

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE UNA
TROMBINA LIKE CON ACTIVIDAD SERINO PROTEASA DE**

***Bothrops roedingeri* JERGÓN DE LA COSTA - 2018**

TESIS

PRESENTADA POR:

Br. JHONATAN JOSE MACHACA YUCRA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

PUNO – PERÚ

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

CARACTERIZACION ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE UNA TROMBINA-LIKE CON ACTIVIDAD SERINO PROTEASA DE *Bothrops roedingeri* JERGÓN DE LA COSTA - 2018

TESIS PRESENTADA POR:


Br. JHONATAN JOSE MACHACA YUCRA

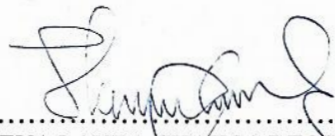
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:


LICENCIADO EN BIOLOGÍA

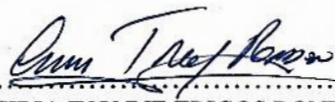
APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:



PRESIDENTE : 
D.Sc. DANTE JONI CHOQUEHUANCA PANCLAS

PRIMER MIEMBRO : 
Blgo. EVA LAURA CHAUCA DE MEZA

SEGUNDO MIEMBRO : 
Mg. DANTE MAMANI SAIRITUPAC

DIRECTOR / ASESOR : 
Mg. CIRIA IVONNE TRIGOS RONDÓN

ÁREA : Ciencias Biomédicas
TEMA : Biología Molecular

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 28 DE DICIEMBRE DE 2018

DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado la vida y terminar esta hermosa profesión, mostrándome su mano en diferentes circunstancias de la vida dándome a conocer los designios de la vida, la verdad y el camino hacia el a través, de sus sagradas palabras y sus principios.

A mis padres Juan Cancio y Olga Mauricia, quienes me dieron la vida, protección y aliento en momentos donde ya no parecía haber salida por guiarme con sabiduría y ejemplo en cada momento.

A mí querida familia Tania, Ana, Sandra y Axel, por su gran apoyo a cada instante y por los momentos inolvidables que afrontamos frente a las adversidades de la vida juntos y seguiremos persistiendo a las pruebas remitidas en el camino de este mundo.

Al Ph. D. Luis Alberto Ponce Soto, gran maestro, por enseñarme que el camino de la investigación nunca termina rompiendo paradigmas, brindarme apoyo, asesoría, tiempo y orientación para el presente trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTOS

- A mis maestros y maestras de mí querida escuela profesional de biología, así como a la carrera misma por acogerme durante toda la etapa de mi formación académico profesional.
- A mi presidente de tesis Dr. **Dante Joni Choquehuanca Panclas**, y a los miembros del jurado **Blgo. M. Sc. Eva Laura chuca de Meza** así como al **Mg. Dante Mamani Sairitupac**. Por sus invaluable apreciaciones y correcciones para la mejora del presente trabajo.
- Un agradecimiento especial y con gratitud eterna para la directora de la presente investigación **Mg. Ciria Ivonne Trigos Rondón**, por su desinteresada ayuda, comprensión y colaboración para el desarrollo del trabajo de investigación.
- Al **Ph. D. Luis Alberto Ponce Soto**, Director de investigación de la Universidad Católica Santa María de Arequipa por tener el desprendimiento y la generosidad de abrirme las puertas del laboratorio de química de proteínas junto con el Laboratorio de Química de espectrometría de masas del Instituto de Thomson UNICAMP, Campinas, Sao Paulo-Brasil. Su apoyo fue fundamental para el desarrollo de este trabajo, por la enseñanza impartida sobre química de proteínas con mi personas todo fue suficiente para sobredimensionas el presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	pág.
RESUMEN	13
ABSTRACT.....	14
I. INTRODUCCIÓN	15
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	18
2.1 ANTECEDENTES.....	18
2.2 MARCO TEÓRICO	22
2.3 MARCO CONCEPTUAL.....	47
III. MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1 ÁREA DE ESTUDIO	49
3.2 TIPO DE INVESTIGACIÓN	49
3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	49
3.4. METODOLOGÍA	50
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
V. CONCLUSIONES.....	83
VI. RECOMENDACIONES.....	85
ANEXOS	99

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Ubicación geográfica de la especie <i>Bothrops roedingeri</i> en la costa (Marcado con rojo) (Adoptado de Valeriano et al., 2012).....	27
Figura 2: <i>Bothrops roedingeri</i> – Familia Viperidae (adaptado de Ministerio de salud, 2000).....	28
Figura 3: Esquema de activación de la cascada de coagulación por las vías intrínseca, extrínseca y común. Adaptado de (Mosier, 2007).....	36
Figura 4: Esquema de la fibrinólisis. El activador de plasminógeno tisular es liberado por las células endoteliales. (Adoptado de Espitia, 2015)	38
Figura 5: (A) Estructura de saxtrombin (serinoproteasa trombina-simili aislada de <i>Gloydius saxatilis</i>) destacando la posición de los residuos de aminoácidos (B). Las triadas catalíticas, His57, Asp102 y el residuo reactivo Ser195 respectivamente. (Ilustración modificada: Ma <i>et al.</i> , 2005)	40
Figura 6: Algunas serinoproteasas del veneno de serpientes actuando en la cascada de coagulación (Basada en Marckland, 1998).....	41
Figura 7: Degradación del fibrinógeno (Adoptado de Zaganelli et al., 1996).....	46
Figura 8: Perfil cromatográfico de purificación del veneno total de <i>Bothrops roedingeri</i> en una columna de Sephadex G-75. 50 mg. Del veneno total, fueron homogenizados en 1.0 mL. De tampón bicarbonato de amonio 0.2 M pH=7.8. flujo constante de 0.3 ml/min. Y monitoreada a 280nm. Laboratorio Thomson de espectrometría de masas del instituto de química UNICAMP- Sao Paulo, Brasil (junio-octubre 2018).	61

- Figura 9: Cromatografía de la fracción TLBroed (trombina “like”) en fase reversa, en una columna μ -Bondapack C-18, equilibrada en solución de TFA 0.1% (Tampón A). La muestra aplicada fue de 1 mg de material obtenido en la columna de exclusión molecular. Tampón A: TFA 0,1% Tampón B: Acetonitrilo (20, 40 y 60%) en TFA 0,1% Flujo mL /min. Absorbancia 280 nm. Laboratorio Thomson de espectrometría de masas del instituto de química UNICAMP- Sao Paulo, Brasil (junio-octubre 2018) 64
- Figura 10: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SD). En a) marcadores de masa molecular. En b) la TLBroed en condiciones reductoras. Laboratorio de química de proteínas UCSM- Arequipa (junio-septiembre 2018) 66
- Figura 11: Espectro ESI MS/MS (conteniendo 13 residuos aminoacídicos antes de R) reflejan la región N-terminal de TLBroed a partir del veneno de *Bothrops roedingeri*. Laboratorio Thomson de espectrometría de masas del instituto de química UNICAMP- Sao Paulo, Brasil (junio-octubre 2018). 68
- Figura 12: Actividad proteolítica de las fracciones obtenidas de la cromatografía del veneno total de *Bothrops roedingeri* en cromatografía HPLC-fase reversa. El perfil de la actividad proteolítica fue monitoreado en la absorbancia de 405 nm. (*) serino proteasa TLBroed (Proteína que será considerada las caracterizaciones fisicoquímicas y biológicas). Laboratorio Thomson de espectrometría de masas del instituto de química UNICAMP- Sao Paulo, Brasil (junio-octubre 2018)..... 70

- Figura 13: SDS-PAGE (12.5%). Análisis de degradación de fibrinógeno bovino por acción de la TLBroed en diferentes tiempos: 0:15, 0:30, 1:00, 2:00, 3:00, 6:00, 12:00 y 24:00 horas, fueron incubados a 37°C. Tenemos fibrinógeno como control a 0 minutos mostrando la presencia de cadenas α , β , y γ . Liberación de fibrinopeptidos A, a las 2 horas liberación de fibrinopeptidos B a las 1 horas. Laboratorio de química de proteínas UCSM-Arequipa (junio-septiembre 2018). 71
- Figura 14: Efecto inhibitorio de la actividad proteolítica de la TLBroed frente a PMSF, EDTA y SBTI. Las enzimas fueron incubadas en la presencia o ausencia de inhibidores por 40 minutos a 37°C. y la lectura de absorbancia fue monitoreada en 405nm. La actividad se expresa como porcentaje de la velocidad de reacción (%), y fue calculada basada en la p-nitroanilida liberada después de la catálisis..... 73
- Figura 15: Análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de la trombina “like” de *Bothrops roedingeri* (TLBroed) con otras serinoproteasas semejantes obtenidas de la base de datos BLAST-Protein Data Bank (Pubmed-Medline) donde las regiones con bordes amarillos representan a los aminoácidos que componen el sitio catalítico de esta clase de enzimas. Donde las regiones de anaranjado indican los residuos de cisteína y la de azul indican a los aminoácidos que establecen la región N-terminal. Laboratorio de química de proteínas UCSM-Arequipa (junio-septiembre 2018)..... 75

- Figura 16: Árbol de relación entre algunas SVTLE's. elaborado mediante el programa MegAling, la TLBroed forma un clúster con las demás SVTLE's. del mismo género lo que evidencia un origen común. Laboratorio de química de proteínas UCSM-Arequipa (junio-septiembre 2018)..... 77
- Figura 17: Perfil hidropático de la región N-terminal de la trombina “like” de *Bothrops roedingeri* (TLBroed). Elaborado mediante el programa Protean. Laboratorio de química de proteínas UCSM-Arequipa (junio-septiembre 2018)..... 79
- Figura 18: Análisis del punto isoelectrico a través de la herramienta Protean de DNASTAR. Laboratorio de química de proteínas UCSM-Arequipa (junio-septiembre 2018)..... 82
- Figura 19: Procedimiento de espectrometría de masa en TADEM Electrospray (ESI) y cromatografía HPLC-Fase Reversa con la colaboración del laboratorio Thomson de espectrometría de masas del instituto de química de la Universidad del estado de Campinas-SP Brasil, bajo la responsabilidad del Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D. 100
- Figura 20: Laboratorio de Química de Proteínas de la Universidad Católica de Santa María – Arequipa. Con la colaboración del Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D 101

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Principales serpientes venenosas del Perú (Yarleque, 2000)	24
Tabla 2: Características diferenciales entre serpientes venenosas de dos familias importantes en el Perú. (MINSA, 2000)	25
Tabla 3. Factores de coagulación, vías o sistemas en que participan en sus respectivas funciones. (Moran y Viele, 2005).....	34
Tabla 4: Clasificación de las proteasas de acuerdo con la naturaleza de sitios activos. (Neurath, 1984)	39
Tabla 5: Resumen descriptivo de las diferencias y similitudes entre la trombina y las trombina-like de veneno de serpientes.....	43
Tabla 6: Análisis de identidad comparativo en porcentajes de la trombina “like” de <i>Bothrops roedingeri</i> (TLBroed) con otras serinoproteasas aisladas de diferentes especies. Elaborado mediante el programa MegAlign v. 8.1. Laboratorio de química de proteínas UCSM-Arequipa (junio-septiembre 2018)	76
Tabla 7: Composición de aminoácidos de trombina “like” aislado de <i>Bothrops roedingeri</i> (TLBroed). Los valores son expresados en mol de aminoácidos por mol de proteína Laboratorio de química de proteínas UCSM-Arequipa (junio-septiembre 2018).....	80

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

ADP	Adenosina-difosfato
APC	Proteína C
APS	Proteína S
AT	Antitrombina
C18	18 Carga alta de carbono, alta actividad de silice.
DFP	Diisopropil fluorofosfato
DL-BApNA	N α -Benzoil-DL-Arginil ρ -Nitroanilida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGTA	Ácido glicol-bis (2 aminoetileter) -N,N,N,N-tetracético
ESI-QTOF-MS/MS	Ionización por Electrospray – cuádruplos por tiempo de vuelo- espectrometría de masas/ espectrometría de masas
FB	Fibrinógeno bovino
FL	Fosfolípidos
FP-A	Fibrinopeptidos A
FP-AB	Fibrinopeptidos AB
FP-B	Fibrinopeptidos B
FT	Factor tisular
GpIb	Glicoproteína Ib
HMWK	Cinínógeno de alto peso molecular
HPLC-RP	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia - Fase Reversa
kDa	kilo Dalton

Milli Q	Agua destilada, aspirogenica, desnionizada y con una electrocond- actividad controlada, purificada con filtros waters.
MS/ESI	Espectrometría de masa/Ionización por Electrospray
OMS	Organización Mundial de la salud
PAF	Factor activador de plaquetas
PAR1	Receptor activador de protease 1
PAR4	Receptor activador de protease 4
pH	Potencial hidrogenionico
pI	Punto isoelectrico
PITC	Fenilisotiocianato
PMID	Identificador PubMed
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto, Fluoreto de Fenilmetilsulfonilo
p-NA	p-nitroanilida
PSA	Persulfato de amonio
SDS	Dodecil sulfato de sodio, Lauril sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de poliacrilamida en presencia de Dodecil Sulfato de Sodio.
Superdex G-75	columna de exclusión molecular con matriz compuesta de dextrano y agarosa
SVTLE's	Enzima trombina like de veneno de serpientes
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilenodiamino
TFA	Ácido Trifluoracético
TLBroed	Trombina like Bothrops roedingeri
μ-Bondapak C18	Columna de HPLC con n-octadeci como base de la fase estacionaria

RESUMEN

La investigación fue realizada en el Laboratorio de Química de Proteínas de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa; en colaboración el laboratorio Thomson de Espectrometría de masas del Instituto de Química de la Universidad del Estado de Campinas-Sao Paulo, Brasil, de junio a setiembre del año 2018. El empleo de serinoproteasas de veneno de serpientes, podría tener en el futuro uso como terapia coagulante. El objetivo principal fue Caracterizar estructural y funcionalmente una isoforma de serino proteasa con actividad trombina “like” procedente del veneno de *Bothrops roedingeri* (Katari). La metodología aplicada fue: la purificación del veneno de serpiente se ha empleado dos pasos cromatográficos de exclusión molecular Superdex G-75 y cromatografía de fase reversa; la caracterización físico-química mediante electroforesis y espectrometría de masas en Tadem Electrospray (ESI); la actividad enzimática mediante el método DL- BapNA, PMSF y test de degradación del fibrinógeno; la caracterización estructural y análisis bioinformático a través de la plataforma, Swiss-Prot (NCBI-BLAST) y el software DNASTar. Resultados: se obtuvo una serinoproteasa mediante cromatografía de exclusión molecular mostrando 4 picos de actividad serinoproteasa de los cuales el pico II mostro mayor actividad a la cual se denominó TLBroed; con un peso molecular de (27 KDa.), se obtuvo la secuencia N-terminal VIGGDECNINEHR, con acción proteolítica registrando las constantes ($V_{max} = 4.006 \times 10^{-2}$ nmoles/min), con acción inhibitoria del (43.34±1,5 %) frente a PMSF y actividad fibrinogenolítica hidrolizando la cadena α y β ; y para finalizar TLBroed fue secuenciada mostrando homología con otras serinoproteasas tales como Venombin A 100%, bilineobin 66.7%, Crotalasa 78.5%, Pictobin 73.7%, Gyroxin 71.9%, Collenein-1 71.5%. En conclusión, se purifico una serinoproteasa con actividad trombina-like (TLBroed) del veneno de *Bothrops roedingeri* mostrando esta actividad proteolítica y fibrinogenolítica y se caracterizó mediante análisis bioinformático a la TLBroed siendo esta similar en su estructura aminoacídica a otras serinoproteasas.

Palabras clave: Trombina like, *Bothrops roedingeri*, serinoproteasa, SDS-PAGE, HPLC- fase reversa.

ABSTRACT

The research was carried out in the Protein Chemistry Laboratory of the Catholic University of Santa María of Arequipa; in collaboration with the Thomson Mass Spectrometry Laboratory of the Chemistry Institute of the State University of Campinas-Sao Paulo, Brazil, from June to September of the year 2018. The use of snake venom serinoproteases could have in the future use as coagulant therapy. The main objective was to structurally and functionally characterize an isoform of serine protease with thrombin activity "like" from the venom of *Bothrops roedingeri* (Katari). The applied methodology was: the purification of the venom of snake has been used two chromatographic steps of molecular exclusion Superdex G-75 and chromatography of reverse phase; physical-chemical characterization by electrophoresis and mass spectrometry in Tadem Electrospray (ESI); enzymatic activity by the DL-BapNA method, PMSF and fibrinogen degradation test; structural characterization and bioinformatic analysis through the platform, Swiss-Prot (NCBI-BLAST) and DNASTAR software. Results: a serinoprotease was obtained by means of gel permeation chromatography, showing 4 peaks, of which peak II showed greater activity, which was called TLBroed; with a molecular weight of (27 KDa.), the N-terminal sequence VIGGDECNINEHR was obtained, with proteolytic action on registering the constants ($V_{max} = 4.006 \times 10^{-2}$ nmol / min), with inhibitory action of (43.34 ± 1.5 %) against PMSF and fibrinogenolytic activity by hydrolyzing the α and β chain; and finally TLBroed was sequenced showing homology with other serinoproteases such as Venombin A 100%, bilineobin 66.7%, Crotalase 78.5%, Pictobin 73.7%, Gyroxin 71.9%, Collenein-1 71.5%. In conclusion, a serinoprotease with thrombin-like activity (TLBroed) of the venom of *Bothrops roedingeri* was purified showing this proteolytic and fibrinogenolytic activity and was characterized by bioinformatic analysis to the TLBroed being similar in its amino acid structure to other serinoproteases.

Keywords: Thrombin like, *Bothrops roedingeri*, serinoprotease, SDS-PAGE, HPLC-reverse phase.

I. INTRODUCCIÓN

Los venenos de serpientes contienen varios componentes, dentro de los cuales existen algunos factores que actúan a nivel del sistema hemostático, como proteínas y enzimas de la familia serinoproteasas, semejantes a los factores que son propios de la cascada de coagulación sanguínea; específicamente en la vía fibrinogenolítica (factor I) y que han recibido el nombre de trombina “like”.

Las toxinas de animales han sido largamente utilizadas como herramientas moleculares dentro de la fisiología y de la farmacología, tales herramientas constituyen sondas moleculares, modelos para la síntesis de nuevos fármacos, como agentes terapéuticos (Tubocurarina de la toxina botulínica), o medicamentos como el Captopril, que fue sintetizado a partir del modelo molecular de la toxina de *Bothrops jararaca*.

En relación a la caracterización físico-química y farmacológica, resultados preliminares de la purificación por cromatografía de exclusión molecular, han mostrado varias fracciones biológicamente activas, cuya caracterización farmacológica, aún se desconoce del veneno de *Bothrops roedingeri*. Estas informaciones apoyan la idea de proponer el presente proyecto sobre la padronización de nuevas metodologías optimizadas en la purificación y caracterización bioquímica y biológica de las fracciones con acción serinoproteasa, en un solo paso cromatográfico. Hasta la fecha, las metodologías utilizadas para la purificación de este tipo de enzimas no consiguen distinguir isoformas presentes en el veneno.

Este tipo de enzimas denominadas trombina “like” aisladas de veneno de serpientes, son quizá las más relevantes en el ataque de las serpientes Viperidas, al causar la rápida conversión del fibrinógeno en fibrina sin llegar a la formación de un coágulo

normal, desencadenando la formación de un coágulo débil, produciendo un cuadro de trombosis en la víctima.

Uno de los objetivos de la presente investigación es aislar y caracterizar físico-química y biológicamente la presencia de nuevas fracciones con actividad serinoproteasa presentes en el veneno de la serpiente *Bothrops roedingeri*, poco o casi nada estudiada. Siendo una especie de distribución geográfica restringida, los presentes estudios se tornan relevantes, pudiendo traer nuevas informaciones de tipo ecológico, genético y micro-evolutivo de la especie

La escasa investigación de componentes tipo trombina “like” en el veneno de *Bothrops roedingeri* de nuestra costa, ha motivado el interés de estudiar y contribuir en el conocimiento de este factor utilizando una óptima tecnología que nos permita caracterizar de manera segura tal componente y que pueda en un futuro contribuir al diseño de nuevos fármacos que puedan ser usados, de manera individual o en conjunto, con otros fármacos ya disponibles en el mercado, en el tratamiento de patologías hemostáticas.

Pensar hoy en un fármaco que ayude al tratamiento de esas patologías es ya pensar en el futuro. Sin embargo, hay un largo camino que recorrer entre el estudio de TLBroed y la elaboración de un nuevo fármaco que pueda estar disponible en el mercado. Puede llevar años para que este fármaco pueda ser comercializado, pero el primer paso para que esto suceda ya fue dado en el presente trabajo.

La investigación tuvo como objetivo general

Caracterizar estructural y funcionalmente una isoforma de serino proteasa con actividad trombina “like” procedente del veneno de *Bothrops roedingeri*.

Objetivos específicos

- Purificar una isoforma de serinoproteasa con actividad trombina “like” a partir del veneno total de *Bothrops roedingeri* por
- Caracterizar físico-químicamente una isoforma de serino proteasa a través de la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y espectrometría de masas.
- Caracterizar enzimáticamente una isoforma de serino proteasa con actividad trombina “like” a través de su actividad proteolítica, fibrinogenolítica, inhibición de la actividad de la serino proteasa en presencia de PMFS (fenilmetilsulfonilfluorido).
- Caracterizar estructuralmente una isoforma de serinoproteasa con actividad trombina-like a través de la secuencia “de novo” de su estructura y homología secuencial por bioinformática.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES

Desde tiempos remotos, a las serpientes se les consideró como los más cautelosos y peligrosos animales, a tal punto que muy pocas personas se sintieron estimuladas para realizar estudios sobre serpientes (Yarleque, 1996) y sobre estas se han escrito una serie de mitos y supersticiones por ejemplo (Ouyang, 1957) sostenía que las mordeduras de estas eran peligrosas solo cuando el animal estaba irritado (Mesia, 1996) el descubrimiento de las alteraciones en el sistema hemostático producido por los venenos de serpientes data desde hace más de dos siglos (Marckland, 1998) el cuadro clínico que se desarrolla en estos casos se asocia con daños locales rápidos, seguido de alteraciones sistémicas (sangrado, coagulopatias, shock cardiovascular) (Otero, 1992 y Gutiérrez, 1995) siendo el sistema hemostático uno de los más afectados especialmente en aquellas mordeduras infringidas por las de la familia Viperidae (Braud *et al.* 2000). Recién a partir de 1884 se tuvieron los primeros indicios de que los venenos de serpiente contenían enzimas proteolíticas, capaces de destruir tejidos de mamíferos, como también hidrolizar proteínas inmersas en sus fluidos biológicos. Muchos venenos contienen factores coagulantes y anticoagulantes (Nahas *et al.*, 1964 y Mohamed *et al.*, 1969) y para ese tiempo se obedecía a que las coagulopatias eran una característica de los venenos viperidos y también que su efecto dependía de la dosis inoculada haciendo efecto coagulante o anticoagulante (Magalhaes, 2006).

Las alteraciones en la coagulación sanguínea contemplan una de las principales características de los envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae (Marckland, 1998), dentro del sistema hemostático la circulación junto al sistema vascular hace posible la comunicación metabólica entre diferentes órganos (Nelson y Cox, 2011) Lo

interesante de los venenos de serpientes yace en que estas desarrollan algunos principios bioquímicos que afectan las actividades circulatorias el flujo de sangre y la integridad de eritrocitos (Stocker, 1990). Entonces a inicios del presente siglo, aparecieron las primeras publicaciones acerca de las propiedades coagulantes de algunos venenos ofídicos (Mellamby, 1909) sin embargo, partir de 1967 se han empezado a obtener proteínas purificadas por su acción semejante a la trombina (Denson *et al.*, 1967, Esnouf y Tunnah, 1967) y muchas de estas asociadas con cuadros de desfibrinación, coagulación intravascular diseminada y trombocitopenia (Rosenfeld, 1971, Fan y Cardoso, 1995, Gutiérrez, 1995).

