-MP es una metaloproteasa.

4.3.2. Caracterización de la metaloproteasa Ba-MP por espectrometría de masa (MALDI TOF/TOF)

Se muestra el espectro de masa de los péptidos hidrolizados correspondientes al pico 2 que mostró la cromatografía de intercambio iónico en SP- Sephadex C-50, y contrastado con la electroforesis bidimensional. Esta espectrometría de masa muestra la relación masa/carga (m/z) presentes en Ba-MP, mostrando un pico que presenta una resolución aceptable de los espectros reflectron para el análisis de masa. Los espectros correspondientes nos muestran la fracción N-terminal de Ba-MP que denota la secuencia de 16 aminoácidos los cuales fueron (QNLQPQRYIQLVVDH) respectivamente (Figura 8).

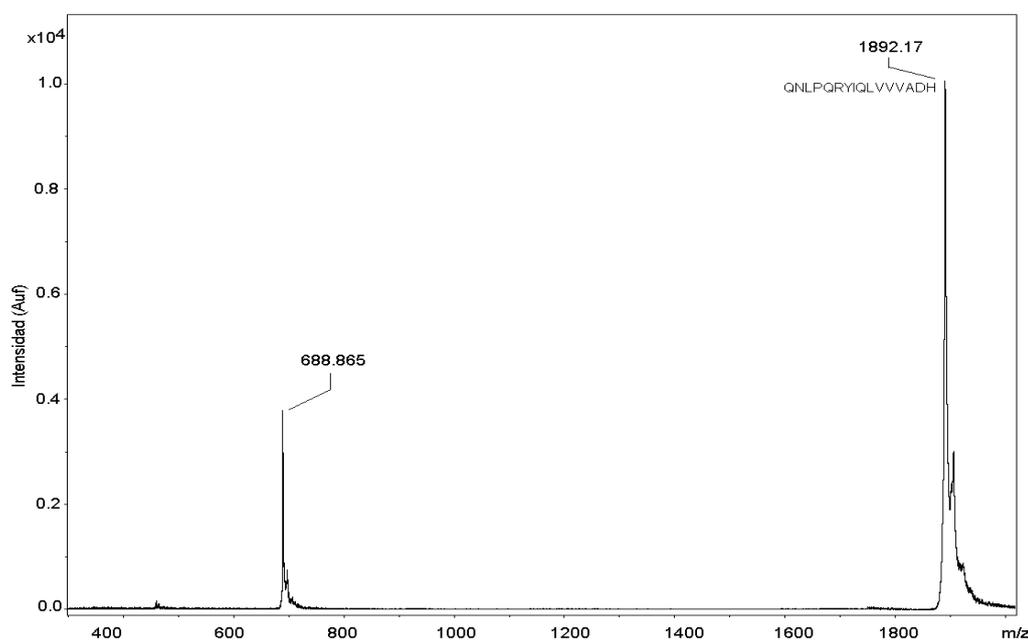


Figura 8: Espectro de masa (MS) reflectron de la región N-terminal de la metaloproteasa Ba-MP obtenida a partir del veneno de *Bothrops andianus*. Laboratorio Thomson de espectrometría de masas del Instituto de Química UNICAMP - São Paulo, Brasil (junio - septiembre 2018).

Los resultados obtenidos de la espectrometría de masa de los péptidos hidrolizados correspondiente a la metaloproteasa Ba-MP del veneno de *Bothrops andianus* de 33 KDa, cada señal de péptido observado se encuentra en rangos de valores de resolución que van desde 400 a 2000 m/z. nuestro péptido obtenido dio una señal en m/z 1892.17 de peso molecular, el cual fue el pico que presento una resolución aceptable, el espectro correspondiente obtenido da la secuencia N-terminal de 16 aminoácidos de Ba-MP los cuales fueron (QNLPQRYIQLVVDH) respectivamente.

Esta obtención de 16 residuos de aminoácidos por parte de la espectrometría de masa es de vital importancia ya que con ella podemos obtener mediante la homología (BLAST, 2018) del secuenciamiento completo de dicha enzima. De igual manera servirá para hacer comparación con las diferentes metaloproteasas, las cuales tengan una homología cercana al 100%.

Es importante conocer la región N-terminal ya que gracias a esta región los investigadores pueden identificar con unos pocos residuos la secuencia completa de una proteína (Ferreira *et al.*, 2009). Por esta razón todas las investigaciones en cuanto a la identificación de una proteína se basan a la obtención de la región N-terminal.

Torres (2013), indica que los resultados obtenidos de la masa molecular relativa de su electroforesis 25 KDa de la metaloproteasa BtaHF junto con la masa molecular obtenida a partir de la espectrometría de masa 25968,1621 Da tienen que ser aproximadamente el 99,99% iguales, el cual confirmaría la verdadera masa molecular de la metaloproteasa.

En nuestra investigación, la metaloproteasa Ba-MP tuvo una masa molecular relativa de 33 KDa, (Figura 7) en la electroforesis bidimensional, siendo esta la masa molecular de toda la enzima. En comparación con la obtenida de la espectrometría de

masa el cual fue de 1892.17 de peso molecular, estos resultados no debe con llevar a una confusión ya que esta última solo viene hacer el peso molecular de los 16 aminoácidos de la fracción N-terminal de Ba-MP.

4.4. REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS ENCONTRADAS EN EL CONTEXTO DE LA BIOPROSPECCIÓN COMO AGENTE TERAPÉUTICO

4.4.1. Secuencia de la región N-terminal de la fracción Ba-MP de *Bothrops andianus* y estudio de homología secuencial

La proteína Ba-MP después de ser secuenciada en su región N-terminal hasta el residuo 16, revela una alta homología secuencial al ser comparadas con otras metaloproteasas homólogas, como HT-D (atrolisina D), HT-B (atrolisina B), HT-C (atrolisina-C), BmHP-1 (metaloproteasa de veneno de serpiente HF-1) , adamalysin II y la metaloproteasa no hemorrágica atroxase, conforme a lo ilustrado en la figura 9.

