

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA

PROYECTO DE TESIS DE LICENCIATURA

Andrés Feoli Grant  
Carné A82340

Tutora: Teresa Escalante Muñoz, *Ph.D.*

Lectores:

Alexandra Rucavado Romero, *Ph.D.*  
Jose María Gutiérrez Gutiérrez, *Ph.D.*

**Evaluación de la actividad proteolítica de metaloproteinasas de  
venenos de serpiente *in vitro* e *in vivo* utilizando sustratos de matriz  
extracelular fluorescentes**

Instituto Clodomiro Picado

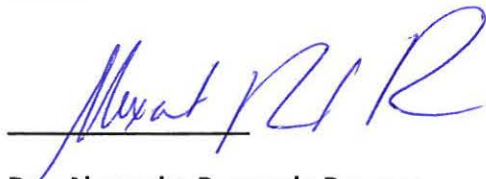
Julio, 2015

**Los que aquí firmamos damos fe que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación:**



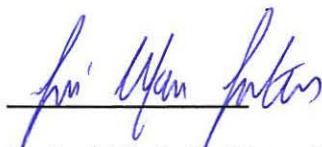
**Dra. Teresa Escalante Muñoz**

**Tutora**



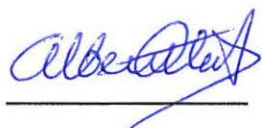
**Dra. Alexandra Rucavado Romero**

**Lectora**



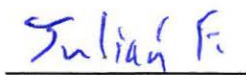
**Dr. José María Gutiérrez Gutiérrez**

**Lector**



**Dr. Alberto Alape Girón**

**Presidente del Tribunal**



**Dr. Julián Fernández Ulate**

**Profesor designado**

# INDICE

	Página
<b>Índice</b>	1
<b>Resumen</b>	2
<b>Introducción</b>	3
<b>Justificación</b>	9
<b>Hipótesis</b>	10
<b>Objetivo General</b>	10
<b>Objetivos Específicos</b>	10
<b>Materiales y Métodos</b>	11
<b>Resultados</b>	15
<b>Discusión</b>	22
<b>Conclusiones</b>	26
<b>Referencias</b>	28

## Resumen

Los eventos hemorrágicos generados por venenos de serpientes son causados principalmente por metaloproteinasas del veneno de serpiente o MPVS que se agrupan con base en la composición de sus dominios en PI, PII y PIII. Se ha llegado a la conclusión que un elemento clave para que las MPVS puedan dañar la microvasculatura y producir hemorragia *in vivo*, es la capacidad de estas metaloproteasas de alcanzar y degradar proteínas de la membrana basal de los capilares así como componentes de la matriz extracelular circundante. La mayoría de metaloproteinasas pueden degradar proteínas de matriz extracelular, sin embargo, existen diferencias en la actividad hemorrágica de estas enzimas y aún no se conoce la causa de estas diferencias. Una hipótesis es que las enzimas con mayor potencia hemorrágica poseen mayor capacidad proteolítica sobre proteínas claves de la membrana basal como el colágeno tipo IV. Para evaluar esta hipótesis en esta investigación se evaluó la actividad proteolítica de metaloproteinasas de los grupos PI, PII y PIII con distinta potencia hemorrágica, utilizando gelatina y colágeno tipo IV fluorescentes. Con estos ensayos se logró demostrar que la actividad proteolítica sobre gelatina varía según la metaloproteinasa estudiada, siendo mayor en la PIII, seguida por la PII y por último la PI. En el caso del colágeno IV, las tres metaloproteinasas fueron capaces de degradarlo, sin embargo, la PI (metaloproteasa con menor potencia hemorrágica fue la que degradó en mayor grado este sustrato, lo que sugiere que la actividad proteolítica *in vitro* no correlacionan con la actividad hemorrágica de estas toxinas y que juegan un papel importante otros factores como fuerzas biofísicas, flujo, distribución de las toxinas y accesibilidad al sustrato.

Por otra parte, otra interrogante aún no estudiada, es por cuánto tiempo se mantienen activas las metaloproteinasas en los tejidos. Estudios previos sugieren que podrían mantenerse activas por varios días luego de la inyección, lo cual podría estar influyendo en los procesos inflamatorios y regenerativos, sin embargo esto no ha sido demostrado aún. Una de las principales limitantes para abordar esta pregunta es la sensibilidad de las pruebas para detectar la actividad enzimática de las metaloproteinasas. Debido a esto en este trabajo se utilizaron sustratos fluorescentes que poseen alta sensibilidad para detectar la actividad de estas enzimas *in vivo*. Para ello, se utilizó un modelo murino en el cual se administró intramuscularmente veneno completo de *Bothrops asper* y la metaloproteinasa BaP1, posteriormente a varios intervalos de tiempo se tomaron muestras de exudado y del tejido muscular y fueron analizadas utilizando gelatina fluorescente y zimografía. Se logró detectar actividad proteolítica en los exudados inducidos por el veneno y por la BaP1 hasta 24h después de la inyección; la actividad fue mayor en las muestras de 1h y fue disminuyendo con el tiempo. Esta actividad fue neutralizada por completo por EDTA y casi por completo por anticuerpos específicos contra la BaP1 lo sugiere que es debida a metaloproteinasas del veneno. En la zimografía se observó un aumento en la expresión de metaloproteinasas endógenas a través del tiempo, pero no se observaron las formas activas, lo que concuerda con que la actividad proteolítica detectada se deba principalmente a las metaloproteinasas del veneno. Con estos resultados se logra concluir que el ensayo de proteólisis sobre sustratos fluorescentes posee una gran sensibilidad ya que permitió demostrar que hay actividad proteolítica *in vitro* e *in vivo* detectable a concentraciones muy bajas de toxina y es metodológicamente muy sencillo lo que tiene ciertas ventajas con respecto a otros métodos tradicionales.

## **Introducción**

Los envenenamientos por mordeduras de serpientes venenosas son bastante comunes en el mundo. Se estima que 2.5 millones de personas son envenenadas cada año, de las cuales 125000 fallecen y un número similar presenta secuelas severas (Chippaux, 1998).

En América Latina la mayor cantidad de envenenamientos se da por serpientes de la familia Viperidae, cuyo veneno se caracteriza por afectar los tejidos y producir daños locales de rápida instauración como sangrados locales y necrosis. Adicionalmente se pueden presentar manifestaciones sistémicas como sangrados en varios órganos y coagulopatías. Estos eventos hemorrágicos son causados principalmente por una serie de proteínas presentes en el veneno de la serpiente llamadas metaloproteinasas del veneno de serpiente o MPVS (Gutiérrez, 2002; Escalante *et al*, 2011). Es importante agregar que aparte de generar eventos hemorrágicos, estas proteínas pueden tener además otras actividades, entre ellas, actividad fibrinolítica, activan el factor X de la coagulación, activan la protrombina, poseen actividad apoptótica, inhiben la agregación plaquetaria, adicionalmente contribuyen el proceso inflamatorio, la dermonecrosis, la mionecrosis y la pobre regeneración muscular (Markland & Swenson, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2009, Braud *et al*, 2000).

### **Clasificación y características estructurales de las MPVS**

Los primeros estudios de clasificación de estas MPVS, realizados por Fox y Bjarnason en la década de 1980, llevaron a la idea de que existían dos clases estructurales basadas en el peso molecular de estas proteínas, las toxinas pequeñas y las grandes hemorrágicas (Markland & Swenson, 2013). Hoy en día se sabe que las MPVS tienen diversos tipos de dominios y se agrupan con base en la composición de sus dominios en tres clases (Fox & Serrano, 2005)

- **MPVS P-I**

La clase P-I se caracteriza por poseer solamente un dominio metaloproteinasa más un prodominio y poseer un peso molecular que oscila entre 20 y 30 kDa (Fox & Serrano, 2005; Markland & Swenson, 2013). El dominio se caracteriza por poseer

una secuencia de unión a zinc HEXXHXXGXXH seguida por un giro de metionina (Escalante et al, 2011; Fox & Serrano, 2009). Un ejemplo de una metaloproteinasa P-I es la BaP1 de 22,7 kDa aislada del veneno del vipérido *Bothrops asper* (Watanabe et al, 2003).

- **MPVS P-II**

Estas metaloproteinasas se caracterizan por ser de mediano tamaño y por tener una masa molecular entre 30 y 60 kDa (Markland & Swenson, 2013). Aparte del prodominio y el dominio metaloproteinasa contienen un dominio desintegrina que generalmente es proteolizado y liberado para generar la desintegrina activa (Fox & Serrano, 2005; Jia et al, 1996).

