

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Purificación y caracterización bioquímica de una
enzima similar a trombina aislada del veneno de la
serpiente peruana *Bothrops barnetti* (Viperidae)
“Sancarranca”**

TESIS

para optar el título profesional de Biólogo con mención en Biología Celular
y Genética

AUTOR

Dan Erick Vivas Ruíz

Lima – Perú

2008

Gracias Dios por permitirme estar aquí para esta tesis, por ser tu voluntad antes que la mía.

En la lucha entre el río y la roca, gana siempre el río, no por su fuerza sino por su perseverancia.

A Teodoro y Estela, cimientos
de mis valores y mis
sentimientos, para ellos: mi
eterna gratitud.

A Marco, Luis y Vanina,
fuentes de mis
conocimientos más
importantes; mis ejemplos de
superación y perseverancia.

A ti, una nueva razón de
vivir, una nueva oportunidad
para cambiar, un nuevo

sentir de verdad, una
definición de cómo ser
íntegro y de cómo ser
ordenado en la vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Mayor de San Marcos, a la Facultad de Ciencias Biológicas, a los profesores en general por los conocimientos impartidos durante mi formación académica.

Al Doctor Armando Yarlequé, jefe del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM por su constante apoyo, asesoramiento y por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis.

A la profesora Fanny Lazo, por haberse convertido sin querer en mi coasesora, por ese incondicional apoyo, a ella toda mi estima y respeto.

A la profesora Edith Rodríguez, por los buenos consejos y el continuo interés en el avance de esta tesis.

Al profesor Orestes Málaga, un verdadero maestro, por esas sugerencias y palmaditas de ánimo, y por el honor de haber compartido un dictado de clase con su persona.

Al Biólogo Javier Cárdenas Tenorio, maestro y amigo, por enseñarme acerca del cuidado y manejo de serpientes, por su apoyo incondicional, por darme el tema de tesis y los valiosos consejos al inicio de esta.

Un agradecimiento especial a la profesora María del Pilar Suyo Titto, por estar pendiente de mis avances académicos y desarrollo personal.

A la Bióloga Rosio Inga, por los primeros conocimientos adquiridos en el laboratorio, por enseñarme que los pequeños detalles son muy importantes para obtener buenos resultados y corregirme rigurosamente cuando fue necesario.

Al Biólogo Gustavo Sandoval, por compartir sus conocimientos acerca de la enzima similar a trombina y ayudarme a entender todo lo relacionado al comportamiento de esta.

A mis amigos Pedro Palermo, Fanny Reyes, Julio Mendoza, Frezya Loyola y Patricia Talavera por darme ánimo en los momentos de querer dar un paso al costado.

A Nora Ruiz, Susan Medina, Gladys Ccahuantico y Edgar Gonzales, por enseñarme a como enseñar.

Y por supuesto un agradecimiento muy especial a mis amigas del Serpentario Oswaldo Meneses del Museo de Historia Natural, por la ofídica

amistad brindada, el respeto mutuo compartido y por esa bífida lengüita mostrada como saludo.

ÍNDICE

Pág.

RESUMEN.....	
.....	1
ABSTRACT.....	
.....	2
INTRODUCCIÓN.....	
.....	3
ANTECEDENTES.....	
.....	6
MATERIALES Y MÉTODOS.....	
.....	9
RESULTADOS.....	
.....	23
DISCUSIÓN.....	
.....	27

CONCLUSIONES.....

..... 44

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

..... 45

TABLAS Y

FIGURAS.....

..... 56

ABREVIATURAS

BAPNA:	Benzoil-Arginil-p-Nitroanilina
Chromozym TH:	Tosyl-Glycyl-Prolyl-Arginyl-p-Nitroanilina Acetate.
CM Sephadex C-50:	Carboximetil Sephadex C-50
DE:	Dosis eficaz
EDTA:	Etilen diamino tetra acético
kDa:	KiloDaltons
EST:	Enzima similar a trombina
mg:	miligramo
DCM-P:	Dosis coagulante mínima sobre plasma
DCM-F:	Dosis coagulante mínima sobre fibrinógeno
NIH:	Unidad internacional de los Institutos Nacionales de Salud
PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PNGasa F:	Glicosil asparriguinasa recombinante
PMSF:	Fenil metil sulfonil fluoruro
rpm:	revoluciones por minuto
SDS:	Dodecil sulfato de Sodio
TEMED:	N,N,N,N'- Tetrametil etilen diamino
TLCK:	Tosil lisil clorometil cetona
Tris:	Tris (hidroximetil) amino metano
µg:	microgramo
µl:	microlitro
UA:	Unidades de actividad
UV:	Ultravioleta

RESUMEN

Se ha aislado una enzima similar a trombina del veneno de la serpiente peruana *Bothrops barnetti* mediante dos pasos cromatográficos sobre CM Sephadex C-50 y Sephadex G-100, en ambos casos utilizando Acetato de Amonio 0,05 M a pH 5,0. La enzima fue purificada 45 veces con un rendimiento de 14% y por PAGE-SDS se obtuvo una sola banda proteica de 52 kDa en condiciones reductoras con 2 β -Mercaptoetanol y de 48 kDa en condiciones no reductoras, determinándose que la enzima es de una sola cadena polipeptidica con al menos un enlace disulfuro. El tratamiento con N-glicosidasa (PNGasa F) determinó que es una glicoproteína con un 45% de contenido total de carbohidratos. La enzima mostró tener actividad coagulante sobre plasma citratado y fibrinógeno y actividad amidásica sobre BApNA y Chromozym TH, La potencia coagulante sobre fibrinógeno bovino fue equivalente a 131 unidades NIH de trombina/mg. La enzima es inhibida por PMSF y por el inhibidor de tripsina de soya calificándola como una serinoproteasa; el pH óptimo para la actividad amidolítica fue de 8,0 y es estable hasta los 40 °C. Se demostró mediante inmunoelectroforesis e inmunodifusión la antigenicidad de la enzima frente al suero antitoxico polivalente sobre plasma citratado (DE: 250 μ l de antiveneno/ mg de enzima).

Palabras clave: Veneno, serpiente, enzima similar a trombina, *Bothrops barnetti*, coagulante.

ABSTRACT

A thrombin- like enzyme was purified from *Bothrops barnetti* peruvian snake venom using CM Sephadex C-50 followed by Sephadex G-100, in both two cases with 0,05 M Amonium Acetate buffer pH 5,0. The enzyme was purified 45 fold with 14% of yield and the PAGE-SDS showed only protein band of 52 kDa under reducing condition with 2 β -Mercaptoetanol and 48 kDa under non reducing condition indicating that the enzyme has a single polypeptide chain with disulfide bond. The PNGase treatment showed that it is a basic glycoprotein containing 45% total carbohydrates. The enzyme has coagulant activity on fibrinogen and citrated plasma and amidolytic activity on BApNA and Chromozym TH. The coagulant potency was equivalent to 131 NIH thrombin Units/ mg. In addition the enzyme is inhibited by PMSF and soybean trypsin inhibitor suggesting that is a serine proteinase. The enzyme had optimal amidolytic activity pH was 8,0 and is stable until 40 °C. The antigenicity and neutralization of enzyme was demonstrated by immunodiffusion and immunoelectrophoresis with the polyvalent antiothropic serum on citrated plasma (ED: 250 μ l of antivenom/ mg of enzyme).

Key words: Venom, snake, enzyme, thrombin like, *Bothrops barnetti*, coagulant.

INTRODUCCIÓN

Los venenos de serpientes, son las más sofisticadas e intrigantes armas en el mundo natural producto de una intensa presión selectiva por parte de la naturaleza sobre estos animales. Estas armas cumplen las funciones fundamentales de inmovilizar, matar y digerir a la presa, todo esto gracias a que los venenos son una compleja mezcla de componentes orgánicos e inorgánicos cuya composición puede variar enormemente entre especies (Chippaux *et al.*, 1991, Fry, 2005 y Kini, 2005)

Si bien es cierto que la gran mayoría de serpientes no son venenosas, el resto de ellas que poseen ponzoñas, han llegado a causar serios problemas de salud para la especie humana, al punto de que se han diseñado programas completos de prevención contra la mordedura de estos animales (Chippaux, 1998). Así mismo, la complejidad bioquímica y farmacológica de los venenos de serpientes, han motivado el gran interés científico a nivel mundial no sólo desde el punto de vista clínico si no, la potencialidad de esas sustancias como herramientas en el ámbito científico (Stocker, 1990 y Gutiérrez, 2002).

La compleja fisiopatología de estos envenenamientos se debe a la presencia de enzimas y toxinas que en su conjunto alteran el equilibrio fisiológico de la persona afectada, siendo el sistema hemostático uno de los más afectados especialmente en aquellas mordeduras inflingidas por serpientes pertenecientes a la familia Viperidae en cuya ponzoña existen proteínas y péptidos con propiedades coagulantes y anticoagulantes (Braud *et al.* 2000).

Dentro del sistema hemostático la circulación sanguínea junto con el sistema cardiovascular representan la comunicación metabólica entre los órganos en los

vertebrados. Es bien conocido que la sangre transporta los nutrientes, hormonas y el oxígeno a diferentes partes del cuerpo lo que le atribuye un rol vital en un vertebrado (Lehninger, 1982).

Lo interesante de los venenos de serpientes radica en que han llegado a desarrollar algunos principios bioquímicos que afectan la oxigenación tisular tanto por el bloqueo de los sistemas respiratorios neuromusculares como las actividades circulatorias, la integridad del sistema cardiovascular, el flujo de la sangre y la integridad de los eritrocitos. Como consecuencia la sola o coordinada acción de estos componentes provocan el daño en la oxigenación tisular llevando a una rápida inmovilización de la presa (Stocker, 1990).

El presente trabajo se ha centrado en uno de los componentes más estudiados en los venenos de serpientes que afecta la coagulación de la sangre debido a que convierte el fibrinógeno en fibrina, es decir, una enzima con acción tipo trombina. Esta enzima, conocida comúnmente como enzima similar a trombina (EST), es característica, aunque con diferente potencia coagulante, en los venenos de las serpientes de la sub familia Crotalinae también presentes en la herpetofauna peruana (Stocker *et al.* 1982; Yarlequé, 1989; Cahuana 1996, Mesias, 1996 y Liman, 1996)

La especie escogida para esta tesis fue *Bothrops barnetti* “sancarranca” (Parker, 1938) conocida también como “macanche”, sin embargo este último nombre se le atribuye mayormente a la *Boa constrictor ortonii* perteneciente a la familia Boidae ,la cual no posee veneno.

Bothrops barnetti (Figura 1) pertenece a la sub familia Crotalinae, familia Viperidae super familia Caenophidia, a esta última pertenecen también las familias Elapidae y Colubridae (Graham *et al.*, 2008). Ésta es la única serpiente venenosa que se ha

registrado en las tres regiones del Perú, en los departamentos de La Libertad, Lambayeque, Cajamarca Piura y Tumbes, (Carrillo e Icochea, 1995; Asencios y Cutti, 1995). Este ofidio posee una longitud entre 57 - 85 cm, la parte dorsal de la cabeza y el cuerpo varía de un color marrón medio a un gris pálido o un color paja llegando a ser pálido lateralmente. La parte superior posee una marca característica de color marrón oscuro en forma de "V", con manchas marrones longitudinales que van desde los ojos hasta el cuello. La coloración marrón esta presente como puntos discretos en la parte ventral. (Campbell y Lamar, 1989).

El incesante incremento demográfico y actividades humanas en la región norte (agricultura, ganadería y minería), esta ocasionando la perturbación de su hábitat, lo que conlleva al aumento de la casuística de accidentes ofídicos; siendo la sintomatología: edema local y hemorragia la cual puede derivar en necrosis y en casos graves hipotensión y producción de uremia. Por tanto, se considera a *B. barnetti* como la mayor responsable de los casos de ofidismo en la zona norte del Perú, de allí su importancia en el estudio de los componentes de su ponzoña. (Meneses, 1974; Zavaleta y Salas 1996).

El objetivo de la presente tesis fue aislar y purificar la EST del veneno de la serpiente *Bothrops barnetti* para posteriormente caracterizarla bioquímicamente y de esta manera comprender el mecanismo de acción de esta enzima con miras a poder establecer su rol en el envenenamiento.

ANTECEDENTES

En un inicio el efecto coagulante causado por la mordedura de una serpiente fue atribuida a “espíritus irritados” presentes en el veneno que la bestia expelía, los cuales eran demasiados fríos congelando de esta manera la sangre de las venas. (Van Helmont siglo XVI). Años más tarde Charas (1685) especificó que tales efectos se debían sólo cuando la serpiente estaba irritada. En el año 1749 estos espíritus irritados fueron cambiados a microscópicos “animaculos” por Buffon.

Redi puso fin a estos mitos en 1664 puesto que demostró, después de múltiples observaciones, que no sólo el veneno era efectivo cuando se inyectaba bajo la piel, e inefectivo por vía oral, sino que tales venenos eran igualmente peligrosos si provenían de serpientes vivas o muertas recientemente. Sin embargo, fue Fontana (1781) quién observó por primera vez el efecto coagulante del veneno de las serpientes, después de haber inyectado el veneno de una serpiente vipérida en la vena yugular de conejos, notó una rápida coagulación de la sangre de estos animales los cuales morían inmediatamente.

En 1883 Mitchell y Reichert hicieron una serie de interesantes observaciones sobre los efectos coagulantes y anticoagulantes de las serpientes cascabeles, investigaciones que llevaron a Phisalix en 1889 a establecer dos actividades características de los venenos de viperidos: anticoagulantes a bajas dosis, y coagulantes a altas dosis.

La acumulación de investigaciones en los años siguientes llevó a la primera tentativa para la clasificación de venenos de acuerdo a sus acciones sobre el plasma citratado hecha por Lamb (1901-1903) y subsecuentemente por Noc (1904);

siendo este último, quien supuso que los venenos inducían la coagulación, contribuyendo a la formación de una trombina activa con funciones en la sangre, pero, no excluía la posibilidad de que estos venenos podían contener una trombina preformada.