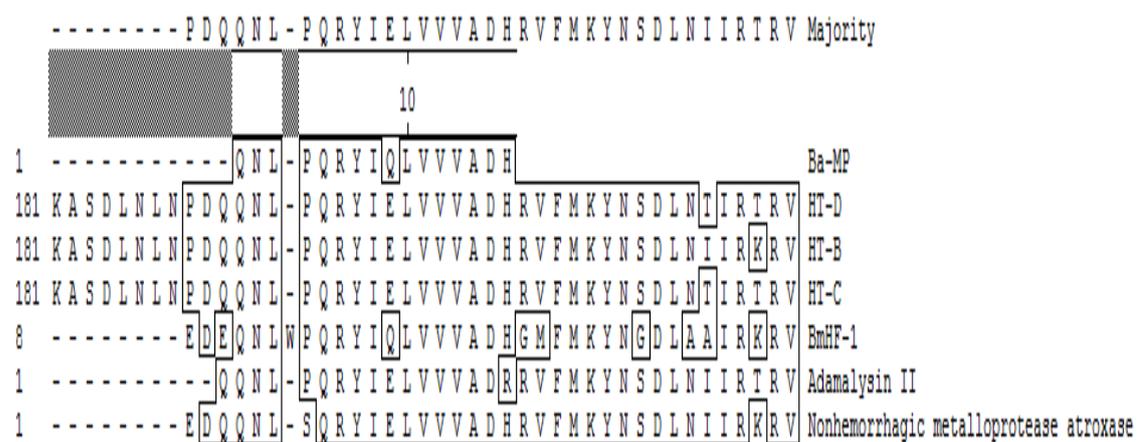


Figura 9: Estudio comparativo de homología secuencial de la región N-terminal de la fracción metaloproteasa Ba-MP de *Bothrops andianus* con otras proteínas homólogas provenientes de venenos de serpientes. Laboratorio de Química de Proteínas UCSM – Arequipa (junio - septiembre 2018).

Ba-MP se sometió a la secuenciación N-terminal. Los primeros 16 residuos de aminoácidos de la secuencia N-terminal (QNLPQRYIQLVVADH) se enviaron al BLAST. La secuencia Ba-MP compartió un alto grado de identidad con otras metaloproteasas hemorrágicas como HT-D, HT-B, HT-C, BmHF-1, adamalysin II y la metaloproteasa no hemorrágica atroxase. Generalmente se hace la comparación con los primeros 5 resultados que tengan mayor homología (BLAST, 2018), pero en nuestro trabajo de investigación se acoplo una metaloproteasa mas (metaloproteasa no hemorrágica atroxasa).

La mayor homología encontrada de Ba-MP con otras metaloproteasas fue con las atrolisinas D, B, C (Banco de proteínas NCBI BLAST, 2018). La atrolisina D y C son casi idénticas solo se diferencian en 1 aminoácido, la HT-D (alanina) y HT-C (aspartato). Tanto la HT-D, HT-B y HT-C son metaloproteasas hemorrágicas, la HT-D y HT-C causan hemorragia al provocar la degradación de las proteínas subendoteliales, en cambio la HT-B altera la hemostasia. Las 3 atrolisinas encontradas todas en *Crotalus atrox* tienen como cofactor al Zn^{2+} y tienen la misma longitud de 414 aminoácidos y con una masa molecular casi idéntica (HT-D: 46,845 Da; HT-B: 46,845 Da y HT-C: 46,769 Da), en comparación con nuestra metaloproteasa Ba-MP de 33 KDa y de acuerdo a la homología presentada, nuestra Ba-MP posee un aminoácido diferentes a las demás metaloproteasas el cual lo hace diferente, la glutamina. Podríamos deducir que la Ba-MP tiene aproximadamente 414 aminoácidos en toda su estructura por la homología alta presentada con las atrolisinas y tiene un mismo cofactor al Zn^{2+} . La homología secuencial con las atrolisinas D, B y C y la Ba-MP comienza en el aminoácido 181 de las atrolisinas, diferenciándolos la glutamina presente en Ba-MP y la treonina y lisina en las atrolisinas.

BmHF-1 es una metaloproteasa que tiene una hemorragia débil (Banco de proteínas NCBI BLAST, 2018) y tiene actividad fibrinogenolíticas α y β . Aislada y purificada de *Bothrops marajoensis*, teniendo como las atrolisinas al cofactor Zn^{2+} , tiene 238 aminoácidos en toda su estructura, con una masa de 27,2966 Da. La homología con nuestra Ba-MP comienza en el aminoácido 8, diferenciándose entre las 2 la presencia exclusiva en BmHF-1 del triptófano, al igual que nuestra Ba-MP presenta de la misma forma a la glutamina.

Adamalysin-2 Banco de proteínas NCBI BLAST (2018), es una metaloproteasa el cual no tiene actividad hemorrágica significativa, aislada de *Crotalus adamanteus*, tiene como cofactor al Zn^{2+} con 203 aminoácidos y con 23,079 Da. Su homología en comparación con Ba-MP comienza en el aminoácido 1, diferenciándose esta por la presencia de arginina.

La metaloproteasa no hemorrágica atroxasa, obtenida de *Crotalus atrox*, con una longitud de 203 aminoácidos al igual que la adamalysin 2, y con 23,204 Da de masa molecular (Banco de proteínas NCBI BLAST, 2018), es una metaloproteasa no hemorrágica pero que no induce ni inhibe la agregación plaquetaria y no puede activar al plasminogeno. La homología con Ba-MP comienza en el aminoácido 1, pero esta metaloproteasa no hemorrágica presenta en su estructura a la serina lo cual lo diferencia de Ba-MP.

Todas las metaloproteasas homologadas y no homologadas con la Ba-MP presentan en el aminoácido 10 de nuestra secuencia de 16 aminoácidos una leucina, siendo este aminoácido el único el cual podemos encontrar en todas las estructuras de las metaloproteasas hemorrágicas como no hemorrágicas.

4.4.2. Niveles porcentuales de homología y divergencia de Ba-MP con las otras metaloproteasas homologas

La homología (porcentual) de la fracción N-terminal de Ba-MP en relación con otras metaloproteasas de venenos de serpientes se observa en la Tabla 2. El cual da una relación de una identidad porcentual en relación con la divergencia entre las proteínas homologas obtenidas gracias a la plataforma bioinformática, observase que tanto la metaloproteasa HT-D, HT-B, HT-C presentan una homología porcentual de 93.8% en relación con Ba-MP. En cambio la BmHF-1 presenta una homología de 81.5%, adamalysin II y metaloproteasa no hemorrágica atroxase presenta una homología de 87.5%.

Tabla 2: Identidad porcentual en relación con la divergencia de Ba-MP con las otras metaloproteasas homologas. Laboratorio de Química de Proteínas UCSM – Arequipa (junio - septiembre 2018).