- **MPVS P-III**

Por otro lado, las P-III se caracterizan por pesar de 60-100 kDa y por lo tanto son de gran tamaño (Markland & Swenson, 2013). Se caracterizan por tener los mismos dominios que las P-II más un dominio rico en cisteína (Fox & Serrano, 2005).

### **Sustratos diana sobre los que actúan de manera *in vivo* las metaloproteasas de veneno de serpiente**

Se ha documentado que las metaloproteasas de veneno de serpiente juegan varios papeles a nivel de la patogénesis del daño tisular local, actuando sobre diversos sustratos, entre ellos, componentes de los factores de la coagulación, las plaquetas y componentes de la matriz extracelular (Gutiérrez & Rucavado, 2000).

Por un lado, se ha visto que las MPVS P-I tienen una actividad proteolítica sobre moléculas diversas tales como receptores, moléculas de la matriz o de adhesión celular que lleva a una serie de eventos como hemorragia, la inhibición de la agregación plaquetaria, inhibición de la adhesión de los neutrófilos, e inclusive la inducción de la apoptosis en células endoteliales (Hsu & Huang, 2010).

Por otro lado, al poseer un dominio metaloproteasa, uno disintegrina y uno rico en cisteína, las P-III tienen actividad proteolítica gracias al dominio metaloproteasa y actividad de unión gracias a los dominios tipo disintegrina y el rico en cisteína, generando además de hemorragia, inhibición de la agregación plaquetaria e inducción de la apoptosis de las células endoteliales al igual que las P-I (Hsu & Huang, 2010). Las metaloproteinasas P-III son generalmente más potentes en su actividad hemorrágica que las metaloproteinasas P-I, efecto que se ha asociado con la presencia de dominios adicionales que localizan la enzima a sitios blancos de la microvasculatura (Baldo *et al*, 2010).

Las metaloproteinasas tipo P-II han sido poco caracterizadas; un trabajo reciente caracterizó estructural y funcionalmente una P-II del veneno de *Bothriechis lateralis* de Costa Rica. Esta enzima es una proteína dimérica que mantiene en su estructura el dominio metaloproteína y el dominio disintegrina; posee una actividad hemorrágica muy potente e induce inhibición de la agregación plaquetaria (Camacho *et al*, 2014).

La hemorragia inducida por las metaloproteinasas de venenos ocurre principalmente a nivel de los capilares sanguíneos (Moreira *et al.*, 1992), los cuales están formados por dos estructuras básicas: una capa de células endoteliales y una lámina basal circundante. La lámina basal está formada por redes independientes de colágeno IV y laminina, las cuales se interconectan por medio del nidogén y proteoglicanos de heparán sulfato como el perlecan (Kalluri, 2003).

Con respecto al mecanismo de hemorragia, se han realizado estudios que demuestran que hay alteración a nivel de la membrana basal y de las células endoteliales luego de la inyección con MPVS (Escalante *et al*, 2011). Se ha observado que la microvasculatura capilar se afecta rápidamente después de la inyección con metaloproteinasas, formándose lesiones en las células endoteliales, diversas alteraciones celulares y disrupción de la membrana basal, entre otros, que lleva a que los eritrocitos y otros componentes sanguíneos puedan salir hacia el espacio intersticial (Gutiérrez & Rucavado, 2000).

Se ha demostrado la capacidad de las metaloproteinasas de degradar diversas proteínas de la membrana basal *in vivo*, como los colágenos tipo IV, tipo VI y tipo XV, el nidogen y el perlecan, proteínas que participan en la estabilidad mecánica de los capilares sanguíneos (Baldo et al., 2010, Escalante et al., 2011).

Se ha llegado a la conclusión que un elemento clave capaz de generar que algunas MPVS puedan dañar la microvasculatura y producir hemorragia, es la capacidad de estas metaloproteinasas de alcanzar y degradar proteínas de la membrana basal de los capilares así como componentes de la matriz extracelular circundante (Escalante, 2011).

De hecho, en una investigación se demostró que la MPVS P-III jararhagina marcada con la sonda fluorescente Alexa488, se unía de manera preferencial a la membrana basal de los capilares generando una cotinción con el colágeno tipo IV, proteína clave de la membrana basal. Además, se publicó que al utilizar una proteína que solamente poseía el dominio tipo Desintegrina y el tipo Cisteína de la jararhagina, se lograba un patrón de distribución de la fluorescencia similar a la de la jararhagina completa sobre el colágeno IV, demostrando así que estos dominios son los que dirigen la proteína hacia la microvasculatura (Baldo *et al*, 2010).

A pesar de que se han realizado avances recientes con respecto al mecanismo de acción de las metaloproteinasas hemorrágicas y sus sustratos *in vivo*, aún no se ha logrado determinar la razón de por qué algunas metaloproteinasas son altamente hemorrágicas y otras poseen una baja actividad hemorrágica, siendo que la mayoría actúa sobre componentes de la matriz extracelular. Esta interrogante requiere de investigaciones que evalúen diferencias en unión a proteínas blanco y estudien las variaciones en la capacidad proteolítica sobre sustratos de la matriz extracelular. En este contexto resulta relevante comparar la capacidad proteolítica de metaloproteinasas con distinta actividad proteolítica sobre proteínas de matriz extracelular como gelatina y colágeno tipo IV, para investigar si toxinas con mayor actividad hemorrágica poseen mayor capacidad proteolítica sobre estos sustratos.



## **Ensayos utilizados para demostrar la actividad proteolítica de las metaloproteasas de veneno de serpiente**

Existen métodos tradicionales para demostrar la actividad proteolítica de las MPVS, mediante la utilización de sustratos como caseína, gelatina o algunas proteínas de la matriz extracelular (Escalante *et al*, 2011).

En 1961, Kalan y Telka evaluaron la degradación enzimática de la  $\beta$ -caseína por una preparación de veneno del vipérido *Crotalus adamanteus* mediante la medición de la turbidez generada en un espectrofotómetro. El fundamento del ensayo consistía en que si se incubaba la  $\beta$ -caseína con una preparación de veneno con actividad fosfodiesterasa, se desarrollaba turbidez, debido a la presencia y a la naturaleza de los enlaces de fosfato presentes en las fracciones de  $\beta$ -caseína (Kalan & Telka, 1961).

Hoy en día, se utiliza esta misma caseína modificada químicamente con enlaces covalentes que unen grupos sulfonilamida, que son los que le dan la coloración anaranjada. Su fundamento radica en que durante el período de incubación, las proteasas hidrolizan los enlaces peptídicos, liberando aminoácidos y péptidos más pequeños. Luego, el ácido tricloroacético precipita las macromoléculas remanentes, que se remueven por centrifugación. El sobrenadante de variable coloración naranja (que contiene los pequeños péptidos y aminoácidos) es al que se le mide la intensidad del color de manera espectrofotométrica para determinar la actividad proteolítica (Sandhya *et al*, 2006) Es importante mencionar que sustratos cromogénicos como este también se pueden utilizar en ensayos de neutralización con antiveneno, usando cantidades pequeñas de veneno y antiveneno (Sánchez *et al*, 2010).

Existen otros métodos además de los mencionados anteriormente para evaluar la actividad proteolítica de las MPVS, uno de ellos es la zimografía. La zimografía es un método que fue introducido en 1962 y es utilizado para estudiar las enzimas hidrolíticas con base en la degradación de un sustrato (Vandooren *et al*, 2013).

En 1986, Markland y Perdon utilizaron el método del gel electroforético con fibrinógeno elaborado por Lacks y Springhorn en 1980, un método zimográfico para detectar la actividad proteolítica de venenos de diversas especies de serpientes de Norte América. Este método consistía en introducir fibrinógeno en un gel de poliacrilamida para que las enzimas de los venenos realizaran los cortes proteolíticos en esta molécula. Una vez que el gel era teñido con azul de Coomasie para visualizar las proteínas, el color azul debido al fibrinógeno estaba ausente en bandas que demostraban tener actividad proteolítica (Markland & Perdon, 1986).

Posteriormente se desarrollaron nuevas técnicas más sensibles para medir la actividad proteolítica, entre ellas, la zimografía con gelatina. Esta técnica de la zimografía es útil para evaluar la actividad hemorrágica de venenos de serpiente (Bee *et al*, 2001) y otras enzimas proteolíticas, como por ejemplo metaloproteinasas endógenas de matriz (Warner *et al*, 2004). Otro método que ha demostrado ser muy práctico para la determinación de la actividad proteolítica es el empleo de sustratos fluorescentes. Estos sustratos se han empleado para una amplia gama de determinaciones, como por ejemplo ensayos de degradación de componentes de la matriz extracelular para analizar la invasión celular local (Artym *et al*, 2009), localización de actividad gelatinasa *in situ* en la MEC de metástasis de cáncer de colon en ratas (Mook *et al*, 2003) y más recientemente, análisis cuantitativos de metaloproteinasas de veneno de serpiente y sus inhibidores (Biardi *et al*, 2011).