La producción literaria respecto de estos venenos menciona, el aislamiento y la caracterización de innumerables proteínas ofídicas, que presentan diversas actividades biológicas y/o enzimáticas tales como proteasas, miotoxinas, fosfolipasas A₂, fosfo monoesterasas, L-aminoacidoxidasas, acetilcolinesterasas, nucleotidasas, nucleosidasas y desintegrinas. (Matsui *et al.*, 2000 y Markland *et al.*, 2005) y algunas enzimas proteolíticas, clasificadas principalmente como metalo y serinoproteasas, generalmente afectan procesos hemostáticos (García *et al.*, 2004 y Sánchez *et al.*, 2005) pudiendo ser clasificadas como procoagulantes, anticoagulantes y/o fibrogenolíticas (Markland *et al.*, 1991).

Los venenos de serpientes contienen SVTLE's (Trombina-like enzimas), son ampliamente distribuidas en varios géneros de serpientes (Agkistrodom, Bothrops, Lachesis e Trimeresurus) así como en verdaderas víboras (Bitis e Cerastes) y los culibrideos *Dispholidus typus* (Pirkle, 1998) estos venenos de serpientes contienen una variedad de enzimas proteolíticas como las enzimas trombina "like" que son responsables de varios efectos farmacológicos: transformación de fibrinógeno en coágulos de fibrina (Meier y Stocker, 1991, Zhang *et al.*, 1998, Castro *et al.*, 2004) inestables que son

degradados tempranamente por los procesos fibrinolíticos secundarios y por lo tanto produce una fluidez atípica de la sangre. (Kamiguti y Cardoso, 1989, Ouyang *et al.*, 1992) además de determinar también que la mayoría de SVTLE's de viperidos remueven el fibrinopeptido A del fibrinógeno para la formación de fibrina, a diferencia de la trombina que remueve los fibrinopeptidos A y B (Stocker *et al.*, 1982).

Se reporta la purificación parcial de una enzima semejante a trombina del veneno de *Lachesis muta* la cual tenía una potencia coagulante equivalente a 168 unidades (NIH) de trombina y un peso molecular cercano de 50 KD. Mientras que, (Yarleque *et al.*, 1987) describió el procedimiento de purificación total de esta enzima, determinando que su potencia coagulante es de 885.7 NIH y su peso molecular calculado por electroforesis en gel de poliacrilamida es de 40 KD. (Campos *et al.*, 1985)

Se han purificado enzimas similares a trombina de diferentes venenos tales como la del veneno de *Agkistrodon cotortrix*, *Agkistrodon acutus* (Ouyang *et al.*, 1971) *Trimeresurus gramineus*, *Trimeresurus okinavensis* (Anderson *et al.*, 1972) así como crotalasa del veneno del cascabel norteamericano *Crotalus adamanteus* (Markland y Damus, 1971) así como enzimas similares a trombina del veneno del género *Bothrops* que son utilizados en humanos para contener hemorragias locales por su alta capacidad para coagular la sangre; dentro de estas se encuentra por ejemplo Batroxobin del veneno de *Bothrops asper*, *Bothrops marajoensis*, *Bothrops moojeni* (Stocker *et al.*, 1974) y Reptilasa de *Bothrops atrox* (Ouyang *et al.*, 1979).

En el año de 1998 se estimaba que más de 40 SVTLE's habían sido descubiertas, inclusive en algunas de ellas ya se conocía su estructura primaria en donde se ponía en evidencia que la mayoría de SVTLE's tenían modificaciones postraduccionales como la glicosilación, que en muchas de estas llegaban hasta un 60% de su masa molecular y se

ponía de manifiesto que algunas de estas enzimas como habutobin (*Trimeresurus flavoviridis*) tenían actividad sobre el fibrinógeno endógeno de especies específicas (Kinjoh *et al.*, 1997, Pirkle, 1998, Murayama *et al.*, 2003).

Asimismo, activan el factor V de la cascada de la coagulación sanguínea (Kisiel, 1979 y Tokunaga *et al.*, 1988) y proteína C en el plasma (Kisiel *et al.*, 1987) liberando cininas de cininógeno (Petretski *et al.*, 2000) y clivando componentes del complemento C3 (Tambourgi *et al.*, 1994 y Yamamoto *et al.*, 2002) algunas de estas proteínas pueden contribuir con los efectos nocivos que pueden causar mionecrosis, disturbios en la coagulación sanguínea, shock cardiovascular, mioglobinuria y liberación de mediadores endógenos tales como la bradicinina (Kini, 2015) hasta hoy, más de 60 secuencias de trombina “like”, han sido determinadas con un alto grado de similaridad. Para el 2004 se estableció que todas las SVTLE’s poseían un único dominio catalítico, incluyendo los residuos de la triada catalítica (His57, Asp102 e Ser195) y los sitios específicos S1 (Asp189) y S2 (Gly216), es la región más importante conservada. Sin embargo, ellas muestran menos similaridad con la trombina de mamífero (Castro *et al.*, 2004) así como la trombina, las enzimas trombina “like” específicamente catalizan hidrólisis limitadas de fibrinógeno y permiten la coagulación del fibrinógeno. Basado en la relación de liberación de fibrinopéptidos A y B, las enzimas trombina “like” pueden ser clasificadas en tres grupos: Venombin A, Venombin B e Venombin AB (Markland, 1998).

En la última década ha sido posible la expresión de forma recombinante de enzimas similares a trombina tanto en modelos eucarióticos como procarióticos, esto con la visión de poder tener mayor cantidad de enzima para el estudio de sus propiedades bioquímicas, moleculares, biológicas y farmacológicas (Valeriano *et al.*, 2012) En el Perú, dentro de venenos de serpientes peruanas se ha encontrado, estudios al respecto de estas proteasas con acción en la coagulación sanguínea, han sido realizados

principalmente con las serpientes venenosas del género *Bothrops*. *Bothrops brazili*, *Bothrops bilineatus*, *Bothrops pictus* y *Bothrops barnetti* (Yarleque, 1989, Liman, 1996, Mesia, 1996, Cahuana, 1996 y Vivas, 2008) Varias enzimas aisladas de venenos de serpientes poseen actividad trombina “like” (Smolka *et al.*, 1998, Ponce-Soto, *et al.*, 2007, Valeriano *et al.*, 2012).

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Las serpientes

Las serpientes o cobras, pertenecen a la clase de los reptiles, orden de los escamados y suborden Serpientes (ofidios) (Vizzoto, 2003) y los accidentes con serpientes son bastante comunes y son un problema para la salud pública, en especial en los países tropicales por la frecuencia con la que ocurren, por la gravedad y por posibles dejadas en las víctimas (Pinho y Pereira, 2001).

Hoy en día se tiene conocimiento de la existencia de 3200 variedades de serpientes (Hati *et al.*, 1991) de las cuales se conoce aproximadamente 500 son especies venenosas y que 200 pueden provocar envenenamiento en humanos (Matzui, 2000) las especies que son venenosas emplean sus venenos para defenderse, atacar e inmovilizar a sus víctimas y así facilitar su ingestión y digestión, existen varias familias de serpientes de las cuales se diferencia su hábitat y características tanto internas como externas. Se detallan las más importantes y como son sus sinónimos hoy en día: *Elapidae* (cobra, coral) *Colubridae* (Culebra, se le denomina así a todo ofidio inofensivo para el hombre a excepción de las “boomslang” que origino muerte en algunos humanos), *Hydrophiidae* (especies marinas), *Viperidae* (víboras, familia de serpientes muy venenosas) y *Crotalidae* (cascabel, considerada la familia con un amplio número de especies venenosas) (Sánchez *et al.*, 2005).

Varios elementos de los venenos de las serpientes cumplen sus respectivos efectos venenosos sobre diferentes caminos toxicológicos y también cuentan con una organización biológica como por ejemplo una ruta común hacia varias toxinas, que son referentes a diversos linajes de proteínas y presente en los venenos de varias serpientes. Existen algunas argumentaciones que no se está de acuerdo en composición y formación de la actividad de los venenos de serpientes, pero estos se clasifican en función de dos cuadros patológicos que se desarrollan que son: neurotóxico y hemotóxico. Estos dos cuadros se relacionan únicamente en cuanto a síntomas como son debilidad generalizada, dolor e inflamación local (Pinho *et al.*, 2001).

En la actualidad en nuestro país podemos encontrar 9 de 15 familias de especies que se encuentren en el mundo, teniendo más del 50% en especies ofídicas, siendo consideradas el segundo país en Latinoamérica por la biodiversidad de nuestras serpientes (Zavaleta, 1996) y de estas especies se sabe que 33 son venenosas y solo 9 serpientes son autóctonas del país y los 24 restantes son de países vecinos (Carrillo, 2007). Las familias más relevantes y primordiales por el amplio campo de estudio de serpientes venenosas que habitan en el país son *Viperidae* y *Elapidae* (Campbell, 1889).

Hoy en día, los accidentes por mordedura de ofidios provocan un sin número de pérdidas de vidas humanas; si en caso no ocurra pérdidas, los heridos tienden a sufrir un destrozamiento de tejidos hasta la pérdida global o parcial de algún órgano (Pesantes, 2000) según los reportes de MINSA se estima que hubo 2035 accidentes ofídicos en el 2008, año donde hubo un mayor número de afectados (Navarro, 2009).

Teniendo en cuenta que en nuestro país se cuenta con una amplia región de la selva que supera los 600 000 km², se conoce que son muchas las serpientes que son registradas en este lugar, a la vez se sabe que existe especies registradas en valles

interandinos y también en la costa del pacífico, no obstante, los estudios al respecto no están finalizados debido a que se tiene la seguridad que se puede obtener y trabajar futuros informes, sin embargo, el serpentario “Oswaldo Meneses” reportó las siguientes especies que se observa (MINSA, 2000) en la tabla 1, basado en los aportes de (Meneses, 1974, Camphbell y Lamar, 2004, Carillo e Icochea, 1994, Yarleque, 2000, Pesante, 2000) que son motivos de estudio e investigación para diversos fines académicos y relevantes para el país, de igual manera también se observa las características y diferencias detalladas de dos familias de serpientes que son las que más habitan en el país.

Tabla 1: Principales serpientes venenosas del Perú (Yarleque, 2000)

FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE COMUN
	<i>Bothrops atrox</i>	Jergón de la selva
	<i>Bothrops brazili</i>	Jergón shushupe
	<i>Bothrops pictus</i>	Jergón de la costa
	<i>Bothrops roedingeri</i>	Jergón de la costa
Viperidae	<i>Bothriopsis bilineata</i>	Loromachaco
	<i>Bothriopsis oligolepis</i>	Lamon o jergón negro
	<i>Bothriopsis muta</i>	Shushupe
	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Cascabel sudamericano
Elapidae	<i>Micrurus spixii</i>	Coral o naca naca
	<i>Micrurus surinamensis</i>	Coral o naca naca
	<i>Micrurus tschuddi</i>	Coral de la costa

Tabla 2: Características diferenciales entre serpientes venenosas de dos familias importantes en el Perú. (MINSa, 2000)

Características Diferenciales	Serpientes venenosas	
	Familia <i>Viperidae</i>	Familia <i>Elapidae</i>
Cabeza	Triangular	Redonda
Pupilas	Elípticas disposición vertical	Elípticas disposición diagonal
Hábitos	Nocturnos	Nocturnos
Escamas cabeza	Quilladas, ásperas	ausente
Placas simétricas en la cabeza	Ausentes	Presentes
Movimientos	Lentos, posición de ataque	lentos
Cuello	Estrecho	Grueso
Foseta loreal	Presente	Ausente
Anillos transversales de colores	Ausentes	Completos, Bandas negras, impares
Cola	Corta y afinada	Larga y afinada
Colmillos	Móviles	Fijos

2.2.2 Bothrops roedingeri

2.2.2.1. Taxonomía

Es conocida como “JERGON DE LA COSTA” también como “CATARI” en lengua quechua, de igual manera pertenece a la familia *Viperidae* también es conocido con el sinónimo de víbora y a esta familia se le engloba como” serpientes del viejo mundo” cuenta con características que se detallan líneas más abajo.

Reino:	Animalia
Filo:	Chordata
Subfilo:	Vertebrata
Clase:	Reptilia
Orden:	Squamata
Suborden:	Serpentes
Familia:	Viperidae
Subfamilia:	Crotalinae
Género:	Bothrops
Especie:	<i>Bothrops roedingeri</i> (Katari) (Mertens, 1942)

2.2.2.2. Ubicación geográfica

Esta especie la podemos encontrar en los valles cercanos al mar desde el departamento de Ica y fundamentalmente en la costa y valles del departamento de Arequipa. (Figura 1)



Figura 1: Ubicación geográfica de la especie *Bothrops roedingeri* en la costa (Marcado con rojo) (Adoptado de Valeriano *et al.*, 2012)

2.2.2.3. Características

Este reptil es uno de los más peligrosos y temidos de la costa peruana, mide entre 40 y 60 cm. De longitud, también existen ejemplares de la misma familia de hasta 1 m. de longitud, su forma general es alargada y normalmente cilíndrica, consta de la piel cubierta de escamas pequeñas en el dorso y mayores en el vientre; recubierto de una delgada piel que varía constantemente a lo largo del año, (Campbell y Lamar, 2004) Esta piel es transparente y comienza a desprenderse por los labios y continua por la cabeza, cuerpo y la col. Sus ojos son redondos con pupilas circulares y verticales, con falta de párpados y protegidos por una membrana transparente como el vidrio de un reloj. Su boca es muy dilatada que le permite ingerir alimentos de gran tamaño, con la lengua larga, filiforme y protractil está siempre húmeda y posee varios corpúsculos sensitivos que lo utiliza para el tracto y el gusto (Figura 2). En el olfato consta de un sentido más

desarrollado que el auditivo y por ultimo su forma de transporte es arrastrándose mediante ondulaciones laterales del cuerpo (Serrano y Maroun, 2005).

Su veneno se ha caracterizado por la presencia de enzimas trombina “like” es tal vez la enzima de acción más espectacular en el ataque de serpientes Viperidas. Causa rápida conversión del fibrinógeno en fibrina, es decir coagulación aun en presencia de heparina, otra característica importante es su tolerancia a la temperatura ya que soporta calentamiento hasta de 80 grados centígrados sin perder su actividad (Yarleque, 2000)



Figura 2: *Bothrops roedingeri* – Familia *Viperidae* (adaptado de Ministerio de salud, 2000)

2.2.3 Veneno botrónico

Numerosos estudios experimentales han demostrado que el veneno botrónico posee en su composición una gama bastante diversa y compleja de componentes que actúan sobre el sistema hemostático, y la literatura es bastante amplia. El veneno produce daño tisular local marcado por incluir dolor, edema, hemorragia (Teixeira *et al*, 2003). Hay todavía, otros efectos tóxicos/farmacológicos, incluyendo su acción hemorrágica

sistémica, insuficiencia renal hemolítica (Gutiérrez y Lomonte, 1997, Valentín y Lambeau, 2000, Maruñak *et al.*, 2007) y necrosis (Gutiérrez, Ownby, 2003 y Harris, 2003).

2.2.3.1 Acción hemorrágica

El efecto hemorrágico es causado por un grupo de toxinas hemorrágicas o hemorraginas, que son enzimas proteolíticas de tipo Metaloproteasas, ya que su actividad enzimática depende de Zinc en su sitio activo (Bjarnason y Fox, 1994). Estas actúan para fragilizar la integridad del endotelio vascular, degradando colágeno, fibronectina; tiene actividad de desintegrina, además de ser potentes atagregantes plaquetarios. Se cree que la cliva específica es en puntos clave pueda llevar al desencadenamiento de un mecanismo endógeno amplificador, teniendo un ataque proteolítico de la lámina basal vascular (Franca y Malaque, 2003).

2.2.3.2 Actividad inflamatoria

Es causada por diversas fracciones del veneno botrópico, por ejemplo, aminas biogénicas pre-formadas del tipo histamina, hasta pequeños péptidos, o proteínas como las fosfolipasas A_2 esterasas, proteasas, enzimas liberadoras de cinina (calicreína, cininogenasas) y lectinas. Otros mediadores de inflamación, incluidos la bradicinina, las prostaglandinas, los leucotrienos y tromboxanos, entre otros, ejercen papel en etapas posteriores o tardías de la formación del edema (Costa *et al.*, 2002). La actividad edematogénica es muy potente, evidenciada en los casos clínicos y modelos experimentales. En estos últimos las dosis de veneno o fracciones requeridas para inducir un efecto significativo varían de unos pocos microgramos a decimos de microgramos (Teixeira *et al.*, 2003).

2.2.3.3 Acción coagulante

El veneno botrópico posee capacidad de activar factores de coagulación sanguínea, ocasionando consumos de fibrinógeno y formación de fibrina intravascular, induciendo frecuentemente la incuagubilidad sanguínea, además de activar la protrombina de la cascada de coagulación sanguínea. La fracción del veneno que posee esta acción coagulante actúa de manera diferente de trombina fisiológica, pues, no es neutralizado por la heparina (Kini, 1997).

2.2.4 Hemostasia

El termino hemostasia es definido como un conjunto de factores responsables por la manutención del fluido sanguíneo en el interior de los vasos sanguíneos (García y Navarro, 2005) o que es la parada de sangrados o hemorragias (Baker, 2006) es que está relacionada al control de la hemorragia y disolución del coagulo por medio de eventos mecánico y bioquímicos (López *et al.*, 2007) y un concepto más claro es que la hemostasia es el cese fisiológico del sangrado por un mecanismo complejo que envuelve un cambio de estado físico, del líquido al sólido, con la formación del coagulo de fibrina y del enlace en una malla insoluble (Quintana y González, 2002).

a) Hemostasia primaria

La primera respuesta a una injuria vascular es un espasmo o vasoconstricción, que resulta en la disminución del flujo sanguíneo distal al local de la lesión (Plaisier, 2001 y Cheville, 2009) señalan que esta fase inicial corresponde a una fase transitoria resultante de mecanismos neurogenicos reflejos (respuesta central), en el local de la lesión por las endotelinas potentes vasoconstrictores derivados de las células endoteliales (respuesta local). La reducción del foco sanguíneo disminuye a la pérdida de sangre, además de

posibilitar una reacción enzimática más eficaz en los procesos de coagulación y agregación plaquetaria (Cheville, 2009).

En una etapa siguiente, las plaquetas circulantes son expuestas al colágeno subendotelial y rápidamente, se adhieren al mismo y a la pared del vaso (Plaisier, 2001) pueden adherir también a la fibronectina y a otras glicoproteínas y proteoglicanos. Entretanto, la adhesión más eficiente ocurre cuando el factor de Von Willebrand (FvW) es liberado. El FvW actúa como puente entre el colágeno y el receptor GpIb de la membrana de las plaquetas (Plaisier, 2001, Mosier, 2007 y Cheville, 2009) es en esta etapa y sin la estimulación más profunda, las plaquetas adheridas y agregadas se pueden separar, entretanto, las plaquetas agregadas secretan el contenido de sus cuerpos densos y α -gránulos para acelerar la hemostasia, la adenosinas-difosfato (ADP) liberada de los gránulos densos hace el enlace del fibrinógeno al receptor GpIIb-IIIa de las plaquetas, resultando en la formación de puentes que enlazan las plaquetas a la red de fibrina suelta. La contracción plaquetaria promueve la retracción de ese coagulo suelto, Formando un tampón denso, que cubre el área damnificada. Cuando la injuria vascular es mínima, los tampones de plaquetas son suficientes para resolver el daño. Caso contrario, el colágeno expuesto y los fosfolípidos plaquetarios agregados promueven la hemostasia secundaria del local (Mosier, 2007).

2.2.4.1 Hemostasia secundaria

La hemostasia secundaria culmina con la activación de los factores de coagulación McFarlene, Davie y Ratnoff (1964) fueron los primeros que describieron el mecanismo de formación del coagulo, como una serie de conversiones de proteínas o zimógenos conectados para activar otras proteínas o enzimas (Iskander y Cheng, 1999) a primera vista, las muchas interacciones, retroalimentaciones, activadores, aceleradores y

inhibidores de los factores de la coagulación parecen complicadísimos, entre tanto, los eventos relacionados a esta fase pueden ser didácticamente categorizados en una estructuración básica, en que los factores de la coagulación son diferenciados *in vitro* en un sistema intrínseco, en un sistema extrínseco y, finalmente en un sistema común se refuerza se fortalece que tales categorías son estrictamente, tratadas separadamente *in vitro*, cuando uno de estos sistemas es activado *in vivo*, el otro sistema también sufre activación en virtud de la activación cruzada de los sistemas (Baldwin *et al.*, 1998).

Los factores de coagulación son formados por una familia de proteínas que poseen similitud en sus secuencias, estructuras y, en cierto grado, función. Hay aproximadamente 50 miembros de esta familia. Las proteasas, en general clivan cadenas de polipéptidos, rompiendo el enlace que tienen las proteínas de la coagulación en estado inactivo, siendo denominadas pro-proteínas o zimógenos (Moran y Viele, 2005) Para facilitar el entendimiento de la hemostasia, el comité de Nomenclatura de Factores de Coagulación Sanguínea determinó que cada proteína involucrada en la cascada de coagulación fuera designada con un numeral romano (Iskander y Cheng, 1999). La letra “a” debe ser colocada después del numeral romano para indicar que la proteína está en forma activa. Se observa que, aunque los factores sean designados por números romanos, los mismos pueden ser designados por otros nombres (Moran y Viele, 2005) todas las proteínas plasmáticas involucradas en el proceso de coagulación son sintetizadas en el hígado. Los factores II, VII, IX, y X son dependientes de la vitamina K y circulan en la forma inactiva (Solimán, 2006) y todos estos factores que participan del proceso de coagulación están enlistados en la (tabla 3). Además de los factores de coagulación, existen otras proteínas regulatorias que son esenciales para la formación del coágulo, dentro de ellas, las principales son la Antitrombina III, proteína C, proteína S, trombosudolina y factor de Von Willebrand (FvW) (Moran, 2005).

a) Vía Intrínseca

La coagulación intrínseca (Figura 3) es un proceso complejo y altamente interdependiente que se inicia por el grupo de factores de coagulación. La pre-caliceína y el factor XI normalmente circulan en dirección al cininógeno de alto peso molecular (HMWK), que actúa como catalizador para la activación de los mismos. Siguiendo a la injuria vascular, la pre-caliceína, el HMWK y el factor XII forman un complejo en la superficie endotelial o subendotelial negativamente cargada, que resulta en la activación del factor XII (factor XIIa). El factor XIIa inicia una compleja serie de reacciones que activa las cininas del sistema de complemento y a fibrinólisis. El factor XIIa activa el factor XI (XIa) e interactúa con la pre-caliceína para formar la caliceína, que a su vez interactúa con HMWK para formar cininas. La cliva del factor XIIa por la caliceína, plasmina y otras enzimas proteolíticas forma fragmentos, que poseen actividad similar, sin embargo, resulta más débil la del factor IXa, entonces, enlaza los fosfolípidos de plaquetas en un complejo con Ca^{2+} , pueden activar el factor IX (IXa). El factor IXa, entonces, enlaza los fosfolípidos de plaquetas en un complejo con Ca^{2+} y factor VIII. Después la modificación del factor VIII en VIIIa, por la trombina, el complejo VIIIa-factor IXa/ Ca^{2+} -fosfolipedeo activa el factor X para iniciar la vía de coagulación común (Baldwin *et al.*, 1998, Mosier, 2007 y Cheville, 2009).