Hasta la presente fecha, son conocidas más de 100 diferentes especies de serpientes cuyos venenos afectan el sistema hemostático por una variedad de mecanismos. Estos venenos presentan un grupo de enzimas terapéuticamente interesantes; las enzimas similares a trombina (EST), serino proteinasas, defibrinogénicas que poseen la habilidad de transformar el fibrinógeno en coágulos de fibrina inestables que son degradados tempranamente por los procesos fibrinolíticos secundarios y por lo tanto producen una fluidez atípica de la sangre (Denson *et al.*, 1972; Stocker *et al.*, 1982; Farid *et al.*, 1989; Kamiguti y Cardoso, 1989; Ouyang *et al.*; 1992).

Las ESTs son características de serpientes pertenecientes a la Familia Viperidae y algunas especies de la subfamilia Colubrinae (Castro *et al.*, 2004). Se han purificado y caracterizado más de 30 ESTs en especies pertenecientes a los géneros *Agkistrodon*, *Bitis*, *Bothrops*, *Cerastes*, *Crotalus*, *Dispholidus*, *Lachesis*, y *Trimesurus* (Pirkle, 1998) y se ha podido determinar también que la mayoría de ESTs de vipéridos remueven el fibrinopéptido A del fibrinógeno para la formación de fibrina, a diferencia de la trombina que remueve los fibrinopéptidos A y B (Stocker, *et al.* 1982).

Dentro de las ponzoñas de Vipéridos peruanos se han encontrado y caracterizado: la enzima similar a trombina de *Lachesis muta*, considerada la especie venenosa más grande de América, la de *Bothrops brazili*, la de *Bothrops bilineatus* y *Bothrops pictus* (Yarlequé, 1989; Liman, 1996; Mesia, 1996 y Cahuana, 1996).

Por otro parte, en la ponzoña de *Bothrops barnetti*, se ha determinado la presencia de algunas actividades enzimáticas como, coagulante, fosfolipásica, así como sus acciones biológicas capaces de inducir hemorragia y hemolisis (Castañon *et al.*, 1993 y Martinez *et al.*, 1989), En cuanto a la presencia de la enzima similar a trombina, se ha demostrado su potencia coagulante empleando como sustrato tanto fibrinógeno, plasma bovino, como fibrinógeno canino (Orejuela *et al.*, 1991). Sin embargo estas investigaciones se han efectuado utilizando el veneno crudo y no fracciones purificadas.

La importancia de las ESTs del género *Bothrops*, es que conociendo sus propiedades bioquímicas, puedan ser utilizadas en humanos para contener hemorragias locales por su alta capacidad para coagular la sangre (Funk *et al.*, 1971; Stocker *et al.*, 1974), máxime cuando la nula acción mostrada por la heparina en el bloqueo de esta actividad enzimática le permite una rápida acción coagulante. Algunas de estas enzimas tienen utilidad clínica potencial para el tratamiento de enfermedades humanas, ya que se emplean como agente defibrinogénicas, y son ampliamente usadas en los laboratorios de diagnóstico para la detección de fibrinógeno en muestras de sangre heparinizada (Braud *et al.*, 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

1.1 Veneno

Se utilizó veneno de la serpiente *Bothrops barnetti* de ejemplares procedentes de Santa Cruz (Cajamarca), mantenidos en el Serpentario “Oswaldo Meneses” del Instituto Nacional de Salud – Lima (Lote B.bar1L-2002). El veneno fue extraído por presión manual, liofilizado y conservado a -8 °C hasta su uso.

1.2 Antiveneno

El antiveneno empleado fue el suero antibotrópico polivalente líquido, producido por el Instituto Nacional de Salud el cual contiene anticuerpos neutralizantes contra 4 especies del género *Bothrops* y una del género *Bothrocophias* que son: *B. atrox*, *B. barnetti*, *B. brazili*, *B. pictus* y *B. hyoprora* respectivamente. Cada vial contiene 10 ml de antiveneno que neutralizan no menos de 25 mg del veneno de *Bothrops atrox*.

1.3 Plasma humano citratado

Se obtuvo de sangre venosa de personas voluntarias; la cual fue recibida en tubos que contenían citrato de sodio 3,8% (1:9). Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm x 10 minutos y el plasma sobrenadante fue alicuotado en fracciones de 0,2ml para su uso.

2. Material de laboratorio

2.1 Reactivos

a) Sustratos

- Fibrinógeno bovino. (Sigma Chemical Company).
- Benzoil Arginil p-Nitroanilida (BAPNA). (Sigma Chemical Company).
- Tosil-Gly-Pro-Arg-4-nitranilina acetate (Chromozym TH) (ROCHE Diagnostic Germany).

b) Buffers

- Fosfato Salino 0,02 M, pH 7,4
- Acetato de Amonio 0,05 M pH 5,0
- Tris-HCl 0,05 M pH 7,5; 8,0; 8,1; 8,5 y 9,0
- Acetato de Sodio 0,2 M pH 4,0; 5,0 y 6
- Fosfato de Sodio 0,2 M pH 6,0 y 7,0

c) Estándares de peso molecular

Se emplearon kits comerciales con proteínas de peso molecular conocidos tales como: albúmina bovina sérica (66 kDa), ovoalbúmina (45 KDa), anhidrasa carbónica (29 KDa) y lisozima (14,3 kDa) de Sigma Chemical Company, USA.

d) *Electroforesis*

Acilamida, bis acilamida, tetra etil metilen diamino (TEMED), persulfato de amonio, azul brillante de Coomassie, azul de bromofenol y sodio dodecil sulfato (SDS).

e) *Geles para cromatografía*

Para el fraccionamiento del veneno de *Bothrops barnetti* se emplearon columnas cromatográficas de intercambio iónico y filtración molecular, tales como CM Sephadex C-50 y Sephadex G-100 respectivamente.

f) *Reactivos para la determinación de carbohidratos asociados*

Para la determinación de carbohidratos asociados se uso el set GLICANASA-NX (Sigma) que contiene la enzima recombinante de PNGasa, buffer de reacción, solución denaturante y solución detergente (15% solución de IGPEAL®).

g) *Agentes modificadores de la actividad enzimática*

Fenil Metil Sulfonil Fluoruro (PMSF), Iodoacetato, Tosyl lisil clorometil cetona (TLCK), inhibidor de tripsina de soya, glutatión, acido glutámico, ácido etilen diamino tetracético (EDTA), 2β-mercaptoetanol y heparina.

h) *Otros*

- Cloruro de sodio.
- Cloruro de potasio.

- Fosfato de potasio monobásico.
- Fosfato de sodio dibásico.
- Azida de sodio.
- Ácido acético.
- Trombina bovina.
- Caseína al 2%

2.2 *Instrumental de vidrio*

- Probetas graduadas de 10, 100 y 250 ml.
- Fiolas de 50 y 100 ml.
- Beakers de 50, 100 y 250 ml.
- Tubos de ensayo (13 x 100 cm)
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 ml.

2.3 *Equipos*

- Balanza analítica, Ainsworth.
- Baño de temperatura regulable, Memmert.
- Equipo de electroforesis en placa vertical, Sigma Techware.
- Espectrofotómetro UV, Shimadzu 120 02
- Fotocolorímetro, Spectronic Bausch & Lomb
- Fuente de poder para electroforesis, Duostat Beckman.
- Potenciómetro digital, Orion Research 611.
- Cronómetro digital

3. Métodos

3.1. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA

La cantidad de proteína fue calculada midiendo la absorbancia de luz UV a 280 nm (Warburg y Christian, 1941), y por el método de Lowry *et al.* (1951) empleando albúmina sérica bovina como proteína estándar.

3.2. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA

50 mg de veneno de *Bothrops barnetti* disueltos en buffer acetato de amonio 0,05 M pH 5 fueron aplicados por una columna de intercambio iónico CM Sephadex C-50 (30 cm x 1.5 cm) previamente equilibrada con el mismo buffer. Se colectaron dos volúmenes de columna en condiciones isocráticas seguidos por dos volúmenes del mismo buffer con 0,3 M de NaCl y finalmente con 0,6 M NaCl. Se colectaron fracciones de 3 ml respectivamente. Se determinó la cantidad de proteína en cada fracción por absorbancia a 280 nm y la presencia de la enzima, monitoreando su actividad amidolítica sobre el substrato BApNA a 405nm. Aquellas fracciones que presentaban actividad fueron juntadas para ser dializadas y concentradas hasta un volumen de 1ml. Posteriormente fue sometida a un segundo paso cromatográfico, esta vez de filtración molecular en Sephadex G-100 previamente equilibrado con el mismo buffer utilizado en el primer paso, colectándose volúmenes de 1 ml por fracción. Las fracciones con actividad amidolítica fueron juntadas para luego ser utilizadas en las pruebas correspondientes (Mesia, 1996 modificado).

3.3. *ELECTROFORESIS EN GELES EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO DE SODIO (PAGE-SDS)*

Este método fue utilizado para determinar la pureza de la proteína así como también su peso molecular. Cantidades equivalentes a 20 µg de la enzima en estudio fueron tratadas con buffer muestra para PAGE-SDS en condiciones reductoras (2β-mercaptoetanol) y no reductoras. Luego, se realizaron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida durante 1 h a un voltaje constante de 100 voltios (Laemmli, 1970). Se usaron como proteínas patrones de peso molecular: albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y lisosima (14.3 kDa).

Después de la corrida, los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie 0,1% por 15 min y lavados con solución decolorante conteniendo metanol, ácido acético y agua (25:8:67) hasta evidenciar las bandas formadas.

3.4. *INMUNODIFUSIÓN E INMUNOELECTROFORESIS.*

El veneno crudo y la EST se analizaron por inmunodifusión e inmunolectroforesis, contra el suero antibotrópico polivalente obtenido del Instituto Nacional de Salud (INS) de Lima.

La prueba de inmunodifusión se llevo a cabo sobre geles de agarosa al 1% en buffer fosfato 0,15M pH 7,0. Para ello, la agarosa fue disuelta en este buffer por calentamiento a 100 °C por 5 minutos y 3 ml de esta solución se extendieron en láminas portaobjetos dejándose enfriar durante 10 minutos. Luego se hicieron tres pocillos equidistantes y uno central en el cual colocó 10µl de suero antibotrópico, en uno de los pocillos laterales 10µl de veneno

crudo (5mg/ml), en el otro 15µl de la enzima purificada (0,112 mg/ml) y en el último 10µl de solución salina (Ver figura 5). La difusión se llevo a cabo en una cámara húmeda a 10°C durante 48 horas luego de lo cual se lavó con citrato trisódico al 5% por 10 minutos y finalmente se realizaron seis lavados de 6 horas cada uno con NaCl 0,9%. A continuación se hizo un lavado con agua destilada durante 10 minutos y posteriormente se cubrió la lámina con papel filtro humedecido en agua para colocarla en una estufa a 37 °C por 24 horas. Una vez secados los geles, se procedió a teñirlos con azul brillante de Coomasie al 0,1% por 5 minutos y luego se decoloró con la misma solución decolorante empleada para electroforesis hasta que se evidenciaron los arcos de precipitación (Ouchterlony y Nilsson, 1978).

La prueba de inmunoelectroforesis se realizó también en geles de agarosa al 1% en buffer glicina 0,05M pH 8,3. Luego de la gelificación se hicieron dos pocillos cerca de un extremo de la lámina y una canaleta horizontal en el centro de la lámina (Ver figura 5B). Se retiró el gel de los pocillos y en ellos se colocó 10µl de la enzima purificada (0,112 mg/ml) y 5µl del veneno crudo de *B. barnetti* (5mg/ml) para realizar la electroforesis con el buffer antes mencionado. El polo negativo se estableció en el extremo cercano a los pocillos. Luego de dos horas de corrida con un amperaje de 2mA por lámina, se retiró el gel de la canaleta horizontal y en ella se colocaron 30µl de suero antibotrópico, realizando la inmunodifusión de acuerdo a lo descrito anteriormente (Ouchterlony y Nilsson, 1978).

3.5. *DEGLICOSILACIÓN DE LA ENZIMA PURIFICADA*

20 µl de la enzima purificada fue diluida en buffer de reacción (50 mM Tris–HCl, pH 8.0) en un volumen final de 50µl, posteriormente se agregaron 2,5µl de solución denaturante (SDS 2% y 1M 2-β mercaptoetanol) y se sometió la muestra a calentamiento por 5 min a 100°C e inmediatamente se detuvo en frío. Se agregaron 2,5µl de solución detergente (IGEPAL® 15%) y por ultimo se añadió 2µl de la enzima PNGasa F (N-glicosidasa F). La muestra fue incubada a 37°C por 24 horas y detenidas por calentamiento con buffer muestra para PAGE –SDS y analizada por medio de electroforesis. (Metodología del set GLICANASA-NX-Sigma)

3.6. *ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS*

Las primeras tres actividades enzimáticas que se describen a continuación, se utilizan para evaluar la actividad similar a trombina.

a) *Actividad coagulante.-*

Fue ensayada según el método descrito por Copley (1973), usando plasma humano citratado o fibrinógeno bovino, este último a una concentración de 5mg/ml en buffer Tris HCl 0,05 M pH 7,4; la mezcla de la reacción contenía 0,2 ml del sustrato y 0,1 ml de cloruro de sodio 0,9% tamponado a pH 7,4; preincubándose por 10 minutos a 37 °C para luego agregar 0,1 ml del veneno crudo ó de la enzima purificada.

Se determinó la actividad enzimática dividiendo la inversa del tiempo de coagulación entre los mg de proteína utilizada. Así mismo se calculó la

dosis coagulante mínima (DCM) para ambos sustratos, que es la cantidad de nuestra (μg) que produce un coágulo en 60 segundos.

b) *Actividad sobre tripéptido sintético.-*

Se determinó por el método de Svendsen (1977), utilizando Tosyl-Glycyl-Prolyl-Arginyl-4-nitranilina acetate (Chromozym TH) como sustrato. El sustrato sintético es un derivado tripeptídico en el que la p-nitroanilina está unido como grupo cromógeno mediante un enlace amida al grupo carboxil de la arginina. La hidrólisis enzimática del sustrato produce la liberación del grupo p-nitroanilina, el cual es cuantificado a 405 nm.