El estudio de la actividad proteolítica y hemorrágica de toxinas de venenos de serpientes se ha enfocado más en el uso de métodos *in vitro*, y se tiene poca información sobre el empleo de condiciones *in vivo*. (Lomonte *et al*, 1994; Bottrall *et al*, 2010; Escalante *et al*, 2011).

De lo poco que se sabe, los estudios con toxinas de venenos de serpientes realizados *in vivo* se han basado en evaluar la proteólisis de sustratos específicos de la membrana basal mediante inmunohistoquímica, western blot y proteómica (Escalante *et al*, 2011 Baldo *et al*, 2010). Sin embargo, en estos estudios se ha evaluado el efecto de las toxinas sobre proteínas del tejido en períodos cortos de tiempo. Además, no se ha detectado aún la actividad de estas toxinas *in vivo* a períodos de tiempo prolongados. Este vacío lleva a las

siguientes interrogantes: ¿Por cuánto tiempo se mantienen activas las metaloproteinasas de veneno de serpiente en el tejido? ¿Se mantienen activas por largos períodos de tiempo y podría esto afectar los procesos inflamatorios y regenerativos?

## **Justificación**

En Centroamérica el envenenamiento ofídico representa un problema de salud pública relevante que afecta principalmente a la población rural. Las características fisiopatológicas del envenenamiento incluyen tanto efectos locales como sistémicos, los cuales pueden comprometer la vida del paciente y causar lesiones locales severas que, en muchos casos, pueden generar secuelas permanentes. Las metaloproteinasas del veneno juegan un papel muy importante en la lesión tisular provocada por estos venenos y aunque han sido extensamente estudiadas aún se desconocen varios aspectos de su mecanismo de acción y de su papel en la destrucción tisular.

El uso de sustratos, como gelatina y colágeno tipo IV, para estudiar la actividad proteolítica de las metaloproteinasas *in vitro* ofrece la ventaja de que son similares a los sustratos blanco a los que se dirigen las metaloproteinasas *in vivo*, por lo que el uso de estos sustratos sobre sustratos convencionales como la azocaseína, permite obtener mayor información sobre la actividad proteolítica de las enzimas. Adicionalmente, el uso de estos sustratos marcados con fluorocromos aumenta la sensibilidad de la detección por lo que ofrece una ventaja en comparación con los sustratos cromogénicos tradicionales. Aunado a lo anterior, las diferencias en actividades hemorrágicas entre metaloproteinasas de veneno de serpiente podrían deberse a diferencias de especificidad por estos sustratos, principalmente al colágeno tipo IV, el cual es una de las proteínas claves para la estabilidad de los vasos capilares. Por ello en este trabajo se compararon enzimas de los tres grupos PI, PII y PIII en cuanto a su degradación sobre gelatina y colágeno tipo IV, comparación que no se ha realizado en investigaciones previas por lo que se obtuvo información novedosa con respecto a las diferencias entre estos tres grupos de enzimas.

Por otro lado, la detección de la actividad de estas enzimas *in vivo* y su medición a través del tiempo permite determinar el tiempo que se mantienen activas las metaloproteinasas de

veneno de serpiente en el tejido y si podrían estar influyendo sobre procesos inflamatorios en el organismo, posteriores al daño tisular agudo. Esto aportaría información valiosa para investigaciones futuras que podrían llevar a encontrar la forma regular estos procesos inflamatorios para reducir el daño en los tejidos.

## **Hipótesis**

1. Los sustratos de matriz extracelular fluorescentes permiten detectar diferencias en la actividad proteolítica de metaloproteinasas de venenos con distinta potencia hemorrágica.
2. Las metaloproteinasas de veneno de serpiente se mantienen activas por varias horas luego de ser administradas en el tejido muscular de ratón y su actividad puede ser detectada utilizando sustratos fluorescentes.

## **Objetivo general**

Evaluar la actividad proteolítica de metaloproteinasas hemorrágicas del veneno de serpiente *in vitro* e *in vivo* utilizando sustratos de matriz extracelular fluorescentes.

## **Objetivos específicos**

- Evaluar la actividad proteolítica *in vitro* de metaloproteinasas tipo PI, PII y PIII sobre sustratos de matriz extracelular fluorescentes para determinar si enzimas de diferentes grupos poseen diferencias en la especificidad por estos sustratos.
- Comparar la actividad proteolítica de las metaloproteinasas en estudio con la potencia hemorrágica de estas enzimas para establecer si existe una relación que explique las diferencias en la actividad hemorrágica.
- Detectar actividad proteolítica de metaloproteinasas *in vivo* en un modelo murino de daño muscular inducido por veneno completo de *Bothrops asper* y por una metaloproteinasa purificada de este veneno, para determinar por cuánto tiempo se mantienen activas estas enzimas en el tejido.
- Evaluar si la actividad proteolítica detectada en el tejido muscular es debida a metaloproteinasas del veneno o metaloproteinasas endógenas.

## **Materiales y Métodos**

### **1. Veneno y Metaloproteinasas**

Se utilizó veneno liofilizado de la serpiente *Bothrops asper* de especímenes de la vertiente del Pacífico (Pac), el cual fue suministrado por el serpentario del Instituto Clodomiro Picado. Se trabajó con tres metaloproteinasas de venenos de serpiente: BaP1, CsH1 y la BlatH1. La toxina BaP1, es una PI que se purificó a partir del veneno de la serpiente *Bothrops asper*, mediante cromatografía de intercambio iónico en CM-Sephadex C-50, y por último cromatografía de afinidad en Affi Gel Blue, según la metodología descrita por Gutiérrez *et al.* (1995).

Por otro lado, la CsH1, una metaloproteinasa hemorrágica PIII aislada del veneno de la serpiente *Crotalus simus*, se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacrose y posteriormente una filtración en gel (Herrera *et al.*, 2015). Por último, la BlatH1, una metaloproteinasa hemorrágica tipo P-II se purificó a partir del veneno de la serpiente *Bothriechis lateralis* mediante cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacrose, seguido por cromatografía de intercambio hidrofóbico en una columna de fenil-sepharosa y posteriormente una filtración en gel en una columna de Sephacryl S-200 (Camacho *et al.*, 2014).

La homogeneidad de las preparaciones se verificó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras (Laemmli, 1970) y cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) utilizando columnas de fase reversa. Los venenos de las serpientes *B.asper*, *C.simus* y *B.lateralis* utilizados para purificar las toxinas fueron proporcionados por el serpentario del Instituto Clodomiro Picado y fueron obtenidos a partir de varios especímenes adultos de cada especie.

## **2. Animales de experimentación**

Para todos los estudios *in vivo* se utilizaron ratones CD-1, con un peso entre 18 y 20 g, proporcionados por el bioterio del Instituto Clodomiro Picado. Todos los experimentos que incluyeron animales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuido de Animales de la Universidad de Costa Rica.

## **3. Ensayos *in vitro***

### **3.1 Estandarización del ensayo para medir la actividad proteolítica sobre sustratos fluorescentes**

El ensayo sobre sustratos fluorescentes se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el protocolo EnzCheck® Gelatinase/Collagenase Assay Kit de Molecular Probes, Life Technologies. En breve, en una placa de 96 hoyos se agregó amortiguador de reacción (preparado previamente a partir del amortiguador de reacción 10 X) a cada pocillo de ensayo. Luego se agregó la solución fluorescente de gelatina o colágeno IV según el caso. Posteriormente, se adicionaron distintas dosis de veneno y BaP1 a utilizar diluidas previamente en amortiguador de reacción y se incubó la placa a temperatura de ambiente, protegida de la luz durante los tiempos de medición. La medición de la intensidad de fluorescencia se realizó en el BioTek Synergy HT utilizando filtro de absorción de 495 nm y fijando la emisión de fluorescencia a 515 nm. Las mediciones se hicieron a distintos tiempos de prueba.

Este procedimiento de estandarización se realizó con el objetivo de determinar las dosis óptimas y la sensibilidad del ensayo.

### **3.2 Evaluación de la actividad proteolítica *in vitro* de las metaloproteinasas de venenos de serpientes**

Para evaluar y comparar la actividad proteolítica de las metaloproteinasas se utilizaron 2 sustratos: gelatina fluorescente y colágeno IV fluorescente. Se realizaron curvas sobre los diferentes sustratos fluorescentes a tiempos diferentes.