		Percent Identity								
		1	2	3	4	5	6	7		
Divergence	1	■	93.8	93.8	93.8	81.3	87.5	87.5	1	Ba-MP
	2	6.5	■	88.9	99.3	58.8	79.8	73.9	2	HT-D
	3	6.5	12.1	■	88.2	68.9	82.3	94.6	3	HT-B
	4	6.5	0.7	12.9	■	58.4	79.3	73.4	4	HT-C
	5	0.0	48.4	30.3	49.2	■	68.0	75.4	5	BmHF-1
	6	13.7	23.6	20.3	24.3	36.7	■	76.8	6	Adamalysin II
	7	13.7	29.9	4.1	30.6	19.6	24.6	■	7	Nonhemorrhagic metalloprotease atroxase
		1	2	3	4	5	6	7		

Ba-MP presenta una homología del 93.8% con las metaloproteasas hemorrágicas denominadas atrolisinas (HT-D, HT-B y HT-C) (Banco de proteínas NCBI BLAST, 2018); esta homología dada entre la Ba-MP con las 3 atrolisinas muestra y corrobora que nuestra metaloproteasa es hemorragia, así descartando su uso como un agente antitrombótico. La divergencia podríamos entenderlo como el alejamiento, diferencia

que se da entre las metaloproteasas. Las 3 atrolisinas tienen una divergencia de 6.5% con respecto a Ba-MP. Esta diferencia es mínima y muy aceptable por la comunidad científica.

La BmHF-1 (hemorragina débil) Banco de proteínas NCBI BLAST (2018), presenta una homología de 81.3% respecto a la Ba-MP, siendo esta homología la más menor encontrada con respecto a las otras 5 metaloproteasas, pero su divergencia es de 0.0%. Esta divergencia nula da entender que tanto la Ba-MP como BmHF-1 tienen propiedades casi idénticas.

La adamalysin-2 (metaloproteasa que no presenta actividad hemorrágica significativa), junto con la atroxasa (metaloproteasa no hemorrágica) Banco de proteínas NCBI BLAST (2018), presentan una homología igual del 87.5% con respecto a la Ba-MP. En comparación con la BmHF-1, que no presentaba divergencia con Ba-MP, la adamalysin-2 y la atroxasa presentan la más grande divergencia con un 13.7% respecto a Ba-MP. La diferencia entre la Ba-MP (metaloproteasa hemorrágica) con una metaloproteasa no hemorrágica pero con una homología alta (87.5%) de 13.7%.

4.4.3. Árbol filogenético de Ba-MP en relación con las homologías secuenciales de HT-D, HT-B, HT-C, BmHF-1, adamalysin-2 y la metaloproteasa no hemorrágica atroxasa

En la figura 10, se muestra la filogenia molecular, representada en un árbol filogenético de las secuencias homologas (HT-D, HT-B, HT-C, BmHF-1, adamalysin-2 y la metaloproteasa no hemorrágica atroxasa) con respecto a nuestra metaloproteasa Ba-MP. Podemos observar el árbol de filogenia molecular de proteínas, donde la distancia entre una y otra proteína está en función del número de sustituciones de nucleótidos (x100).

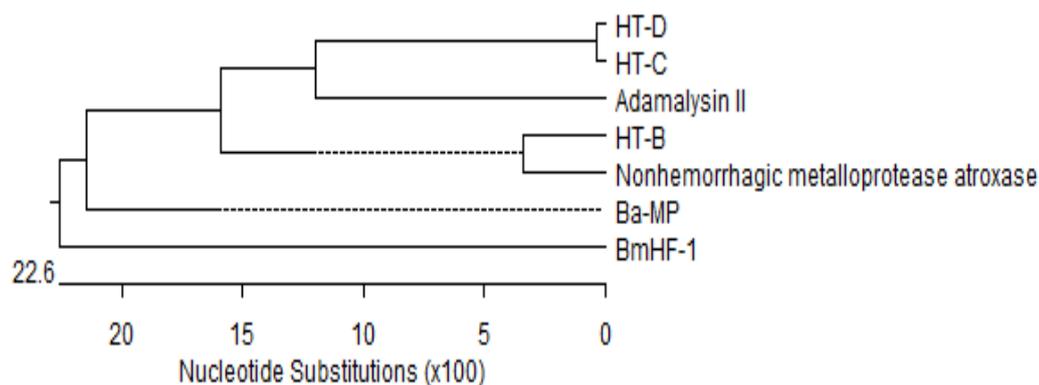


Figura 10: Árbol filogenético de las homologías secuenciales con respecto a la metaloproteasa Ba-MP obtenida a partir del veneno de *Bothrops andianus*. Laboratorio de Química de Proteínas UCSM – Arequipa (junio - septiembre 2018).

Se observó molecularmente que el antecesor común de todas las metaloproteasas homologas (HT-D, HT-B, HT-C, BmHF-1, adamalysin-2, metaloproteasa no hemorrágica atroxasa) y la Ba-MP comienza en el punto 22.6 (sustitución de nucleótidos x 100) (este punto sería al ancestro común).

Se observa que la BmHF-1 es molecularmente muy diferente a las demás metaloproteasas (Ba-MP, atroxasa, HT-B, HT-C, HT-D y adamalysin-2), por eso es la ramificación muy diferente a las demás. Dentro del grupo de las demás metaloproteasas se observa que Ba-MP presenta características que lo hacen molecularmente muy diferente a atroxasa, HT-B, HT-D, HT-C y la adamalysin-2. Se observa que la atroxasa y HT-B tendrían molecularmente rasgos comunes, pero estas se van diferenciar de la adamalysin-2, HT-C y HT-D. La adamalysin-2 presenta molecularmente diferencias con las metaloproteasas hemorrágicas HT-D y HT-C las cuales son casi idénticas la diferencia entre ambas solo se encuentra en la presencia de un aminoácido como ya se mencionó.

4.4.4. Características fisicoquímicas (perfil hidropático) de Ba-MP

El perfil hidropático resultante, brinda el análisis del grado de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos de nuestra proteína deducida, con ella podemos caracterizar o identificar la posible estructura (figura 11).