Se disolvió el Chromozym TH (5mg) en agua destilada en un volumen final de 4 ml. La mezcla de reacción contenía 2,8 ml de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,3 con NaCl 0,2M más 0,3 ml de Chromozym TH. Los tubos se incubaron por 5 minutos a 37°C. Posteriormente se adicionó 0,1 ml de veneno crudo (0,5 mg/ml) y de la enzima purificada (0,112 mg/ml). Se tomo lecturas cada minuto por un lapso de 8 minutos a 405 nm.

Para el cálculo de la actividad se empleo la siguiente fórmula:

$$\text{U/ml de enzima} = \frac{V}{v \times \epsilon \times d} \times \Delta A / \text{min}$$

V= volumen total

v=volumen de enzima empleado

ϵ_{405nm} = 10 (Coeficiente de extinción molar de la 4-nitroanilina)

d= diámetro de la celda

$\Delta A / \text{min}$ = cambio de la absorbancia por minuto

Posteriormente se convirtió las U/ml a U/mg de proteína dividiendo el resultado con la concentración de muestra empleada

c) *Actividad amidolítica.-*

Fue determinada por el método de Erlanger *et al.*, (1961) modificado, empleando el sustrato cromogénico Benzoil-Arginil-p-Nitroanilida (BApNA) midiéndose la liberación de pNitroanilina a 405 nm.

La mezcla de reacción contenía 1 ml de BApNA a una concentración de 9×10^{-4} M, 0,45 ml de buffer Tris HCl 0,05M pH 8,1 y 25 μ l de la enzima purificada. Luego de incubar por 15 minutos a 37°C se adicionó 1 ml de ácido acético al 60 % para detener la reacción y luego medirla a 405nm.

d) *Actividad caseinolítica.-*

Fue determinada mediante el método de Kunitz, modificado por Takahashi y Ohsaka (1970), midiéndose la liberación de ácidos solubles.

La mezcla de reacción contenía 1 ml de caseína al 2% en buffer Tris-HCl 0,2 M pH 8,5; 0,45 ml de agua destilada y 50 μ l de la enzima, incubándose inmediatamente a 37° C por 30 minutos. La reacción se detuvo con 1,5 ml de ácido tricloro acético (TCA) 0,44M en frío y los productos ácidos solubles obtenidos por centrifugación a 4000 rpm por 15 minutos fueron leídos a 280 nm.

3.7. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

a) *Determinación de la potencia coagulante.-*

Se determinó por el ensayo de líneas paralelas usando fibrinógeno bovino como sustrato para comparar los tiempos de coagulación obtenida con trombina bovina, veneno crudo y enzima purificada. Para tal efecto, se prepararon soluciones iniciales de trombina bovina 5 unidades/ml, veneno 0,100 mg/ml y enzima purificada 0,060 mg/ml, a partir de las cuales se hicieron diluciones seriadas 1/2, 1/4, 1/8 con cloruro de sodio 0,9 % (Baughman, 1970).

Las mezclas de reacción contenían 0,2 ml de fibrinógeno 5 mg/ml, 0,1 ml de cloruro de sodio 0,9%. Luego de incubar por tres minutos a 37° C se adicionó 0,1 ml de muestra respectiva midiéndose el tiempo de coagulación total.

Para obtener la potencia coagulante se prepararon gráficas usando el programa Excel 2008 indicando en el eje de las abscisas (X) el logaritmo de las de las diluciones y en el eje de las ordenadas (Y) el logaritmo de los tiempos de coagulación. La actividad coagulante de la trombina es comparada entonces con los valores obtenidos para el veneno crudo y la enzima purificada respectivamente. En cada caso, la recta obtenida para trombina debe ser paralela a la de la muestra problema. Posteriormente se escoge un tiempo arbitrario sobre las gráficas de modo que la recta paralela al eje de las abscisas que se forme corte sucesivamente a las líneas paralelas ya indicadas y se trazan perpendiculares en los puntos de interacción de tal manera que las rectas resultantes señalen en el eje de las abscisas las concentraciones de trombina en cada caso.

Para el cálculo de la potencia se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Potencia coagulante (NIH / mg)} = \frac{R}{I} \quad R = \frac{T}{E} \times U$$

T = concentración de trombina obtenida a partir del intercepto sobre su recta.

E = concentración de trombina obtenida a partir del intercepto sobre la recta del veneno o de la enzima purificada.

U = valor de la concentración inicial de la trombina.

I = concentración inicial de veneno o enzima purificada.

b) pH óptimo.-

Fue determinado utilizando buffer acetato de sodio 0,2 M para un rango de 4,0 a 6,0, buffer fosfato de sodio 0,2 M para un rango de 6,0 a 7,0 y buffer Tris HCl 0,2 M para un rango de 8,0 a 10,0 empleando 25 μ l de la enzima y midiéndose la actividad sobre BApNA.

c) Efecto de la temperatura.-

La tolerancia a la temperatura fue medida utilizando alícuotas de 30 μ l de la enzima purificada las que fueron colocadas en viales de plástico con tapa por 10 minutos a 37, 40, 50, 60, 70 80 y 90^o C respectivamente, para luego ser enfriados bruscamente en una cubeta con hielo. La actividad fue medida sobre BApNA.

d) Efecto de inhibidores de proteasas.-

Se colocaron en viales pequeños 75 μ l de la enzima y 75 μ l del inhibidor correspondiente incubándose a 37^oC por 10 minutos. Luego se tomaron alícuotas de 50 μ l de la mezcla realizando los ensayos por triplicados para la prueba de actividad amidolítica con un tiempo de incubación de 15 minutos.

3.8. REACTIVIDAD FRENTE AL SUERO ANTIOFÍDICO.-

La neutralización de la actividad coagulante del veneno crudo y la enzima purificada fue evaluada usando el suero antibotrópico polivalente producido por el Instituto Nacional de Salud. La neutralización fue medida usando plasma humano citratado.

Se prepararon mezclas que contenían una cantidad constante de enzima o veneno (dosis de reto) y varias diluciones del antiveneno, llegando a una concentración final de enzima o veneno que corresponde a 2 Dosis Coagulantes Mínimas en 0.1 ml de la mezcla.

A cada tubo se agregó un volumen de diversas diluciones del antiveneno, de manera que se obtuvieron las siguientes razones μl de antiveneno/mg de veneno: 1000, 500, 250, 125, 62,5 y 31,2; completando los volúmenes correspondientes con solución salina para obtener la concentración de veneno requerida. Se preparó un control conteniendo la misma cantidad de veneno pero sin antiveneno, así como un control conteniendo el antiveneno pero sin veneno.

Se incubaron los tubos con las mezclas en baño maría a 37°C durante 30 min y a parte, fueron agregados 0,2 ml de plasma citratado a tubos de vidrio e incubaron durante 5 minutos en baño de agua a 37°C. Posteriormente se adicionó a cada tubo 0,1 ml de cada una de las mezclas y trabajando por duplicado se determinó el tiempo de coagulación con la ayuda de un cronómetro.

Se preparó una curva dosis-respuesta (razón μl de antiveneno/mg de veneno en el eje de las abscisas (X) vs tiempo de coagulación en el eje de las ordenadas (Y)), empleando una escala logarítmica para la razón

antiveneno/veneno y una escala milimétrica para el tiempo de coagulación. Tomando como punto de referencia el tiempo de coagulación observado en los tubos con la solución control de veneno sin antiveneno, se estimó la Dosis Eficaz (DE), que es la razón μl de antiveneno/mg de veneno en la que el tiempo de coagulación corresponde a 3 veces el tiempo de coagulación del plasma al que se le agregó veneno sin antiveneno (Manual del Instituto Clodomiro Picado, 2007).

RESULTADOS

Cuantificación de la proteína

Determinada la absorbancia de la proteína directamente a 280 nm se obtuvo que 1 mg/ml del veneno de *Bothrops barnetti* tiene una absorbancia de 0,983 mg/ml y por el método de Lowry, se calculó que 1 mg de veneno posee 0.790 mg de proteína.

Purificación de la enzima

Al realizar el primer paso (Figura 2) usando la columna de intercambio iónico CM-Sephadex C-50, se obtuvieron dos picos en el volumen isocrático y después de agregar buffer con 0,3 M de sal se obtuvieron dos picos consecutivos, siendo el primero de gran tamaño. Con el segundo cambio de sal, 0,6 M, se resolvió un sólo pico. La actividad amidolítica se presentó en la subida del primer pico eluido con NaCl 0,3 M.

En el segundo paso (Figura 3) usando el sistema de filtración molecular en Sephadex G-100, fueron resueltos en 3 picos de proteína. La actividad amidolítica se presentó en el primer pico coincidiendo la máxima actividad con el pico de proteína.

De esta manera, se obtuvo la EST de *B. barnetti* con una purificación de 45 veces y un rendimiento de 14%. (Tabla 1).

Electroforesis en gel de poliacrilamida

El análisis por electroforesis (Figura 4) presentó una sola banda de proteína tanto en condiciones reductoras como no reductoras correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 52 kDa y 48 kDa respectivamente, lo que establece la naturaleza homogénea y unicatenaria de la enzima aislada.

Antigenicidad de la enzima.

Las pruebas de inmunodifusión e inmunolectroforesis, evidenciaron que la enzima en estudio mostró una sola arco de precipitación al ser enfrentada con el suero antibotrópico, demostrándose de este modo su antigenicidad. Así mismo, el veneno crudo en ambos ensayos reveló la presencia de varios componentes inmunogénicos correspondiente a los arcos de precipitación (Figura 5 A y B).

Deglicosilación de la proteína

La enzima demostró ser una glicoproteína debido a que presentó mayor movilidad electroforética luego de haber sido tratada con la PNGasa F. El peso molecular de la proteína deglicosilada parcialmente fue de 27 kDa a diferencia de la proteína nativa cuyo peso original fue de 48 kDa y de la tratada con 2 β -mercaptoetanol fue de 52 kDa dando un porcentaje en masa de carbohidratos de 45%. (Figura 6)

Actividad coagulante y amidásica de la enzima en estudio

La enzima demostró tener una acción similar a trombina al atacar el fibrinógeno bovino y el plasma humano citratado hasta la coagulación total. Al realizar la

comparación de las actividades de la enzima purificada con el veneno crudo sobre estos sustratos, se obtuvo un incremento de 37 veces para el fibrinógeno bovino y 38 veces cuando se emplea plasma humano citratado. (Tabla 2).

La dosis coagulante mínima sobre plasma (DCM-P) fue de 16,4 μg para el veneno crudo y de 1,5 μg para la enzima purificada mientras que la dosis coagulante mínima sobre fibrinógeno (DCM-F) fue de 18,2 μg para el veneno crudo y de 1,2 μg para la enzima purificada.

En cuanto a la actividad amidásica ó amidolítica sobre BApNA, la actividad de la enzima purificada fue 45 veces más que la del veneno crudo. En cambio la actividad sobre Chromozym TH, fue 12 veces mayor para la enzima purificada con respecto al veneno crudo (Tabla 2). Por otra parte, la enzima no mostró tener acción sobre caseína.

Potencia coagulante

La enzima similar a trombina del veneno de *B. barnetti* fue capaz de coagular el fibrinógeno bovino con una actividad específica de 131 Unidades NIH de trombina/mg, lo que equivale a una potencia 15 veces mayor que el veneno crudo cuya potencia coagulante fue de 8,3 Unidades NIH de trombina/mg. (Figuras 7 y 8).

pH óptimo

La enzima purificada mostró tener acción en el rango de pH de 7 a 9,5, teniendo su máxima actividad a pH 8,0 al usarse BApNA como sustrato. (Figura 9).

Efecto de la temperatura

La enzima purificada demostró tener una creciente actividad sobre BApNA en el rango de 25 °C a 40°C; mientras que a 60°C la enzima perdió al menos el 50% de su actividad. A 80 °C la EST pierde 93% de su actividad máxima en tanto que a 100°C la pérdida de actividad fue total. (Figura 10).

Efecto de inhibidores de proteasas

Se observó que la EST tuvo una inhibición cerca al 50% de su actividad con el PMSF (5 mM), mientras que con el inhibidor de tripsina de soya (1mg) presentó una inhibición del 20% y tan sólo un 6% con el glutatión (5 mM). No se registró inhibición con la heparina (5 U/ml), EDTA (5mM), TLCK (5mM) e Iodo acetato (5mM) (Tabla N° 3).

Reactividad frente al suero antiofídico

Las pruebas de inmunodifusión e inmunolectroforesis demostraron un reconocimiento de la enzima purificada por parte del suero antibotrópico polivalente observándose un solo arco de precipitación. Así mismo, se determinó la dosis eficaz del suero antibotrópico ante el veneno crudo de *B. barnetti* (146,7 µl de antiveneno/mg de veneno) y ante la EST purificada (250 µl de antiveneno/mg de proteína).

DISCUSIÓN

CONTENIDO DE PROTEICO

El veneno ofídico es una mixtura de componentes y quizás, sin temor a equivocaciones, sea uno de los fluidos secretados de más alta concentración proteica que un vertebrado pueda producir. Cerca del 90% de los componentes sólidos del veneno de una serpiente son proteínas y péptidos causantes de la mayoría de efectos tóxicos o biológicos producidos por la mordedura de este animal. La fracción no proteica, consiste en cationes y aniones inorgánicos, sustancias de bajo peso molecular tales como aminoácidos, péptidos pequeños, lípidos, nucleótidos, nucleósidos, carbohidratos y aminas. (Stocker, 1990).

B. barnetti presenta un contenido proteico menor (74% del peso seco) que los venenos de *L. muta* (85%), *B. brazili* (83%) y *B. atrox* (78%) y mayor con respecto a la ponzoña de *B. pictus* (69%). Es inmediato, entonces, manifestar que el contenido proteico varía de acuerdo a los géneros y especies pero, sin desmerecer lo dicho anteriormente, estas variaciones están mayormente atribuidas a factores propios de un mismo espécimen, es decir, la variación individual tales como: edad, dieta alimentaria, distribución geográfica y estación de año donde se recolecta el veneno (Chippaux, *et al.*1991).