Tabla 3. Factores de coagulación, vías o sistemas en que participan en sus respectivas funciones. (Moran y Viele, 2005).

Factor	Nombre común	Vía	Función
I	Fibrinógeno	Común	Forma el coagulo (fibrina)
II	Protrombina	Común	Activa I, V, VII, XII, proteína C y plaquetas
III	Factor tisular	Extrínseca	Cofactor VIIa
IV	Pro-acelerina	Común	Requerido por factores de coagulación para enlazar fosfolípidos
V	Acelerina	Común	Cofactor X, con lo cual forma el complejo protrombinasa
VII	Pro-convertina acelerados de conversión de la protrombina sérica, tromboplastina	Extrínseca	Factor Va
VIII	Factor A anti-hemofílico, globulina anti-hemofílica.	Intrínseca	Cofactor IX
IX	Factor christmas, factor B anti-hemofílico, componente de tromboplastina plasmática.	Intrínseca	Activa el factor X
X	Factor Stuart-Power	Común	Activa el factor II, forma el complejo protrombinasa con el factor V.
XI	Antecedente de tromboplastina plasmática	Intrínseca	Activa los factores XII, IX y pre-caliceína.
XII	Factor hageman	Intrínseca	Activa pre-caliceína y fibrinólisis
XIII	Pro-transgluminase, factor estabilizador de fibrina o FAF, fibrinólisis.	Común	Enlaces cruzados de fibrina
Pre-caliceína	Factor fletcher	Intrínseca	Activa caliceína y cliva HMWK
HMWK*	Cofactor de activación de contacto; Fitzgerald, Flaujeac, Williams.	Intrínseca	Da soporte a la activación de los factores XII, XI y pre-caliceína

*abreviación: high-molecular-weight kininogen (cininógeno de alto peso molecular)

b) Vía extrínseca

La liberación del factor III (FT) por las células que rodean el endotelio lesionado, o del endotelio activado, inicia la vía extrínseca (Figura 3). FT es un fosfolípido que contiene glicoproteína de alto peso molecular encontrado en la membrana plasmática de muchas células, incluyendo el endotelio activado. La producción del FT por la célula endotelial es estimulada por sustancias como endotoxinas, FNT, IL-1, factor de crecimiento transformador β (TGF- β) y trombina. Cuando el factor circulante VII entra

en contacto con el FT, ocurre la formación del complejo FT: VII Ca^{2+} -dependiente en la superficie del FT expreso. A pesar de este complejo posee actividad enzimática en algunos casos, la activación del factor VII por sustancias como los factores XIIa, IXa, IIa y calicreína resulta mucho más activa que el complejo FT: VIIa. Este factor, unido al Ca^{2+} , activa el factor X, para dar inicio a la vía común (Baldwin *et al.*, 1998, Mosier, 2007 y Cheville, 2009).

c) **Vía común**

Según Mosier *et al.* (2007) las vías intrínsecas y extrínsecas se funden con la activación del factor X (Figura 3). El factor Xa es encontrado en el endotelio o la membrana plasmática de plaquetas, donde puede convertir el factor II en IIa (trombina). Entretanto, cuando el factor Xa es combinado como factor Va y Ca^{2+} (complejo protrombinasa), esta reacción ocurre más rápido. La trombina es un mediador multifuncional cuya principal función es clivar los fibrinopeptidos A y B del factor I (fibrinógeno), para formar monómeros de fibrina. La remoción de estos fibrinopeptidos reduce las fuerzas repulsivas intermoleculares, así los monómeros de fibrina espontáneamente forman enlaces con el H^+ y se transforman en polímeros solubles de fibrina. El factor XIIIa, formado por la acción conjunta de los factores Xa y IIa, junto al Ca^{2+} , cataliza la formación de enlaces covalentes que unen las moléculas de fibrina para formar un polímero insoluble. El elemento de unión transversal de la red de fibrina, aliado a la contracción de las plaquetas y a la presencia de abundante calcio, trombina y adenosina-trifosfato (ATP), causa la retracción del trombo de fibrina-plaqueta. La retracción reduce el tamaño del trombo para permitir que el flujo sanguíneo continúe y ocurra la unión de los bordes de la lesión, para una cicatrización eficiente (Baldwin *et al.*, 1998, Mosier, 2007 y Cheville, 2009).

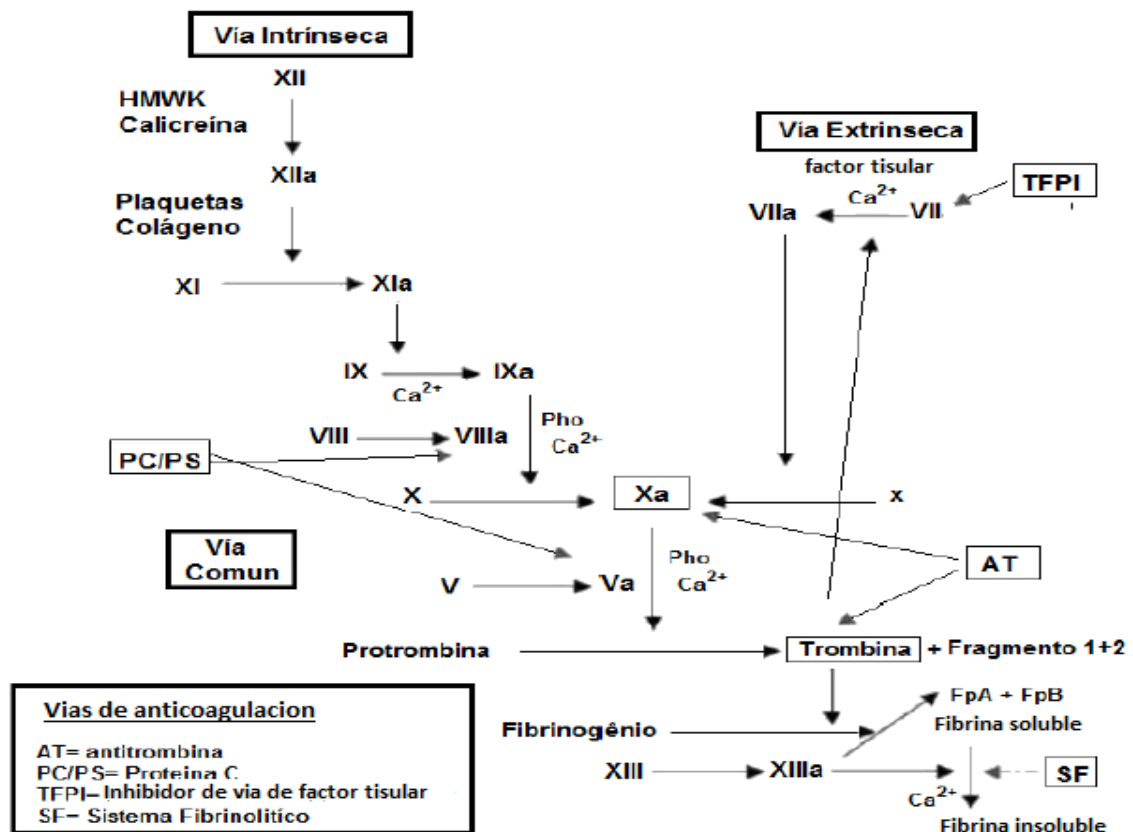


Figura 3: Esquema de activación de la cascada de coagulación por las vías intrínseca, extrínseca y común. Adaptado de (Mosier, 2007)

d) Fibrinólisis

Según Carlson & Desancho, (2010) la disposición de fibrina es limitada por un sistema anticoagulante endógeno, compuesto por:

- **Antitrombina.** – proteína plasmática, miembro de la familia de las serpinas (inhibidores de proteasas séricas), que inhibe la actividad de todas las otras proteasas activadas.
- **Proteína C.**- proteína dependiente de la vitamina K que actúa sobre los factores Va y VIIIa para inactivar fragmentos. Se unen a un receptor de proteína C endotelial (EPCR) y es activada por la trombina, generando trombomodulina, otra proteína de base de la membrana celular endotelial, en una reacción modulada por un cofactor, la proteína S.

- **Inhibidor del factor tisular.** - proteína plasmática que forma un complejo cuaternario con el factor tisular, factor VIIa y factor Xa, promoviendo, así la inhibición de la vía de coagulación intrínseca.

El coagulo plaquetario primario es reforzado por la formación de fibrina. La fuerza elástica es aumentada por la malla cruzadas del polímero de fibrina, mediadas por el factor XIIIa, que convierte α 2-antiplasmina en fibrina, además de proteger el coagulo contra fibrinólisis entretanto, la fibrinólisis constituye un pre-requisito para la hemostasia, por una posible tendencia la formación de trombos en individuos con deficiencia de plasminógeno. El activador de plasminógeno tisular (APT) es liberado por las células endoteliales y convierte plasminógeno en plasmina, una proteasa. Esta reacción es promovida cuando el APT es liberado de la fibrina y sometido a feedback positivo. La plasmina rompe el APT en una molécula de dos cadenas, aumentando a exposición de sitios de exposición y promoviendo la formación del complejo. La plasmina hidroliza arginina y lisina, resultando en la proteólisis de varios sustratos, incluyendo el fibrinógeno, la fibrina y los factores V, VIII y XIII. El clivaje de la fibrina y del fibrinógeno genera los fragmentos X e Y, que inhiben la polimerización de la trombina y de la fibrina, respectivamente. La excesiva fibrinólisis resulta en el consumo del fibrinógeno. La hemorragia es prevenida por la inhibición del APT y de la plasmina, por el activador de inhibidor de plasminógeno (AIP) y por la α 2-antiplasmina (Allfor y Machin, 2004) el proceso de fibrinólisis se encuentra esquematizado en la (Figura 4).

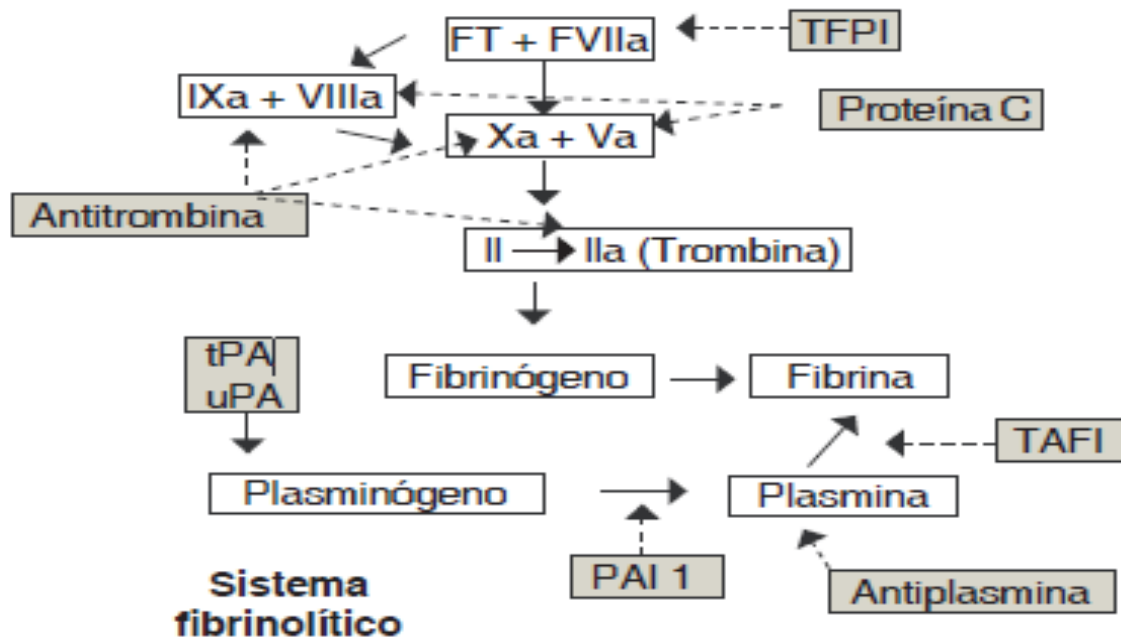


Figura 4: Esquema de la fibrinólisis. El activador de plasminógeno tisular es liberado por las células endoteliales. (Adoptado de Espitia, 2015)

2.2.5 Proteasas

Las enzimas proteolíticas o proteasas son enzimas que catalizan la cliva de enlaces peptídicos de proteínas. Esas proteasas adquirirán un alto grado de especialización durante su micro evolución, restringiendo su mecanismo de acción sobre enlaces peptídicos específicos. (Barret y Rawlings, 1995) es así que los procesos biológicos son regulados por la acción de proteasas, por ejemplo, coagulación sanguínea y fibrinólisis, la liberación de proteínas hormonales de precursores moleculares, el transporte de proteínas secretoras a través de la membrana, activación del sistema de complemento, fertilización, germinación y control de la digestión proteolítica (Wenzel y Tschesche, 1995, Declerk y Imren, 1994) y en el Perú, los estudios de proteasas con acción en la coagulación sanguínea han sido realizados principalmente con las encontradas en serpientes venenosas del género *Bothrops* y *Crotalus*. De acuerdo con la naturaleza de sus sitios activos las proteasas son clasificadas en serinoproteasas I y II, cisteinoproteasas, metaloproteasas I y II y aspartiloproteasas (Vilca, 2010).

Tabla 4: Clasificación de las proteasas de acuerdo con la naturaleza de sitios activos. (Neurath, 1984)

Familia	Proteasas representativas	Componentes del sitio activo
Serinoproteasas I	Quimiotripsina, tripsina (trombina “like”, elastasa, calicreinas.	Asp ₁₀₂ , Ser ₁₉₅ , His ₅₇
Serinoproteasas II	Subtilisina.	Asp ₃₂ , Ser ₂₂₁ , His ₆₄
Cisteinoproteasas	Papaína, actinidina, catepsinas B y H de hígado de rata.	Cys ₂₅ , His ₁₅₉ , Asp ₁₅₈
Aspartilproteasas	Penicilopepsina, pepsina y renina.	Asp ₃₃ , Asp ₂₁₃
Metaloproteasas I	Carboxipeptidasa bovina A y B	Zn, Glu ₂₇₀ , Tyr ₂₄
Metaloproteasas II	Termolisina	Zn, Glu ₁₄₃ , Tyr ₂₄

2.2.5.1 Serinoproteasas

La clase de enzimas muy bien estudiadas y caracterizadas es la de las serinoproteasas, teniendo como ejemplo a tripsina, Quimiotripsina y elastasa, de las cuales la más estudiada es la tripsina. Esas enzimas presentan elevado grado de homología y mecanismos de catálisis semejante, aunque presenten diferencia acentuadas en cuanto a especificidad de sustrato, algunos mecanismos de catálisis enzimática fueron propuestos, para las serinoproteasa, siendo más aceptado el mecanismo de la transferencia de protones del residuo Ser₁₉₅ el residuo His₅₇, y en seguida para el residuo Asp₁₀₂, precisamente los aminoácidos que componen el sitio activo de las serinoproteasas. El resultado de esa transferencia es la formación de una carga negativa parcial que será la responsable de la catálisis enzimática propiamente dicha, que ocurre por medio de un ataque nucleofílico los radicales carbonilos de los residuos de arginina y lisina de los sustratos susceptibles a la tripsina (Barret y Rawlings, 1995).

a) Serinoproteasas SI

Las serino proteasas de la subfamilia S I (familia de la Quimiotripsina bovina) presentan como principal característica un dominio tripsina es la mayor de todas las familias de proteasas, con más de 4875 secuencias de enzimas identificadas hasta el momento. Presentan una triada catalítica His-Asp-Ser y las secuencias de aminoácidos alrededor del sitio catalítico forman motivos muy conservados. Sus estructuras tridimensionales son extremadamente conservadas. Hasta el momento, todas las proteasas de la familia S I son endopeptidasas. Diversas serinoproteasas de la familia de la Quimiotripsina ya tuvieron su estructura tridimensional determinada (Oliveira, 2010)

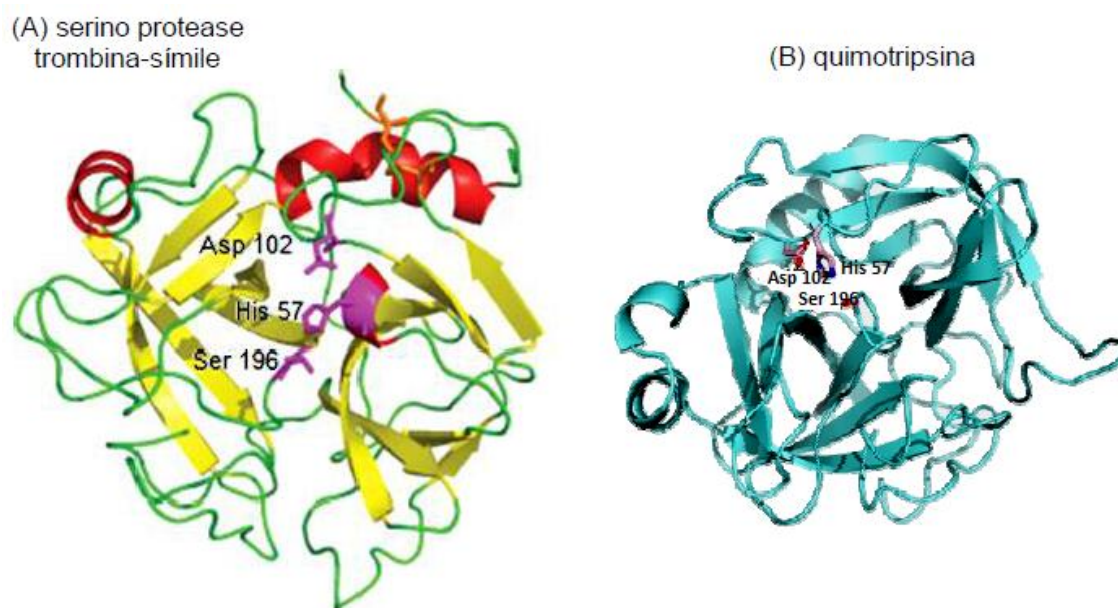


Figura 5: (A) Estructura de saxtrombin (serinoproteasa trombina-simili aislada de *Gloydius saxatilis*) destacando la posición de los residuos de aminoácidos (B). Las triadas catalíticas, His57, Asp102 y el residuo reactivo Ser195 respectivamente. (Ilustración modificada: Ma *et al.*, 2005)

Las proteasas de esta familia desempeñan muchos papeles biológicos, principalmente en la digestión (tripsina y quimiotripsina), homeostasis (factores de coagulación), respuesta inmune mediada por IgA (triptasa y la quimasa encontrada en las células citotóxicas y en mastocitos), entre muchas otras actividades importantes. Por esa

razón, ellas tienen relevancia farmacéutica y biológica como objetivo de drogas (Teixeira *et al.*, 2003) relacionadas a la hemostasia y activación del sistema de complemento. Las serino proteasas de venenos de serpientes (SVSPs-Snake venom serine protease) presentan muchas de estas funciones, siendo bien establecidas las acciones en la cascada de la coagulación, conforme ilustrado para algunas toxinas mostradas en la (Figura 6) (Mosier *et al.*, 2007).

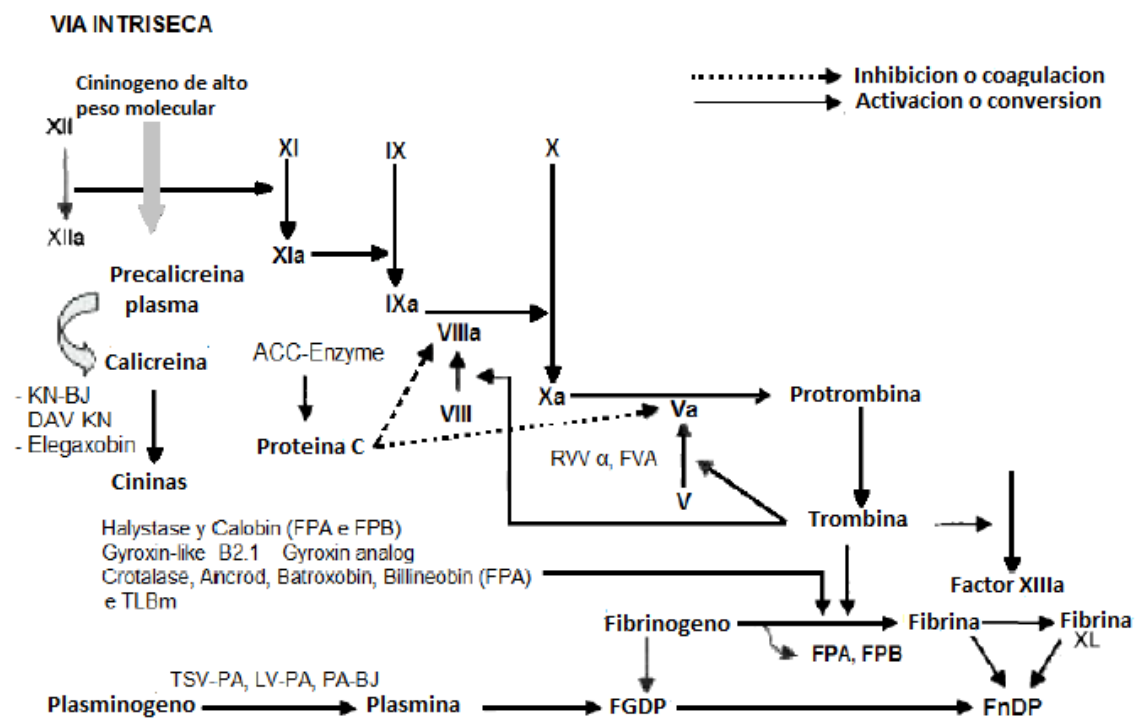


Figura 6: Algunas serinoproteasas del veneno de serpientes actuando en la cascada de coagulación (Basada en Marckland, 1998)

FGDP: Fibrinógen degradation products; **Fndp:** Fibrin degradation products; **FPA:** Fibrinopeptide A; **FPB:** Fbrinopeptide B. **KN-BJ**, *Bothrops jararaca* (Serrano *et al.*,1998) **Dav-KN**, *Agkistrodon acutus* (Wang *et al.*, 2001) **Elexobin-1**, *Trimeresurus elegans* (Oyama *et al.*, 2002) **ACC-C Protein C activator**, *Agkistrodon contortrix* (McMullen *et al.*, 1989), **Halystase**, *Agkistrodon halys blomhofni* (Matsui *et al.*, 1998) **Calobin**, *Agkistrodon caliginosus* (Hahn *et al.*, 1996) **Gyroxin-like 82.1**, *Crotalus durissus terrificus* (Magallanes *et al.*, 1993) **Batroxobin:** *Bothrops atrox* (Itoh *et al.*,

1987) **Bileneobin**, *Agkistrodon bilineatus* (Nikai *et al.*, 1995) **LV-PA**, *Lachesis muta muta* (Sánchez *et al.*, 2000) **PA-BJ**, *Bothrops jararaca* (Nikai *et al.*; 1995) **TLBm**, *Bothrops marajoensis* (Vilca *et al.*, 2010).