El ensayo sobre sustratos fluorescentes se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.1. Las soluciones de las metaloproteinasas diluidas en amortiguador de reacción se ajustaron a dosis equimolares, donde 1 nmol de cada enzima corresponde a 22,7 µg de BaP1, 45 µg de CsH1 y 84 µg de BlatH1 respectivamente. En el ensayo se utilizó 1 µg de BaP1, 4 µg de BlatH1 y 2 µg de CsH1 por cada 100 µL de amortiguador de reacción, lo cual corresponde a 0,04 nmol de cada toxina. Las mediciones se realizaron a los 15 minutos, 1 hora y 24 horas.

#### **4. Ensayos *in vivo***

Para determinar si las metaloproteinasas del veneno permanecen activas en el tejido se utilizó un modelo murino de lesión muscular inducida ya sea por el veneno completo de *B.asper* o por una metaloproteinasa pura, la BaP1.

##### **4.1 Determinación de la actividad proteolítica de metaloproteinasas *in vivo* con gelatina fluorescente**

Para determinar la actividad proteolítica *in vivo*, se procedió a inyectar en el gastrocnemio derecho cuatro grupos de ratones CD-1 (n = 5) con una preparación de 100 µg de veneno completo de *Bothrops asper* y otros cuatro grupos con una de 100 µg de BaP1, diluidas en 50 µL de PBS. Se sacrificó por dislocación cervical el grupo de cada tratamiento a 1 hora, a las 3 horas, a las 6 horas y a las 24 horas. Se extrajo luego el exudado de cada ratón del grupo con un capilar heparinizado, se hizo un pool de cada grupo horario, se centrifugaron a 3000 r.p.m. 5 minutos y se guardaron en un congelador a -70 °C.

Se determinó la actividad proteolítica de los exudados sobre la gelatina fluorescente siguiendo el protocolo anteriormente mencionado en el apartado 4.1. Cada muestra se analizó por triplicado y se incluyó un blanco de reactivos. Las lecturas se realizaron a 1 hora, 3 horas, 5 horas y 24 horas en el Biotek Synergy HT del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET).

## 4.2 Neutralización de la actividad proteolítica de la BaP1 *in vivo*

Para determinar si la actividad proteolítica detectada en las muestras de exudado es debida a metaloproteinasas del veneno de serpiente o a proteasas endógenas, se utilizaron anticuerpos específicos anti BaP1 para la neutralización de la actividad proteolítica de los exudados. Se utilizaron anticuerpos contra esta metaloproteinasa, ya que esta constituye la metaloproteinasa más abundante de este veneno. Primero se inmunizó un conejo con BaP1 para luego purificar los anticuerpos del suero mediante una cromatografía de afinidad conteniendo BaP1 unida a la fase sólida de *Sepharose*® activada con *CNBr* según en el método descrito por Lomonte (2007).

Para realizar la neutralización se seleccionaron las muestras de exudado de 1h por ser las que presentaron mayor actividad proteolítica sobre la gelatina fluorescente.

En breve, alícuotas de 1 hora del exudado inducido por veneno completo y BaP1 se incubaron durante 20 minutos a 37 °C con los anticuerpos anti BaP1 purificados; otras muestras se incubaron con EDTA 20 mM, el cual es un agente quelante que inhibe tanto las metaloproteinasas del veneno como las metaloproteinasas endógenas. Posteriormente se montaron por triplicado las mezclas de reacción y el blanco de reactivos en una placa de 96 hoyos y se realizó la lectura en el Biotek Synergy HT del CIET, siguiendo el protocolo anteriormente mencionado en el apartado 3.1. Las lecturas se realizaron a 1 hora, 3 horas, 5 horas y 24 horas.



### **4.3 Determinación de la actividad proteolítica *in vivo* utilizando el método de zimografía con gelatina**

Para determinar por otra metodología si la actividad proteolítica *in vivo* es debida a metaloproteinasas del veneno de serpiente o a metaloproteinasas endógenas, se procedió a realizar un ensayo de zimografía con gelatina según la metodología de Herron et al. (1986), con las modificaciones descritas por Rucavado et al. (1998) y algunas adicionales. Se prepararon geles de poliacrilamida al 7,5 % con 0,50 mg/mL de gelatina disuelta en ellos. Posteriormente, se procedió a montar en los pocillos de los geles diluciones de los exudados inducidos por la BaP1 y veneno completo, obtenidos según la metodología utilizada en el apartado 4.1. Los geles se corrieron en cámara electroforética a 100 V. Una vez finalizada la corrida, los geles se lavaron en agitación constante con Tritón X 1 % durante 30 minutos. Luego se incubaron los geles con el amortiguador para revelado de zimografía 1 X durante 20 horas a 37 ° C. Posteriormente, se tiñeron durante 2 horas con Azul de Coomassie R-250 y se decoloraron en agua destilada durante 20 minutos.

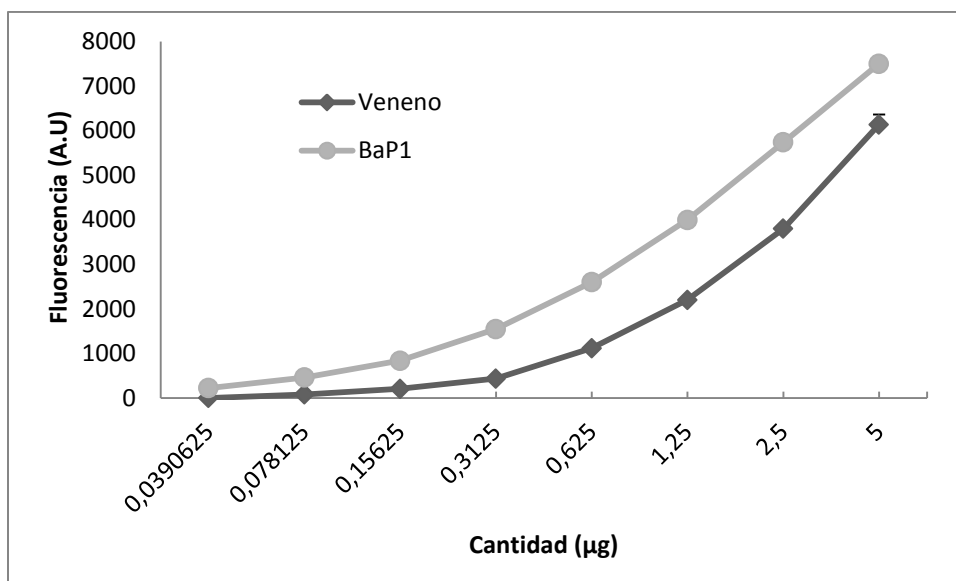
## **5. Análisis Estadístico**

Los resultados de análisis cuantitativos se expresaron como promedio  $\pm$  desviación estándar. Para determinar si la diferencia entre los promedios de varios grupos experimentales fue significativa, se realizó un análisis de variancia (ANOVA) considerando un valor de  $p < 0.05$  como significativo. Se realizó estudio post hoc para determinar entre cuales grupos existen diferencias

## **6. Resultados**

### **6.1. Evaluación de la actividad proteolítica *in vitro* del veneno de *Bothrops asper* de especímenes de la vertiente del Pacífico (Pac) y metaloproteinasas purificadas sobre sustratos de matriz extracelular fluorescentes**

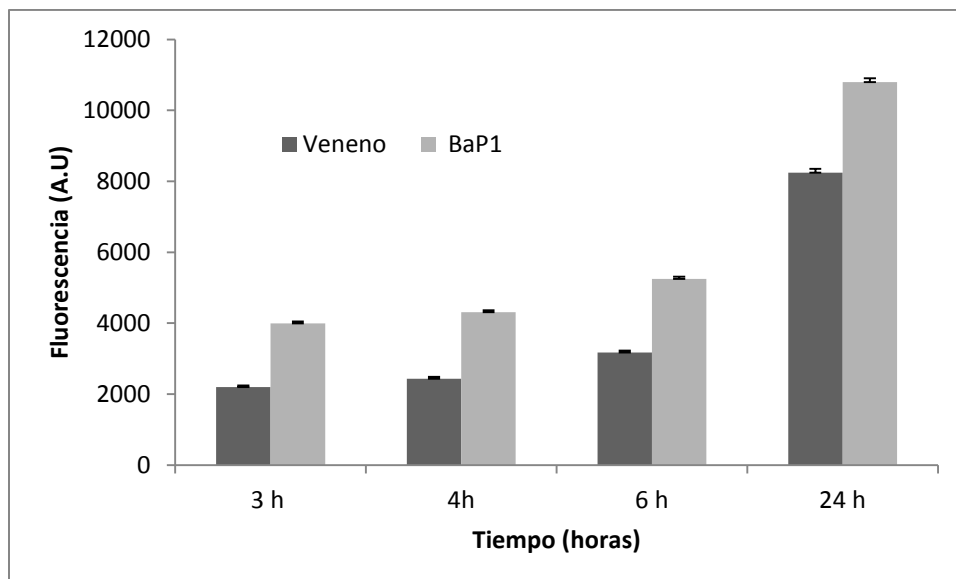
En la Figura 1 se muestran las diferencias en la actividad proteolítica a distintas concentraciones del veneno de *Bothrops asper* de especímenes de la vertiente del Pacífico (Pac) y la BaP1 sobre gelatina fluorescente.