Ejemplos claros de estas variaciones individuales son para el caso de *B. pictus* donde se reportó un contenido proteico de 92% (Liman, 1996) mientras que otro reporte señaló un contenido proteico de 63% (Cárdenas, 1993), otro ejemplo lo representa *B. atrox* donde Cárdenas (1993) reporta 69% de contenido proteico y Roncalla (1989) registro un valor de 42.8% de proteína y por último, *L. muta*

presentó un contenido proteico de 64% (Roncalla, 1989) y de 51% (Yarlequé, 1987) todos ellos utilizando el método de Lowry para la cuantificación proteica de las ponzoñas.

PURIFICACION DE LA ENZIMA

Es inherente en la caracterización bioquímica y/o molecular de una enzima la purificación de esta; en el caso de las proteínas presentes en los venenos de serpientes el aislamiento y purificación se hace mediante procedimientos cromatográficos. Un principio común en la purificación es el uso combinado de técnicas cromatográficas que permiten la separación de las proteínas aprovechando las características bioquímicas que cada una de ellas poseen.

Para el aislamiento de la EST de *B. barnetti* se empleó como primer paso una columna de intercambio catiónico (CM Sephadex C-50), donde la enzima fue eluída mediante la adición de NaCl 0,3M lo que indica la naturaleza básica de la proteína en estudio a pH 5,0; en este primer paso se obtuvo a la enzima 7 veces purificada con un rendimiento del 30%. El segundo paso consistió una resina de filtración molecular (Sephadex G-100), la enzima eluyó en el primer pico indicando que se trata de una proteína de un peso molecular cercano al límite de exclusión de la resina; y en este segundo paso se obtuvo a la enzima 45 veces purificada con un rendimiento del 14%. (Tabla 1)

La purificación de otras enzimas similares a trombina en venenos de serpientes peruanas involucró también el empleo de resinas de filtración molecular y de intercambio iónico; así por ejemplo, para la purificación de la EST de *B. pictus* se usó Sephadex G-100 como primer paso y un segundo paso en CM Sephadex C-50 obteniendo la enzima 18 veces purificada con un rendimiento del 30% (Mesia,

1996), el mismo procedimiento fue utilizado para la EST de *B. bilineatus* con una purificación de 24 veces y un rendimiento de 16% (Cahuana, 1996). En la purificación de EST de *B. brazili* se utilizó un primer paso en Sephadex G-100 y un segundo, en DEAE Sephadex A-50 con una purificación de 14 veces y un rendimiento de 21%. (Liman, 1996). En el aislamiento de la EST de *L. muta* peruana involucró un primer paso en Sephadex G-100 y una recromatografía en la misma resina para posteriormente pasar la enzima por DEAE celulosa, obteniéndose a la enzima 28 veces purificada con un rendimiento de 44% (Yarlequé, 1989); esta técnica fue modificada posteriormente al compararse las EST de los venenos de *L. muta* de Brasil y Perú, usándose Sephacryl S-200 y un sistema de HPLC ligado a agmatina, molécula sintética que es una arginina decarboxilada y permite el reconocimiento y asociación con las EST de estos venenos (Magalhaes *et al.*, 2003).

En el caso de *B. barnetti* se invirtió el proceso convencional de purificación debido a que la mayoría de los componentes del veneno son de alto peso molecular no permitiendo una buena separación parcial de la enzima. Por ello, utilizando la columna de intercambio iónico CM Sephadex C-50, como primer paso, se logró obtener menor cantidad de proteínas contaminantes de alto peso lo que condujo a la ulterior purificación de la enzima usando la columna de filtración Sephadex G-100, como segundo paso.

Otros procedimientos cromatograficos para purificar las EST fueron desarrollados utilizando las mismas resinas mencionadas (por ejemplo: Oyama and Takahashi, 2000; Lu *et al.*, 2000; Zhang *et al.* 1997; Smolka *et al.* 1998; Suzuki and Takahashi, 1984), sin embargo, en la actualidad el uso de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) y más aún la de afinidad se ha acentuado con fuerza debido a la eficacia en cantidad de muestra recuperada y el menor tiempo empleado en el

procedimiento (Ponce-Soto *et al.*, 2007). Así tenemos que, la capacidad que poseen las serinoproteasas para interactuar con la p-aminobenzamidina (De-Simone, 2005) ha permitido su uso en columnas de purificación con mejores resultados en cuanto a rapidez y rendimiento en el aislamiento de las ESTs de los géneros *Bothrops* y *Agkistrodon* (Silva-Junior *et al.*, 2007; Bortoleto *et al.*, 2002 y Braga *et al.*, 2007).

PUREZA Y PESO MOLECULAR

El análisis de la enzima hecha mediante PAGE–SDS (Figura 4) mostró una sola banda tanto en condiciones reductoras como no reductoras indicando que esta enzima presenta una sola cadena proteica, es decir, se trata de una proteína unicatenaria. De la misma manera, los análisis en geles de inmunodifusión e inmunolectroforesis (Figura 5) revelaron una solo arco de precipitación lo que no sólo indica la pureza de la enzima sino, su reconocimiento específico por el suero antiofídico.

En cuanto el peso molecular de la EST de *B. barnetti* esta fue de 52 kDa bajo condiciones reductoras y de 48 kDa en condiciones no reductoras indicando que se trata de un proteína de mediano peso molecular. Las diferencias obtenidas en el peso molecular se debe a que las enzimas similares a trombina poseen puentes disulfuro intracatenarios que por la acción del agente reductor 2β-mercaptoetanol, se rompen causando que la proteína se presente de manera lineal con mayor superficie que en condiciones nativas, retrasando, de esta manera, su movilidad electroforética (Castro *et al.*, 2004; y Mesia, 1996).

Actualmente, la electroforesis es la principal técnica utilizada para evaluar tanto la pureza como el peso molecular de una proteína. Los pesos moleculares de las

ESTs de *B. pictus*, *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. jararacá*, *B. insularis*, *Agkistrodon caliginosus*, *A. saxatilis*, *Trimeresurus stejnegeri*, *T. elegans* y *T. jerdonii*, han sido obtenidos solamente por medio de esta técnica mostrando el mismo comportamiento en diferencia de peso cuando son tratadas con un agente reductor (Mesia, 1996; Smolka, *et al.*, 1998; Bortoleto, *et al.*, 2002; Braga, *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2000; Koh, *et al.*, 2001; Zhang, *et al.*, 1997; Oyama and Takahashi, 2000 y Lu, *et al.*, 2000); no obstante, las técnicas de cromatografía de filtración, de HPLC entre otras también han sido empleadas en el cálculo del peso molecular como son los casos de *B. jararacussu*, *B. brazili*, *B. bilineatus*, *L. muta* y *Lachesis muta rhombeata* (Silva-Junior, *et al.*, 2007; Liman, 1996; Cahuana 1996; Yarlequé 1989 y Aguiar, *et al.*, 1996). Es conveniente aclarar que la técnica de cromatografía en filtración molecular sólo se puede utilizar para proteínas nativas y no para aquellas tratadas con agentes reductores por lo que su uso es cada vez más limitado. En comparación en la electroforesis con SDS se puede establecer con gran precisión los pesos moleculares y sus variaciones si es que las cadenas contiene puentes disulfuro que son afectados por el 2 β -mercaptoetanol, agente que no afecta la condiciones de corrida electroforética.

El peso de 52 kDa de la EST de *B. barnetti* (Figura 4), bajo condiciones reductoras, la coloca dentro del las de mayor peso encontrado en el grupo de enzimas coagulantes de origen ofídico; un análisis previo de la fracción coagulante para esta serpiente en condiciones nativas, realizado en columna cromatográfica Sephadex G-100 determinó un peso de 66,5 kDa. (Orejuela *et al.*, 1991). La EST de mayor peso molecular registrada hasta la fecha, por PAGE-SDS bajo condiciones reductoras, es la *Agkistrodon contortix contortix* con 71-76 kDa y la de menor peso es la del veneno de *Trimeresurus flavoviridis* con 24 kDa (Pirkle, 1998). En el caso de serpientes peruanas, se han reportado pesos moleculares menores a la EST de *B.*

barnetti, bajo condiciones no reductoras, así tenemos la EST de *L. muta* que registra un peso molecular de 40,2 kDa, *B. bilineatus* 45 kDa y la de *B. pictus* 45,5 kDa.

DEGLICOSILACION DE LA PROTEINA

Las determinaciones del peso molecular de una proteína por medio de electroforesis en PAGE-SDS posee un margen de error máximo de ~10%. Algunos tipos de proteínas pueden mostrar una migración atípica en esta técnica, por ejemplo, proteínas con puntos isoeléctricos muy extremos, o proteínas altamente glicosiladas (Lomonte, 2002).

Es muy conocido que las ESTs son glicoproteínas cuyo contenido de carbohidratos pueden llegar hasta un 36% (Pirkle, 1998 y Castro *et al.*, 2004). En este aspecto, la EST de *B. barnetti* presentó una reducción promedio de su peso molecular desde 48 kDa a 27 kDa cuando fue tratada con la enzima PNGase F, una glicosilasparraginasa recombinante, que rompe los enlaces entre la asparragina no terminales y los azúcares asociados a esta, desaminando la asparraguina a ácido aspártico pero dejando el oligosacárido intacto (Norris, 1994). Existe evidencia considerable que todos los carbohidratos presentes en una EST están ligados al aminoácido asparraguina (Silva-Junior *et al.*, 2007).

El análisis de carbohidratos con asociación de tipo N encontrados en EST tratadas con PNGasa F han permitido evaluar el diferente porcentaje de este tipo de glicosilación, *B. jararacussu* presenta un 42%, *B. leucurus*, 20%, *A. saxatilis*, 28% y *L. muta muta* 38% (Silva-Junior *et al.*, 2007; Magalhaes *et al.*, 2007; Koh, *et al.*, 2001 y Magalhaes *et al.*, 2003).

El tratamiento de EST de *B. barnetti* con PNGasa dio como resultado la deglicosilación mostrando dos bandas principales de 27 kDa y 25 kDa respectivamente, lo que representa un 45% de contenido aproximado de carbohidratos; siendo este el primer reporte donde se registra el mayor grado de glicosilación para este tipo de enzimas. Los diferentes grados de glicosilación son responsables de la microheterogeneidad de este tipo de proteasas, esta microheterogeneidad también se encuentran en las EST de vipéridos tales como: *Agkistrodon rhodostoma*, *Crotalus horridus horridus*, *Lachesis muta muta*, *Bothrops jararacá*, *Bothrops jararacussu* y *Bothrops. leucurus*. (Magalhaes *et al.*, 2007 y Petretski *et al.*, 2000).

ACTIVIDAD SIMILAR A TROMBINA

La característica más resaltante de las EST desde el punto de vista clínico, es la capacidad que tienen estas serinoproteasas de tener un efecto coagulante *in vitro* y un efecto anticoagulante *in vivo*. Este efecto se debe a que la fibrina obtenida por este proceso forma una malla amorfa muy inestable que rápidamente se degradada por acción proteolítica de la plasmina. Un hecho interesante, es la capacidad intrínseca del veneno ofídico para degradar su propio coágulo, tanto en plasma citratado como en fibrinógeno, esto debido a la presencia de proteasas del veneno (Lôbo de Araújo *et al.*, 2001).

El veneno crudo de *B. barnetti* presentó una DCM-P de 16,4 µg mientras que, para la misma especie, Rojas *et al.*,(2005) obtuvo una DCM-P de 21 µg. Como se mencionó en la parte de contenido proteico, la variabilidad individual se puede presentar también en las actividades enzimáticas, casos similares son obtenidos para el veneno crudo de especímenes de *B. alcatraz*, *B. atrox* y *Crotalus durissus*

uruima, cuyas actividades coagulantes difieren con la zona geográfica (Furtado, 2005; Cavinato *et al.*, 1998 y Dos-Santos *et al.*, 2005), donde se observa una mayor actividad sobre el plasma que sobre fibrinógeno para algunos especímenes y lo contrario para otros.

En comparación con la actividad coagulante de otras serpientes peruanas, el veneno crudo de *B. barnetti* presenta una alta DCM-P (16.4 μ g) con respecto a *B. atrox* y *B. brazili* 3,61 μ g y 7,39 μ g respectivamente y una baja DCM-P con respecto a *B. pictus*. 46,6 μ g (Rojas *et al.*, 2005). Esto quiere decir que la ponzoña de *B. barnetti* es menos coagulante que los veneno de *B. brazili* y *B. atrox* pero tiene una mayor actividad coagulante que la ponzoña de *B. pictus*.

Por otro lado, la actividad amidolítica de la enzima purificada sobre BApNA (1,046 unidades de actividad /mg de proteína) es inferior a la de *Lachesis muta* peruana (2,25 UA/mg de proteína) lo mismo ocurre con el sustrato específico para trombina Chromozym TH (actividad similar a trombina) con el cual se registro una actividad 10,6 UA/mg de proteína para *B. barnetti* y 12,75 UA/mg de proteína para *L. muta* (Yarlequé, 1989). Así mismo, comparando con otros vipéridos peruanos del género *Bothrops*, la enzima purificada de *B. barnetti* tiene una actividad amidolítica de 1,046 mayor que la de *B. pictus* (0,635), *B. bilineatus* (0,445) y de *B. brazili* (0,074) todas ellas expresadas en UA/ mg de proteína. (Mesia, 1996, Cahuana, 1996 y Liman, 1996.), esto debido al grado de purificación que se obtuvo en el presente trabajo (Tabla 1).

Todas las enzimas similares a trombina presentan importantes posiciones conservadas en su secuencia como lo son la triada de residuos en su sitio activo (His 57, Asp 102, Ser 195), y en los sitios específicos primario (S1) y secundario (S2), Asp 189 y Gly 126 respectivamente. La presencia de estos dominios

específicos garantiza la interacción de las enzimas similares a trombina para interactuar con sustratos cromógenicos como el TAME y el BApNA. (Castro, *et al.*, 2004). El Benzoil Arginil p-Nitroanilida (BApNA), es un modelo en miniatura de sustratos naturales, representa las uniones de la cadena A α del fibrinógeno, sobre la cual actúan las serinoproteasas como la trombina (Cahuana, 1996) mientras que, el Tosyl-Gly-Pro-Arg-4-nitranilina acetato, es un sustrato mucho más específico y exclusivo para trombina y las similares a trombina.