2.2.6 Serinoproteasas de venenos de serpiente

Son conocidas por causar desordenes hemostáticos, interfiriendo en distintos puntos de la coagulación sanguínea por degradación proteolítica o selectivamente, por activación o inhibición específica de factores coagulantes envueltos en la agregación plaquetaria, coagulación y fibrinólisis (Braud *et al.*, 2007) causando paradójicamente, coagulación *in vitro* (Pirkle, 1998; Magallanes *et al.*, 2007) y incouagulabilidad *in vivo* por disminuir el fibrinógeno circulante, compitiendo con la trombina (TR) por la hidrólisis del fibrinógeno. Sin embargo, al contrario de la acción de (TR), las enzimas trombina-like (TLEs) no son inhibidas por la heparina y, generalmente no activan el factor XIII de la cascada de coagulación. La actividad de las serino proteasas está relacionada principalmente a la acción del tipo trombina (trombina-simili) de venenos botropicos (Matsui, *et al.*, 2000, Santoro y Sano-Martins, 2003). Estas serinoproteasas poseen residuos de aminoácidos en posiciones específicas correspondiendo a una triada catalítica altamente conservada (Ser₁₉₅, His₅₇, y Asp₁₀₂) en posiciones análogas en relación a las serinoproteasas de mamíferos, conforme a la numeración del quimiotripsinogeno (Perona y Craik, 1997, Matsui *et al.*, 2000, Serrano y Maroun, 2005) y pueden activar o inactivar factores de coagulación sanguínea, interferir en la agregación plaquetaria y participar del sistema fibrinolítico (Braud *et al.*, 2000, White, 2005). Las diferencias y similitudes entre la trombina y las enzimas trombina “like” del veneno de serpientes puede ser observadas en la siguiente tabla.

Tabla 5: Resumen descriptivo de las diferencias y similitudes entre la trombina y las trombina-like de veneno de serpientes.

TROMBINA	ENZIMA TROMBINA-LIKE
Pertenece a la familia de las tripsinas.	Pertenece a la familia de las tripsinas
Inducen agregación plaquetaria.	Pueden o no inducir agregación plaquetaria.
Actúan sobre otros factores de coagulación.	Pueden o no actuar en otros factores de coagulación
Hidroliza simultáneamente cadenas α y β .	Hidroliza cadenas α , β o ambas α y β simultáneamente.
Son inhibidas por la heparina	No son inhibidas por la heparina
Activan el factor XIII, responsable de la polimerización de redes de fibrina.	No activan el factor XIII y consecuentemente no fortalece las redes de fibrina.
Tiene sitios de unión de Na^+ , por lo tanto son regulados alostericamente por estos iones (Tyr ₂₂₅ funciona como enlace de ese ion).	No tiene sitios de unión de Na^+ y no son regulados alostericamente (presentan Pro ₂₂₅ en este sitio, diferentemente de la trombina).
Presenta dos regiones cargadas positivamente y una región de naturaleza hidrofóbica, sitios importantes para la unión con los sustratos e inhibidores.	Presenta una región hidrofóbica semejante a la trombina, pero no presenta los sitios cargados positivamente.
Presenta bajo grado de similitud con las trombina-like del veneno de serpientes (26-33%) en la secuencia primaria.	No solo comparten la triada catalítica también cinco puentes disulfuro topológicamente iguales.

2.2.6.1 Trombina “like” de venenos de serpientes (SVTLE’s)

Los venenos de serpientes contienen una variedad de enzimas proteolíticas, como las trombinas “like” que actúan de manera semejante a la trombina, proteína humana responsable de la coagulación de sangre. Distribuidas en varios géneros de serpientes (*Agkistrodom*, *Bothrops*, *Lachesis* y *Trimeresurus*), así como en víboras verdaderas (*Bitis* y *Cerastes*) y los culibrideos *Dispholidus typus* (Pirkle, 1998) que son responsables de varios efectos farmacológicos, como la transformación de fibrinógeno en fibrina (Meier y Stocker, 1991, Zhang *et al.*, 1998, Castro *et al.*, 2004) activando el factor V de la coagulación (Kisiel, 1979, Tokunaga *et al.*, 1998) y proteína C en el plasma (Kisiel *et al.*, 1987) liberando cininas de cimógenos (Petretski *et al.*, 2000) y clivando componentes del complemento C3 (Tambourgi *et al.*, 1994, Yamamoto *et al.*, 2002).

Los genes que expresan las trombinas “like” de venenos de serpientes (SVTLE’s) son miembros de una familia de tripsina/calicreína, compuestos por 5 exones y 4 intrones, siendo codificada por exones diferentes (Itoh *et al.*, 1998). Análisis comparativos de la secuencia primaria de diversas trombinas “like” de venenos de serpientes (SVTLE’s) con serinoproteasas clásicas, tales como la quimiotripsina, calicreína, trombina y tripsina, muestran esta relación genética (Castro *et al.*, 2004) entretanto la triada catalítica clásica de las serinoproteasas (His₅₇, Asp₁₀₂, Ser₁₉₅, tomando como base la secuencia de la quimiotripsina) es bastante conservada en las trombinas “like” de venenos de serpientes. La trombina y la quimiotripsina presentan bajos grados de similaridad con las SVTLE’s en la secuencia primaria (26-33% y 24-31% respectivamente), pero todavía son funcionalmente análogas a estas (Castro *et al.*, 2004).

Las trombinas “like” de veneno de serpientes (SVTLE’s) son más semejantes a la calicreína y a la tripsina (34-40% e 31-44% de semejanza estructural, respectivamente). Presentan también 12 residuos de cisteína que forman 6 puntos disulfuro (Amiconi *et al.*, 2000, Nikai *et al.*, 1995, Parry *et al.*, 1998). Estos puentes disulfuro muestran ser esenciales para la actividad catalítica de estas enzimas, una vez que el tratamiento con agentes reductores, como β -mercaptoestanol o ditionotriol (DTT) las inactiva, como es descrita para otras serino proteasas de veneno de serpiente (Pirkle *et al.*, 1998, Tatematsu *et al.*, 2000) las trombinas “like” de los venenos de serpiente (SVTLE’s) son inhibidas por moléculas inhibitoras clásicas de serinoproteasas tales como DFP (fluorofosfato de diisopropil) y PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), lo que confirma la función de serinoproteasa de estas enzimas. (Pirkle, 1998).

Las trombinas “like” de venenos de serpientes (SVTLE’s) son compuestas generalmente por una cadena polipeptídica. La mayoría presenta glicosilaciones en residuos de asparagina, mas no en posiciones conservadas. El contenido de carbohidratos

unidos varia largamente (0 a 30% del peso), teniendo participación hay veces en el reconocimiento de sustratos por la enzima y principalmente, en la estabilización de la estructura terciaria de estas enzimas (Castro *et al.*, 2004) Aunque la región central próxima a la triada catalítica de las trombinas “like” sea bastante conservada, estas enzimas presentan considerables diferencias estructurales de una para otra, lo que explica las diferentes especificidades y actividades en relación a los diversos inhibidores y sustratos en que actúan (Krem y Di cera, 2001) La discusión de este tema es facilitada por el uso de nomenclatura, los aminoácidos en la porción N-terminal del enlace clivado por la proteasa son enumerados de acuerdo con su posición en la cadena, partiendo del enlace (P1, P2, P3 y así por delante). Los aminoácidos de la porción C-terminal son enumeradas como P1', P2', P3', etc. (Schechter y Berger, 1967).

2.2.7 SVTLE's en la cascada de coagulación

La trombina cliva el fibrinógeno en dos enlaces Arg-Gly, una en la cadena A α (liberando fibrinopeptidos A) y otra en la cadena B β (liberando fibrinopeptidos B). algunas trombinas “like” de venenos de serpiente (SVTLE's) clivan el fibrinógeno en ambas cadenas, pero la mayoría de ellas cliva el fibrinógeno en apenas una cadena (A α o B β), las trombinas “like” pueden entonces ser clasificadas de acuerdo con su actividad sobre el fibrinógeno: SVTLE's FP-A o venobim A (clivan preferencialmente la cadena A α liberando fibrinopeptidos A). SVTLE's FP-B o venobim B (clivan preferencialmente la cadena B β liberando fibrinopeptidos B) y SVTLE's FP-AB o venobim AB (clivan las cadenas A α y B β liberando fibrinopeptidos A y B) (Komalik, 1990, Markland, 1997, Braud *et al.*, 2006 y Ponce-Soto *et al.*, 2007).

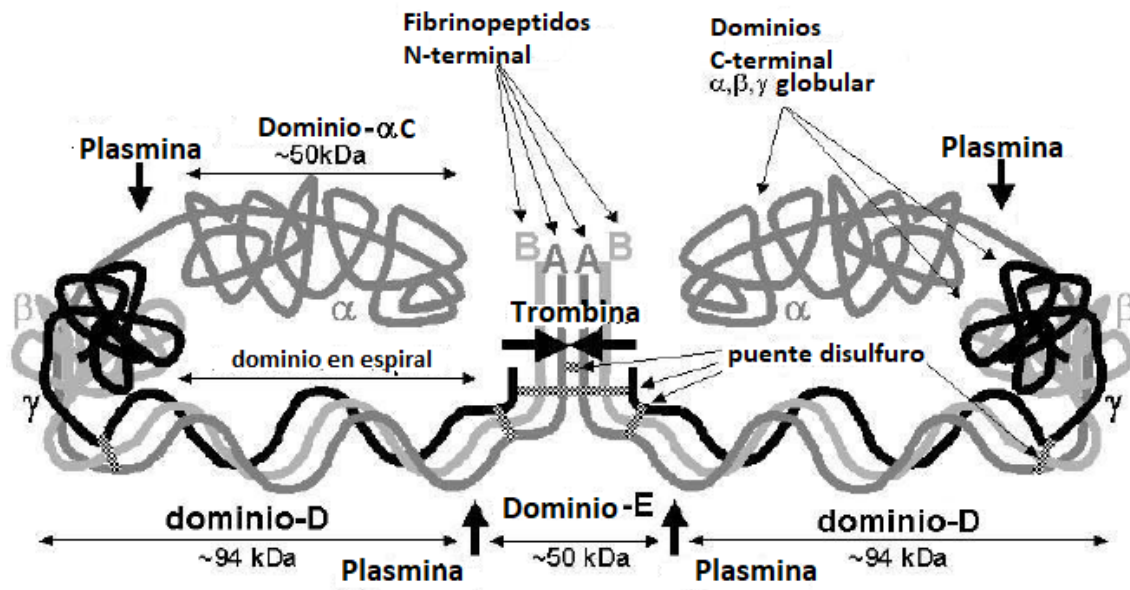


Figura 7. Degradación del fibrinógeno (Adoptado de Zaganelli *et al.*, 1996)

Algunas de estas SVTLE's conocidas como Ancrod aislada del veneno de *Agkistrodon rhodostoma* (Burkhart *et al.*, 1992) Batroxobin, aislada de *Bothrops atrox* (Stocker *et al.*, 1976) y crotalasa, aislada de *Crotalus adamanteus* (Markland *et al.*, 1971) esas enzimas liberan preferiblemente el fibrinopeptido A (FPA) y por lo tanto pertenecen a la clase de Venombin A, estas no activan el factor XIII u otros factores de coagulación y no causan agregación plaquetaria, de esta forma el coagulo producido no posee enlaces covalentes entre las cadenas de fibrina (Marsh, 1994) las SVTLE's que liberan los fibrinopeptidos A y B y activan el factor XIII son conocidas como Venombin AB y poseen como ejemplo a la enzima aislada del veneno de *Bitis gabonica* (Pirkle, 1998). Enzimas como contortrixobina, aislada a partir *Agkistrodon contortrix* (Amiconi *et al.*, 2000) y okinaxobin I, aislada de *Trimeresurus okinavensis* (Iwasaki *et al.*, 1990) representan una tercera clase de venombinas, conocidas como Venombin B, que liberan preferiblemente (FPB)

2.3 MARCO CONCEPTUAL

Coagulo: Masa de sangre que se forma cuando las plaquetas de la sangre, las proteínas y las células se pegan entre sí. Cuando un coágulo de sangre se adhiere a la pared de un vaso sanguíneo, se llama trombo. Cuando se mueve por el torrente sanguíneo y bloquea el flujo de la sangre hacia otra parte del cuerpo, se llama émbolo. (Gutiérrez *et al.*, 2003)

Cromatografía: Técnica que separa los componentes de una muestra de veneno según su polaridad, tamaño molecular o carga eléctrica (Pazos y Álvarez, 2015).

Electroforesis: Técnica utilizada comúnmente para analizar proteínas (Lehninger, 2005).

Fibrinógeno: Sustancia albuminoidea soluble, existente en la sangre y otros fluidos animales, que, por la acción de un fermento, se descomponen y dan origen a la fibrina. (Ponce-Soto *et al.*, 2007).

Hemostasia: Conjunto de factores responsables por la manutención del fluido sanguíneo en el interior de los vasos sanguíneos (García y Navarro, 2005).

Isoforma: una de las distintas formas de una misma proteína, las distintas formas de una proteína podrían ser generadas por genes relacionados, o podrían generarse por el mismo gen a través del proceso de splicing alternativo, o maduración diferencial. (Lehninger, 2005).

Proteólisis: Es la degradación de proteínas ya sea mediante enzimas específicas, llamadas peptidasas, o por medio de degradación intracelular (Lehninger, 2005).

Purificar: Se llama purificación a la acción y efecto de devolver al cuerpo su pureza. Se recurre a ella ya como medida de limpieza (Pazos y Álvarez, 2015).

Serinoproteasa: se llama serinoproteasas a las enzimas capaces de generar proteólisis sobre los residuos de serina mediante su sitio de actividad catalítica (Kini *et al.*, 2005).

Trombina “like”: Enzimas que actúan de manera semejante a la trombina, proteína humana responsable de la coagulación de sangre. Distribuidas en varios géneros de serpientes (*Agkistrodom*, *Bothrops*, *Lachesis* y *Trimeresurus*), así como en víboras verdaderas (*Bitis* y *Cerastes*) y los culibrideos *Dispholidus typus* (Pirkle, 1998).

Veneno: Sustancia química u orgánica que, introducida en el organismo, produce la muerte o graves trastornos (Markland, 1997).

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, con colaboración del 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 fue de tipo experimental y descriptivo.

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

Para el presente trabajo de investigación no se realizó pruebas “*in vivo*” todas las pruebas fueron realizadas “*in vitro*” el veneno total de *Bothrops roedingeri* fue cedido por el Laboratorio de Química Biológica de la Escuela Profesional y Académica de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa a cargo del Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D. (Director del área de investigación de la Universidad Católica Santa María de Arequipa).

3.4. METODOLOGÍA

3.4.1. Purificación de una serino proteasa con actividad trombina “like” del veneno de *Bothrops roedingeri*

a) Cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex G-75.

Fundamento

La cromatografía de exclusión molecular es un tipo de cromatografía líquida en la cual la fase estacionaria es sólida y la fase móvil es líquida. Se utiliza el término de “Cromatografía de exclusión por tamaño”. Su principal aplicación es la separación de las moléculas en función de su tamaño con la finalidad de estudiar el peso molecular distribución de los polímeros (Pazos y Álvarez, 2015).

Procedimiento

El veneno total de *Bothrops roedingeri* (50 mg.) fue disuelto en 200 μ l de tampón bicarbonato de amonio 0,1 M pH=7.8 hasta su homogenización. El homogenizado fue sometido a una clarificación por centrifugación a 450 g por 10 minutos; el sobrenadante obtenido fue aplicado en una columna pre-empaquetada de Superdex G-75 de exclusión molecular (0,78 X 80 cm) (waters) previamente equilibrada con un tampón bicarbonato de amonio pH=7.9, 0.1M y programada para 180 minutos, acoplada a un sistema LC 650 E (waters). La elusión del material fue realizada a un flujo constante de 0,3 ml/min. y fue monitoreado a una absorbancia de 280 nm. Las fracciones de 300 μ L fueron colectadas en un colector de fracciones Foxy 200, luego liofilizadas y guardadas a -20°C .

b) Cromatografía en HPLC de fase reversa**Fundamento**

La HPLC es una técnica que separa los componentes de una muestra según su polaridad, tamaño molecular o carga eléctrica. De acuerdo a la propiedad en la que se base la separación de los componentes se escoge la matriz a utilizar en la cromatografía. Las muestras de los venenos por su naturaleza pueden venir acompañadas de una muy baja concentración de sales, lípidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos, polisacáridos, etc. que no interfieren en general en la separación mediante HPLC (Pazos y Álvarez, 2015).

Procedimiento

Las fracciones con actividad proteolítica y fibrinogenolítica de la etapa anterior fueron repurificadas en una columna μ -Bondapak C18 (0,78 X 30 cm) preparativa, previamente equilibrada con ácido trifluoracético 0.1% pH= 3.5 (Tampón A) acoplada a un sistema de HPLC de fase reversa. El sistema cromatográfico usado fue de HPLC-PDA 991 (waters), equipado con dos bombas (waters) modelo 510/B, un inyector automático de muestras U6K con un lazo o asa de 2,0 ml de capacidad. Inicialmente, la elución de las muestras fue realizada a través de un gradiente lineal con Acetonitrilo 66% (Tampón B), que puede ser modificado para la optimización de la purificación de las fracciones, así como también del veneno total. Las fracciones fueron monitoreadas a 280 nm.

3.4.2. Caracterización físico-química de una isoforma de serinoproteasa a través de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y espectrometría de masas

a) Determinación de peso molecular mediante (Electroforesis en SDS-PAGE)

Fundamento

La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico. La separación puede realizarse sobre la superficie hidratada de un soporte sólido (p. ej., electroforesis en papel o en acetato de celulosa), a través de una matriz porosa (electroforesis en gel), o bien en disolución (electroforesis libre). Dependiendo de la técnica que se use, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa. (Pazos y Álvarez, 2015).

Procedimiento

La electroforesis en gel de poliacrilamida fue realizada siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970). Las placas de poliacrilamida son realizadas de modo discontinuo, presentando un gel de concentración de 5 % y un gel de corrida de 12,5 %. Las placas son preparadas utilizando una solución de acrilamida stock (30%T, 0,8%C). El gel de concentración a 5 % es preparado utilizándose un tampón Tris-HCl 0.5M de pH = 6,8 y el gel de corrida es elaborado utilizándose un tampón Tris-HCl 1M de pH = 8,8. A ambos geles se les agrega SDS al 20% en cantidad suficiente para llevar a una concentración final de 0.5% (v/v).

La electroforesis PAGE-SDS es realizada en sistema doble de mini placas SE 250 Mighty Small II (Hoeffer scientific instruments). Las muestras y los marcadores de masa molecular son disueltos en tampón de muestra (Tris-HCl 0,075M; pH = 6,8; 10% glicerol;

4% de SDS; 0,001% de Bromofenol). 10 μ L de cada muestra y 15 μ L del marcador fueron aplicados separadamente en los pocillos de gel. La corrida electroforética es realizada a 30 mA. Voltaje libre durante 90 minutos.

Fueron usados como padrón los siguientes marcadores moleculares, obtenidos de fábrica: fosforilasa b (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina de soja (20 kDa) y lisozima (14kDa). Después de la corrida electroforética los geles son coloreados con solución de Comassie Blue 0,05% a 37°C, y el exceso de colorante es removido con ácido acético al 10%. Y finalmente la reacción fue interrumpida con adición de agua.

b) Determinación de la secuencia de aminoácidos de la TLRoed mediante Espectrometría de Masas en Tadem Electrospray (ESI)

Fundamento

Los estudios necesarios para la caracterización estructural de la proteína, son realizadas en el Laboratorio de Espectrometría de Masas Thomson, del Instituto de Química sobre la responsabilidad del Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D.

La determinación de la masa total y el estudio de homología secuencial de los diferentes péptidos obtenidos por clivajes enzimáticos serán analizados por espectrómetros acoplados a sistemas de cromatografía de alto desempeño y serán utilizados con fuentes de ionización tipo Maldi (Matrix Assisted Laser Desorption Ionización) y nanoelectrospray (ESI). Para el estudio del alineamiento de los fragmentos peptídicos será utilizado bancos de datos, dentro de ellos el NCBI-BLAST (ALTSCHUL, 1990).

Procedimiento

La espectrometría de masas en tandem ESI-CID-MS/MS fue realizada en un espectrómetro de masas híbrido Quadrupole-Time of Flight (Q-TOF, Micromass Manchester, UK), equipado con una fuente de nano spray operando en modo de ionización positivo. Las condiciones de ionización fueron: voltaje capilar de 2,3 kV, un cono voltaje y lentes RF1 de 30 y 100V, respectivamente y una energía de colisión de 10eV. La temperatura de la fuente fue de 70°C y el cono de gas fue N₂ a un flujo de 80l/h. No fue utilizado gas nebulizador para la obtención del spray. Gas argonio fue utilizado para fragmentación de los iones. Fue realizada la calibración externa con yoduro sódico en una faja de masas a partir de 50 hasta 3000 m/z. Todos los espectros fueron adquiridos con el analizador TOF en modo “Vmode” (TOF kV=9.1) y voltaje MCP a 2150V.

3.4.3. Caracterización enzimática de una isoforma de serinoproteasa con actividad trombina “like” a través de su actividad proteolítica, fibrinolítica, inhibición de la actividad serinoproteasa en la presencia de PMSF (fenilmetilsulfonilfluorido)

a) Determinación de la actividad proteolítica

Fundamento

El sustrato sintético, *p*-nitroanilida, (DL-BAPNA) fue utilizado para el dosaje de la muestra. Este sustrato ha sido empleado para medir la actividad amidásica para enzimas proteolíticas tales como: tripsina, quimiotripsina, factor Xa, calicreína plasmática humana, trombina y plasmina humana. Estos sustratos, péptidos derivados de *p*-nitroanilida, han sido ampliamente utilizados principalmente por la alta sensibilidad fotométrica de la absorbancia a 405 nm de la *p*-nitroanilida liberada después de la

hidrólisis enzimática, según el método de Erlanger, *et al.*, (1961) con las consiguientes modificaciones.

Procedimiento

El sustrato cromogénico utilizado fue BApNA (N α -BENZOIL-DL-ARGININA *p*-NITROANILIDA) (Sigma chemical company USA) 0,1 M para el dosaje de la fracción (1 mg/ml.); 20 μ l de la muestra de serino proteasa fueron colocados en un medio de incubación que contenía 1000 μ l. de solución de sustrato previamente disuelto en Dymethyl sulfoxido (Fisher scientific company USA.) como solución stock para ser utilizado en la proporción de 1/10 (10 μ l.) en tampón Tris-HCl, 10 mM, 10 mM CaCl₂, 100 mM NaCl, pH=7.8, además de contener 250 μ l. más de tampón. Para un volumen final de 1850 μ l. Después de 30 minutos la reacción fue bloqueada con ácido acético 30% (500 μ l.). Los cambios de absorbancia fueron leídos a 405 nm.

Variables analizadas

La determinación de la actividad proteolítica se observó en tres lecturas (L1, L2 y L3) y lo que se comprobó es cuál es la fracción que produce igual o diferente resultado.

$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5$. La lectura de la actividad catalítica es igual en la fracción 1, fracción 2, fracción 3, fracción 4 y veneno total. (Hipótesis del trabajo).

$H_0 \neq \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5$. La lectura de la actividad catalítica es diferente en la fracción 1, fracción 2, fracción 3, fracción 4 y veneno total. (Hipótesis de investigación).