**Fig. 1. Actividad proteolítica del veneno completo de *Bothrops asper* pac (■) y la BaP1 (●) sobre gelatina fluorescente.** Se utilizó la metodología descrita en el protocolo EnzCheck ® Gelatinase/Collagenase Assay Kit de Molecular Probes, Life Technologies. En una placa de 96 hoyos, se adicionan distintas dosis de veneno y BaP1 junto con el amortiguador de reacción y el sustrato de gelatina fluorescente, se deja incubar la placa a temperatura de ambiente, protegida de la luz y se realiza la lectura a las 3 horas utilizando filtro de absorción de 495 nm y fijando la emisión de fluorescencia a 515 nm. Controles de gelatina fluorescente sin las enzimas fueron corridas en paralelo y su señal de fluorescencia fue restada a los valores de las muestras.

De la figura anterior es importante rescatar que la BaP1 a una menor dosis es capaz de degradar en mayor grado la gelatina fluorescente que el veneno completo. Por otro lado, se calculó la unidad proteolítica, que corresponde a la cantidad de veneno o de BaP1 (según sea el caso) que produce unidades arbitrarias de fluorescencia de 3000 en 3h, y se demostró que la BaP1 posee una mayor cantidad de unidades proteolíticas por mg de toxina (746 U/mg) que las que posee el veneno completo (446 U/mg).

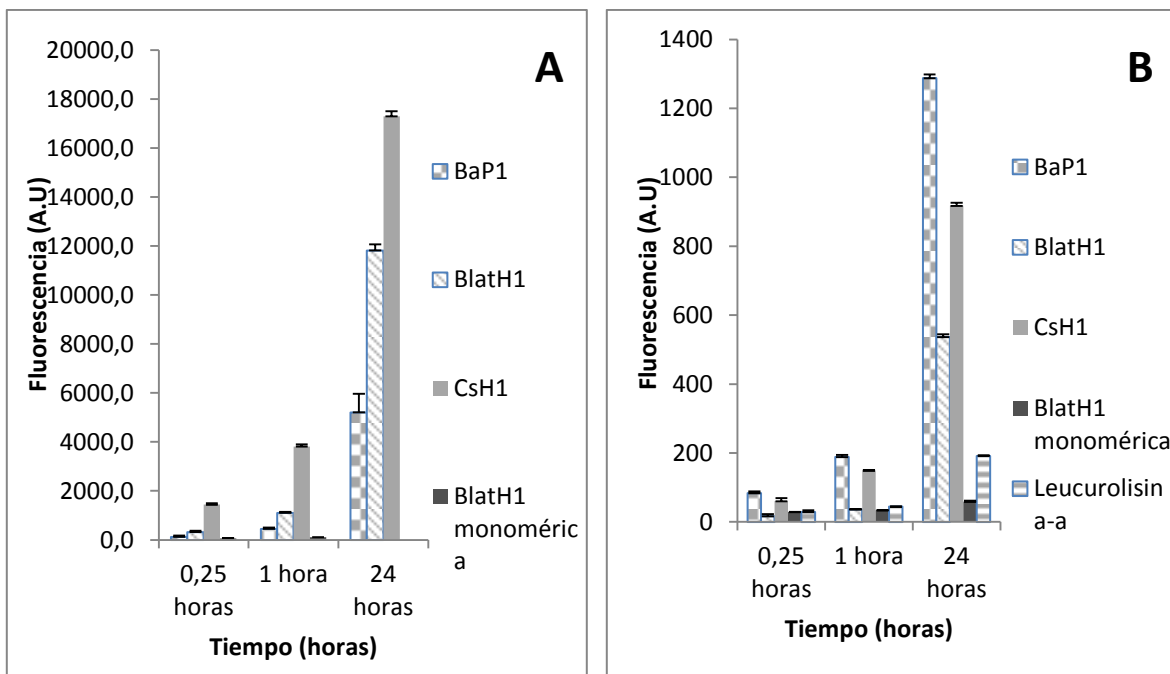
Por otro lado, de la figura 1 se desprende que esta metodología tiene una alta sensibilidad puesto que se puede detectar actividad proteolítica para concentraciones de toxina tan bajas como 39 ng, resultado que no se podía alcanzar con las metodologías convencionales.



**Fig.2. Actividad proteolítica del veneno completo de *Bothrops asper pac* (■) y la BaP1 (□) sobre gelatina fluorescente a distintos tiempos de incubación.** Se utilizó la metodología descrita en el protocolo EnzCheck® Gelatinase/Collagenase Assay Kit de Molecular Probes, Life Technologies. En una placa de 96 hoyos, se adiciona una dosis única de veneno y BaP1 junto con el amortiguador de reacción y el sustrato de gelatina fluorescente para obtener una concentración de toxina de 1,25 µg, se deja incubar la placa a temperatura de ambiente, protegida de la luz y se realiza la lectura a las 3, 4, 6 y 24 horas utilizando filtro de absorción de 495 nm y fijando la emisión de fluorescencia a 515 nm. Controles de gelatina fluorescente sin las enzimas fueron corridas en paralelo y su señal de fluorescencia fue restada a los valores de las muestras.

Como se observa en la Figura 2, la BaP1 posee una mayor actividad enzimática a la misma dosis que el veneno sobre la gelatina. Es importante destacar que conforme se aumenta el tiempo de incubación, la señal de fluorescencia arbitraria que corresponde a la actividad proteolítica es cada vez mayor.

Por otro lado, en la Figura 3 se comparan las actividades proteolíticas de tres metaloproteinasas sobre dos tipos de sustratos fluorescentes distintos. En la figura 3 (A) se observa que la actividad proteolítica sobre gelatina a lo largo del tiempo de incubación aumenta conforme aumentan la cantidad de dominios de las toxinas, es decir, la BaP1 es la que presenta una menor actividad mientras que la CsH1 posee la mayor actividad.

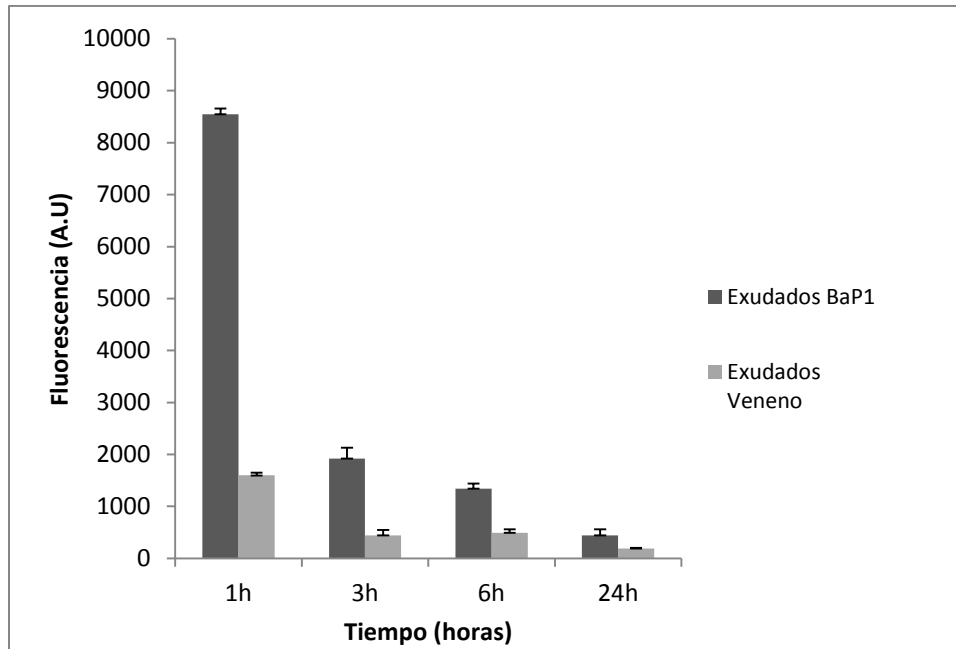


**Fig.3. (A) Actividad proteolítica de la BaP1, BlatH1 dimérica y monomérica, CsH1 y Leucurolisina-a a dosis equimolares sobre gelatina fluorescente y sobre colágeno tipo IV fluorescente (B).** La leucurolisina sólo se ensayó sobre colágeno tipo IV. Las soluciones de las metaloproteinasas diluidas en amortiguador de reacción se ajustan a dosis equimolares. Las mediciones se realizan a los 15 minutos, 1 hora y 24 horas siguiendo la metodología del protocolo EnzCheck® Gelatinase/Collagenase Assay Kit de Molecular Probes, Life Technologies descrito en materiales y métodos. Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  DE.  $*P < 0.05$  cuando se comparan las preparaciones de 1 hora y 24 horas de BaP1 con las preparaciones de 1 hora y 24 horas de la CsH1 y la BlatH1, tanto con gelatina como colágeno.