POTENCIA COAGULANTE

La acción coagulante de trombina o la enzima similar trombina se expresa en unidades NIH de trombina/mg de proteína. Una unidad esta definida como la cantidad de trombina capaz de coagular una muestra de 0,2 ml de plasma en un tiempo de 15 segundos a 37 °C. En el caso nuestro, se utilizó trombina bovina comercial de 250 unidades.

La potencia coagulante obtenida para el veneno crudo de *B. barnetti* usando fibrinógeno bovino como sustrato fue de 8,3 Unidades NIH de trombina/ mg de proteína, actividad un poco más alta a la obtenida por Castañon *et al.* (1993) quien reporta una actividad 7,08 Unidades NIH de trombina/ mg de proteína; esta diferencia, se puede atribuir a la variabilidad del veneno. Un resultado interesante fue el obtenido por Orejuela *et al.*, (1991) quienes utilizando también el mismo sustrato obtuvieron una actividad de 34 Unidades NIH de trombina/ mg de proteína con la fracción coagulante del veneno de *B. barnetti* pasado por una columna de Sephadex G-100 super fino.

La potencia coagulante de las ESTs purificadas están dentro de un rango 0,03 a 2000 Unidades NIH de trombina/ mg de proteína (Pirkle, 1998) y dentro del género

Bothrops, el rango va de 0,7 a 1100 unidades NIH de trombina/mg La enzima similar a trombina purificada en este trabajo fue capaz de coagular el fibrinógeno bovino con una actividad específica de 131 Unidades NIH de trombina/mg de proteína una potencia 15 veces más que el veneno crudo (8,3 unidades NIH de trombina/mg de proteína). Esta actividad es inferior a una de las isoformas de EST encontradas en *B. asper*, 551 y 316 NIH, (Ortiz *et al.*, 1976 y Fortova *et al.*, 1990); *B. atrox* 1100 NIH (Holleman, *et al.*, 1976) *B. jararaca* 814 NIH (Nishida *et al.*, 1994) y *Lachesis muta* peruana, 885.71 NIH (Yarlequé, 1989). Por otro lado, esta actividad es superior la ESTs de *B. alternatus*, 32,8 NIH (Smolka *et al.*, 1998); *B. jararacussu*, 73.4 NIH (Silva-Junior *et al.*, 2007) y una isoforma de EST de *B. moojeni* (Stocker and Barlow, 1976).

pH ÓPTIMO Y ESTABILIDAD TÉRMICA

La estructura y la función de la mayoría de las macromoléculas están notablemente influenciadas por el pH y la mayoría de ellas funcionan óptimamente a un pH determinado. Es conocido que la mayoría de las ESTs son óptimamente activas a pH cercanos a 8,0 y son estables a pH neutros y alcalinos. La enzima aislada en este trabajo demostró tener una actividad por encima del 50% desde un pH neutro (7,0) a moderadamente alcalino (9,5), con un valor óptimo a pH 8,0 usando como sustrato BApNA (Figura 9). Este mismo valor fue obtenido para EST de las serpientes peruanas *B. pictus*, (Mesia, 1996), mientras que para *B. bilineatus* y *B. brazili* peruanas el pH óptimo fue de 7,5 (Cahuana, 1996 y Liman, 1996) usando en ambos casos el mismo sustrato.

Estos valores de pH se asemejan a los reportados para enzimas similares a trombina como: la EST, BJ-48, de *B. jararacussu* que presenta un pH óptimo de 7,5

(Silva-Junior *et al.*, 2007), mientras que otra isoforma de esta enzima, la Jararacussin-I (Bortoleto *et al.*, 2002) tiene un pH óptimo de 8,0 usando ambos el sustrato artificial TAME, Calobin II un segundo tipo de EST de *Akistrodon caliginosus* tiene un pH óptimo de 8,0; la enzima coagulante del veneno de *B. insularis* tiene un pH óptimo de 7,4 (Selistre y Giglio, 1987), para cerastobina de *Cerastes vipera* y cerastocytina de *Cerastes cerastes* el pH óptimo fue de 7,9 y 9,0 usando como sustratos TAME y BApNA respectivamente (Labib *et al.*, 1981; Farid *et al.*, 1992 y El Asmar, 1992).

La EST del veneno de *L. muta* peruana actúa en un rango de pH de 6,5 a 8,5, siendo el pH óptimo para su actividad coagulante de 6,8 y para su actividad amidásica de 8,0 (Yarlequé, 1989).

El valor del pH óptimo varía de acuerdo con la enzima y los diferentes sustratos sobre los cuales ellas actúan. Valores bajos o altos de pH pueden causar desnaturalización proteica considerable y la consecuente inactivación enzimática. Por eso es muy útil saber en qué rango de pH la enzima es más estable, ya que el pH de máxima estabilidad no siempre coincide con el de máxima actividad.

La otra propiedad bioquímica ensayada a la enzima purificada fue la resistencia térmica donde la enzima tuvo una capacidad hidrolizante progresiva desde los 25°C hasta los 40 °C, manteniendo una actividad enzimática hasta los 60 °C por encima del 50%. Estos resultados nos ayudan a entender, desde un punto de vista fisiológico, la importancia de la estabilidad de la enzima en un rango determinado de temperatura debido a que los ofidios son animales que no pueden regular internamente su temperatura (poiquilotermos), lo que lleva a una necesaria adaptabilidad del contenido proteico glandular a los cambios de temperatura,

especialmente en aquellas serpientes que viven en zonas tropicales, y más aún para *B. barnetti* que habita la costa, sierra y selva norte peruana.

Para los casos de las ESTs purificadas de las serpientes peruanas se tiene que para *B. pictus* la actividad amidolítica se mantiene creciente hasta los 50 °C llegando a tener una actividad por encima del 50% hasta los 90 °C (Mesia, 1996); caso contrario sucede con la enzima de *B. brazili* cuya actividad máxima es hasta los 40 °C pero pierde rápidamente su actividad llegando a tener solamente el 17% de actividad a los 70 °C (Liman, 1997). La EST de *B. bilineatus* tiene alta actividad amidolítica entre los 37 °C y 45 °C mientras que la EST del veneno de *L. muta* peruana presenta actividad en un rango de temperatura desde los 37 °C a los 100 °C, siendo su temperatura óptima para su actividad amidásica de 45 °C, siendo esta más estable que su actividad coagulante (Yarlequé, 1989).

En cuanto a otras serpientes, BJ-48 de *B. jararacussu* presentó una actividad amidásica creciente desde los 25 °C hasta los 50 °C usando el BApNA como sustrato (Silva-Junior *et al.*, 2007), mientras que otra isoforma de esta enzima, la Jararacussin-I (Bortoleto *et al.*, 2002) tiene una actividad enzimática creciente desde los 4 °C hasta los 37 °C usando el sustrato artificial TAME, Calobin II *Akistrodon caliginosus* tiene un actividad creciente desde los 20 °C hasta 40 °C, la enzima coagulante del veneno de *B. insularis* mostró ser estable a 45 °C y 60 °C (Selistre y Giglio, 1987), para cerastobina de *Cerastes vipera* la temperatura óptima fue 45 °C (Farid *et al.*, 1989).

Es interesante notar que, para estas dos propiedades estudiadas, la enzima similar a trombina de *B. barnetti*, presentan una considerable estabilidad, especialmente en cuanto al pH, se sabe que, la forma en como este estructurada una proteína le va permitir una cierta adaptabilidad a los medios en donde ejerce su acción

catalizadora. Un ejemplo claro lo dan las fosfolipasas A_2 del veneno de las serpientes, ya que estas enzimas poseen un cierto número de enlaces disulfuros (S-S), lo que les permite tener la característica de ser termoestables hasta los 100 °C; la presencia de aminoácidos hidrofóbicos posicionados cerca del sitio activo puede ejercer también cierta estabilidad térmica (Stocker *et al.*, 1974).

Por otro parte, se ha llegado a establecer que la presencia de carbohidratos asociados a las ESTs les confieren no sólo la capacidad de una estabilidad térmica (Sharon, 1975) si no también, la estabilidad en ciertos rangos de pH (Silva-Junior *et al.*, 2007, Murayama *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en la deglicosilación han demostrado que la enzima similar a trombina del veneno de *B. barnetti* tiene una considerable cantidad de N oligosacáridos; estos carbohidratos estarían involucrados en su estabilidad térmica y de pH.

EFFECTOS DE ALGUNOS INHIBIDORES ENZIMÁTICOS

El uso de agentes químicos capaces de modificar diferentes tipos de grupos funcionales presentes en las enzimas, ha permitido clasificar a las enzimas proteolíticas en cuatro grupos: las serinoproteasas, aspártico-proteasas, cisteino-proteasas y metaloproteasas.

De esta manera se ha evaluado el efecto de algunos agentes inhibitorios de actividades enzimáticas con el objetivo de determinar y/o reforzar la pertenencia de la enzima similar a trombina al grupo de las serinoproteasas (Tabla 3).

El uso del EDTA, agente quelante que liga cationes divalentes, no tuvo efecto alguno sobre la acción de la EST, asumiendo de esta manera que la enzima no precisa de iones metálicos divalentes para su actividad. Del mismo modo, el

iodoacetato, agente alquilante que reacciona con los grupos sulfhidrilos de los restos de cisteína presentes en el centro activo de ciertas enzimas, no mostró un efecto inhibitorio alguno sobre la enzima purificada. Así mismo, el agente reductor 2 β -mercaptoetanol, capaz de escindir enlaces disulfuros, mostró una baja acción inhibitoria en la actividad de la EST, lo que conlleva a deducir que la enzima no depende de los enlaces disulfuros que posee para realizar su actividad catalítica. Además, la heparina, un inhibidor polisacárido que tiene su efecto sobre la formación de tromboplastina sérica, la transformación de protrombina en trombina y la del fibrinógeno en fibrina al interferir con la trombina, no tuvo efecto significativo de inhibición sobre la EST de *B. barnetti* (Tabla 3).

Por otro lado, la acción del glutatión, tripéptido requerido para la actividad de varias enzimas y que puede estar involucrado en la escisión de enlaces disulfuros presentes en una enzima (Barker, 1975), tuvo un efecto parecido a los dos agentes antes mencionados, no llegando a tener un efecto inhibitorio significativo a la concentración experimentada mientras que, el ácido glutámico no produce inhibición sobre la enzima lo que indica que este agente no es determinante en la actividad de la EST en estudio.

En contraste con lo anterior, el PMSF, agente que fosforila el grupo hidroxilo al aminoácido serina presente en el sitio activo de ciertas enzimas, mostró un marcado efecto sobre la EST del veneno de *B. barnetti*, reafirmando que se trata de una serinoproteasa. Por otra parte, el uso de el inhibidor de tripsina de soya logró también reducir la actividad de EST en estudio esto debido a que las ESTs son parte del grupo de la familia génica tripsina/ kalikreina con las cuales comparten una similitud principalmente en el dominio catalítico (Castro *et al.*, 2004). Sin embargo, el TLCK, un inhibidor específico para enzimas similares a tripsina, no tuvo

efecto inhibitorio sobre la enzima purificada, debido probablemente a la ausencia del aminoácido histidina en su centro activo.

El empleo del Fenil Metil Sulfonil Fluoruro (PMSF) y del Di-iso Propil Fluorofosfato (DFP) han permitido clasificar a las enzimas similares a trombina como serinoproteasas (Pirkle, 1998), de igual manera la benzamidina ha venido siendo utilizada como un agente inhibitorio específico para esta clase de enzimas (Cho *et al.*, 2001; Bortoleto *et al.*, 2002, Silva-Junior *et al.*, 2007). Al igual que la trombina, las EST no se ven significativamente inhibidas por los inhibidores clásicos de la tripsina, tales como el inhibidor de tripsina de soya (Castro *et al.*, 2004; Koh *et al.*, 2001) pero contrario a la trombina, la mayoría de las ESTs no son inhibidas por la antitrombina III, hirudina y heparina.

Comparando los resultados obtenidos en el presente estudio con las EST purificadas a partir del veneno de vipéridos peruanos tenemos que, la nula inhibición por parte los agentes EDTA, iodoacetato y TLCK se presenta de igual manera para *B. pictus*, *B. brazili*, *B. bilineatus* y *Lachesis muta*, mientras que una insignificante inhibición con 2 β -Mercaptoetanol coinciden para *B. pictus* y *B. brazili* mas no para *B. bilineatus* cuya EST no es inhibida.

La heparina, a altas concentraciones como 1250 U/ml y 166,66 U/ml, produce una severa inhibición para las EST de *B. pictus* y *B. bilineatus* respectivamente pero a la concentración utilizada en este estudio, 5 U/ml, la inhibición fue nula para *L. muta* *B. brazili* y la EST de *B. barnetti*. En cuanto al glutatión los resultados son parecidos con el de *L. muta* pero no con el ácido glutámico que si ejerce acción inhibitoria marcada para la EST de dicha serpiente.

En cuanto al inhibidor de tripsina de soya (1mg), tanto la actividad de la EST de *B. barnetti* como la *L. muta* se ven inhibidas en un 20%, sin embargo, las ESTs de *B.*

brazili y *B. bilineatus* no son afectadas por este agente. Por otra parte, el PMSF demostró ser un fuerte inhibidor para las ESTs de todas los vipéridos peruanos siendo la más sensible a este agente la EST de *B. brazili* ya que una concentración de 1mM redujo en un 47% la actividad enzimática mientras que la actividad de la EST de *B. barnetti* redujo en un 45% usando una concentración de 5 mM de este agente.

ANTIGENICIDAD DE LA ENZIMA PURIFICADA

La capacidad de una molécula de generar una buena respuesta inmunológica va a depender de diversos factores como su naturaleza química, tamaño y forma.