Aplicación bioestadística

Los resultados fueron expresados por el promedio y el \pm error estándar. ANDEVA seguido por la prueba múltiple "Tukey", utilizando para la comparación estadística de los

datos (análisis de importancia). El análisis estadístico se realizó utilizando las funciones estadísticas del programa Origin v.2017 (OriginLab Corporation, MA, USA). El valor a considerarse significativo es el de $p < 0,05$.

b) Efecto del tiempo en la degradación del fibrinógeno

Fundamento

La determinación de la actividad coagulante de los venenos se basa en la adición de soluciones de veneno a muestras de plasma que contiene citrato de sodio como anticoagulante. También se puede estudiar el efecto coagulante empleando soluciones de fibrinógeno, lo cual permite cuantificar la actividad de enzimas “tipo trombina”. Se cuantifican los tiempos de coagulación de estas muestras. (Pazos y Álvarez, 2015)

Procedimiento

Fue utilizado fibrinógeno bovino (Fraction I from bovins plasm, conteniendo 40-60% de citrato de sodio de Armour pharmaceutical company USA. Esta actividad fue evaluada en gel discontinuo de Poliacrilamida (SDS-PAGE) como establecida por Laemmli (1970) y Ouyang y Teng (1976). Se han preparado varios tubos de ensayo que contienen 900 μ L de la solución de fibrinógeno 0,2% (2 mg / ml tampón Tris-HCl 0,1 M Ph 7,8) mezclados con 100 μ l de una solución salina (CaCl₂ 10 mM pH 7, 8) y luego incubados por 10 minutos a 37 ° C. Después de este tiempo se añadieron independientemente a cada tubo 20 μ l de TLBroed (1 mg / ml tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,8).

Esta mezcla conteniendo la solución de fibrinógeno con las muestras fueron incubadas por diferentes períodos de tiempo: 0h, 30 min, 1h, 2h, 3h, 6h, 12h, 12h, 24h y 36h. Después de estos tiempos, las reacciones se interrumpieron con 100 μ l de una

solución desnaturalante que contenía urea 8,5 M, β -Mercaptoetanol 10%, SDS 2%; EDTA 2 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,0 y azul de Bromofenol 0,05% seguida por ebullición a 100 °C durante 5 minutos; para luego ser analizadas en SDSPAGE 12,5%.

Variables analizadas

La determinación de la actividad proteolítica se observó en 1 lectura (L1) y lo que se comprobó es cuál es el tiempo necesario para degradación del fibrinógeno a partir de suero bovino.

$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8 = \mu_9$. La lectura del efecto del tiempo en la degradación del fibrinógeno de la serinoproteasa sobre el suero es igual en la banda 1, banda 2, banda 3, banda 4, banda 5, banda 6, banda 7, banda 8, y banda 9. (Hipótesis del trabajo).

$H_0 \neq \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5 \neq \mu_6 \neq \mu_7 \neq \mu_8 \neq \mu_9$. La lectura del efecto del tiempo en la degradación del fibrinógeno de la serinoproteasa sobre el suero es diferente en la banda 1, banda 2, banda 3, banda 4, banda 5, banda 6, banda 7, banda 8, y banda 9. (Hipótesis del trabajo).

Aplicación bioestadística

Los resultados fueron expresados de forma descriptiva gracias a la vista de las bandas del gel de poliacrilamida previamente corridas por electroforesis.

c) **Inhibición de la actividad serinoproteasa por PMSF (fenilmetilsulfonil) y otros inhibidores.**

Fundamento

Se puede evaluar la capacidad inhibitoria de sustancias sintéticas o de origen natural. En estos casos se mezcla una cantidad constante de veneno con cantidades variables de la sustancia y/o sustancias potencialmente inhibitorias luego de eso se evalúa la inhibición de la actividad de la serinoproteasa (Pazos y Álvarez, 2015).

Procedimiento

La actividad específica de serinoproteasa frente a los diferentes inhibidores se calculó siguiendo el mismo protocolo para la determinación de la actividad proteolítica. La serinoproteasa se diluyó en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 en la proporción de 1 mg/ml y fue pre-incubada con el inhibidor PMSF (5 mM) por 15 min a 37 ° C antes de añadir al medio de reacción. Las proporciones de la enzima serinoproteasa con el inhibidor están en 1: 1 (v / v). Después de esto, la muestra pre incubada se colocó en el medio de reacción y la velocidad expresada en cantidades de producto formado de ρ -nitroanilida liberado después de catálisis.

Así como el PMSF, también se evaluó la actividad serinoproteasa ante el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 5 mM disuelto en agua desionizada (agente quelante de diversos iones metálicos, inhibidor de la caseína de soja (SBT1) 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (tiene la capacidad de inhibir la tripsina y la quimiotripsina) disuelto en tampón Tris-HCl 0,05 M, pH 7,8. Todos estos inhibidores también se realizaron en las mismas condiciones que el PMSF con proporciones de la serinoproteasa con el inhibidor en 1: 1 (v / v), los ensayos se realizaron en triplicados y las reacciones leídas en 405 nm en un lector VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La actividad proteolítica residual

fue calculada como actividad porcentual en relación a la preparación control que es la serinoproteasa sin agente inhibidor, la cual fue considerada el 100% de la actividad.

Variables analizadas

La determinación de la actividad inhibitoria de la serino proteasa se observó en dos lecturas (L1 y L2) y lo que se comprobó es si efectivamente el PMSF y otros inhibidores efecto sobre la serinoproteasa y si producen igual o diferente resultado.

$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$. La lectura de la actividad inhibitoria es igual para: CONTROL, PMSF, SBTI y EDTA. (Hipótesis del trabajo).

$H_0 \neq \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$. La lectura de la actividad inhibitoria es diferente para: CONTROL, PMSF, SBTI y EDTA. (Hipótesis de investigación).

Aplicación bioestadística

Los resultados fueron expresados por el promedio y el \pm error estándar. ANDEVA seguido por la prueba múltiple “Tukey”, utilizando para la comparación estadística de los datos (análisis de importancia). El análisis estadístico se realizó utilizando las funciones estadísticas del programa Origin v.2017 (OriginLab Corporation, MA, USA). El valor a considerarse significativo es el de $p < 0,05$.

3.4.4. Caracterización estructural de una isoforma de serinoproteasa con actividad trombina “like” a través de la secuencia “de novo” de su estructura y homología secuencial por Bioinformática.

a) Análisis de homología secuencial mediante bioinformática

Los análisis de secuencias peptídicas para la caracterización de la isoforma de serinoproteasa con actividad trombina “like” procedente del veneno total de Bothrops

roedingeri, será realizada, mediante el programa PROTEIN PILOT utilizando algoritmos Paragon y Progroup. La búsqueda de homólogos se realizó en la base de UniProtKB/Swiss-Prot (Swiss-Prot) 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, 2017).

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 con las herramientas EditSeq y MegAlin para poder deducir la secuencia completa de nuestra proteína manualmente por secuenciación del novo (DNASTAR, 2015).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PURIFICACIÓN DE UNA ISOFORMA DE SERINOPROTEASA CON ACTIVIDAD TROMBINA “LIKE” DEL VENENO DE *BOTHROPS ROEDINGERI*

4.1.1. Cromatografía de exclusión molecular en columna de Sephadex G-75

El perfil cromatográfico del veneno de *Bothrops roedingeri* en Sephadex G-75 mostro cuatro picos, denominados I, II, III y IV. Las fracciones fueron sometidas a ensayos de actividad proteolítica sobre sustrato cromogénico DL-BapNA, sugiriendo la presencia de la serinoproteasa de interés en la fracción II, que luego fue liofilizada y sometida a cromatografía de HPLC de Fase Reversa (Figura 8).

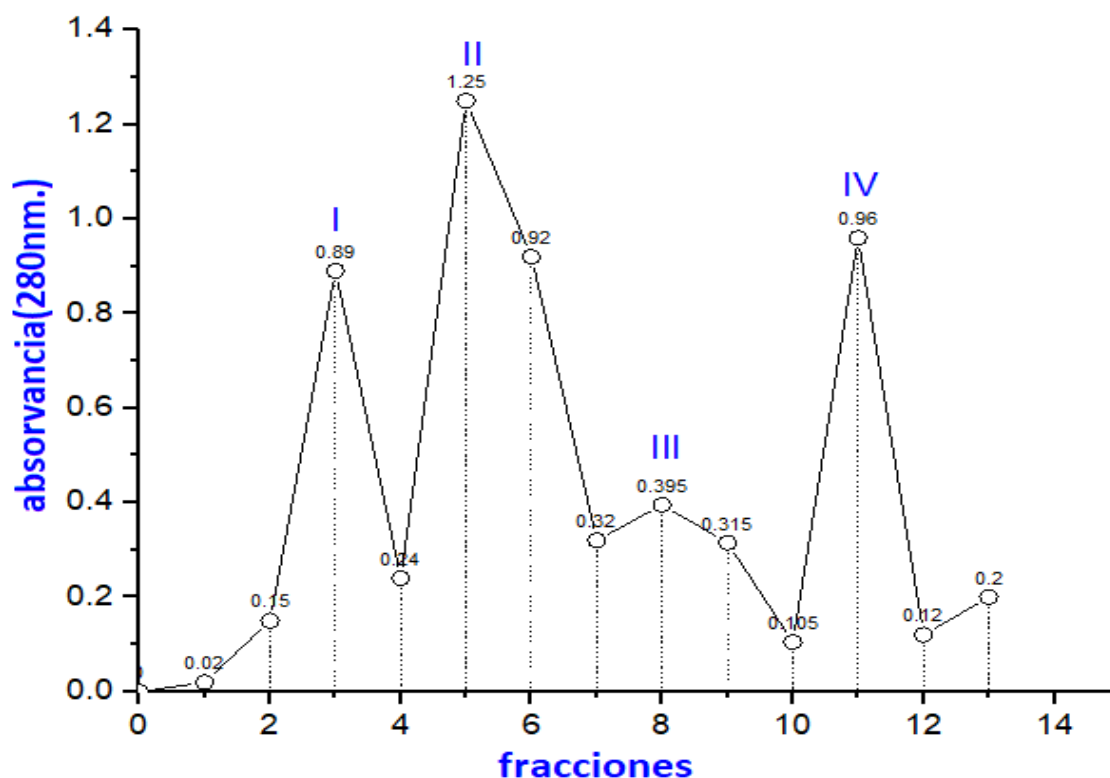


Figura 8: Perfil cromatográfico de purificación del veneno total de *Bothrops roedingeri* en una columna de Sephadex G-75. 50 mg. Del veneno total, fueron homogenizados en 1.0 mL. De tampón bicarbonato de amonio 0.2 M pH=7.8. flujo constante de 0.3 ml/min. Y monitoreada a 280nm. Laboratorio Thomson de espectrometría de masas del instituto de química UNICAMP- Sao Paulo, Brasil (junio-octubre 2018).

Para el aislamiento y purificación de la trombina “like” normalmente utilizan sistemas convencionales de purificación, que consisten entre 2 a 3 técnicas cromatográficas tales como las usadas para la presente investigación: cromatografía de exclusión molecular (Superdex 75), seguido por purificación en DEAE 5PW y por último en una columna Hi Trap Benzamidine FF (Braga *et al.*, 2006) por cromatografía de exclusión molecular Sephadex G-75 seguido por cromatografía de afinidad Sepharosa 6B Benzamidine ultrafiltrado en un sistema Amicon y HPLC en fase reversa usando columna C-18 (Sant´Ana *et al.*, 2008) columna A-50 seguido Columna G-75 y columna de A-50 (Liu *et al.*, 2009) o DEAE-Sepacel seguido da columna de cromatografía Sephadex G-75 e Benzamidine-Sepharosa (Costa *et al.*, 2010).

La utilización de varias etapas de purificación hace que se tenga la necesidad de usar pasos intermediarios a través de liofilizaciones, cuya estimación laboratorial trae consigo la pérdida de 30% de material en cada etapa de concentración. El presente trabajo tiene como visión encontrar una técnica optimizada o la mejor combinación de técnicas cromatográficas que permitan aislar serinoproteasas con actividad trombina “like”, manteniendo las propiedades de las mismas, tales como actividades enzimáticas y actividades biológicas. En este sentido (Ponce-Soto *et al.*, 2007) y (Vivas-Ruiz *et al.*, 2012) trabajaron con la serpiente *Bothrops atrox* y *Bothrops barnetti* en el aislamiento de trombinas “like” las cuales mostraron una combinación altamente eficiente entre cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-75) y cromatografía de alta eficiencia fase reversa (HPLC de fase reversa) en el aislamiento de estas serinoproteasas en comparación con otras técnicas ya mencionadas anteriormente.

Para el presente trabajo se utilizó Cromatografía de exclusión molecular en columna de Sephadex G-75 para purificar el veneno total de *Bothrops roedingeri*, el cual se nos mostró en forma de en forma de 4 picos (pico I: comprende fracciones del tubo 4

al 6), (Pico II: comprende tubos del 4 al 7), (Pico III: tubos del 7 al 9) y (Pico IV: tubos del 10 al 12). Siendo las fracciones con más actividad proteínica los tubos 5,6 y 11, los cuales presentan una absorbancia de 1.25, 0.92 y 0.96 respectivamente estas absorbancias fueron leídas a 280nm. Lo cual nos llevó a pronosticar que estábamos ante una posible serinoproteasa, los tubos 1,2 y 13 no mostraron mucha actividad proteínica. De este modo dejando de lado sus contenidos. (Ponce-Soto *et al.*, 2007) utilizando la cromatografía de exclusión molecular en columna de Sephadex G-75 obtuvo una serinoproteasa de *Bothrops atrox*. El cual produjo 8 picos de proteínas principales denominadas BaI hasta BaVIII. Y de estas la que mostro mayor absorbancia fue la proteína BaIV. Mientras que (Valeriano *et al.*, 2012) también usando cromatografía de exclusión molecular, pero con la especie *Bothrops andianus* obtuvo una serinoproteasa dando como resultado 3 picos denominados I, II y III siendo la fracción I de interés para el investigador. En tanto (Salistre; *et al.*, 19987) con la especie *Bothrops insularis* obtuvo 5 picos de proteína siendo de su interés I-SII.

4.1.2. Cromatografía en HPLC de fase reversa

El perfil cromatográfico del pico II, cuándo es sometida a la columna analítica μ -Bondapak C-18 (Waters), acoplada a un sistema de HPLC de fase reversa, observamos la presencia de 4 picos, que fueron sometidos a ensayos de actividad proteolítica sobre substrato cromogénico DL-BapNA, sugiriendo la presencia de la serinoproteasa así como también fueron realizados ensayos de tiempo de coagulación sobre fibrinógeno Bovino con el propósito de la identificación de la serinoproteasa. La fracción II denominada TLBroed fue la que presento actividad enzimática serino proteasa con característica trombina “like”. Esa fracción fue eluida en el tiempo de retención 24 ± 0.5 min, siendo al 58% del tampón B (Figura 9).

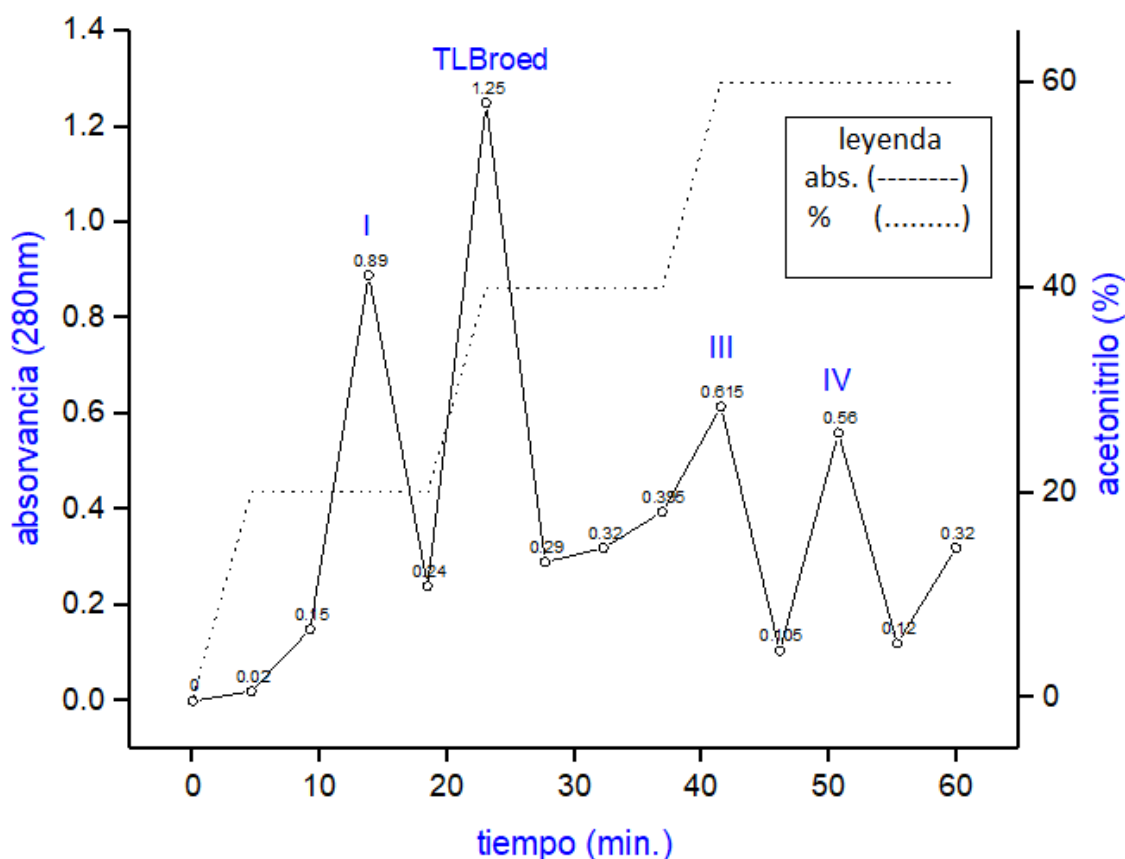


Figura 9: Cromatografía de la fracción TLBroed (trombina “like”) en fase reversa, en una columna μ -Bondapak C-18, equilibrada en solución de TFA 0.1% (Tampón A). La muestra aplicada fue de 1 mg de material obtenido en la columna de exclusión molecular. Tampón A: TFA 0,1% Tampón B: Acetonitrilo (20, 40 y 60%) en TFA 0,1% Flujo mL/min. Absorbancia 280 nm. Laboratorio Thomson de espectrometría de masas del instituto de química UNICAMP- Sao Paulo, Brasil (junio-octubre 2018)

El pico II obtenido de la cromatografía de exclusión molecular fue sometido a una segunda etapa de purificación, utilizando una columna de C-18 acoplada a un sistema de HPLC de fase reversa donde mostro también 4 fracciones principales (Fig. 9), dentro de las cuales hallamos una nueva serinoproteasa con actividad trombina “like” denominada TLBroed fue identificada. Para confirmar el grado de pureza y homogeneidad molecular de TLBroed recorreremos a diferentes técnicas de sensibilidades variadas (electroforesis, espectrometría de masas, análisis de composición de aminoácidos, secuencia de aminoácidos) que garanticen la pureza del aislamiento.

La determinación de presencia de una trombina “like” fue puesta en evidencia gracias a que mostro su actividad proteolítica sobre el sustrato cromogénico DL-BapNA, siendo indicativo que esta enzima tiene la propiedad proteolítica, actuando preferentemente sobre los enlaces Arginil, como podemos verificar que sobre el sustrato DL-BapNA, que contiene enlaces específicos (Arg-Gly), donde actúan las serinoproteasas. Mientras (Ponce-Soto *et al.*, 2007) usando también HPLC-fase reversa obtuvo 8 fracciones dentro de las cuales halló una nueva serinoproteasa denominada BaIV.

4.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE UNA ISOFORMA DE SERINOPROTEASA A TRAVÉS DE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) Y ESPECTROMETRÍA DE MASA

4.2.1. (Electroforesis en SDS-PAGE)

En el análisis electroforético mostro que la enzima purificada de *Bothrops roedingeri* aparece como una banda de 34 kDa. Calculado mediante la determinación de Rf. Valor que se encuentra dentro del rango reportado para otras SVTLE's que va desde los 29 kDa. Hasta los 67 kDa. (Analizado por SDS-PAGE) es de 27 kDa (Figura 10).

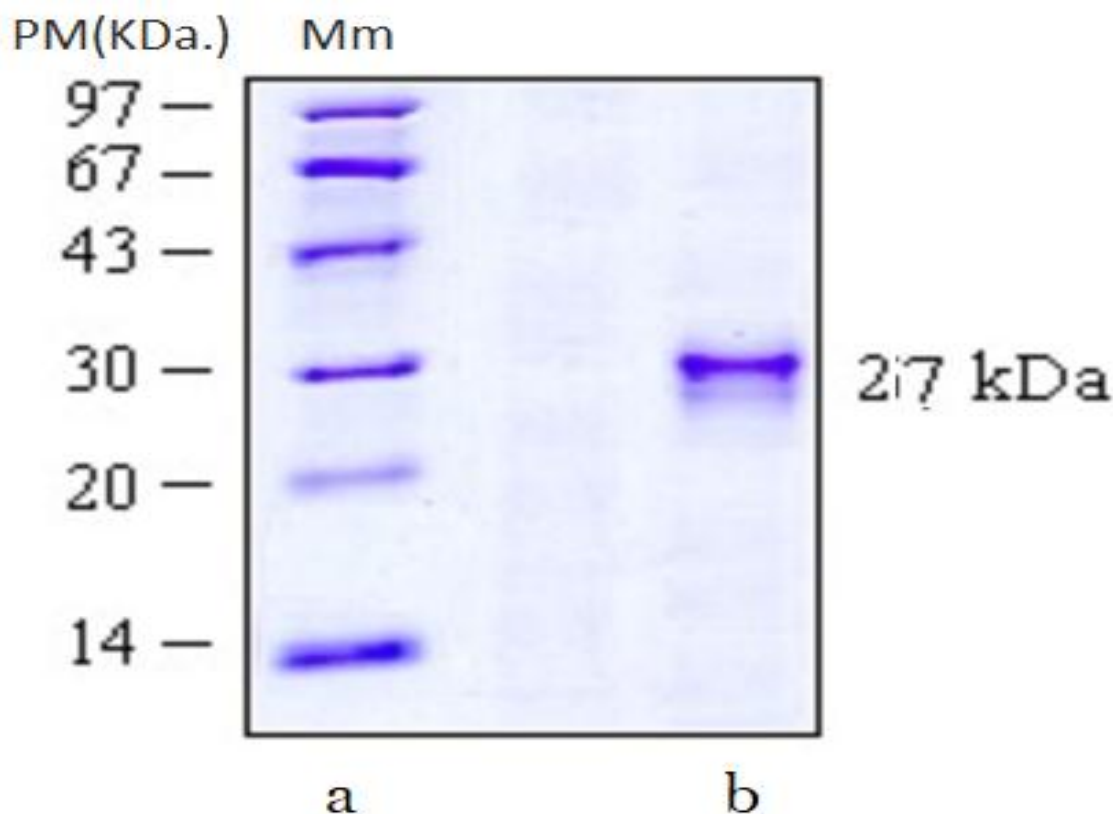


Figura 10: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SD). En a) marcadores de masa molecular. En b) la TLBroed en condiciones reductoras. Laboratorio de química de proteínas UCSM-Arequipa (junio-septiembre 2018)

El perfil electroforético de SDS-PAGE en gel de poliacrilamida de TLBroed muestra que existe una diferencia de peso molecular en cuanto a la forma por bioinformática 26 kDa. Que la realizada por electroforesis 34 kDa. Dándonos a conocer que existen enlaces de puente disulfuro (Cys-S-S-Cys) en la molécula de TLBroed.

Las enzimas trombina “like” purificadas de venenos de serpiente son proteínas de una sola cadena peptídica con pesos moleculares que varían de 26 a 67 kDa. Dependiendo de su contenido de carbohidratos (Serrano y Maroun, 2005, Kini *et al.*, 2005). El contenido de carbohidratos unidos varía largamente 0 a 30% del peso, entre lo que tenemos: N-glicanos unidos, fucosa, hexosa, ácido sialico N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) manos a, galactosa y ácido N-acetil muramico (Castro *et al.*, 2004).