En el caso de la figura 3 (B), la BaP1 posee una mayor actividad proteolítica sobre el colágeno IV que la CsH1. Sin embargo, se demuestra que todas las toxinas ensayadas son capaces de degradar ambos sustratos. Las tres metaloproteinasas degradan diferencialmente los sustratos fluorescentes a los distintos tiempos y la diferencia de la degradación entre las tres es estadísticamente significativa con un  $*p < 0.05$ .

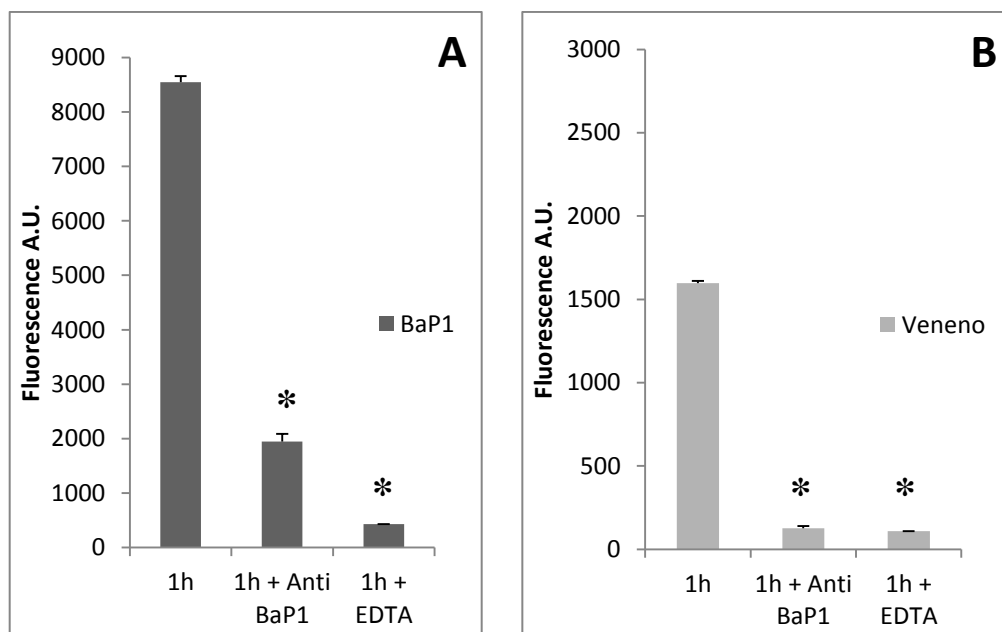
## 6.2. Determinación de la actividad proteolítica de metaloproteinasas *in vivo* con sustratos fluorescentes

Como se observa a continuación, la Figura 4 muestra las diferencias en la actividad proteolítica sobre gelatina fluorescente de los exudados inducidos por la BaP1 y veneno a diferentes intervalos de tiempo.



**Fig. 4. Actividad proteolítica de exudados inducidos por BaP1 y veneno completo de *Bothrops asper* pac en ratones CD-1.** Los exudados se obtuvieron mediante la inyección en el gastrocnemio derecho cuatro grupos de ratones CD-1 (n = 5) con una preparación de 100 µg de veneno completo de *Bothrops asper* y otros cuatro grupos con una de 100 µg de BaP1. Los animales se sacrificaron a 1 hora, a las 3 horas, a las 6 horas y a las 24 horas y los exudados obtenidos se centrifugaron y se midió la actividad proteolítica a las 24 horas siguiendo la metodología del protocolo EnzCheck® Gelatinase/Collagenase Assay Kit de Molecular Probes, Life Technologies descrito en materiales y métodos.

De la figura anterior se desprende que el exudado inducido por la BaP1 presenta una mayor actividad proteolítica que el exudado inducido por el veneno a las diferentes horas. También se observa que a mayor tiempo, la señal de fluorescencia es menor, indicando que los componentes responsables de la actividad proteolítica están en mayor concentración en los primeros tiempos luego de la inyección de la BaP1 o el veneno.

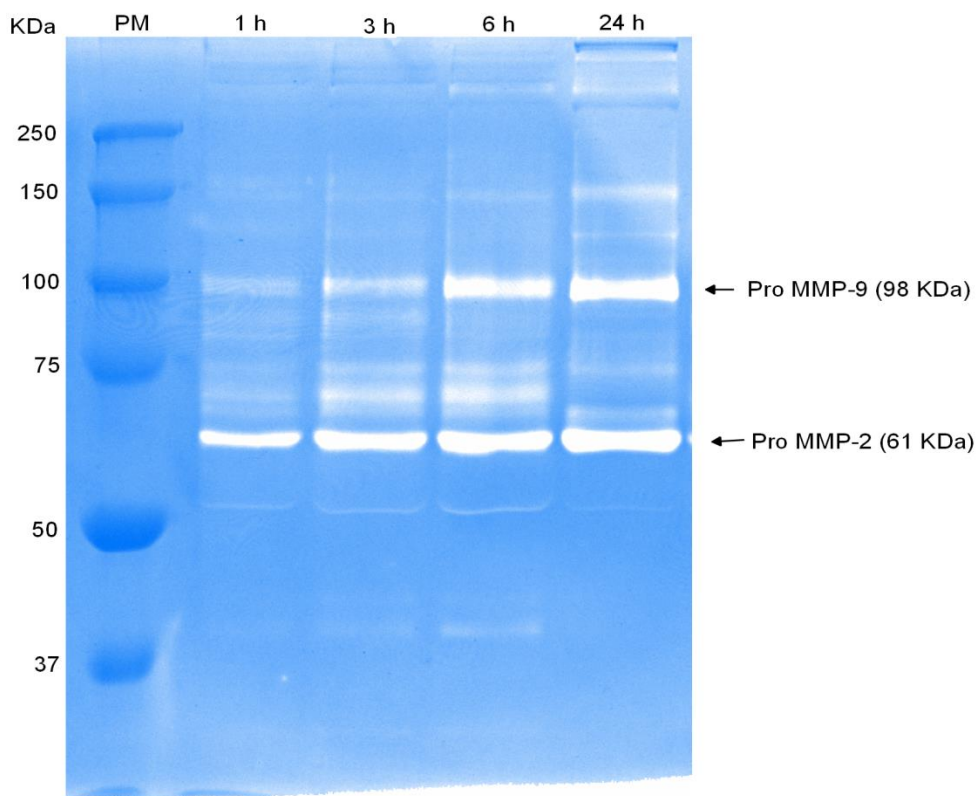


**Fig. 5. (A) Inhibición de la actividad proteolítica de exudados inducidos por BaP1 y (B) veneno completo de *Bothrops asper* pac con anticuerpos anti BaP1 y EDTA.** Los exudados se obtuvieron mediante la inyección en el gastrocnemio derecho cuatro grupos de ratones CD-1 (n = 5) con una preparación de 100 µg de veneno completo de *Bothrops asper* y otros cuatro grupos con una de 100 µg de BaP1. Se sacrificaron los animales a 1 hora, a las 3 horas, a las 6 horas y a las 24 horas y los exudados del grupo de 1 hora obtenidos se centrifugaron, se incubaron con anticuerpos monovalentes anti BaP1 y EDTA 20 mM durante 20 minutos a 37 °C para luego medir la inhibición de la actividad proteolítica a las 24 horas siguiendo la metodología del protocolo EnzCheck® Gelatinase/Collagenase Assay Kit de Molecular Probes, Life Technologies descrito en materiales y métodos. Los resultados se presentan como promedio ± DE. \* $P < 0.05$  cuando se comparan los exudados no inhibidos con los inhibidos por EDTA y anticuerpos anti BaP1.