El veneno de *B. barnetti* demostró ser reconocido, mediante inmunodifusión e inmunolectroforesis, por el suero antitropico polivalente producido por el Instituto Nacional de Salud; de la misma manera, la enzima purificada fue reconocida como un agente antigénico lo que indica que esta proteína genera respuesta inmune contra su estructura (Figura 5); un resultado similar fue obtenido con la EST de *L. muta rhombeata* que también produce reconocimiento cuando se le enfrenta a un suero de origen equino producido por el Instituto Butantan de Brasil (Aguiar *et al.*, 1996)

La neutralización de la actividad coagulante del veneno fue de una dosis eficaz de 146,7 μ l de antiveneno/mg de veneno, un resultado diferente al encontrado por el equipo de Rojas *et al.*, (2005) quienes obtuvieron una dosis eficaz de 2000 μ l de antiveneno/ mg de veneno de usando el mismo tipo de antiveneno peruano contra la ponzoña de *B. barnetti*, sin embargo, el antiveneno polivalente producido por el Instituto Clodomiro Picado de Costa Rica mostró un dosis eficaz semejante al obtenido en el presente estudio, 156 μ l de antiveneno / mg de veneno (Rojas *et al.*, 2005). Estos resultados se atribuyeron a la presencia, en el antiveneno peruano, de

proteínas adicionales a las IgG del plasma equino, que en contacto, con las enzimas del veneno pueden liberar factores procoagulantes o proinflamatorios. Las diferencias encontradas de esa investigación con el presente estudio podría deberse a un diferente lote de antivenenos utilizados por nosotros y que obviamente tiene una elevada capacidad de reconocimiento de la EST de *B. barnetti* como un antígeno dentro del veneno.

En cuanto a la neutralización de la actividad coagulante de la enzima purificada esta fue más baja que la del veneno crudo (250 ul de antiveneno/ mg de enzima). Debemos señalar al respecto que es la primera investigación en la que se reporta la dosis neutralizante con respecto a una enzima purificada del veneno de una serpiente peruana y que además el menor valor obtenido con relación al veneno crudo, indicaría, que la neutralización de la actividad coagulante contra el veneno total no ocurre necesariamente contra una sola proteína sino contra algunos factores procoagulantes presentes en la ponzoña y que eventualmente mejoraría la respuesta neutralizante que se observa al utilizar el veneno crudo. Obviamente este tema debe ser más profundamente investigado en otro estudio.

CONCLUSIONES

1. El veneno de la serpiente *Bothrops barnetti* posee una enzima similar a trombina y es posible purificarla mediante dos pasos cromatográficos usando una columna de CM Sephadex C-50, seguida de una columna de Sephadex G100 a pH 5.0
2. Estructuralmente la enzima es una glicoproteína unicatenaria de mediano peso molecular (48 kDa) con actividad coagulante sobre plasma humano y fibrinógeno bovino y actividad amidolítica sobre BApNA y Chromozym TH.
3. La enzima es una serinoproteasa con una potencia coagulante equivalente de 131 NIH U/mg de trombina.
4. La enzima es estable en rango de pH de 7 a 9.5 con un pH óptimo de 8.0 y su actividad amidolítica es progresiva hasta los 40 °C y posee al menos un puente disulfuro.
5. El suero antitropico polivalente neutraliza la actividad coagulante del veneno de *Bothrops barnetti* y la enzima similar a trombina purificada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, A.S.; Alves, C.R.; Melgarejo, A. and Giovanni-De-Simone, S. 1996. Purification and partial characterization of a thrombin-like/ Gyroxin enzyme from Bushmaster (*Lachesis muta rhombeata*) venom. *Toxicon*, 34(5):555-565.

Ascencios, H. y Cutti, F., 1995. Distribución geográfica de la fauna ofídica ponzoñosa en el Perú." *Bol. Lima* N° 97, pp.91-96.

Barker R. 1975. Química orgánica de los compuestos biológicos. 1era ed. Barcelona: Edit. Alambra.

Baughman, D.J. 1970. Thrombin assay, In: *Methods in enzymology, proteolytic enzymes*. G.E. Periman & L. Lorand Eds. Academic Press. New York-London 19: 145-157.

Bortoleto, R.K.; Murakami, M.T.; Watanabe, L.; Soares, A.M. and Arni, R.K., 2002. Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Toxicon* 40: 1307–1312.

Boquet, P. 1979. History of snake venom research. In *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*. Edit. Board. Vol 52: 3-10.

Braga, M.; Martins, A.; Bezerra de Menezesa, D.; Barbosac,P.; Evangelistac, J.; Hikari, M.; Toyamad, D.; Fontelese, M. and Monteirob, H. 2007. Purification and biological activity of the thrombin-like substance isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon* 49: 329-338.

Braud, S.; Bon, C. and Wisner, A. 2000. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*. 82: 851-859.

Buffon, G. L. de: *Historie naturelle générale et particulière*. Paris: Imprimerie royale 1769-1770.

Cahuana, G. 1996. Características de un enzima coagulante aislada del veneno de la serpiente *Bothrops bilineatus* "Loro Machaco" y su comparación con una coagulasa bacteriana. Tesis para optar al título Profesional de Biólogo con Mención en Microbiología y Parasitología. UNMSM Lima Perú.

Campbell, J. and Lamar, W. 1989. *The venomous reptiles of Latin America*. New York:Crustock Publishing Associate. Pag.192 -197.

Cárdenas, J., 1993. Estudio proteico y enzimático en el veneno de tres especies de serpientes mantenidas en cautiverio. Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo. UNAS Arequipa- Perú.

Carrillo, N. e Icochea, J. 1995. Lista taxonómica de los reptiles vivientes del Perú. Publicaciones del Museo de Historia Natural, UNMSM. Serie A, N° 49, 27 pp.

Castañón, Y.; Zavaleta, A.; Salas, M.; Pancorbo, Z. y Rodríguez, M. 1993. Efectos letal, hemorrágico, coagulante, fosfolipásico y hemolítico de los venenos de las serpientes peruana *Lachesis muta muta* y *Bothrops barnetti*. *Bol. Soc. Quím. Perú* Lima 59 (2): 38-48.

Castro, H.C.; Zingali, R.B.; Albuquerque, M.G.; Pujol-Luz, M. and Rodrigues, C.R., 2004. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cell Mol. Life Sci*. 61: 843–856.

Cavinato, R.A.; Remold, H. and Kipnis, T.L. 1998. Purification and variability in thrombin-like activity of *Bothrops atrox* venom from different geographic regions. *Toxicon* 36: 257-267.

Charas, M.1685. La thériaque d'Andromachus. Paris: Laurent d'Houry.

Chippaux, J.; Williams, V. and White, J. 1991. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*. 29: 1279-1303.

Chippaux, J. 1998. Snake-bites: Appraisal of the global situation. *Bull. World. Org.* 76: 515-524.

Cho, S.Y.; Hahn, B.S.; Yang, K.Y. and Kim, Y.S., 2001. Purification and characterization of calobin II, a second type of thrombin like enzyme from *Agkistrodon caliginosus* (Korean viper). *Toxicon* 39: 499–506.

Copley, A. 1973. Studies of snake venoms on the blood coagulation. The thromboserpentin enzyme in the venoms. *Thrombos. Res.* 2: 487-508.

Denson, K. W. E., Rusell, F. E., Almargo, D. and Bishop, R. C. 1972. Characterization of the coagulant activity of some snake venoms. *Toxicon* 10: 557-562.

De-Simone, S., Correa-Netto, C.; Antunes O.; De-Alencastro, R. and Silva, Jr. 2005. Biochemical and molecular modeling analysis of the ability of two p-aminobenzamidine-based sorbents to selectively purify serine proteases (fibrinogenases) from snake venoms. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 822(1-2):1-9.

- Dos-Santos, M.C.; Assis, E.B.; Moreira, T.; Pinheiro, J. and Fortes-Dias, C. 2005. Individual venom variability in *Crotalus durissus ruruima* snakes, a subspecies of *Crotalus durissus* from the Amazonian region. *Toxicon* 46: 958-961.
- El Asmar, M. and Swanley, B. 1992. Coagulant components in *Cerastes cerastes* (Egyptian and sand viper) venom. *Toxicon* 26(9): 809-816.
- Erlanger, B.; Kokowsky, N. and Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys.* 95: 271-278.
- Farid, T. M.; Tu, A. and El Asmar, M. 1989. Characterization of cerastobin, a thrombin-like enzyme from the venom of *Cerastes vipera* (Shara sand viper). *Biochemistry* 28: 371-377.
- Fry, B. 2005. From genome to “venome”: Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Res.* 15: 403-420.
- Fontana, F. 1781. *Traité sur le Venin de la Vipère*, Florence. Quoted by Phisalix, M. 1940. In “*les Vipères de France*”. Paris: Stock.
- Fortova, H.; Dyr, J. and Suttner, J. 1990. Isolation of a fibrinogen-converting enzyme ficozyme from the venom of *Bothrops asper* by one-step affinity chromatography on Blue Sepharose. *J. Chrom;* 523: 312–316.
- Funk, C.; Gmur, J.; Herold, R. and Straub, P.W. 1971. Reptilase-R: A new reagent in blood coagulation. *Br J Haematology.* 21: 43.
- Furtado, M.F. 2005. Biological and immunological properties of the venom of *Bothrops alcatraz*, an endemic species of pit viper from Brazil. *Comp Biochem. and Physiol, Part C* 141: 117 – 123.

Graham, R.L.J.; Graham, C.; Theakston, D; McMullan, G. and Shaw C. 2008. Elucidation of trends within venom components from the snake families Elapidae and Viperidae using gel filtration chromatography. *Toxicon* 51(1): 121-129.

Gutiérrez, J. 2002. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. *Rev.Biol. Trop.* 50(2): 377-394.

Holleman W. and Weiss L. 1976. The thrombin-like enzyme from *Bothrops atrox* snake venom. Properties of the enzyme purified by affinity chromatography on p-aminobenzamidine-substituted agarose. *J. Biol. Chem.* 251: 1663–9.

Instituto Cloromido Picado. 2007. Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos. Manual de Laboratorio. Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica. Pág.21-22.

Kamaguti, A. and Cardoso, J. 1989 Haemostatic changes caused by the venoms of South American Snakes. *Toxicon* 27(9): 955-963.

Kini, R. 2005. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 34:200–204

Koh, Y.; Chung, K. and Kim, S. 2001. Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolytic serine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom. *Toxicon* 39(4): 555–560.

Labib, R.; Azab, M. and Farag, N. 1981. Effects of *Cerastes cerastes* and *Cerastes vipera* snake venom on blood coagulation: Separation of coagulant and anticoagulant factors and their correlation with arginine esterase and protease activities. *Toxicon* 19 (1): 85-90.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

Lamb, G. 1901. On the action of snake venom on the coagulability the blood. *Ind. Med. Gaz.* 36, 443-455.

Lehninger, A. 1982. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York.

Liman, J. 1996. Purificación y Caracterización parcial de la enzima similar a trombina del veneno de *Bothrops brazili*. Tesis para optar al título profesional de Biólogo con mención en Genética. UNMSM. Lima – Perú.

Lôbo de Araújo, A.; Kamiguti, A. and Bon, C. 2001. Coagulant and anticoagulant activities of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. *Toxicon* 39(2-3): 371-375.

Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. and Randall, R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275.

Lomonte, B. 2002. Manual de métodos inmunológicos. Universidad de Costa Rica 138 pp. Folleto mimeografiado. Capítulo 13: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida, pp.92-101.

Lu, Q.; Jin, Y.; Li, D.; Wang, W. and Xiong, Y. 2000. Characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Trimeresurus jerdonii*. *Toxicon* 38(9): 1225-1236.

Magalhaes, A.; Ferreira, R.; Richardson, M.; Gontijo, S.; Yarleque, A.; Magalhaes, H.; Bloch, C. and Sanchez, E. 2003. Coagulant thrombin-like enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snakes. *Comp Biochem Physiol B.* 136: 255-266.

Magalhães, A.; Magalhães, H.; Richardson, M.; Gontijo, S.; Ferreira, N.; Almeida, A. and Sanchez E. 2007. Purification and properties of a coagulant thrombin-like

enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 146(4):565-75

Martínez, C.; Bonilla, C. y Zavaleta, A. 1989. Acción hemolítica del veneno de la serpiente peruana *Bothrops barnetti* “macanche” sobre eritrocitos humanos. Bol. Soc. Quím. Perú 56: 1-12.

Meneses, O. 1974. Los Animales Venenosos y sus Peligros. Instituto de Salud Pública, Lima – Perú. Publicación Nº 2, pp. 3-14.

Mesia, M. 1996. Purificación y caracterización bioquímica de la enzima similar a Trombina del veneno de la serpiente *Bothrops pictus* “jergón de la costa”. Tesis para optar al título de Biólogo con Mención en Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. UNMSM. Lima – Perú.

Mitchell, S. and Reichert, E. 1883. Preliminary report on the venoms of serpents. Med. News (Philad.) 42: 469.

Murayama, N.; Saguchi, K.; Mentele, R.; Assakura, M.; Ohi, H.; Fujita, Y.; Camargo, A.; Higuchi, S. and Serrano, S. 2003. The unusual high molecular mass of *Bothrops* protease A, a trypsin-like serine peptidase from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbohydrate content. Biochim. Biophys. Acta 1652: 1–6.

Nishida, S.; Fujimura, Y.; Miura, S.; Ozaki, Y.; Usami, Y.; Suzuki, S.; Titani, K.; Yoshida, E.; Sugimoto, M.; Yoshioka, A. and Fukui H. 1994. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. Biochemistry; 33:1843–1849.

Noc, F. 1904. Sur quelques propriétés physiologiques des différents venins de serpents. Ann. Inst. Pasteur 18: 387-406.

Norris, G.; Stillman, T.; Anderson, B. and Baker, E. 1994. The three-dimensional structure of PNGase F, a glycosyl asparaginase from *Flavobacterium meningosepticum* Structure 2(11): 1049-1059.

Orejuela, P., Zavaleta, A., Salas., M., and Marsh, N. 1991. Thrombin-like activity in snake venoms from Peruvian *Bothrops* and *Lachesis* genera. Toxicon, 29(9): 1151-1154

Ortiz, F. and Gubensek, F. 1976. Isolation and some properties of blood clotting enzyme from the venom of *Bothrops asper*. Bull Inst Pasteur; 74:145–148.

Ouchterlony, O. and Nilsson, L. 1967. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Handbook of Experimental Immunology. I (34): 655-660.

Ouyang, C.; Teng, C. and Huang T. 1992. Characterization of snake venoms components acting on blood coagulation and platelet function. Toxicon 30(9): 945-966.

Oyama, E. and Takahashi, H. 2000. Purification and characterization of a thrombin-like enzyme, elegaxobin, from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishimahabu). Toxicon 38(8): 1087-1100.