Ponce-Soto *et al.* (2007) muestra como resultado de su electroforesis de *Bothrops atrox* (BaIV) que su proteína aislada posee un peso molecular de 34 kDa. Mientras tanto (Valeriano *et al.*, 2012) señala que la serinoproteasa denominada TLBan en su corrida electroforética tiene un peso molecular de 26 kDa. En condiciones reducidas en cambio en condiciones no reducidas llega a un peso molecular de 22 kDa. Por otra parte (Salistre; *et al.*, 1987) con la especie *Bothrops insularis* menciona que su serinoproteasa aislada esta con un peso molecular de 39 kDa. Asimismo, tenemos otras serino proteasas y sus pesos moleculares como: flavoridis de 23 kDa de *Trimeresurus flavoviridis* (Shieh *et al.*, 1988), PABJ de *Bothrops jararaca* 30 kDa (Serrano *et al.*, 1995) TVS-PA de *Trimeresurus stejnegeri* 33 kDa (Zhang *et al.*, 1995) LV-PA de *Lachesis muta* con 33 kDa (Sánchez *et al.*, 2000). Otras presentan masas moleculares más elevadas como cerastocitin 38 kDa de *Ceraste cerastes* (Marrakchi *et al.*, 1997) CPIE-2 de *Agkistrodon caliginosus* con 44 kDa (Shimokawa y Takahashi, 1993) Bothrops protease A de *Bothrops jararaca* reportado con 67 kDa (Murayama *et al.*, 2003).

Analizando todos estos resultados podemos ver que nuestra proteína estudiada en el presente trabajo de investigación está dentro del rango de las serinoproteasas, por consiguiente, la consideramos como tal, la presencia de serinoproteasa en *Bothrops roedingeri* que se encuentra restringido al literal peruano sugiere que este veneno sea farmacológicamente semejante a otros venenos botropicos. Pero puede haber diferencias entre los venenos de un mismo género, más si son de localidades diferentes, como sugirió (Ponce-Soto *et al.*, 2007).

4.4.2. Determinación de la secuencia de aminoácidos de la TLRoed. Mediante Espectrometría de Masas Tadem Electrospray (ESI)

Espectro de massa en tadem perteneciente a TLBroed el cual tiene el péptido crucial con una carga de 1519.6688 kDa que confirma la región N-terminal (VIGGDECNINEHR), conteniendo un residuo de histidina aminoácidos que determinan la cadena N-terminal de la proteína. (Figura 11)

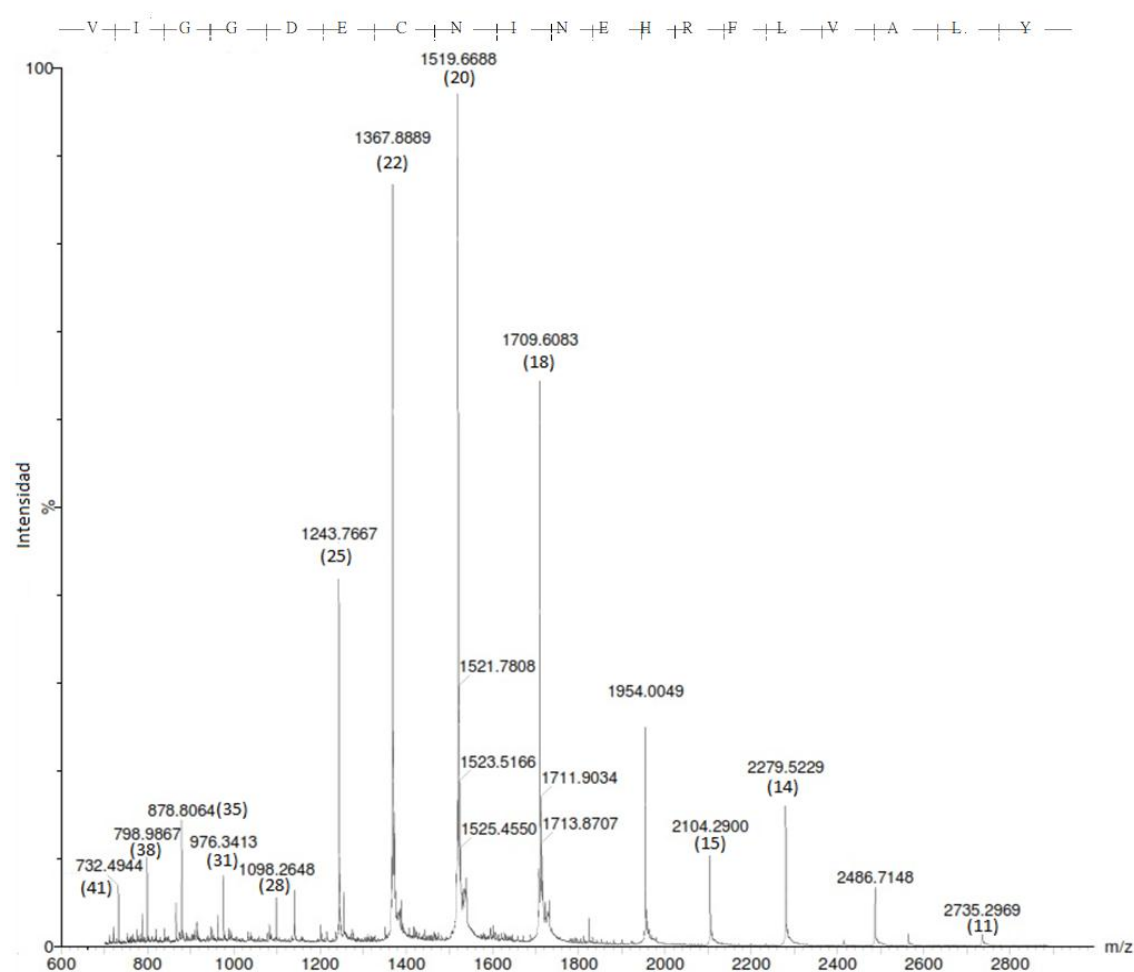


Figura 11: Espectro ESI MS/MS (conteniendo 13 residuos aminoacidicos antes de R) reflejan la región N-terminal de TLBroed a partir del veneno de *Bothrops roedingeri*. Laboratorio Thomson de espectrometría de masas del instituto de química UNICAMP-Sao Paulo, Brasil (junio-octubre 2018).

Los resultados obtenidos de la espectrometría de masa de los péptidos hidrolizados correspondientes a la serinoproteasa TLBroed del veneno de *Bothrops*

roedingeri de aproximadamente 27 KDa. Cada señal de péptido observado, se encuentra en rangos de valores de resolución que van desde 600 a 2800 m/z. nuestro péptido obtenido nos dio una señal en m/z 1516.17 m.w. el cual fue el pico que presento una resolución aceptable, a partir de ahí el espectro correspondiente obtenido nos da la secuencia N- terminal de 13 aminoácidos de TLBroed los cuales fueron (VIGGDECNINEHR) respectivamente. Esta secuencia de aminoácidos fue llevada al programa online (BLAST, 2018) Una vez hecho no muestra que verdaderamente estamos ante una serino proteasa con actividad trombina “like”. (Valeriano *et al.*, 2012) menciona que después de hacer un estudio de espectrometría de masas arroja que 11 péptidos fueron obtenidos a partir de TLBan, de la cuales el péptido 8 fue de su interés con un peso molecular 2181.57 kDa. Obteniendo la siguiente región N-terminal TFFCGMTLINQEWVLTA AH haciendo un total 19 aminoácidos que conforman este péptido de interés para su estudio.

4.3. CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE UNA ISOFORMA DE SERINOPROTEASA CON ACTIVIDAD TROMBINA “LIKE” A TRAVÉS DE SU ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA, FIBRINOLÍTICA, INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD SERINOPROTEASA EN LA PRESENCIA DE PMSF (FENILMETILSULFONILFLUORIDO)

4.3.1. Determinación de la actividad proteolítica

Actividad proteolítica evaluada en las fracciones obtenida de la cromatografía de HPLC-FR del veneno de *Bothrops roedingeri*. El perfil de la actividad proteolítica frente al sustrato cromogénico DL-BApNA muestra que la fracción II fue la que presento mayor actividad proteolítica de 0.040 ± 0.0023 nmoles/min, evidenciando la presencia de una serinoproteasa en esa fracción. Mientras tanto la fracción I con 0.008 nmoles/min, la

fracción III con 0.0093 nmoles/min y la fracción IV 0.01445 nmoles/min entretanto el veneno total de la serpiente *Bothrops roedingeri* muestra una absorbancia de 0.01833 nmoles/min mostrando de esta forma que la fracción II es elegible para continuar con la investigación. (Figura 12).

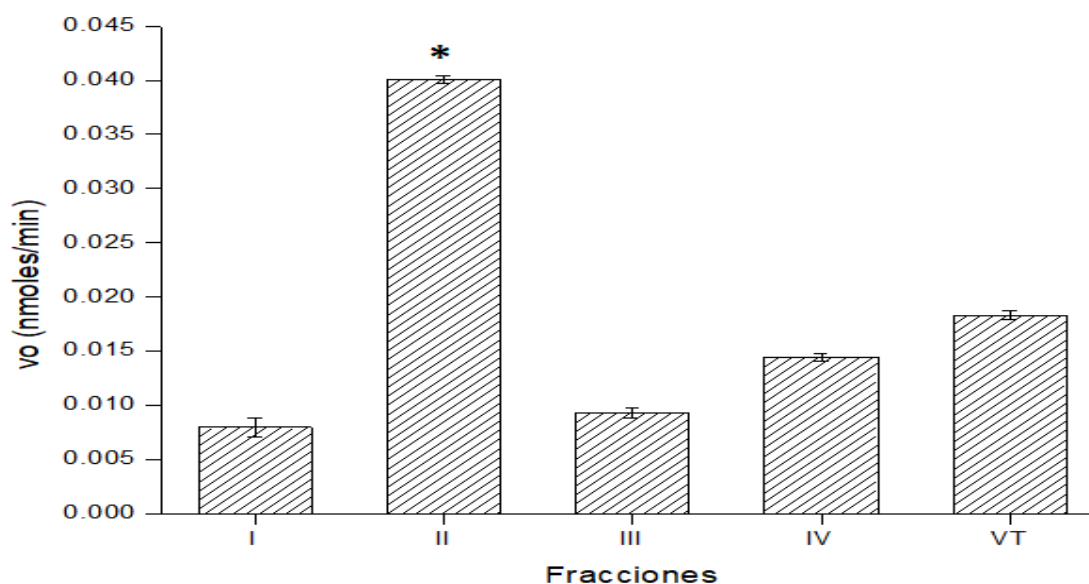


Figura 12: Actividad proteolítica de las fracciones obtenidas de la cromatografía del veneno total de *Bothrops roedingeri* en cromatografía HPLC-fase reversa. El perfil de la actividad proteolítica fue monitoreado en la absorbancia de 405 nm. (*) serino proteasa TLBroed (Proteína que será considerada en las caracterizaciones fisicoquímicas y biológicas). Laboratorio Thomson de espectrometría de masas del instituto de química UNICAMP- Sao Paulo, Brasil (junio-octubre 2018)

La fracción II muestra un alto grado de actividad proteolítica con respecto de las demás fracciones incluyendo dentro de estas al mismo veneno total dándonos a conocer que nuestra muestra problema verdaderamente está en un estado purificado. (Ponce-Soto *et al.*, 2007) también uso el HPLC- fase reversa para determinar actividad proteolítica de su proteína entonces en su investigación obtuvo que, de las 8 fracciones mencionadas con anterioridad, la fracción BaIV es la que mayor actividad proteolítica posee, asimismo (Valeriano *et al.*, 2012) nos muestra que de las 10 fracciones de proteína obtenidas de HPLC-fase reversa evidencian que la fracción I-4 presenta mayor actividad proteolítica por consiguiente también pasando a llamarse TLBan la mencionada fracción.

4.3.2. Degradación del fibrinógeno por la acción de la trombina “like” TLBroed y su análisis en SDS-PAGE

Las muestras, después de ser incubadas por diferentes periodos de tiempo como se describe en la (Fig. 13) tuvieron reacciones interrumpidas con 100 μ L de urea 8.5 M, β -Mercaptoetanol 10%, SDS 2%; EDTA 2 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,0. Los resultados mostrados claramente evidencian que la TLBroed posee actividad proteolítica sobre el fibrinógeno bovino, liberando fibrinopeptidos A, a las 2 horas y fibrinopeptidos B a las 1 hora, mostrando así que pertenecen a la familia venobim AB. La concentración de la enzima para cada ensayo fue de 20 μ L (Figura 13).

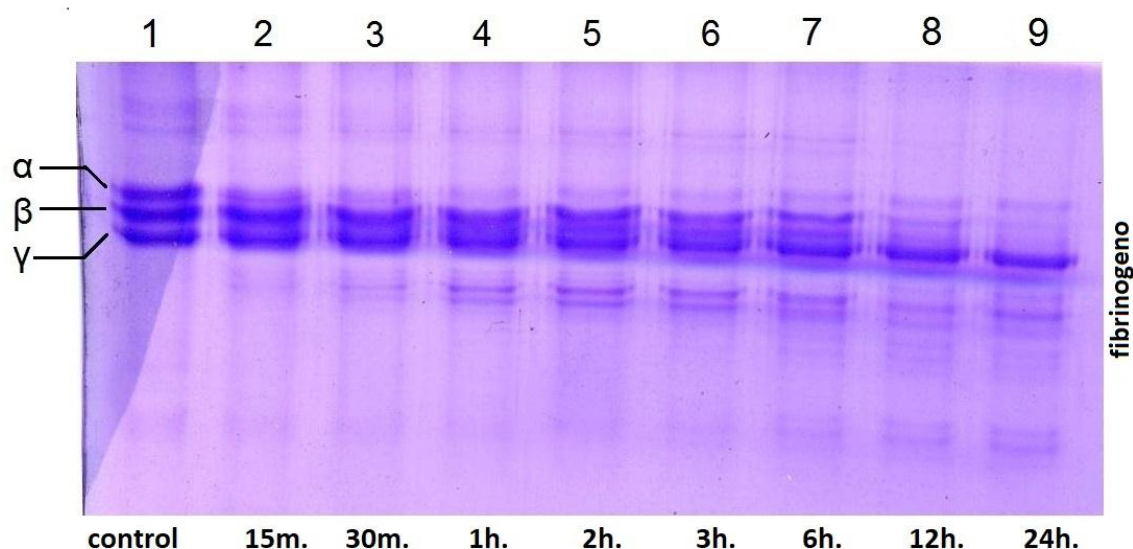


Figura 13: SDS-PAGE (12.5%). Análisis de degradación de fibrinógeno bovino por acción de la TLBroed en diferentes tiempos: 0:15, 0:30, 1:00, 2:00, 3:00, 6:00, 12:00 y 24:00 horas, fueron incubados a 37°C. Tenemos fibrinógeno como control a 0 minutos mostrando la presencia de cadenas α , β , y γ . Liberación de fibrinopeptidos A, a las 2 horas liberación de fibrinopeptidos B a las 1 hora. Laboratorio de química de proteínas UCSM-Arequipa (junio-septiembre 2018)

Nuestros resultados muestran que la TLBroed tiene actividad procoagulante frente al fibrinógeno bovino, revelando así también su actividad trombina “like” hidrolizando las cadenas polipeptídicas α y β del fibrinógeno bovino, pero no la cadena γ ; lo que sugiere que la TLBroed pertenece al grupo AB.

Existen serinoproteasas que tienen actividad fibrinogenolítica y fibrinolítica, pero muchas de ellas clivan específicamente solo el fibrinógeno, liberando preferencialmente lo que sugiere que los fibrinopeptidos A (Venombin A) o fibrinopeptidos B (Venombin B), o ambos fibrinopeptidos A y B (Venombin AB), promoviendo la coagulación. Ya que las serinoproteasas imitan la función de las trombinas de mamíferos al clivar los fibrinopeptidos A y los fibrinopeptidos B, ellas han sido conocidas como enzimas trombina “like” (Markland, 1998, Magalhaes *et al.*, 2006 y Ponce-Soto *et al.*, 2007).

Pero la leucorobina, a pesar de exhibir buena actividad liberadora del fibrinopeptido A del fibrinógeno, no exhibe el mismo perfil de actividad de la trombina sobre los sustratos naturales de esta última, pues libera fibrinopeptidos B, muy lentamente y no activa el factor XIII (Magalhaes *et al.*, 2006). Mientras tanto Ancrod de *Calloselasma rhodostoma* libera fibrinopeptidos A y B de las cadenas α e β del fibrinógeno (Burkhart *et al.*, 1992) Batroxobin (*Bothrops atrox*) libera fibrinopeptidos A de la cadena α y más lentamente fibrinopeptidos B de la cadena β (Itoh *et al.*, 1987). TLBroed degrada las dos cadenas α y β , liberando el fibrinopeptido A e B, siendo clasificada como una serinoproteasa con actividad trombina “like” tipo AB, semejante de Bileneobin de *Agkistrodon bilineatus* (Komori *et al.*, 1993) y la Brevinase de *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus* (Lee *et al.*, 1999) La TLBroed, muestra la degradación del fibrinógeno bovino siendo dependiente de la concentración dependiente al largo del tiempo.

4.3.3. Inhibición de la actividad serinoproteasa por PMSF (fenilmetilsulfonil) y otros inhibidores

Fue estudiado el efecto inhibitorio de EDTA (5 Mm), SBTI (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y PMSF (5 Mm) en la actividad proteolítica de las serinoproteasas con actividad trombina “like”

TLBroed. Los resultados muestran claro efecto inhibitorio de PMSF sobre la actividad proteolítica de la serinoproteasa TLBroed (43.24%), lo que evidencia el carácter serinoproteasa de la proteína, al ser inhibida significativamente la actividad proteolítica ante el sustrato cromogénico DL-BA ρ NA. Con los demás inhibidores la banda de inhibición fue de 55 – 70% (Figura 14).

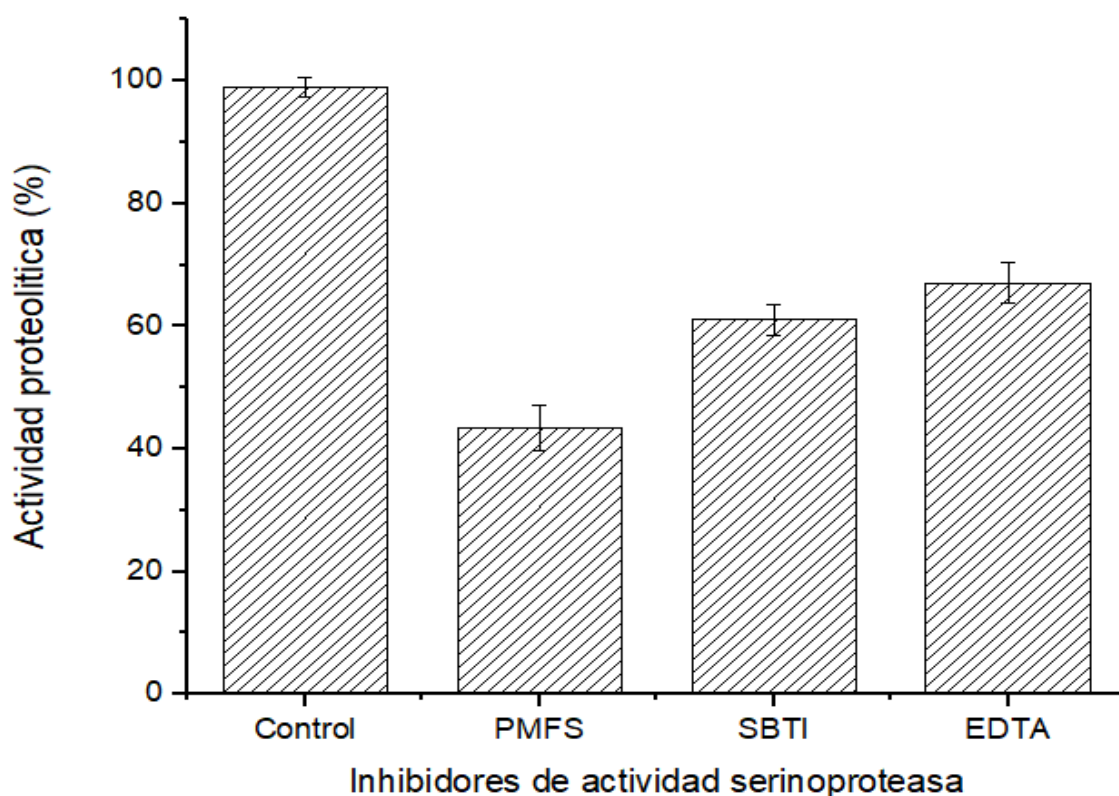


Figura 14: Efecto inhibitorio de la actividad proteolítica de la TLBroed frente a PMSF, EDTA y SBTI. Las enzimas fueron incubadas en la presencia o ausencia de inhibidores por 40 minutos a 37°C. y la lectura de absorbancia fue monitoreada en 405nm. La actividad se expresa como porcentaje de la velocidad de reacción (%), y fue calculada basada en la p-nitroanilida liberada después de la catálisis

La mayoría de las serinoproteasas actúa en diversos sustratos naturales y cromogénicos sintéticos y sus propiedades enzimáticas son generalmente afectadas por inhibidores específicos tales como PMSF, leupeptina, aprotinina y benzamidina (Braud *et al.*, 2000; Serrano e Maroun, 2005). Las serinoproteasas en general, así como aquellas procedentes del veneno de serpientes, pueden ser inhibidas por PMSF, un inhibidor competitivo, que actúa sobre las enzimas de la clase de las serinoproteasas al actuar

directamente en la triada catalítica, sobre el residuo de serina, impidiendo de esa forma que suceda la catálisis (Petretski *et al.*, 2000, Castro *et al.*, 2004, Ponce-Soto *et al.*, 2007).

En nuestro trabajo se muestra que solo el PMSF fue capaz de abolir la actividad proteolítica de la enzima TLBroed significativamente con 43.3% de actividad. Este inhibidor es altamente específico de las serinoproteasas y actúan a partir del mecanismo capaz de bloquear el sitio activo de la enzima, específicamente la del residuo serina de la triada catalítica. Por otro lado, EDTA y SBTI mostraron significativa actividad proteolítica sobre TLRoed mientras tanto (Castro, 2004). Indica que las serinoproteasas no son afectadas por los inhibidores de tripsina SBTI y alfa tripsina, sin embargo (Orthner *et al.*, 1988) hace mención de que el SBTI en algunos casos mostro su efecto inhibitorio en las concentraciones tales como ACC-C y Cerastocitin (Marrakchi *et al.*, 1995). Mientras tanto EDTA y EGTA fueron capaces de inhibir las actividades de las serinoproteasas reportados como Cerastocitin de *Cerastes cerastes* negativa para heparina y positiva para SBTI (Dekhil *et al.*, 2003) y Batroxobin de *Bothrops atrox* que también presenta inhibición negativa para heparina y SBTI (Serrano, 2005).