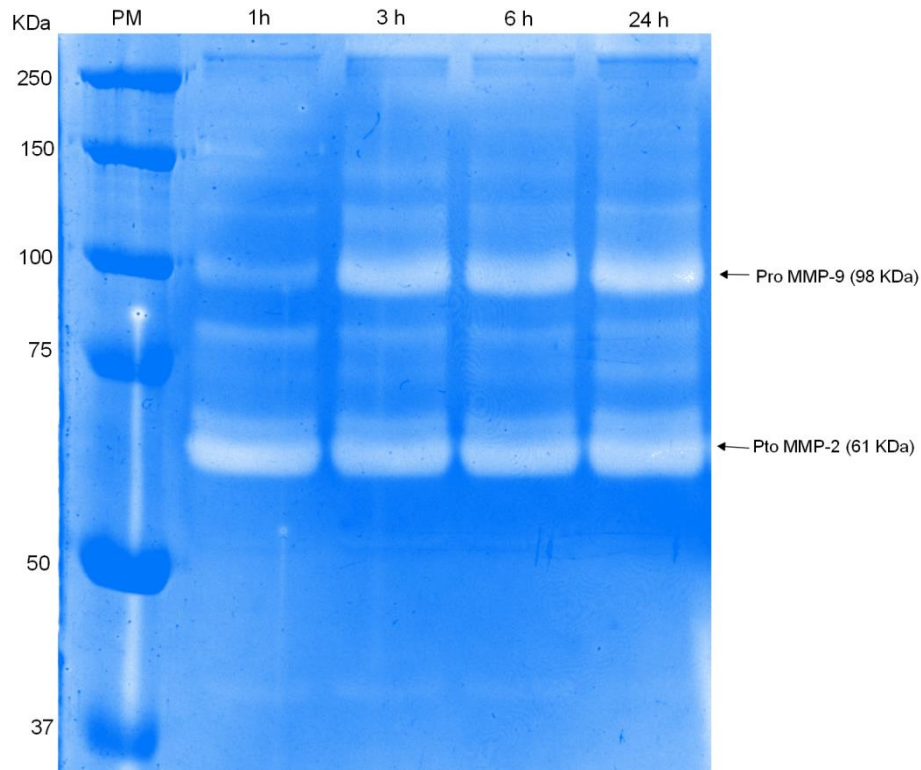
En la figura 5 se observa claramente que la actividad del exudado inducido por la BaP1 y del exudado inducido por veneno es neutralizada por los anticuerpos anti BaP1 y por el EDTA. Es importante mencionar que el exudado de veneno es el que es neutralizado casi en su totalidad. Además, existe una diferencia estadísticamente significativa entre los exudados sin inhibición y los inhibidos por anticuerpos con un  $*p < 0.05$ . El mismo resultado se obtuvo cuando se compararon los exudados sin inhibición con los inhibidos por EDTA. En el exudado de la BaP1 queda un 23% de actividad proteolítica luego de la neutralización con los anticuerpos, no obstante el EDTA si logra neutralizarlo por completo.

En las fig 6 y 7 se presentan los resultados de las zimografías. De los resultados de las zimografías se destaca que a mayor tiempo hay una mayor actividad de metaloproteinasas

endógenas. A los diferentes tiempos se observan varias bandas con actividad proteolítica cuyos pesos moleculares varían entre los 50 a los 150 kDa. En las muestras de 6h y 24h se observa un aumento principalmente de dos bandas una de aproximadamente 100 kDa y otra de aproximadamente 60 kDa. Estos pesos moleculares concuerdan con la Pro-MMP-9 y Pro-MMP-2, sin embargo no se detectan las formas activas de estas enzimas. Por otra parte no se logró detectar bandas de menor peso molecular que correspondieran con la metaloproteínasa BaP1.



**Fig. 6. Zimografía de exudados de herida.** Muestras de exudado de ratón tratado con BaP1 y obtenidas a diferentes intervalos de tiempo (1, 3, 6 y 24h) se separaron en un gel de poliacrilamida al 7,5% conteniendo gelatina disuelta en una concentración de 0,50 mg/mL. Se incubó el gel a 37°C y posteriormente se tiñó con azul de Coomassie R-250.



**Fig. 7. Zimografía de exudados de herida.** Muestras de exudado de ratón tratado con veneno de *B. asper* de especímenes de la vertiente del Pacífico (Pac) y obtenidas a diferentes intervalos de tiempo (1, 3, 6 y 24h) se separaron en un gel de poliacrilamida al 7,5% conteniendo gelatina disuelta en una concentración de 0,50 mg/mL. Se incubó el gel a 37°C y posteriormente se tiñó con azul de Coomassie R-250.

## 7. Discusión

Desde que se empezaron a estudiar los componentes proteolíticos de los venenos de serpiente, se han diseñado varios métodos para la detección rápida y de manera sensible de estos tanto *in vitro* como *in vivo*. Existen métodos tradicionales para demostrar la actividad proteolítica de las MPVS, mediante la utilización de sustratos como caseína, gelatina o algunas proteínas de la matriz extracelular (Escalante *et al*, 2011), sin embargo, muchos de los métodos están restringidos al uso de sustratos diferentes a los sustratos blanco a los que se dirigen las metaloproteinasas *in vivo*, por lo que el empleo de métodos con sustratos similares a los sustratos diana permite obtener mayor información sobre la actividad proteolítica de las enzimas.



### **Determinación de la actividad proteolítica de metaloproteinasas *in vitro***

Si se toman en cuenta los resultados mostrados en la figura 1., se demuestra que la técnica posee una gran sensibilidad y tiene ciertas ventajas con respecto a otros métodos. En un estudio realizado donde se comparó la acción de dos MPVS sobre la membrana basal capilar *in vitro* e *in vivo*, se demostró mediante el empleo del ensayo de degradación sobre azocaseína, que la dosis más baja de BaP1 necesaria para generar una señal detectable de  $\Delta$  absorbancia (450 nm) de 0,1 fue de 1,25  $\mu$ g (Escalante *et al*, 2006). Mientras que en el presente trabajo, el empleo de sustratos fluorescentes demuestra que la dosis más baja de BaP1 que genera una señal detectable, es de apenas 0,04  $\mu$ g, lo que ratifica la sensibilidad de la técnica. Otra ventaja con respecto al ensayo sobre azocaseína, es que utiliza gelatina como sustrato, siendo este un sustrato más parecido a los sustratos *in vivo* a los que se dirigen las metaloproteinasas. Además, se demuestra que tanto la BaP1 como el veneno completo de *B. asper* pac tienen una alta actividad proteolítica sobre la gelatina fluorescente.

Por otro lado, en la figura 2, se observa que inclusive a 24 horas se puede obtener una mayor sensibilidad del ensayo, es decir, se pueden detectar cantidades inclusive más bajas de proteasas que realizando sólo la lectura a las 3 horas, como se muestra en la figura 1. Esto se ejemplifica claramente ya que a las 3 horas, el punto de 1, 25  $\mu$ g sólo genera una señal de 2200 A.U para veneno y una de 4000 A.U para BaP1, mientras que a las 24 horas, las señales son de 8200 A.U y 10 800 A.U respectivamente.

Si se compara el efecto de las metaloproteinasas utilizadas sobre ambos sustratos fluorescentes, se demuestra que todas estas toxinas son capaces de degradar ambos sustratos aunque se presentan diferencias entre estos sustratos y entre las tres enzimas. Sin embargo estas diferencias no concuerdan con las diferencias en la actividad hemorrágica de estas metaloproteinasas. Las dosis hemorrágicas mínimas de la BaP1, BlatH1 y la CsH1 son respectivamente: 14  $\mu$ g, 0,5  $\mu$ g y 2  $\mu$ g (Morazán, 2012) y se podría pensar que la BlatH1 que es la más hemorrágica podría ser la más proteolítica, sin embargo, se observa que la BlatH1 no es la más proteolítica sobre ambos sustratos.

Una de las razones que podría explicar esta actividad sobre los sustratos es que la actividad proteolítica *in vitro* no necesariamente refleja la actividad *in vivo*. Esta última puede estar modulada por los otros dominios que tienen las PII y las PIII. Además, estos dominios pueden estar dirigiendo las toxinas a sitios relevantes en el tejido. Estudios recientes han demostrado que las PII y las PIII son dirigidas a los capilares *in vivo* debido a la localización proporcionada por estos dominios adicionales, mientras que la BaP1, al no tener estos dominios adicionales se dispersa hacia otros sustratos y no se fija a los vasos sanguíneos (Herrera et al, 2015). Por lo tanto, los resultados que se observan en la figura 3 de que la más hemorrágica no es la más proteolítica, apoyan la importancia de estos dominios adicionales *in vivo* (Escalante *et al*, 2011).