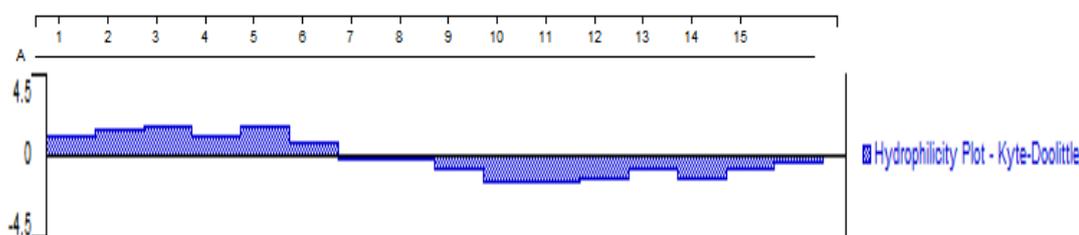


Figura 11: Perfil hidropático según la escala de Kyte-Doolittle de la secuencia de aminoácidos de la región N-terminal de la metaloproteasa Ba-MP obtenida a partir del veneno de *Bothrops andianus*. Laboratorio de Química de Proteínas UCSM – Arequipa (junio - septiembre 2018).

La importancia del perfil hidropático es que brinda la hidrofobicidad de una secuencia proteica; indicando las posibilidades en la que quedan orientados los residuos hidrofóbicos de los aminoácidos de dicha secuencia, en su plegamiento hacia el interior en contacto con sus semejantes y alejados del agua.

Los resultados mostrados en forma de graficas donde el eje de la abcisas designa la posición de los aminoácidos y el de las ordenadas (Score) asignada para cada tipo de aminoácido, reflejando su carácter hidrofóbico basadas en la escala de Kyte-Doolittle indicando aminoácidos hidrófobos (en la figura orientados ↑).

La escala de Kyte-Doolittle se usa ampliamente para detectar regiones hidrófobas en proteínas. Las regiones con valor positivo son hidrófobas. La hidrofobicidad de la región N-terminal de la secuencia de 16 aminoácidos de Ba-MP ((1) Q: Glutamina, (2) N: Asparagina, (3) L: Leucina, (4) P: Prolina, (5) Q: Glutamina, (6) R: Arginina, (7) Y: Tirosina, (8) I: Isoleucina, (9) Q: Glutamina, (10) L: Leucina, (11) V: Valina, (12) V: Valina, (13) V: Valina, (14) A: Alanina, (15) D: Acido aspártico, (16) H: Histidina), se

observa que la secuencia de aminoácidos del 1 al 6 son hidrofóbicos en la región N-terminal de Ba-MP ya que estos poseen valor positivo, mientras que los aminoácidos del 9 al 16 son hidrofílicos ya que poseen según la escala de Kyte-Doolittle valores negativos.

4.4.5. Análisis de la composición de aminoácidos de Ba-MP

La fracción N-terminal de Ba-MP, sometido al DNASTAR nos muestra en la Tabla 3, el análisis bioinformático de la composición de aminoácidos de Ba-MP.

Tabla 3: Análisis bioinformático de la composición global de aminoácidos de la fracción N-terminal de Ba-MP del veneno de *Bothrops andianus*. Laboratorio de Química de Proteínas UCSM – Arequipa (junio - septiembre 2018).

Analysis	Whole Protein
Molecular Weight	1892.17 m.w.
Length	16
1 microgram =	528.495 pMoles
Molar Extinction coefficient	1280±5%
1 A(280) =	1.48 mg/ml
Isoelectric Point	7.15
Charge at pH 7	0.08

Whole Protein Composition Analysis

Amino Acid(s)	Number count	% by weight	% by frequency
Charged (RKHYCDE)	4	30.21	25.00
Acidic (DE)	1	6.08	6.25
Basic (KR)	1	8.25	6.25
Polar (NCQSTY)	5	34.97	31.25
Hydrophobic (AILFWV)	7	37.42	43.75
A Ala	1	3.76	6.25
C Cys	0	0.00	0.00
D Asp	1	6.08	6.25
E Glu	0	0.00	0.00
F Phe	0	0.00	0.00
G Gly	0	0.00	0.00
H His	1	7.25	6.25
I Ile	1	5.98	6.25
K Lys	0	0.00	0.00
L Leu	2	11.96	12.50
M Met	0	0.00	0.00
N Asn	1	6.03	6.25
P Pro	1	5.13	6.25
Q Gln	3	20.31	18.75
R Arg	1	8.25	6.25
S Ser	0	0.00	0.00
T Thr	0	0.00	0.00
V Val	3	15.72	18.75
W Trp	0	0.00	0.00
Y Tyr	1	8.62	6.25
B Asx	0	0.00	0.00
Z Glx	0	0.00	0.00
X Xxx	0	0.00	0.00
. Ter	0	0.00	0.00

Se observa que el peso molecular de Ba-MP es de 1892,17 (el cual valida nuestra espectrometría de masa), longitud de 16 aminoácidos (fracción N-terminal, encontrada en la espectrometría de masa), 1 microgramo de Ba-MP es 528,495 pMoles. El coeficiente molar de extinción es de $1218 \pm 5\%$, 1A (280) es a 1.48 mg/ml, punto isoeléctrico es de 7.15 (igual dio la electroforesis bidimensional $PI=7.1$), carga de pH 7 es a 0.08.

El análisis de toda la composición de la fracción N-terminal de la proteína de Ba-MP especificado, muestra resultados en porcentaje por peso como en porcentaje por frecuencia, así podemos observar que los aminoácidos que tienen carga (RKHYCDE) de estos aminoácidos solo encontramos 4 los cuales van a tener un peso (%) de 30.21 y una frecuencia (%) de 25.00. Los aminoácidos ácidos (DE) encontramos 1 con un peso (%) de 6.08 y una frecuencia de (%) de 6.25. Los aminoácidos básicos (KR) encontramos 1 con un peso (%) de 8.25 y una frecuencia de (%) de 6.25. Los aminoácidos polares (NCQSTY) encontramos 5 con un peso (%) de 34.97 y una frecuencia de (%) de 31.25 y los aminoácidos hidrofóbicos (AILFVVV) encontramos 7 con un peso (%) de 37.42 y una frecuencia de (%) de 43.75.

También se obtuvo la cantidad de aminoácidos específica junto con su peso (%) y frecuencia (%), de la región N-terminal de Ba-MP. Se observa que se tiene una unidad de aminoácidos de A, D, H, I, N, P, R y Y. Tenemos 2 aminoácidos de L y 3 aminoácidos de Q y V. La fracción N-terminal de Ba-MP no posee los siguientes aminoácidos C, E, F, G, K, M, S, T, W, B, Z y X.