4.4. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE UNA ISOFORMA DE SERINOPROTEASA CON ACTIVIDAD TROMBINA “LIKE” A TRAVÉS DE LA SECUENCIA “DE NOVO” DE SU ESTRUCTURA Y HOMOLOGÍA SECUENCIAL POR BIOINFORMÁTICA

4.4.1. Homología secuencial de la TLBroed aislada del veneno de *Bothrops roedingeri*

Una vez realizado el análisis de espectrometría de masa. La fracción TLBroed con actividad trombina “like” presento las siguientes secuencias de aminoácidos utilizando el

banco de datos NCBI-BLAST, señalando un alto grado de similaridad con otras SVTLE's. (Figura 15)



Figura 15: Análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de la trombina “like” de *Bothrops roedingeri* (TLBroed) con otras serinoproteasas semejantes obtenidas de la base de datos BLAST-Protein Data Banck (Pubmed-Medline) donde las regiones con bordes amarillos representan a los aminoácidos que componen el sitio catalítico de esta clase de enzimas. Donde las regiones de anaranjado indican los residuos de cisteína y la de azul indican a los aminoácidos que establecen la región N-terminal. Laboratorio de química de proteínas UCSM-Arequipa (junio-septiembre 2018)

La secuencia de aminoácidos de TLBroed fue deducida utilizando la database NCBI-BLAST, demostrando poseer un alto grado de similaridad (Fig. 15) con Venombin A de *Lachesis muta muta* (Magalhaes *et al.*, 1993) bilineobin de *Agkistrodum bilineatus* (Nikai *et al.*, 1995) Crotalasa de *Crotalus adamanteus* (Pirkle *et al.*, 1999) Pictobin de *Bothrops pictus* (Sandoval *et al.*, 2013) Gyroxin de *Crotalus durissus terrificus* (Magalhaes *et al.*, 2009) Collenein-1 de *Crotalus durissus collineatus* (Souza *et al.*, 2015), BPA de *Bothrops jararaca* (Serrano *et al.*, 2013) Bothrobrin de *Bothrops jararaca* (Suzuki *et al.*, 1994) y GPV-TL2 de *Trimeresurus albolabris* (Pawena *et al.*, 2015).

4.4.2. Identidad porcentual en relación con la divergencia de TLBroed con algunas trombinas “like” homologas

Secuencia N-terminal de la serinoproteasa con actividad trombina “like”, sometida a investigación, bajo un banco de datos de las proteínas con secuencias ya determinadas y mostradas en la (Fig. 15). La TLBroed mostro una alta homología de en relación con otras serinoproteasas (media 67.7%) (Tabla 6).

Tabla 6: Análisis de identidad comparativo en porcentajes de la trombina “like” de *Bothrops roedingeri* (TLBroed) con otras serinoproteasas aisladas de diferentes especies. Elaborado mediante el programa MegAlign v. 8.1. Laboratorio de química de proteínas UCSM-Arequipa (junio-septiembre 2018)

		Percent Identity											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Divergence	1	■	78.5	66.7	68.4	78.5	71.5	78.9	71.9	73.7	100.0	1	TLBroed
	2	24.8	■	67.2	71.9	77.9	80.0	86.8	80.4	75.3	78.9	2	Bilionovin
	3	42.4	41.2	■	72.4	64.7	62.9	67.2	63.4	75.9	66.2	3	bothrombin
	4	38.6	33.7	34.4	■	72.1	68.5	76.0	72.5	80.0	68.9	4	BPA
	5	24.2	25.7	46.0	34.9	■	79.8	81.5	82.4	75.8	78.5	5	C-adamanteus
	6	34.5	22.7	49.1	38.8	23.5	■	75.6	99.2	69.3	71.5	6	collenein-1
	7	24.2	14.5	42.4	28.6	21.2	28.6	■	78.5	78.8	79.4	7	GPV-TL2
	8	33.8	22.2	48.3	34.3	20.1	0.8	24.9	■	73.3	71.9	8	Gyroxin-like
	9	28.9	26.6	27.2	23.9	29.8	35.5	24.6	33.0	■	73.7	9	pictovin
	10	0.0	24.8	42.4	38.6	24.2	34.5	24.2	33.8	28.9	■	10	Venombin A
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

La secuencia de aminoácidos de TLBroed fue sometida al programa MegAling de DNASTAR la cual muestra los porcentajes en cuanto identidad se refiere y a la divergencia que existe entre las mismas mostrando que TLBroed respecto a Venombin A de *Lachesis muta muta* (Magalhaes *et al.*, 1993) tiene 100% de homología y 0% de divergencia, en cambio con bilineobin de *Agkistrodum bilineatus* (Nikai *et al.*, 1995) muestra 66.7% de homología y 24.8% de divergencia; mientras que con Crotalasa de *Crotalus adamanteus* (Pirke *et al.*, 1999) se tiene 78.5% de homología y 24.2% de divergencia; entre tanto con Pictobin de *Bothrops pictus* (Sandoval *et al.*, 2013) muestra tiene 73.7% de homología y 28.9% de divergencia; con otra serinoproteasa como Gyroxin de *Crotalus durissus*

terrificus (Magalhaes *et al.*, 2009) indica que tiene 71.9% de homología y 28.9% de divergencia; mientras que con Collenein-1 de *Crotalus durissus collineatus* (Souza *et al.*, 2015) posee 71.5% de homología y 34.5% de divergencia; con otra serinoproteasa como BPA de *Bothrops jararaca* (Serrano *et al.*, 2013) tiene 68.4% de homología y 38.6% de divergencia; pero con Bothrombin de *Bothrops jararaca* (Suzuki *et al.*, 1994) tiene 66.7% de homología y 42.4% de divergencia y para con GPV-TL2 de *Trimeresurus albolabris* (Pawena *et al.*, 2015) tiene 78.9% de homología y 24.2% de divergencia. Lo que confirma que estamos ante una serinoproteasa de verdad.

4.4.3. La diversidad catalítica y la microheterogeneidad de las SVTLE's

Arbol filogenético molecular entre la serino proteasa de nuestro estudio con respecto a otras serinoproteasas homologas de acuerdo a su secuencia aminoacidica entre estos homólogos encontramos a la (collenein-1, Gyroxin-like, C. adamanteus, bilionovin, GPV-TL2, Venombin A, BPA, pictovin y la bothrombin). Observamos el árbol de filogenia molecular de proteínas entre estas serinoproteasas, donde la distancia entre una y otra proteína está en base del número de sustituciones de nucleótidos (x100) (Figura 16).

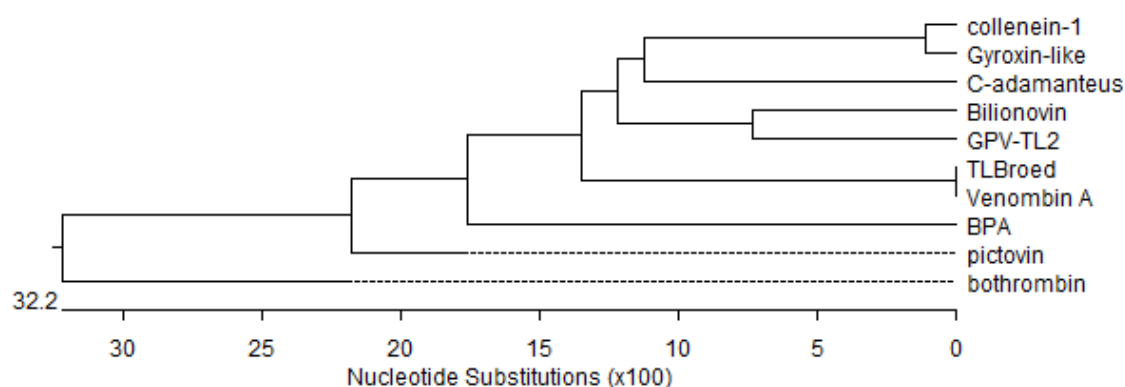


Figura 16: Árbol de relación entre algunas SVTLE's. elaborado mediante el programa MegAling, la TLBroed forma un clúster con las demás SVTLE's. del mismo género lo que evidencia un origen común. Laboratorio de química de proteínas UCSM-Arequipa (junio-septiembre 2018)

Gracias a la herramienta MegAlign de DNASTar podemos establecer un árbol filogenético molecular de TLBroed en comparación con las demás serinoproteasas encontradas gracias a la herramienta BLAST en la que podemos observar un claro ancestro común y/o antecesor común dentro de todas estas serinoproteasas altamente homologas (Collenein-1, Gyroxin-like, *C. adamanteus*, Billionovin, GPV-TL2, Venombin A, BPA, Pictobin, Bothrombin) mientras que la TLBroed comienza en el punto 32.2 (sustituciones de nucleótidos x 100) siendo este el ancestro común. se observa que Bothrombin es molecularmente diferente de todo el pool de serinoproteasas (Collenein-1, Gyroxin-like, *C. adamanteus*, Billionovin, GPV-TL2, Venombin A, BPA, Pictobin) por eso se muestra una línea divergente de la misma con respecto a otras entre tanto existe similitud muy significativa hasta podríamos aseverar que son homólogos al 100% estos son los casos TLBroed con Venombin A esto quedó demostrado en la Tabla N° 7 en el cual se señalaba que existe una homología de 100% con divergencia de 0% esto significa que estas compuestos por regiones similares de aminoácidos en su configuración. También observamos similitud al 100% entre las serinoproteasas Gyroxin-like y Collenein-1 ya que estas pertenecen al mismo género de serpientes mas no a la misma especie *Crotalus durissus terrificus* y *Crotalus durissus collineatus* los que no lleva a deducir que no necesariamente por ser del mismo género las proteínas tienen que ver con otras cuestiones.

4.4.4. Características fisicoquímicas (perfil hidropático) de TLBroed

En cuanto a características fisicoquímicas de proteínas podemos encontrar que el punto de hidrofobicidad es de vital importancia ya que gracias a ella podemos deducir la posterior naturaleza de nuestra proteína a estudiar nos brinda el grado de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos de nuestra proteína estudiada. Con ella podemos identificar y caracterizar una posible estructura. (Figura 17)

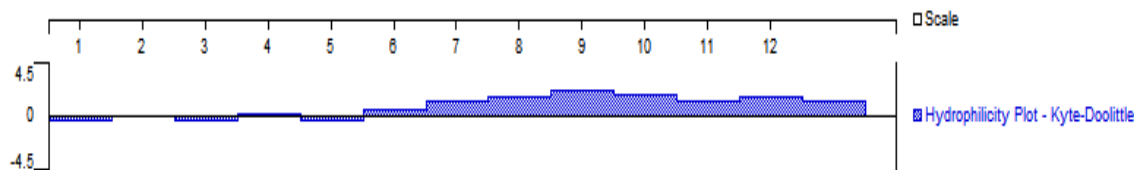


Figura 17: Perfil hidropático de la región N-terminal de la trombina “like” de *Bothrops roedingeri* (TLBroed). Elaborado mediante el programa Protean. Laboratorio de química de proteínas UCSM-Arequipa (junio-septiembre 2018)

Los resultados están basados en la escala de Kyte-Doolittle la topología de una proteína permite conocer la localización de residuos o regiones esenciales, ya sea para la función o para mantener la estructura correcta de la proteína en estudio un primer paso para este fin es la localización de regiones hidrofóbicas en la secuencia de aminoácidos esto se logra mediante la obtención del perfil hidropático. El perfil hidropático es un análisis del grado de hidrofobicidad que presenta una proteínas a lo largo de la secuencia de aminoácidos.

Los resultados mostrados en forma de graficas indicando en el eje de las ordenadas (el rango de Kyte-Doolittle -4.5 a 4.5) y en el eje de las abscisas a los aminoácidos de la cadena N-terminal VIGGDECNINEHR las mismas que son asignadas en la gráfica con números (1) V: valina, (2) I: isoleucina, (3) G: glicina, (4) G: glicina, (5) D: acido aspártico, (6) E: acido glutámico, (7) C: cisteína, (8) N: asparagina, (9) I: isoleucina, (10) N: asparagina, (11) E: acido glutámico, (12) H: histidina y (13) R: arginina. La figura N°17 nos muestra que los aminoácidos 6 a 13 muestran hidrofobicidad por lo tanto son significativos en la región N-terminal de nuestra proteína problema. Mientras que los restantes no muestran hidrofobicidad.

4.4.5. Análisis de composición de aminoácidos

Con relación al análisis de la composición de aminoácidos la Tabla 7 muestra que la TLBroed tiene un total de 228 aminoácidos de los cuales el 10% de los aminoácidos

totales son ácidos (Glu y Asp) y un elevado porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos, tales como Gly, Pro, Leu y Ile. Las 12 cisteínas detectadas evidencian la posible presencia de 6 puentes disulfuro. Todas estas características sugieren que la TLBroed es una serinoproteasa.

Tabla 7: Composición de aminoácidos de trombina “like” aislado de *Bothrops roedingeri* (TLBroed). Los valores son expresados en mol de aminoácidos por mol de proteína Laboratorio de química de proteínas UCSM-Arequipa (junio-septiembre 2018)

Analysis	Whole Protein
Molecular Weight	25628.30 m.w.
Length	228
1 microgram =	39.019 pMoles
Molar Extinction coefficient	40130±5%
1 A(280) =	0.64 mg/ml
Isoelectric Point	6.78
Charge at pH 7	-0.61

Whole Protein Composition Analysis

Amino Acid(s)	Number count	% by weight	% by frequency
Charged (RKHYCDE)	70	35.73	30.70
Acidic (DE)	23	10.82	10.09
Basic (KR)	22	12.31	9.65
Polar (NCQSTY)	68	29.96	29.82
Hydrophobic (AILFWV)	69	31.22	30.26
A Ala	8	2.22	3.51
C Cys	12	4.83	5.26
D Asp	14	6.29	6.14
E Glu	9	4.53	3.95
F Phe	11	6.32	4.82
G Gly	20	4.45	8.77
H His	5	2.68	2.19
I Ile	13	5.74	5.70
K Lys	10	5.00	4.39
L Leu	17	7.51	7.46
M Met	4	2.05	1.75
N Asn	17	7.57	7.46
P Pro	17	6.44	7.46
Q Gln	8	4.00	3.51
R Arg	12	7.31	5.26
S Ser	11	3.74	4.82
T Thr	12	4.73	5.26
V Val	15	5.80	6.58
W Trp	5	3.63	2.19
Y Tyr	8	5.09	3.51
B Asx	0	0.00	0.00
Z Glx	0	0.00	0.00
X Xox	0	0.00	0.00
. Ter	0	0.00	0.00

Para el presente ítem se utilizó dos programas DNASTar y Protparam conforme a la determinación en la composición de aminoácidos según la Tabla 7. Se evidencia poco volumen de aminoácidos ácidos como Asp y Glu, 23 en total lo que significa 10.9% así como un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos tales como Pro, Val, Leu y Ile

haciendo un 29.39%. Observamos que el peso molecular es de 25628,30 m.w. (el cual valida nuestra espectrometría de masa), longitud de 228 aminoácidos (fracción N-terminal, encontrada en la espectrometría de masa), 1 microgramo de TLBroed es 39, 019 pMoles. El coeficiente molar de extinción es de $40130 \pm 5\%$, 1A (280) es a 0.64 mg/ml, punto isoeléctrico es de 6.78, carga de pH 7 es -0.68. lo que nos indica que estamos frente a una proteína acida.

Lo que fue evidenciado en la elución de la cromatografía de fase reversa en HPLC al ser eluida en 20, 40 y 60% de tampón B (Fig. 9). Las interacciones hidrofóbicas son responsables por el arreglo molecular de la proteína, una vez que exponen los aminoácidos hidrofílicos (polares) y conservan en su interior los hidrofóbicos (apolares). La Crotalasa aislada de *Crotalus adamanteus* (Pirkle, *et al.*, 1981) registra 12 cisteínas probablemente implicadas en la formación de seis puentes disulfuro; Investigaciones recientes indican subsecuentemente que no hay ningún sulfidrilo libre (Souza *et al.*, 2013, Vivas-Ruiz *et al.*, 2012).

Según el análisis de composición de aminoácidos, podemos inferir que se trata de una proteína de carácter acido, lo que se podría correlacionar con las ya existentes en los bancos de datos. Las estructuras primarias de todas estas enzimas tipo Trombina “like” han sido determinadas (Itoh *et al.*, 1987, Burkhart *et al.*, 1992, Pirkle *et al.*, 1996) basándose en la homología con serinoproteasas de mamífero. Al respecto existe un acuerdo general acerca del posicionamiento de los tres residuos laterales activos (usando la Trombina “like” Ancrod purificada a partir de veneno de *Calloselasma rhodostoma* que es responsable de la numeración) incluyendo a la serina₁₉₅ (residuo 178), histidina₅₇ (residuo 43) y ácido Aspártico₁₀₂ (residuo 88).

4.4.6. Determinación del punto isoelectrico calculado de la región N-terminal de TLBroed mediante bioinformática

Gracias al programa ProtParam (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) obtenemos el punto isoelectrico graficado el cual nos muestra que el Punto isoelectrico de la serinoproteasa TLBroed es de 6.8. (Figura 18)

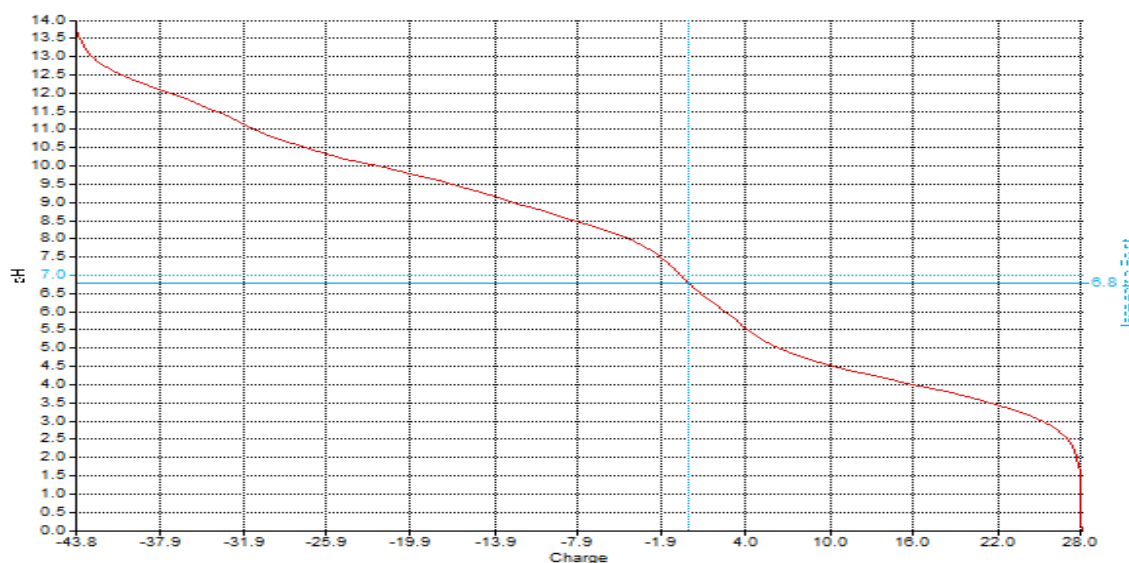


Figura 18: Análisis del punto isoelectrico a través de la herramienta Protean de DNASTar. Laboratorio de química de proteínas UCSM-Arequipa (junio-septiembre 2018)

El punto isoelectrico en el valor de pH, en el cual su carga neta es cero por lo que, su movilidad electroforética es nula. Dentro de las serinoproteasas con actividad trombina “like” purificadas, se encuentran muchas que presentan un pI ácido en torno 4 a 5 (Tu *et al* 1996, Cavinato, *et al.*, 1998, Smolka, *et al.*, 1998) debido a ello actualmente la purificación y caracterización de serinoproteasas ácidas es intensa.

La muestra indico un punto isoelectrico de 6.8 lo que conlleva a ver que se obtuvo una proteína ligeramente ácida, pero ácida al fin y al cabo con lo que confirmamos que estamos ante una serinoproteasa.

V. CONCLUSIONES

- Se purificó una isoforma de serinoproteasa con actividad trombina-like a partir del veneno total de *Bothrops roedingeri* por medio de cromatografía de exclusión molecular Sephadex-75 y de una cromatografía de alta eficiencia (HPLC de fase reversa). Sin perder actividad enzimática.
- Se caracterizó físico-químicamente una isoforma de serino proteasa (TLBroed) a través de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (27 KDa.) y también se obtuvo la región N-terminal (VIGGDECNINEHR) por espectrometría de masas en Tadem Electrospray (ESI). Con estudios de caracterización estructural de la TLBan. Ambas metodologías mostraron que TLBroed se encuentra dentro del intervalo de la familia de las serinoproteasas tipo trombina-like asimismo tiene un carácter ácido por la composición de aminoácidos y una alta homología secuencial de su estructura primaria con otras serinoproteasas con actividad trombina-like.
- Se caracterizó enzimáticamente una isoforma de serinoproteasa a la cual denominamos como TLBroed demostrando actividad proteolítica sobre el cromógeno sintético DL-BapNA ($V_{max}=4.006 \times 10^{-2}$, asimismo la actividad fibrinogenolítica liberando fibrinopeptidos α y β del fibrinógeno bovino siendo inmersa en el grupo de los Venombin AB, y siendo inhibida la actividad serinoproteasa en presencia de PMFS (43.34%) y otros dos inhibidores como el EDTA y el SBTI.
- Se caracterizó estructuralmente una isoforma de serinoproteasa con actividad trombina-like a través de la secuencia “de novo” y homologado con otras serinoproteasas de venenos de serpientes a partir de la secuencia N-terminal

(VIGGDECNINEHR), esta homología entre enzimas coagulantes fue confirmada por la presencia de residuos de valina como primer aminoácido de la región N-terminal mostrando un alto grado similitud con estas a través de herramienta bioinformáticas.

VI. RECOMENDACIONES

- Continuar con el estudio de serinoproteasa de venenos de serpiente con la finalidad de tener mayor conocimiento y a mayor escala sobre este tipo de proteínas ya que la química de proteínas y otras técnicas moleculares de alta complejidad son de gran utilidad para desarrollar futuros agentes terapéuticos contra alguna patología que hoy en día acechan a la población de esta manera hacer investigaciones de utilidad para con nuestra sociedad.
- Fomentar, dar iniciativa e incentivo a futuras investigaciones en toxicología sobre componentes de venenos de otras serpientes que alberga nuestra región y país, también de venenos de otro tipo de especies que a lo largo del tiempo puedan ayudar también como agentes terapéuticos.
- Realizar investigaciones sobre serinoproteasas de venenos de serpientes aplicando otras técnicas moleculares como electroforesis en 2D, cDNA, actividad letal LD50, cristalografía, difracción de rayos x.
- Realizar investigaciones aplicando modificaciones genéticas en especies de hongos como *Pichia pastoris* para el aislamiento de serinoproteasas a escala industrial.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, F., Madden, L., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, J., (1990). *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic. Acids. Res. 25, 3389-3402.
- Animales y plantas de Perú. Blogspot Actualizado (4 de junio de 2007), citado 30 Oct (2017) Disponible en:
<https://animalesyplantasdeperu.blogspot.pe/2007/06/vbora.html>
- Allford, L. y Machin, J. (2004). *Hemostasis*. Surgery, Saint Louis 22(8), 200a-200d
- Baker, J. y Tu T. (1996). *Atroxase: a fibrinolytic enzyme isolated from the venom of western diamondback rattlesnake: isolation, characterization and cloning*. Toxicon. 34, 291.
- Baldwin, J., Cowell, L., Kostolich, M., Tyler, D. y Sempere, C. (1998). *Hemostasia fisiologia e tratamento dos distúrbios hemorrágicos em paciente cirúrgicos*. In: Slatter, D. Manual de cirugía de pequeños animales. 2. ed, São Paulo: Manole 3, 36-65.
- Barrett, J. y Rawlings, D. (1995). *Families and clans of serine peptidases*. Arch. Biochem. Biophys. 318, 247-250.
- Bjarnason, B., Barish, A., Drenzo, S., Campbell, R. y Fox, W. (1983). *Kallikrein-like enzymes from Crotalus atrox venom*. J. Biol. Chem. v. 258, p.12566-12573.
- BLAST NCBI: *Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI)* agosto 2017.
- Braud, S., Bon, C. y Wisner, A. (2000). *Snake venom proteins acting on hemostasis*. Bioquímie 82, 851-859.