Petretski, J.; Kanashiro, M.; Silva, C.; Alves, E. and Kipnis, T. 2000. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. Braz J Med Biol Res.33 (11):1293-300.

Pirkle, H. 1998. Thrombin-like enzymes from snake Venoms: An updated inventory. Thromb. haemost. 79: 675-683.

Ponce-Soto, L.; Bonfim, V.; Novello, J.; Navarro, R.; Yarlequé A. and Marangoni, S. 2007. Isolation and Characterization of a Serine Protease, Ba III-4, from Peruvian *Bothrops atrox* venom. The Protein Journal, Vol. 26 (6): 387-394.

Redi, F. 1664. Observatione Intorno Alle Vipera. Florence.

Roncalla, R. 1989. Efecto del ácido glutámico en venenos de serpientes de la Familias Crotalidae, Viperidae y Elapidae. Tesis para optar al Grado Académico de Bachiller en Ciencias Biológicas. UNAS. Arequipa- Perú.

Rojas, E.; Quesada, L.; Arce, V.; Lomonte, B.; Rojas, G. and Gutiérrez, JM. 2005. Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp. snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú and Costa Rica: preclinical assessment. Acta Trópica 93: 85-95.

Selistre, H. and Giglio, J. 1987. Isolation and characterization of a thrombin-like from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). Toxicon 25(11): 1135-1144.

Sharon, N.1975. Complex carbohydrates: Their chemistry, biosynthesis, and functions. Reading, Mass.: Addison-Wesley.

Silva-Junior, F.; Guedes, H.; Garvey, C.; Aguiar, A.; Bourguignon S.; Di Cera, E. and Giovanni-De-Simone S. 2007. BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the *Bothrops jararacussu* venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: Role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility Toxicon 50(1): 18-31.

Smolka, M. B., Marangoni, S., Oliveira, B., and Novello, J. C.1998. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. Toxicon 36(7): 1059–1063.

Stocker, K.; Christ, W. and Leloup, P. 1974. Characterization of the venoms of various *Bothrops* species by immunoelectrophoresis and reaction with fibrinogen. *Toxicon*. 12: 415-417.

Stocker, K. and Barlow, G. 1976. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin). *Methods Enzymol* 45: 214–23.

Stocker, K.; Fisher, H. and Meyer, J. 1982. Thrombin-like snake venom proteinases. *Toxicon*. 20(1): 265-273.

Stocker, K. 1990. *Medical Use of Snake Venoms Protein*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Suzuki ,T. and Takahashi, H. 1984. Purification of two thrombin-like enzymes from the venom of *Agkistrodon caliginosus* (kankoku-mamushi). *Toxicon* 22(1): 29-38.

Svendsen, L. 1977. Aktivitätsbestimmung proteolytischen enzyme mit synthetischen substanzen (Activity determination of proteolytic enzyme with synthetic substances). *Chromogene substrate in der Gerinnungsanalytik, Aktuelle Diagnostik*, Boheringer Mannheim. Pp 14-17.

Takahashi, T. and Ohsaka, A. 1970. Purification and characterization of a proteinase in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. Complete separation of the enzyme from hemorrhagic activity. *Biochim. biophys. Acta* 198: 293-307.

Warburg, O. and Christian, W. 1941. Isolierung and Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem.* 2(130): 384-421.

Yarlequé, A.; Campos, S.; Escobar, E.; Lazo, F.; Sanchez, N.; Hyslop, S.; Marsh, N.A.; Butterworth, P.J. and Price, R.G. 1989. Isolation and characterization of a

Fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake *Lachesis muta muta* (Peruvian bushmaster). *Toxicon*, 27(11): 1189-1197.

Yarlequé; A. 1989. Enzima similar a trombina del veneno de la serpiente *Lachesis muta*: Aislamiento, caracterización bioquímica y acción biológica. Tesis Doctoral UNMSM, Lima Perú.

Yarlequé. M. 1987. Estudio comparativo de algunas propiedades bioquímicas en venenos de las serpientes de las familias: Crotalidae, Viperidae y Elapidae. Tesis para optar al Grado Académico de Bachiller en Ciencias Biológicas. URP Lima-Perú.

Zhang, Y.; Gao, G.; Lee, W.; Zhu, S.; Xiong, Y. and Wang, W. 1997. Characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from *Trimeresurus stejnegeri* venom, and comparative study with other venom proteases. *Toxicon* 36(1): 131-142.

Zavaleta, A., Salas, M., 1996 Ofidismo: envenenamiento por mordeduras de serpientes. En: Martínez-Villaverde, J.R., León-Barúa, E., Vidal-Neira, L., Losno-García, R. (Eds), Emergencias en medicina interna. Lima Perú, pp 241-260.

TABLAS Y FIGURAS

Figura 1.. *Bothrops barnetti*
“sancarranca”



Figura 2. PRIMER PASO DE PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA SIMILAR A TROMBINA DEL VENENO DE *Bothrops barnetti* POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO CM SEPHADEX C-50

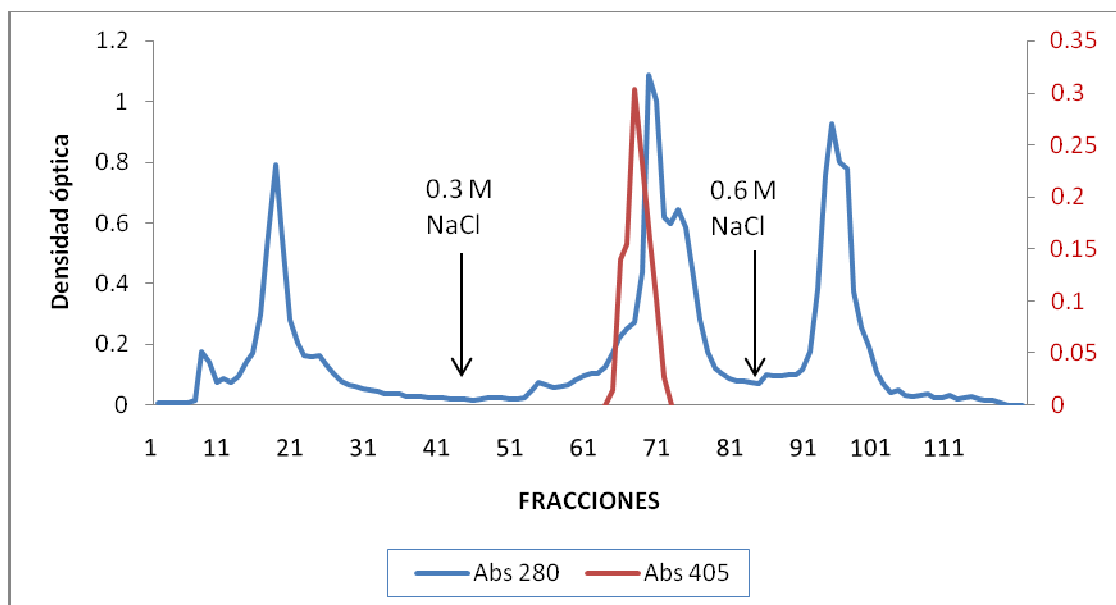


Figura 3. SEGUNDO PASO DE PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA SIMILAR A TROMBINA DEL VENENO DE *Bothrops barnetti* POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN MOLECULAR SEPHADEX G-100.

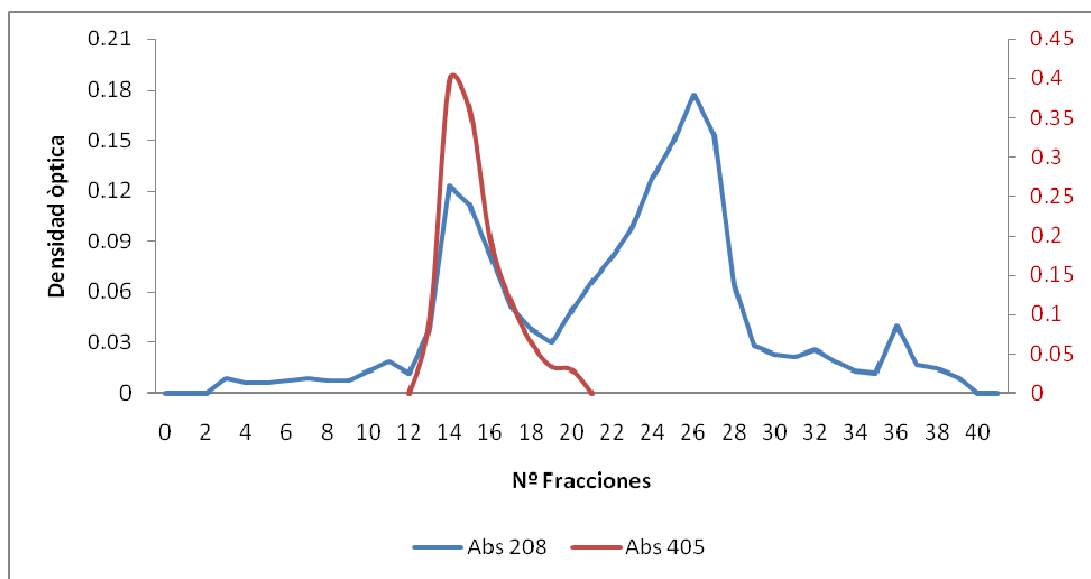
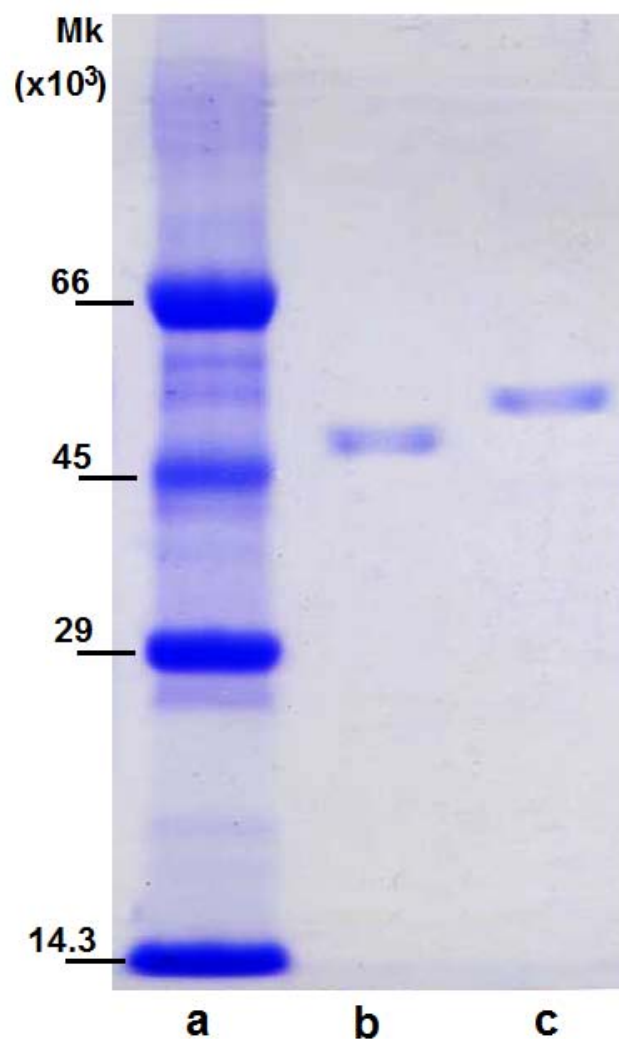


Tabla 1. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA SIMILAR A TROMBINA DEL VENENO DE *Bothrops barnetti* "sancarranca".

Muestra	Proteína		Actividad específica*	Unidades totales de Actividad	Rendimiento (%)	Purificación
	Cantidad (mg)	%				
Inicial (veneno crudo)	143.78	100	0.02	3.31	100	1
1er paso CM-Sephadex C-50	6.31	4.39	0.16	1.02	30	7
2do paso Sephadex G- 100	0.35	0.25	1.05	0.43	14	45

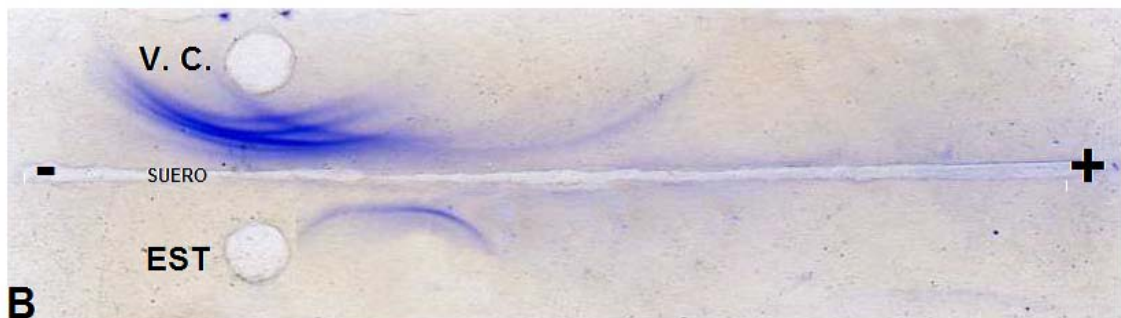
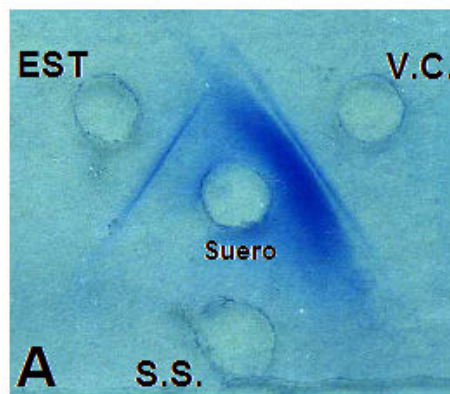
*Actividad específica: Unidades de actividad (μ moles de pnitroanilina liberada/ minuto)/ mg proteína)

Figura 4. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON SODIO DODECIL SULFATO (PAGE-SDS) DE LA ENZIMA SIMILAR A TROMBINA DEL VENENO DE *Bothrops barnetti*



- (a) Marcadores de peso molecular albúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y lisozima (14,3 kDa).
- (b) EST en condiciones no reductoras (48 kDa).
- (c) EST en condiciones reductoras(52 kDa).