4.4.6. Determinación bioinformático del punto isoeléctrico calculado de la fracción N-terminal de Ba-MP

Del análisis bioinformático de Ba-MP, gracias al DNASTar se obtiene el PI. El cual nos muestra que el PI de la metaloproteasa Ba-MP es de 7.1 (figura 12).

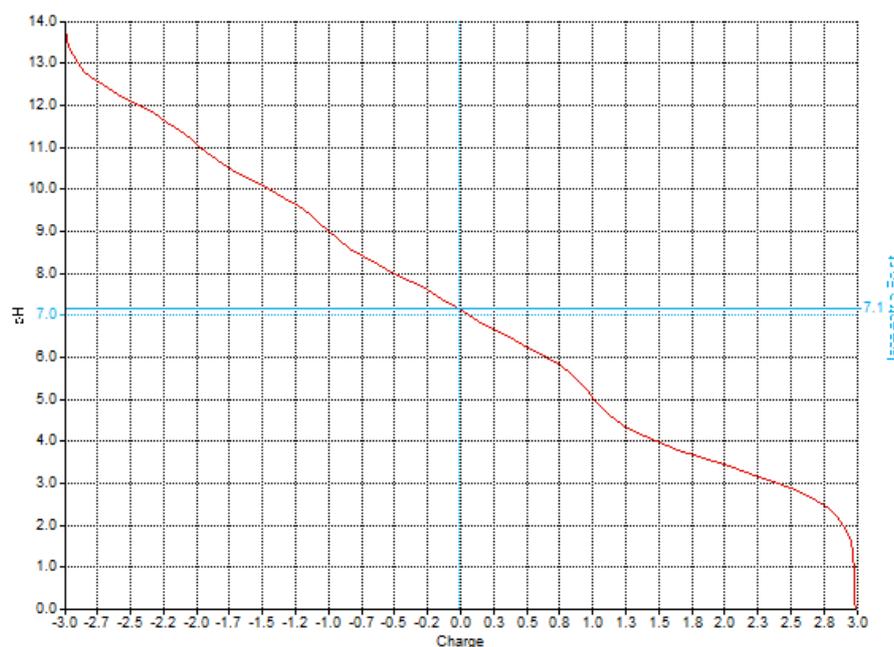


Figura 12: Análisis del punto isoeléctrico a través de la bioinformática de Ba-MP del veneno de *Bothrops andianus*. Laboratorio de Química de Proteínas UCSM – Arequipa (junio - septiembre 2018).

El punto isoeléctrico es el valor de pH en el cual su carga neta es cero, por lo tanto, su movilidad electroforética es nula. El análisis bioinformático da un PI de 7.1 de la fracción N-terminal de Ba-MP, en comparación con el PI obtenido por la electroforesis bidimensional de toda la estructura molecular de Ba-MP dio el mismo PI de 7.1 por lo tanto ambos resultados se validan. En cambio, el PI obtenido del análisis bioinformático de la tabla 3 da un resultado de 7.15, esta diferencia es insignificante, por lo tanto podemos ratificar que el PI de Ba-MP es de 7.1.

V. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se ha logrado purificar una metaloproteasa del veneno de *Bothrops andianus* (Ba-MP) con actividad hemorrágica a través de la cromatografía de interacción iónica SP Sephadex C-50.
- La enzima Ba-MP presentó un DMH de 39 mm por lo que demostró que posee una actividad hemorrágica, como también presento una actividad metaloproteasa catalítica (17.65 nmoles/min) frente a un sustrato cromogénico propio de las metaloproteasas como es el TAME.
- Se logró obtener la masa molecular de la enzima Ba-MP (33 KDa) purificada obtenida por la electroforesis bidimensional (2D), en relación con su punto isoeléctrico (7.1). También se obtuvo la región N-terminal (QNLQRYIQLVVDH) de Ba-MP por la espectrometría de masas (MALDI TOF/TOF).
- Fue analizada la identidad de la proteína Ba-MP a partir del análisis bioinformático por la secuencia N-terminal (QNLQRYIQLVVDH) obtenida a través de la espectrometría de masa, determinándose ser una metaloproteasa con actividad hemorrágica procedente de serpientes de la familia viperidae (Swiss-Prot/NCBI).

VI. RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio de metaloproteasas en otras especies de serpiente, con la finalidad de obtener un conocimiento más detallado de estos, como también con la finalidad de saber si estos pueden ser utilizados como futuros agentes terapéuticos.
- Fomentar investigación concerniente a metaloproteasas con perspectivas terapéuticas en serpientes de otras especies pertenecientes a nuestra región y a nuestro país.
- Fomentar investigación en cofactores presentes en las metaloproteasas de venenos de serpientes.
- Continuar el estudio de toxinas, proteínas, enzimas en venenos de serpientes, ya que estos pueden ayudar con el tratamiento de enfermedades patológicas graves.
- Continuar con la investigación en la biodiversidad de nuestra región, no solamente en veneno de serpientes, sino también en otros compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en otras especies de animales.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aebersold, R. y Mann, M. (2003). *Mass spectrometry based proteomics*. Nature 422:198-207.
- Aguirre, B. (2006). *Purificación y caracterización bioquímica de una proteína K49 fosfolipasa A₂ homóloga, a partir del veneno total de Bothrops atrox* “Jergón de la selva” Arequipa-2005. Tesis de pre grado. Universidad Nacional de San Agustín. Facultad de Ciencias Biológicas y agropecuarias. Arequipa.
- Alegre, C. R. (2015). *Análisis Bioinformático de una proteína expresada en el músculo de Engraulis ringens (anchoveta peruana)*. Una perspectiva nutricional. Tesis de pre grado. Universidad Católica De Santa María, Arequipa. Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas. Escuela profesional de Ingeniería Biotecnológica. Arequipa.
- Bellido, C. C. (2014). *Purificación y caracterización de una metaloproteasa hemorrágica del veneno de la serpiente del Perú Bothrops pictus* (Tschudi, 1845) “Jergón de la Costa”. Disponible:

<http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/3751>
- Bjárnason, J. B. y Fox, J. W. (1994). *Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms*. Pharmacology and Therapeutics. Vol. 62: 325-372.
- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (2018). BLAST NCBI: *Centro nacional de investigación biotecnológica* (NCBI). Disponible en:

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

- Bonfim, R. K., Toyoma, M. H., Novello, J. C., Hyslop, S., Oliveria, C. R., Rodriguez, L. y Marangoni, S. (2001). *Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A2 from Bothrops jararacassu snake venom*. J Protein Chem; 20(3):239-45.
- Braud, S., C. Bon y A. Wisner. (2000). *Snake venom proteins acting on hemostasis*. Biochimie 82: 851-859.
- Campbell, J. A., Lamar, W.W. (2004). *The venomous reptiles of Latin America*. The Herpetologist leaguem (pub). Museum Natural History. Pittsburgh, U.S.A.
- Carrillo, de E. Y Icochea, J., (1995). *Lista taxonómica preliminar de los reptiles vivientes del Perú*. Publicaciones del Museo de Historia Natural. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. (A) Nro. 49: 1-27.
- Carvalho, D. Marangoni, S. Oliveria, B. y Novello, J. C. (1998). *Isolation and characterization of a new lectin from the venom of the snake Bothrops jararacussu*, Biochem. Molecular Biology International, 44: 933 – 938.
- Cominetti, M. R. (2007). *Caracterización de la actividad proteolítica de toxinas y uso de inhibidores*, en: *Selistre de Araújo, H. S; Ferreira de Souza, D. H. (Eds.), Métodos en Toxicología: toxinas de Serpientes*. EdUFSCAR. San Carlos. Brasil. pp. 45-51.
- Da Silva, I. R., Lorenzetti, R., Rennó, A. L., Baldissera, L. J., Zelanis, A., Serrano, S.M. e Hyslop, S. (2012). *BJ-PI2, a non-hemorrhagic metalloproteinase from Bothrops jararaca snake venom*. Toxicon. 1820(11):1809-21.
- De Moraes, N. C., Neves, C.C., Fonseca, K. C., De Queiroz, M. R., Gomes-Filho, S.A., Santos-Filho, N. A., Bordon Kde, C., Beletti, M. E., Sampaio, S. V., Arantes, E. C., De Oliveira, F. (2012). *Isolation and characterization of moojenin, an acid-*

active, anticoagulant metalloproteinase from Bothrops moojeni venom. *Toxicon*. 1;60 (7):1251-8.

De Queiroz, M. R., Mamede, C. C. N., Fonseca, K. C., de Moraes, N. C. G., de Sousa, B. B., Santos-Filho, N. A. y De Oliveira, F. (2014). *Rapid Purification of a New P-I Class Metalloproteinase from Bothrops moojeni Venom with Antiplatelet Activity*. *BioMed Research International*, 2014, 352420.

Declerck, Y.A. e Imren, S. (1994). *Protease inhibitors: role and potencial therapeutic use in human cáncer*. *Eur. J. Cancer*, 30^a: 2170-2180.

DNAS^tar. (2018). *Software que proporciona lo necesario para la información genómica y Proteómica de la biología estructural*. Tutorial: Ponce Soto Luis. Disponible en: <http://www.dnastar.com/>

Erlanger, B. F., Kolowsky, N. y Cohen, N. (1961). *Preparation and properties of two new chromogenic substrates of TAME*. *Arch. Biochem. Biophysic*. 95:271-490.

Escalante, T., Rucavado, A., Fox, J. W. y Gutiérrez, J. M. (2011). *Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases*. *Journal of proteomics*, 74(9), 1781-1794.

Ferreira, R. N., Rates, B., Richardson, M., Guimarães, B. G., Sanchez, E. O. F., de Castro Pimenta, A. M. y Nagem, R. A. P. (2009). *Complete amino-acid sequence, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of leucurolysin-a, a nonhaemorrhagic metalloproteinase from Bothrops leucurus snake venom*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 65(Pt 8), 798–801.

- Fox, J. W. y Serrano, S. M. T. (2005). *Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases*. *Toxicon*. Vol. 45: 969-985.
- Fox, J. W. y Serrano, S. M. T. (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*. Vol. 275: 3016–3030.
- Fry, B. G., Vidal, N., Norman, J. A., Vonk, F. J., Scheib, H., Ramjan, S. F. R., Kuruppu, S., Fung, K., Hedges, B., Richardson, M. K., Hodgson, W. C., Ignjatovic, V., Summerhayes, R. y Kochva, E. (2006). *Early evolution of the venom system in lizards and snakes*. *Nature*. Vol. 439: 584-588.
- Girón, M. E., Rodríguez, A., Salazar, A. M., Sánchez, E. E., Galán, J., Ibarra, C. y Guerrero, B. (2013). *Isolation and characterization of two new non-hemorrhagic metalloproteinases with fibrinolytic activity from the mapanare (Bothrops colombiensis) venom*. *Toxicol.* 87(1):197-208.
- Grams, F., Huber, R., Kress, L. F., Moroder, L. y Bode, W. (1993). *Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism*. *FEBS Journal*. Vol. 335: 76-80.
- Gutiérrez, J. M., Romero, M., Nuñez, J., Chaves, F., Borkow, G. y Ovadia, M. (1995). *Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaHI, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake Bothrops asper (Terciopelo)*. *Exp Mol Pathol* 62: 28-41.

- Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., Escalante, T. y Díaz, C. (2005). *Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage*. *Toxicon*. Vol. 45:997–1011.
- Gutiérrez, J. M. y Rucavado, A. (2000). *Snake Venom Metalloproteases: Their Role in the Pathogenesis of Local Tissue Damage*. *Biochimie*, Vol. 82: 841-850.
- Gutiérrez, J. M. (2002). *Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigación en América Latina*. *REv. Biol. Trop.* Vol. 50 n.2.
- Gutierrez, J. M. y Lomonte, B. (2003). *Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en America Latina - ANIMAIS PEÇONHENTOS NO BRASIL: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes* Ed. Sarvier, São Paulo pp. 310-323.
- Hati, R., Mitra, P., Sarker, S. y Bhattacharyya, K. K. (1999). *Snake Venom Hemorrhagins*. *Critical Reviews in Toxicology*. Vol. 29: 1–19.
- Hite, L. A., Shannon, J. D., Björnason, J. B. y Fox, J. W. (1992). *Sequence of a DNA clone encoding zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from Crotalus atrox: evidence for signal, zymogen and desintegrin-like structures*. *Biochemistry*. Vol. 31: 6203-6211.
- Hou, J., Li, M., Chen, J., Qiu, P., Liang, X., Lou, Z. y Yan, G. (2005). *Crystallization and preliminary X-ray studies of a non-haemorrhagic fibrin (ogen) olytic metalloproteinase from the venom of Agkistrodon acutus*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 61(Pt 4), 355–358.