- Carlson, S. y Desancho, T. (2010). *Hematological issues in critical patients with cancer*
III. Critical Care Clinics, Philadelphia. 26, 107-132.
- Cahuana, G., Vivas, D., Rodríguez, E. y Yarlequé, A. (2012). *Purificación y características de bilineatobina, una proteína coagulante del veneno de la serpiente peruana arborícola Bothrops bilineatus (loro machaco)*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 78(1), 43-52.
- Campbell, A. y Lamar, W. W. (1989). *The venomous reptiles of Latin America*. The Herpetologist leaguem (pub). Museum Natural History. Pittsburgh, U.S.A.
- Campbell, A. y Lamar, W.W. (2004). *the Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. 2 volumes. Comstock Publishing Associates, Ithaca and London. 870. 1500 plates.
- Carrillo, E. y Icochea, J. (1995). *Lista taxonómica preliminar de los reptiles vivientes del Perú*. Publicaciones del Museo de Historia Natural. Univerdad Nacional Mayor de San Marcos. (A) Nro. 49: 1-27.
- Cheville, F. (2009). *Hemostasia e trombose*. In: CHEVILLE, N. F. *Introdução à patologia Veterinária*. 3 Edic, Barueri, São Paulo: Manole 6, 146-151.
- Costa, O., Fonseca, C., Mamede, N., Beletti, E., Santosfilho, A., Soares, M., Arantes, C., Hirayama, S., Selistre-De-Araujo, S., Fonseca, F., Henrique-Silva, F., Penhasilva, N. y Oliveira, F. (2010). *Bhalternin: Functional and Structural Characterization of a new Thrombin-like enzyme from Bothrops alternatus snake venom*. *Toxicon*, v. 55, p. 1365-1377.
- Costa, C., Belchor, N., Rodrigues, C., Toyama, O., Oliveira, A., Novaes, P. y Toyama, M.H. (2018). *Edema inducido por una serina proteasa de veneno de Crotalus*

durissus terrificus (Cdtsp 2) implica la ruta PAR y la activación de PKC y PLC. *Revista internacional de ciencias moleculares*, 19 (8), 2405. Doi: 10.3390 / ijms19082405

DNAStar (2015). *Software que proporciona lo necesario para la información genómica, y proteómica de la biología estructural, marzo 2015*

Deshimaru, M., Ogawa, T., Nakasjima, K., Nobuhisa, I., Chijiwa, T., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y., Niwa, M., Yamashina, I., Hattori, S. y Ohno, M. (1996). *Accelerated evolution of crotaline snake venom gland serine proteases*. *FEBS Lett.* 397: 83 – 88.

Declerck, A. y Imren, S. (1994). *Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer*. *Eur. J. Cancer* 30, 2170-2180.

Erlanger, F., Kolowsky, N. y Cohen, N. (1961). *Preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin*. *Arch. Biochem. Biophysic.* 95: 271-278.

Ferreira, N., Rates, B., Richardson, M., Guimarães, G., Sanchez, F., De Castro, M. y Nagem, 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. <http://doi.org/10.1107/S17443091090257677>.

Ferreira, L., Henriques, B., Lebrum, I., Batista, C., Prezuto, C., Andreoni, S., Zelnik, R. y Habermehl, B. (1992). *A new bradykinin potentiating (Peptide P)*. Isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu Tapete, Urutu Dourado). *Toxicon* 30 (1): 33 - 40.

- França, S. y Málaque, S. (2003). *Acidente Botrópico*. In: *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes*. 72-86.
- García, T., Parreiras e Silva, T., Ramos, H., Carmona, K., Bersanetti, A. y Selistre-De-Araujo, S. (2004). *The effect of posttranslational modifications on the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 138, p. 23–32.
- Gutiérrez, M., Arroyo, O., Chaves, F., Lomonte, B. y Cerdas, L. (1986). *Pathogenesis of myonecrosis induced by coral snake (Micrurus nigrocinctus) venom in mice*. *British Journal of Experimental Pathology*, 67(1), 1–12.
- Gutiérrez, M. y Lomonte, B., (1997). *Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms*. In: Kini R.M, (Ed.) *Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester, England, pp. 321 352.
- Gutiérrez, M. y Lomonte, B. (2003). *Efeitos Locais no Envenenamento Ofídico na America Latina - Animais peçonhentos no brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes* Ed. Sarvier, São Paulo Cap 32 pp 310-323.
- Harris, B. (2003). *Myotoxic phospholipases A2 and regeneration of skeletal muscles*. *Toxicon*. 42, 933-945.
- Hahn, S., Yang, Y., Park, M., Chang, M. y Kim, S. (1996). Purification and molecular cloning of calobin, a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon caliginosus* (Korean viper). *J. Biochem.* 119, 835 843.
- Hati, R., Mitra, P., Sarker, S. y Bhattacharya, K. (1999). *Snake Venom Hemorrhagins*. *Critical Reviews in Toxicology*, 29: 1 – 19.

- Iskander, P. y Cheng, Y. (1999). *Fundamentals of normal hemostasis*. Anesthesiology Clinics of North America, Philadelphia 17(4), 715-731.
- Itoh, N., Tanaka, N., Mihashi, S. y Yamashina, I. (1987). *Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme*. J. Biol. Chem. Vol. 262, p.3132–3135.
- Iwanaga, S. y Suzuki, T. (1979). *Enzymes in Snake Venom*. In: *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*. Lee, C.Y. vol. 52, cap. 4, pp 105. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York.
- Kini, M. (2005a). *Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms*. Pathophysiol Haemost Thromb. 34, 200-4.
- Kini, M. (1997). *Phospholipase A2: a complex multifunctional protein puzzle* in: R. M. Kini (Ed), *Venom Phospholipase A2 enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Wiley, Chichester. 1-28.
- Kisiel, W. (1979). *Molecular properties of the Factor V-activating enzyme from Russell's viper venom*. J. Biol. Chem. 254 (23), 12230 12234.
- Kisiel, W., Kondo, S., Smith, J., McMullen, A. y Smith, F. (1987). *Characterization of a protein C-activator from Agkistrodon contortrix contortrix venom*. J. Biol. Chem. 262 (26), 12607-12613.
- Kornalik, F. (1990). *Toxins affecting blood coagulation and fibrinolysis*. In: *Handbook of Toxinology* 683 (Shier, W.T. and Mebs, D., Eds) New York: Marcel Dekker.
- Krem, M., Rose, T. y Di Cera, E. (2001). *Sequence determinants of function and evolution in serine proteases*. Trends Cardiovasc Med. 10, 171-176.

- Laemmli, K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227, 680-685.
- Lu, M., Yang, J., Li, D., Wang, Y. y Xiong, L. (2000). *Characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of Trimeresurus jerdonii*. Toxicon, 38: 1225 – 1236.
- Ma, W., Tang, C. y Lai, L. (2005). *Specificity of Trypsin and Chymotrypsin: Loop-Motion- Controlled Dynamic Correlation as a Determinant*. Biophys J. 89(2):1183-93.
- Magalhaes, A., Campos-Brasil, B., Ribeiro, C., Gilroy, J. y Richardson, M. (1993). *The complete amino acid sequence of a thrombin-like enzyme/gyroxin analogue from venom of the bushmaster snake (Lachesis muta muta)*. FEBS Lett. 329:116-120.
- Magalhaes, A., Magalhaes, P., Richardson, M., Gontijo, S., Ferreira, N., Almeida, P. Sanches, F. (2007). *Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of Bothrops leucurus*. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 146, p. 565-575.
- Magalhaes, B., Magalhaes, A., Juliano, L., Nelson, L. y Rogana, E. (2006). *Mechanism of action and determination of the best substrate for a thrombin-like enzyme from Lachesis muta muta venom by regression analysis of the kinetic parameters determined withpeptidyl p-nitroanilide substrates*. Toxicon, v.47, p-453-458.
- Mcmullen, A., Fujikawa, K. y Kisiel, W. (1989). *Primary structure of a protein C activator from Agkistrodon contortrix contortrix venom*. Biochemistry 28, 674-679.
- Maruñak, L., Acosta, C., Leiva, C., Ruiz, M., Aguirre, V. y Teibler, P. (2004). *Mice plasma fibrinogen consumption by thrombin-like enzyme present in rattlesnake*

venom from the north-east region of Argentina. *Medicina* (Buenos Aires). 64, 509-17.

Matsui, T., Fujimura, Y. y Titani, K. (2000). *Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1477, p. 146–156.

Matsui, T., Sakurai, Y., Fujimura, Y., Hayashi, Oh-Ishi, S., Suzuki, M., Hamako, J., Yamamoto, Y., Yamazaki, J., Kinoshita, M. y Titani, K., (1998). Purification and aminoacid sequence of lialystase from snake venom of *Agkistrodon halys biomhoffii*, a serine protease that cleaves specifically fibrinogen and kininogen. *Eur. J. Biochem.* 252, 569-575.

Meier, J. y Stocker, K. (1991). Effects of snake venoms on hemostasis. *Crit. Rev. Toxicon* 21 171-182.

Meneses, O. (1974). *Los animales venenosos y sus peligros*. Instituto de Salud Pública, Lima-Perú. Publicación No. 2, pp. 3-14.

Mertens, R. (1942). *Amphibien und Reptilien I*. Ausbeute der Hamburger Südperu-Expedition.en: Titschack, E. (ed.), Beiträge zur Fauna Perus, (vol. 2). Hamburgo, pp. 277-287.

Mesía, M., Lazo, F. y Yarlequé, A. (2011). *Purificación y caracterización de un nuevo principio coagulante del veneno de la serpiente peruana Bothrops pictus*. *Rev Soc Quím Perú*. 2011;77 (3):182-90.

Ministerio de Salud del Perú. (2000). *Ofidismo. Oficina General de Epidemiología, Instituto Nacional de Salud. Módulo Técnico*. Serie de Documentos Monográficos 10. Lima-Perú. 57p.

- Morán, A. y Iele, S. (2005). *Normal clotting*. Seminars in Oncology Nursing, Orlando21, 1-11.
- Mosier, A. (2007). *Vascular disorders and thrombosis*. In: MACGRAVIN, Z. Pathologic basis of veterinary disease. 4. ed, St. Louis: Mosby Elsevier 2, 74-82.
- Mukherjee, K. (2014). *Las isoenzimas proteínicas de serina fibroinolíticas procoagulantes purificadas de Daboia russelii russelii coagulan la sangre a través de la activación del factor V: papel de la glicosilación en la actividad enzimática*. PLoS ONE, 9 (2), e86823.
- Navarro, M. (2009). *Responsable Componente Especial de Zoonosis – Dirección General de Salud de las Personas MINSA*. Exposición: Accidentes por Animales Ponzosos Perú. Lima, Perú. 2009.
- Neurath, H. (1984). *Evolution of Proteolytic Enzymes*. Science 224, 350-357.
- Nikai, T., Ohara, A., Komori, Y. y Fox, W. (1995). *Sugihara H*. Primary structure of a coagulant enzyme, bilineobin, from Agkistrodon bilineatus venom. Arch. Biochem. Biophys. 318, 89-96.
- Petretski, H., Kanashiro, M., Silva, P., Alves W., Kipnis, L. (2000). *Two related thrombin-like enzymes present in Bothrops atrox venom*. Braz. J. Med. Biol. Res. 33, 1293-1300.
- Perona, J. y Craik, S. (1997). *Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold*. J. Biol. Chem. 272, 29987-29990.

- Pirkle, H. y Theodor, I. (1988). *Thrombin-like enzymes in the study of fibrin formation*.
In: Hemostasis and Animal Venoms (Pirkle, H. and Markland, F.S., Eds). New
York: Marcel Dekker.
- Pirkle, H. (1998). *Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory*.
Scientific and Standardization Committee's Registry of Exogenous Hemostatic
Factors. *Thromb. Haemost* 79, 675-683.
- Pirkle, H. y Markland, S. (1987). *Hemostasis and Animal Venoms*. Dekker; New York,
NY, USA.
- Pirkle, H. y Stocker, K. (1991). Thrombin-like enzymes from snake venoms: an
inventory. For the Subcommittee on Nomenclature of Exogenous Hemostatic
Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International
Society on Thrombosis and Hemostasis. *Thrombosis and Haemostasis*. 65, 444-
450.
- Pesantes O. (2000). *Prevención y Tratamiento de Accidentes por Serpientes Venenosas*.
Oficina de Relaciones Públicas SEDAPAL. Lima-Perú
- Pinho, O. y Pereira, D. (2001). *Ofidismo*. *Rev Assoc. Med. Bras.* 47, 24-29.
- Plaisier, R. (2001). *Surgical perspectives to control bleeding in trauma*. *Seminars in
Anesthesia, Perioperative Medicine and Pain*, Orlando 20(1), 11-17.
- Ponce-Soto, A., Bonfim, L., Novello, C., Navarro, R., Yarlequé, A. y Marangoni, S.
(2007). *Isolation and Characterization of a Serine Protease, Ba III-4, from
Peruvian Bothrops atrox venom*. *The Protein Journal* ISSN/ISBN: 1572887.

- Ribeiro, M., Mamede, N., De Moraes, G., Cortes, K., Barbosa, B., Migliorini, M. y De Oliveira, F. (2014). Purificación y caracterización de BmooAi: una nueva toxina del veneno de serpiente *Bothrops moojeni* que inhibe la agregación de plaquetas. *BioMed Research International*, 2014, 920942.
- Santoro, L. y Sano-Martins, S. (2003). *Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos no Brasil*. In: *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier: Sao Paulo, p. 289–309.
- Sánchez, E., Galán, A., Powell, L., Reyes, R., Soto, G., Russell, K. y Pérez, C. (2005). *Disintegrin, hemorrhagic, and proteolytic activities of Mojave rattlesnake, Crotalus scutulatus scutulatus venoms lacking Mojave toxin*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 141(2), 124–132. doi:10.1016/j.cca.2005.04.001
- Sanchez, F., Santos, I., Magalhães, A., Diniz, R., Figueiredo, S., Gilroy, J., Richardson, M. (2000). Isolation of a proteinase with plasminogen-activating activity from *Lachesis muta muta* (bushmaster) snake venom.
- Serrano, T., Mentele, R., Sampio, M. y Fink, E. (1995). *Purification, characterization and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of Bothrops jararaca*. *Biochemistry*, 34: 7186 – 7193.
- Serrano, S. y Maroun, R. (2005). *Snake venom serine proteases: sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved*. *Toxicon* 45: pp. 1115-1132.
- Schechter, I. y Berger, A. (1967). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27,157
- Sistema Integrado de Información Taxonómica. «Bothrops (TSN 209554) »

- Slagboom, J., Kool, J., Harrison, A. y Casewell, R. (2017). *Los venenos de serpiente hemotóxicos: su actividad funcional, su impacto en las víctimas de mordeduras de serpientes y la promesa farmacéutica*. *British Journal of Hematology*, 177 (6), 947-959. <http://doi.org/10.1111/bjh.14591>
- Smolka, B., Marangoni, S., Oliveira, B. y Novello, C. (1998). *Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme Balterobin from the venom of Bothrops alternatus*. *Toxicon*, 36: 1059 – 1063.
- Soliman, E. y Broadman, M. (2006). *Coagulation defects*. *Anestesiología Clin.* 24, 549-78.
- Sukkapan, P., Jia, Y., Nuchprayoon, I. y Pérez, C. (2011). *Phylogenetic analysis of serine proteases from Russell's viper (Daboia russelli siamensis) and Agkistrodon piscivorus leucostoma venom*. *Toxicon*, 58(2), 168–178. doi:10.1016/j.toxicon.2011.05.014
- Teixeira, P., Landucci, T., Antunes, E., Chacur, M. y Cury, Y. (2003). *Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2*. *Toxicon*, 42, 947-962
- Tokunaga, F., Nagasawa, K., Tamura, S., Miyata, T., Iwanaga, S. y Kisiel, W. (1988). *The factor V-activating enzyme (RVV-V) from Russell's viper venom. Identification of isoproteins RVV-V alpha, beta, and gamma and their complete amino acid sequences*. *J. Biol. Chem.* 263, 17471-17481.
- Valeriano-Zapana, A., Segovia-Cruz, S., Rojas-Hualpa, M., Martins-de-Souza, D., Ponce-Soto, A. y Marangoni, S. (2012). *Functional and structural characterization of a new serineprotease with thrombin-like activity TLBan from Bothrops andianus (Andean Lancehead) snake venom*. *Toxicon* 59 (2), 231-240.

- Vaiyapuri, S., Wagstaff, C., Harrison, A., Gibbins, M. y Hutchinson, G. (2011). Evolutionary Analysis of Novel Serine Proteases in the Venom Gland Transcriptome of *Bitis gabonica rhinoceros*. *PLoS ONE*, 6(6), e21532.
- Vivas-Ruiz, D., Sandoval, G. A., Lazo, F., Rodríguez, E., Yarlequé, A. & Flores-Sánchez, E. (2015). Caracterización de la enzima similar a trombina del veneno de *Bothrops pictus* "jergón de costa". *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 32(4), 652-658.
- Vizzoto, D. (2003). *Serpentes: Lendas, Mitos, Superstições e Crendices*. São Paulo SP: Plêiade.
- Wang, M., Wang, R. y Tsai, H. (2001). *Serine protease isoforms of Deinagkistrodon acutus venom: cloning, sequencing and phylogenetic analysis*. *Biochem.J.* 354, 161-168.
- Ware A. y Seegers, W. (1949). Two-stage procedure for the quantitative determination of prothrombin concentration. *Am. J. Clin. Pathol.*,19:471.
- Warshel, A., Naray-Szabo, G., Sussman, F. y Hwang, K. (1989). How do serine protease really work *Biochemistry*, 28: 3629-3637.
- Wenzel, R. y Tschesche, H. (1995). *Reversible inhibitors of serine proteases*. In: *Peptides: Synthesis, Structures and Applications*. Academic Press, Inc.
- Yamamoto, C., Tsuru, D., Oda-Ueda, N., Hattori, S. y Kim, S. T. (2002). Flavoxobin, a serineprotease from *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake) venom, independently cleaves Arg 726-Ser-727 of human C3 and acts as a novel, heterologous C3 convertase, *Immunology* 107, 111-117.

- Yarlequé, A. (2000). *Las serpientes peruanas y sus venenos*. Universidad Nacional mayor de San Marcos. Fondo Editorial.
- Zaqueo, D., Kayano, M., Simões-Silva, R., Moreira-Dill, S., Fernandes, C., Fuly, A. y Stábeli, G. (2014). Aislamiento y caracterización bioquímica de una nueva serina proteasa de tipo trombina de *Bothrops pirajai* Snake Venom. *BioMed Research International*, (2014), 595186.
- Zaganelli, G. L., Zaganelli, M., Magalhaes, A., Diniz, R. y De Lima, M. (1996). *Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of Jaracuçu (Bothrops jararacussu)*. *Toxicon* 34, 807-819.
- Zavaleta, S. (1996). *M Ofidismo: Envenenamiento por mordedura de serpientes*. Separata Instituto Nacional de Salud. Perú. 1996.
- Zhang, Y., Gao, R., Lee, H., Zhu, W., Xiong, Y. L. y Wang, W. Y. (1998). Characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from *Trimeresurus stejnegeri* venom, and comparative study with other venom proteases, *Toxicon* 36, 131-142.

ANEXOS

ANEXO 1

REGISTRO FOTOGRÁFICO AL PROCEDIMIENTO DE ESPECTROMETRÍA DE MASA Y HPLC-FASE REVERSA

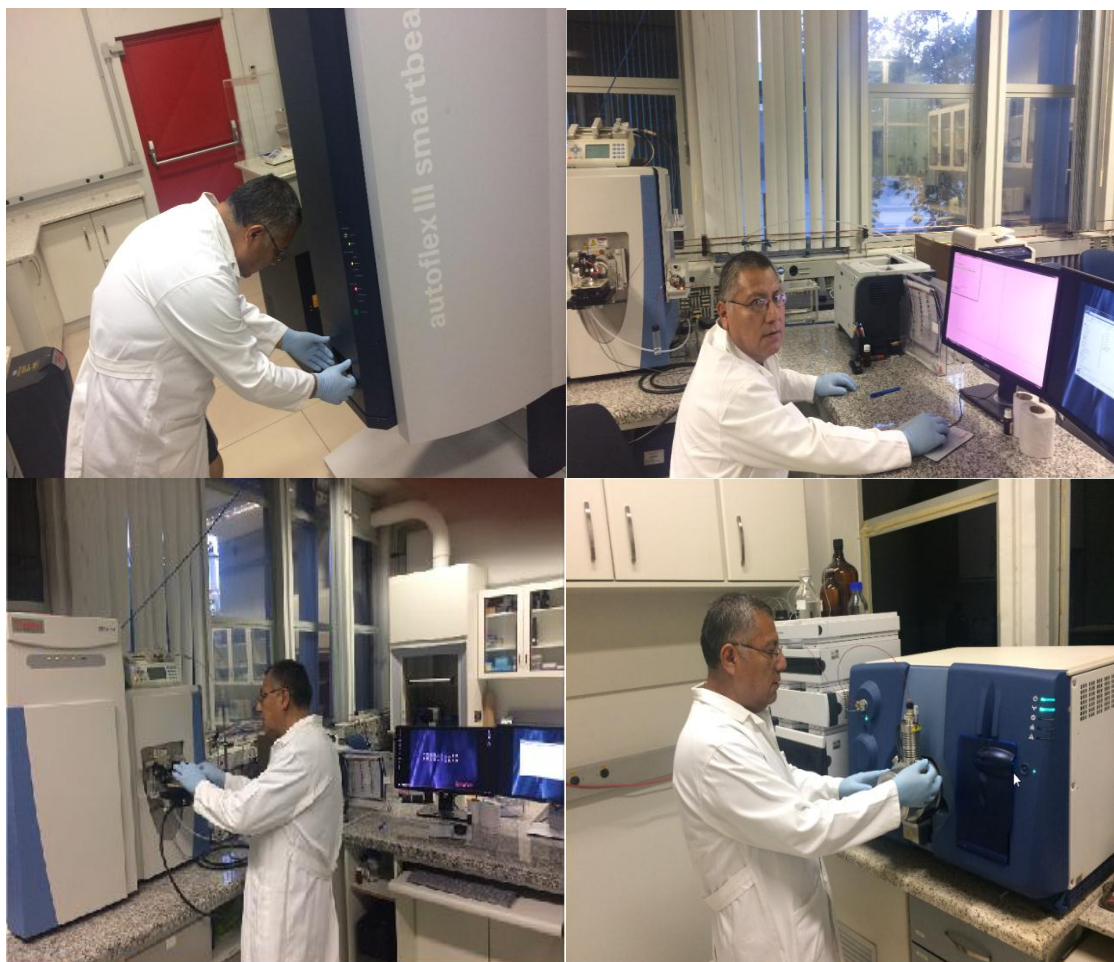


Figura 19: Procedimiento de espectrometría de masa en TADEM Electrospray (ESI) y cromatografía HPLC-Fase Reversa con la colaboración del laboratorio Thomson de espectrometría de masas del instituto de química de la Universidad del estado de Campinas-SP Brasil, bajo la responsabilidad del Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D.

ANEXO 2

REGISTRO FOTOGRAFICO DEL TRABAJO DE INVESTIGACION REALIZADO
EN LA UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA – AREQUIPA

Figura 20: Laboratorio de Química de Proteínas de la Universidad Católica de Santa María – Arequipa. Con la colaboración del Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D



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, **Jhonatan Jose Machaca Yucra**, egresado de la facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional del Altiplano - Puno, ha realizado el trabajo de investigación titulado **CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE UNA TROMBINA-LIKE CON ACTIVIDAD SERINO PROTEASA DE BOTHROPS ROENDIGERI JERGÓN DE LA COSTA -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.