Figura 5. ANTIGENICIDAD DE LA ENZIMA SIMILAR A TROMBINA DEL VENENO DE *Bothrops barnetti*.



EST: enzima similar a trombina, V.C: veneno crudo S.S: solución salina.

(A) Inmunodifusión.

(B) Inmunoelectroforesis.

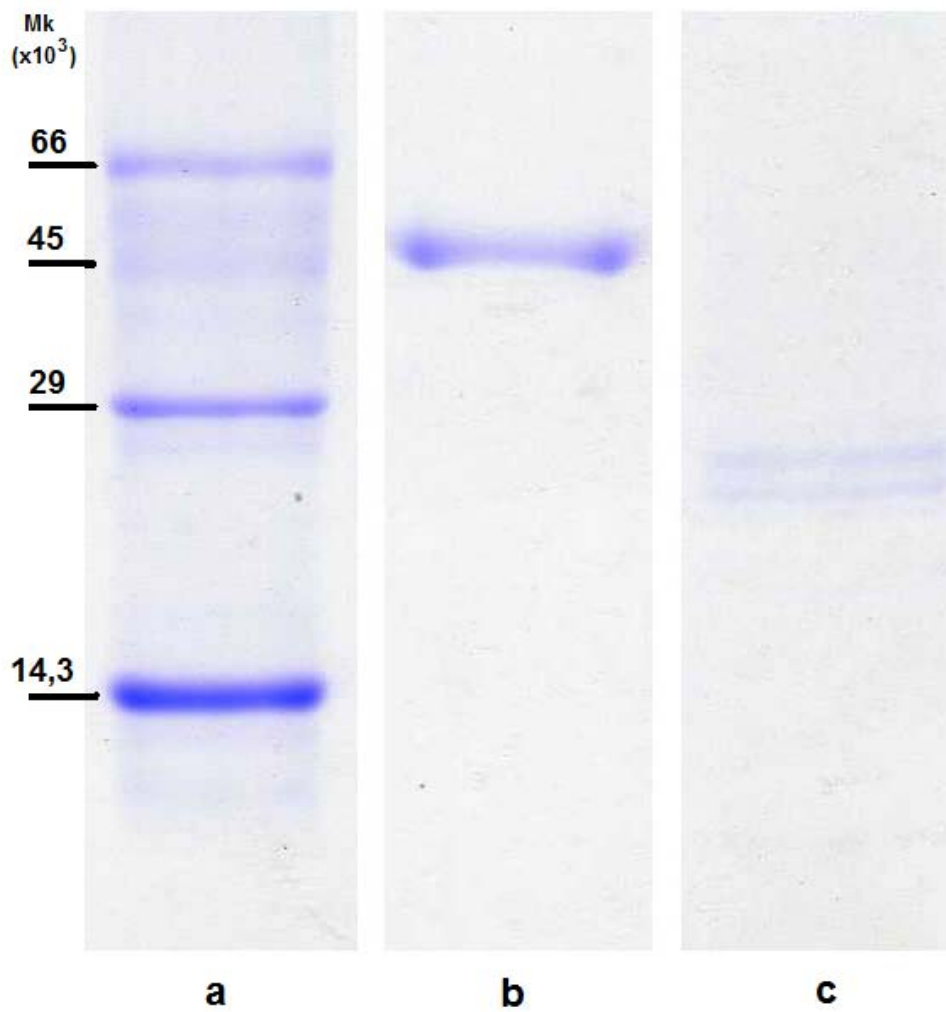
Tabla 2 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DEL VENENO Y LA ENZIMA SIMILAR A TROMBINA PURIFICADA DE *Bothrops barnetti*.

Sustrato	pH	Actividad Específica (UA/ mg de proteína)		Incremento de Actividad (veces)
		Veneno	EST	
Fibrinógeno bovino	7.4	0.64 ¹	23.88 ¹	37.3
Plasma humano	7.4	0.69 ¹	26.66 ¹	38.6
BApNA	8.0	0.02 ²	1.05 ²	45
Chromozym TH	8.3	0.81 ²	10.6 ²	12

UA: ¹Inversa del tiempo de coagulación en segundos

²(μ moles de pnitroanilina liberada/ minuto)

Figura 6.DEGLICOSILACIÓN DE LA ENZIMA SIMILAR A TROMBINA DE *Bothrops barnetti*.



- (a) Marcadores de peso molecular albúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y lisozima (14,3 kDa)..
- (b) Enzima nativa
- (c) Enzima tratada con PNGasa F

Figura 7. POTENCIA COAGULANTE DEL VENENO DE *Bothrops barnetti*.

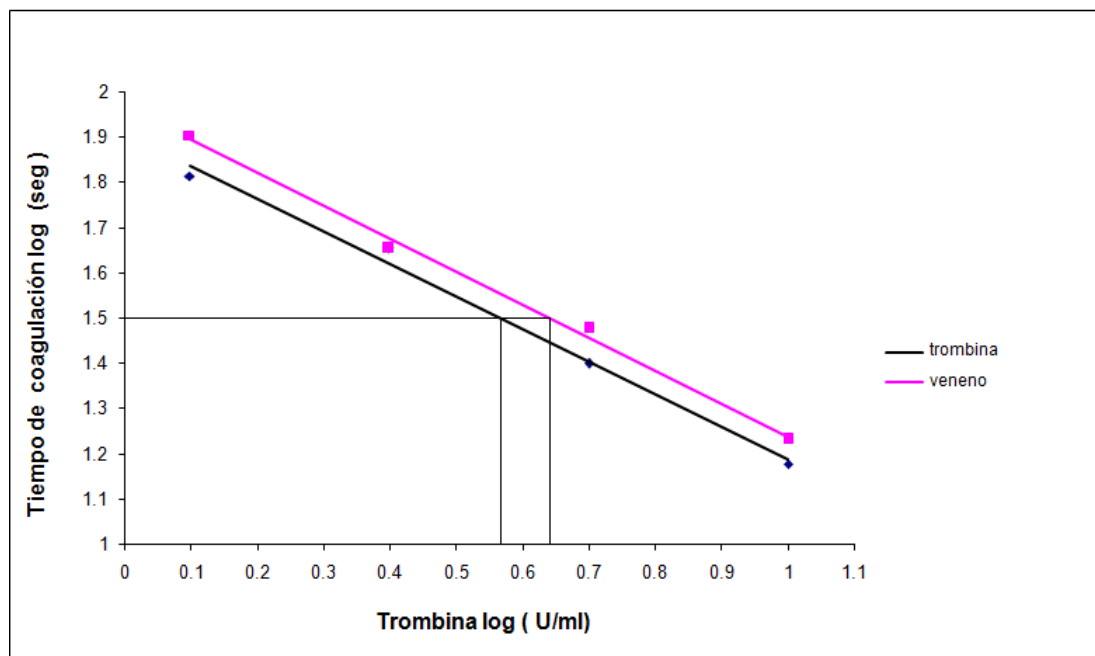


Figura 8. POTENCIA COAGULANTE DE LA ENZIMA SIMILAR A TROMBINA DEL VENENO DE *Bothrops barnetti*.

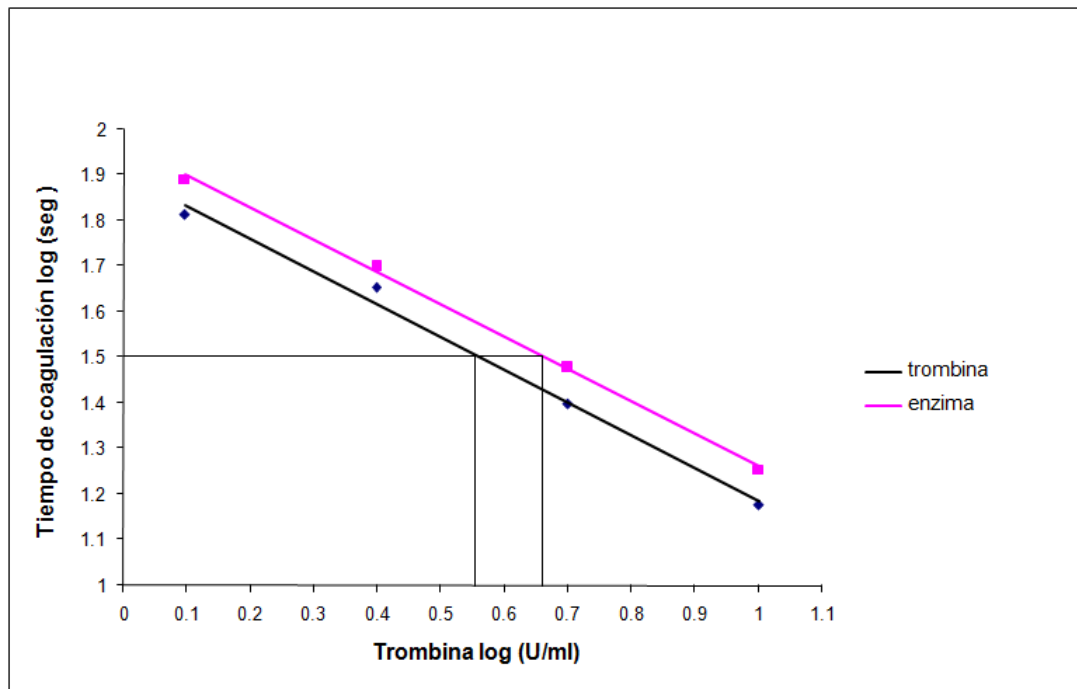


Figura 9 CURVA DE ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SIMILAR A TROMBINA DEL VENENO DE *Bothrops barnetti* A DIFERENTES pH.

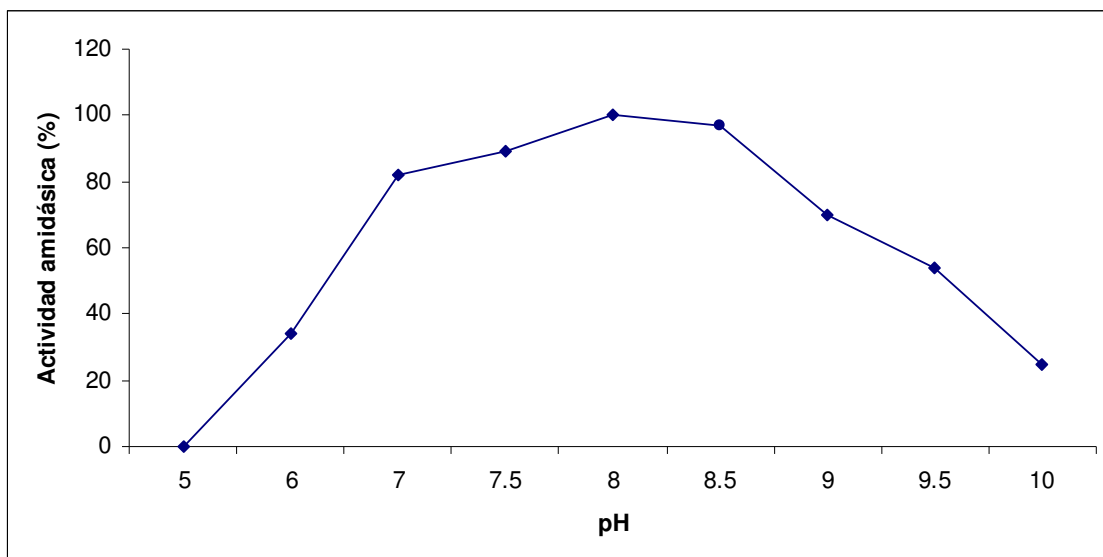


Figura 10. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SIMILAR A TROMBINA DE *Bothrops barnetti*.

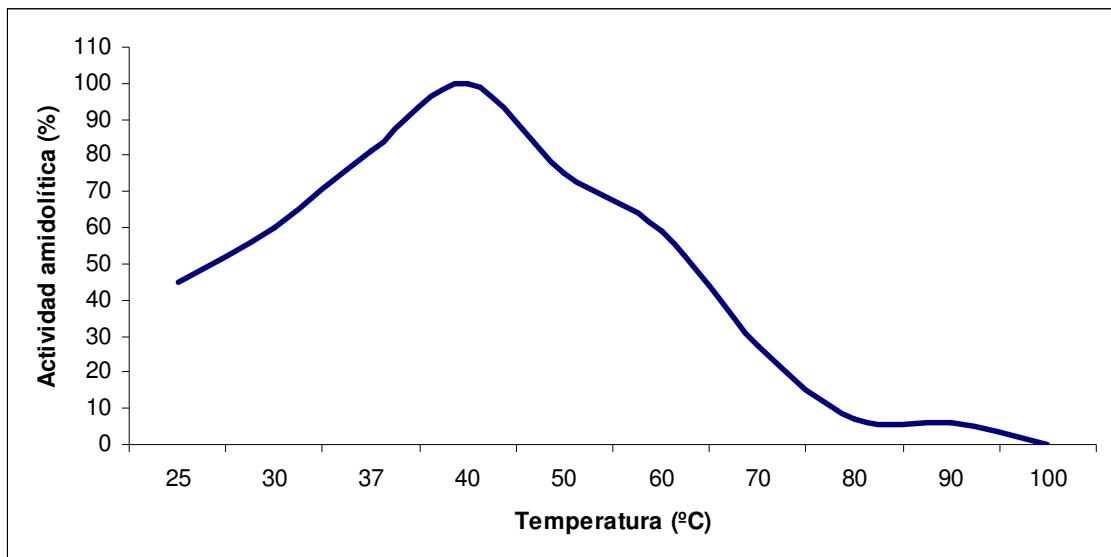


Tabla 3. EFECTO DE ALGUNOS INHIBIDORES DE PROTEASAS SOBRE LA ENZIMA SIMILAR A TROMBINA DE *Bothrops barnetti*.

Agente	Concentración Final	Actividad (%)
Control	-	100
PMSF	5mM	55.3
Inhibidor de tripsina de soya	1 mg	80.4
EDTA	5mM	115.6
TLCK	5mM	118.2
Glutation	5mM	94.5
Iodo acetato	5mM	119
Ácido glutámico	5mM	109.8
Heparina	5 unidades	95.1
2 β -mercaptoetanol	5 Mm	97.2