- Kamiguti, A. S., Hay, C. R. y 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*. *Biochem J.* 320(Pt 2): 635–641.
- Kini, R. M. y Koh, C. Y. (2016). *Metalloproteases Affecting Blood Coagulation, Fibrinolysis and Platelet Aggregation from Snake Venoms: Definition and Nomenclature of Interaction Sites*. *Toxins*, 8(10), 284.
- Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H. y Murata R. H. (1960). *Studies on the quantitative method for the determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom*. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* V. 13: 43-51.
- Laemmli. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*; 227: 680-685.
- Lehninger, A. (2005). *Principios de Bioquímica*. 5rd ed. Voet-Voet Bioquímica Ed. Omega. Barcelona, España.
- Lévano, J. y Fernández, R. (2004). *Diagnóstico y tratamiento de los accidentes por animales ponzoñosos*. Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud, Lima, Perú. 1era edición. pp 74.
- Li, R., Zhu, R., Wu, J., Wang, W., Lu, Q. y Clemetson, K. J. (2008). *L-amino acid oxidase from Naja atra venom activates and binds to human platelets*. *Acta Biochimica Biophysica Sinica*. Vol. 40: 19-26
- Li, Z.Y., Yu, T.F. y 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(11): 1349-1358.

- Markland, F. S. y Swenson, S. (2013). *Snake venom metalloproteinases*. *Toxicon*, 62: 3-18.
- Markland, F. S. (1998). *Snake venoms and the hemostatic system*. *Toxicon* 36: 1749-1800.
- Matsui, T. y Hamako, J. (2005). *Structure and function of snake venom toxins interacting with human von Willebrand factor*. *Toxicon*. 15;45(8):1075-87.
- Matsui, T., Fujimura, Y. y Titani, K. (2000) *Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis*. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1477: 146-156.
- Matsui, T., Hamako, J. y Titani, K. (2009). *Structure and Function of Snake Venom Proteins Affecting Platelet Plug Formation*. *Toxins*, 2(1): 10–23.
- McDiarmid, R. W., Campbell, J. A. y Touré, T. A. (1999). *Snake Species of the World: una referencia taxonómica y geográfica, volumen 1* Washington, Distrito de Columbia: Herpetologists 'League. 511 pp. ISBN 1-893777-00-6(serie). ISBN 1-893777-01-4 (volumen).
- Moura da Silva, A. M., Furlan, M. S., Caporrino, M. C., Grego, K. F., Portes-Junior, J. A., Clissa, P. B. y Magalhães, G. S. (2011). *Diversity of metalloproteinases in Bothrops neuwiedi snake venom transcripts: evidences for recombination between different classes of SVMPs*. *BMC Genetics*, 12: 94-97.
- Navarrete, M., Silva, W. y Vargas, E. (2010). *Las serpientes venenosas de importancia en la salud pública del Perú*. *Redvet*, Vol. 11 (7): 1-17.

- Pérez, M., Rojo, C., De Vicente, L. y Encinas, T. (2008). *Estudio del veneno de serpientes: tipos y tratamientos. Departamento de toxicología y farmacología, facultad de veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. Vol. 2(2).*
- Pesantes, O. (2000). *Prevención y tratamiento de accidentes por serpientes venenosas.* Oficina de relaciones públicas SEDAPAL. Lima-Perú.
- Ponce-Soto, L. A. (2018). *Modificación de la actividad hemorrágica.* Universidad Católica Santa María. Facultad de Biotecnología. Arequipa- Perú.
- Ramos, O. H. P. y Selistre, H. S. (2006). *Snake venom metalloproteases structure and function of catalytic and disintegrin domains.* Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. Vol. 142: 328–346.
- Rodríguez, V. M., Soares, A. M., Andrião-Escarso, S. H., Franceschi, A.M., Rucavado, A., Gutiérrez, J. M. y Giglio, J. R., (2001). *Pathological alterations induced by newiedase, a metalloproteinase isolated from Bothrops newiedi snake venom.* Biochimie 83: 471–479.
- Sales, P. B. V. y Santoro, M. L. (2008). *Nucleotidase and DNase activities in Brazilian snake venoms.* Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. Vol. 147: 85–95.
- Simpson, R. J. (2003). *Proteins and proteomics. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. USA.
- Ströcker, W. y Bode, W. (1995). *Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins.* Current Opinion in Structural Biology. Vol. 5: 383-390.

- Suhr, S. M. y Kim, D. S. (1996). *Identification of the snake venom substance that induces apoptosis*. Bioch. Biophys. Res. Com. 224(1): 134-139.
- Takeda, S., Takeya, H. y 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(1): 164-176.
- Torres, F. D. (2013). *Caracterización de los efectos locales y sistemáticos de la metaloproteasa BtaHF purificada a partir del veneno total de Bothriopsis taeniata*. Tesis doctoral. Universidad la Campinas. Brasil.
- Torres-Huaco, F. D., Ponce-Soto, L.A., Martinz-de-Souza, D. y Marangoni, S. (2010). *Purification and Characterization of a New Weak Hemorrhagic Metalloproteinase BmHF-1 from Bothrops marajoensis Snake Venom*. Protein Journal. Vol. 29: 407–416.
- Toyama, M. H., Soares, A. M., Wen-HWA, L., Polikarpov, I., Giglio, J. R. y Marangoni, S. (2000). *Amino acid sequence of piratoxin-II, a myotoxic K49 phospholipase A₂ homologue from Bothrops pirajai venom*. Biochimie, 82(3): 189-264.
- Tu, A. T. (1996). *Overview of snake venom chemistry*. Adv. Exp. Med. Biol., 391: 37 – 62.
- Tu, A.T. y Chua, A. (1996). *Acid and Alkaline phosphomonoesterases activity in snake venoms*. Comp. Biochem. Physiol. 17: 297-307.
- Westermeier, R. y Naven (2002). *Proteomic in Practice*. WILEY-VCH, Weinheim.

Yarlequé, A. (2000). *Las serpientes peruanas y sus venenos*. Universidad Nacional mayor de San Marcos. Fondo Editorial.

ANEXOS

ANEXO 1

REGISTRO GRAFICO DE LA ACTIVIDAD HEMORRÁGICA MODIFICADA

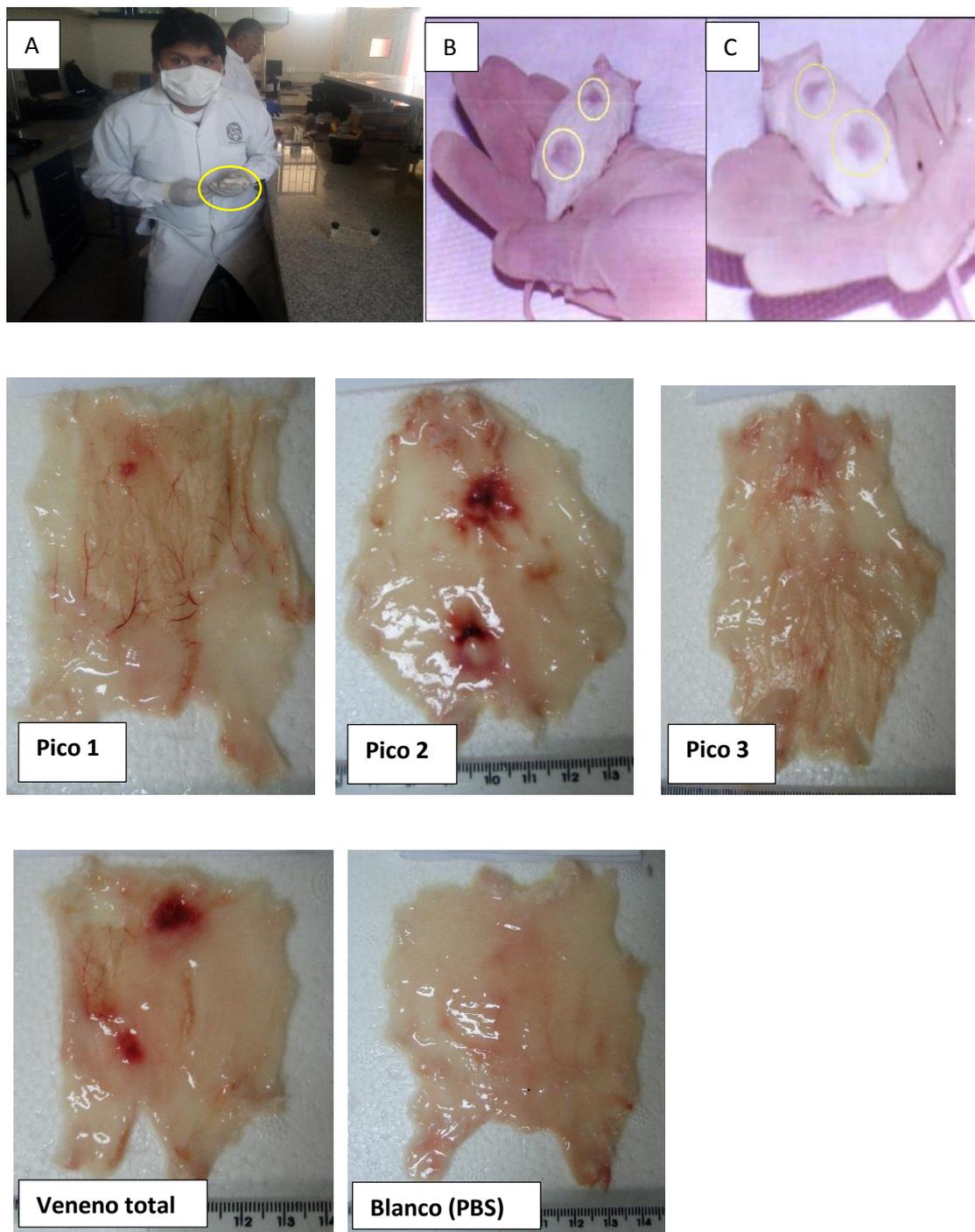


Figura 13: Realización de la actividad hemorrágica modificada. Laboratorio de química de proteínas UCSM – Arequipa (junio - septiembre 2018).

A. Ratón Swiss. **B y C.** inducción intradérmica del veneno de *B. andianus*. **D, E, F, G y H.** medición del DMH.

ANEXO 2

REGISTRO GRAFICO DEL PROCEDIMIENTO DE ESPECTROMETRIA DE
MASA Y DEL ANALISIS BIOINFORMATICO

Figura 14: Procedimiento de espectrometría de masa MALDI (TOF/TOF) y análisis Bioinformático con gran colaboración del laboratorio Thomson de espectrometría de masas del Instituto de Química de la Universidad del estado de Campinas-SP Brasil, bajo la colaboración del Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D. (junio - septiembre 2018)

ANEXO 3

REGISTRO GRAFICO DE LA REALIZACION DEL TRABAJO DE
INVESTIGACION EN LA UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA –
AREQUIPA

Figura 15: Laboratorio de Química de Proteínas de la Universidad Católica de Santa María – Arequipa. Bajo la gran colaboración del Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D. (junio - septiembre 2018).



Universidad Católica de Santa María – Arequipa

Laboratorio de Química de Proteínas en colaboración el Laboratorio de Thomson de
Espectrometría de Masas de la Universidad del Estado de Campinas – SP Brasil

“año de la lucha contra la corrupción y la impunidad”

CONSTANCIA

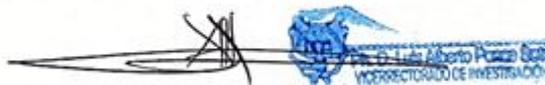
El que suscribe, jefe (e) “Director de investigación de la Universidad Católica de Santa María – Arequipa”

HACE CONSTAR:

Que el señor estudiante, **Franklin Luis Pacco Rivas**, identificado con DNI N° 47389677, egresado de la facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional del Altiplano - Puno, ha realizado el trabajo de investigación titulado **APROXIMACION PROTEOMICA DE METALOPROTEASAS A PARTIR DEL VENENO TOTAL DE *Bothrops andianus*: BIOPROSPECCION TERAPÉUTICA POR ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO – 2018**. Ha realizado su trabajo de investigación en esta casa de estudios junto con la colaboración Laboratorio de Thomson de Espectrometría de Masas de la Universidad del Estado de Campinas – SP Brasil, gracias al convenio entre ambas universidades.

Por lo cual, se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que estime por conveniente.

Arequipa, 20 de Marzo del 2019.



Ph.D. Luis Alberto Ponce Soto.

Director del área de investigación de la Universidad

Católica de Santa María – Arequipa.