Artículos previos sugerían la importancia del colágeno tipo IV para la hemorragia. En un artículo se comparó la acción de dos metaloproteinasas P-I, la BaP1 de *Bothrops asper* y la leucurolisina-a de *B. leucurus*, sobre diversos sustratos. La primera es una toxina con actividad proteolítica y hemorrágica mientras que la segunda sólo tiene actividad proteolítica. Se comparó la actividad proteolítica sobre azocaseína y no se observó diferencia significativa y se realizaron ensayos de degradación sobre proteínas de matriz *in vitro* e *in vivo* y se observó que el colágeno IV es mayormente degradado y en un menor tiempo por la BaP1 que por la leucurolisina-a, sugiriendo la importancia de este sustrato para la hemorragia. (Escalante *et al*, 2011).

La importancia del colágeno tipo IV y la localización diferencial de estas metaloproteinasas también ha sido demostrado previamente con metaloproteinasas de otros venenos. En un estudio, donde se compara la localización en el tejido y degradación *in situ* de una metaloproteinasa tipo P-I con baja actividad hemorrágica (BnP1) y otra P-III hemorrágica (Jararhagina), se demostró que la última indujo una mayor degradación de colágeno IV que de laminina, sugiriendo que el colágeno IV es clave en la hemorragia. (Baldo *et al*, 2010). Por lo tanto, si se compara ahora la degradación del colágeno IV fluorescente por las tres metaloproteinasas hemorrágicas en estudio como se presenta en la figura 3 (B), se observa que todas lo degradan, lo que concuerda que este sustrato es importante para la hemorragia, mientras que la metaloproteinasa no hemorrágica leucurolisina-a fue incapaz de degradar este sustrato fluorescente.

El hallazgo que la metaloproteinasa BaP1, la cual es la que presenta menor actividad hemorrágica, fuera la más proteolítica sobre colágeno IV sugiere que estas diferencias de capacidad de degradación entre las tres metaloproteinasas pueden estar asociadas *in vitro* a la capacidad enzimática del dominio metaloproteinasa. Sin embargo, estas diferencias no se relacionan con la potencia hemorrágica, lo que demuestra que *in vivo* juegan un papel otros factores como fuerzas biofísicas, flujo, distribución de las toxinas y accesibilidad al sustrato, mientras que *in vitro*, el sustrato está accesible y por largos períodos de tiempo.

### **Determinación de la actividad proteolítica de metaloproteinasas *in vivo***

Previamente se habían realizado experimentos donde se demostró la presencia de toxinas de veneno en el tiempo en homogenizados de músculo, pero no se sabía si estas estaban activas. (Saravia-Otten *et al*, 2013). En este trabajo, gracias a la sensibilidad de la técnica se logra demostrar que hay actividad proteolítica detectable a 1 hora con posterior disminución a lo largo del tiempo, sin embargo, se logra detectar actividad inclusive a las 24 horas (ver Fig.4.). Asimismo, parece ser que esa actividad es dada principalmente por metaloproteinasas del veneno, ya que estas son neutralizadas casi por completo al utilizar anticuerpos monovalentes anti BaP1. Conjuntamente, el EDTA elimina prácticamente toda la actividad proteolítica lo que parece indicar que las serinoproteinasas no parecen jugar un papel importante en el proceso de degradación del sustrato *in vivo* (ver Fig.5.) Estos datos sugieren que la BaP1 tiene una gran importancia en la actividad proteolítica del veneno, puesto que los exudados inducidos por esta toxina muestran aún más actividad proteolítica que los inducidos por el veneno completo. De hecho, se realizó un western blot para detectar la BaP1 en los exudados de veneno y se observó una banda que concuerda con el peso molecular de la BaP1 a los diferentes tiempos, excepto a las 24h, lo que refuerza el hecho de que la BaP1 parece tener una gran importancia en la actividad proteolítica en las primeras horas (ver Fig. 1 en Apéndices).

El hecho de que el EDTA lograra una neutralización mayor que el anti-BaP1 en los exudados inducidos por esta metaloproteinasa, puede tener varias explicaciones: existen metaloproteinasas endógenas como las MMPs que también participan de la degradación de la gelatina fluorescente, existen metaloproteinasas del veneno que no son neutralizadas por el anti-BaP1 o la cantidad o afinidad de los anticuerpos anti-BaP1 no permite que se

neutralice el 100% de la actividad de esta enzima. Los resultados de la zimografía permitieron evaluar si la actividad se debe a MMPs o a metaloproteinasas del veneno.

Cuando se analizan por zimografía los exudados de ratón tratados con veneno y BaP1 en un gel al 7,5% con gelatina disuelta, se logra observar en la Fig.6. y la Fig.7. que la metaloproteinasa de aproximadamente 98 kDa, que parece corresponder a la Pro MMP-9, es inducida conforme pasa el tiempo pero no parece estar activa, ya que no se detectan bandas de alrededor de 80 kDa correspondientes a la forma activa. Por otro lado, la banda de 61 kDa parece corresponder a la forma latente de la MMP-2 o Pro-MMP-2 (Rucavado *et al*, 2002). Sin embargo, por esta técnica no se logra detectar las toxinas del veneno y se están detectando metaloproteinasas endógenas de matriz cuya actividad pareciera ser mayor a las 24 horas, lo que indica que los resultados de la proteólisis a menores tiempos son dados principalmente por proteasas del veneno. En otras palabras, a mayor tiempo hay una mayor actividad de metaloproteinasas endógenas, lo que concuerda con la llegada de infiltrado inflamatorio al tejido que se corrobora en la figura 2 ubicada en los apéndices de este trabajo.

Estos datos se ven respaldados con un estudio previo donde inyectaron BaP1 en gastrocnemios de ratón que posteriormente fueron homogenizados a ciertas horas para evaluar la actividad proteolítica de las metaloproteinasas endógenas. En este ensayo, al igual que en la presente investigación, se observó que conforme pasaba el tiempo, había una mayor expresión de MMPs, es decir, un aumento en la actividad pero de manera más tardía (Rucavado *et al*, 2002). Esto sugiere que los resultados generados por la proteólisis sobre gelatina fluorescente realizados con exudados (Fig.6. y Fig.7.) se deben principalmente a las metaloproteasas del veneno.

## **Conclusiones**

- El ensayo de proteólisis sobre sustratos fluorescentes posee una gran sensibilidad y es metodológicamente muy sencillo lo que representa una ventaja con respecto a otros métodos tradicionales.

- La metaloproteinasa B1atH1, la cual es la más hemorrágica, no es la más proteolítica *in vitro* y por lo tanto la actividad proteolítica *in vitro* no necesariamente refleja la actividad *in vivo*.
- Las diferencias en la capacidad de degradación *in vitro* entre las tres metaloproteinasas utilizadas pueden estar asociadas a la capacidad del dominio metaloproteinasa de degradar más rápidamente un sustrato determinado, pero estas diferencias no se relacionan con la potencia hemorrágica, lo que sugiere que *in vivo* juegan un papel otros factores como la localización mediante los dominios.
- El colágeno tipo IV es un sustrato clave en la hemorragia inducida por veneno de serpiente ya que es degradado por las tres metaloproteinasas hemorrágicas
- La sensibilidad de la técnica permitió demostrar que hay actividad proteolítica *in vivo* en exudados inducidos por veneno y por BaP1 detectable a 1 hora con posterior disminución a lo largo del tiempo
- El EDTA elimina prácticamente toda la actividad proteolítica de los exudados lo que parece indicar que las serinoproteinasas no juegan un papel importante en el proceso de degradación del sustrato en este modelo.
- La actividad proteolítica detectada en los exudados es debida principalmente a metaloproteinasas del veneno, ya que esta es neutralizadas casi por completo al utilizar anticuerpos purificados anti BaP1.
- Las MMPs aumentan su expresión en los exudados a partir de las 6h lo que indica que estas no participan de manera importante en la actividad proteolítica de los exudados detectada desde la primera hora

## Referencias

**Artym, V. V., K.M. Yamada, and S.C. Mueller.** 2009. ECM degradation assays for analyzing local cell invasion, p. 211-219. *In* S. Even-Ram, V. V. Artym (ed), Extracellular Matrix Protocols. Humana Press.

**Baldo, C., C. Jamora, N. Yamanouye, T.M. Zorn, and A.M. Moura-da-Silva.** 2010. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**. e727.

**Bee, A., R.D.G. Theakston, R.A. Harrison and S. Carter.** 2001. Novel *in vitro* assays for assessing the haemorrhagic activity of snake venoms and for demonstration of venom metalloproteinase inhibitors. *Toxicon.* **39**:1429-1434.

**Biardi, J. E., K.T. Nguyen, S. Lander, M. Whitley, and K.P. Nambiar.** 2011. A rapid and sensitive fluorometric method for the quantitative analysis of snake venom metalloproteases and their inhibitors. *Toxicon*, **57**:342-347.

**Bottrall, J. L., F. Madaras, C.D. Biven, M.G. Venning, and P.J. Mirtschin.** 2010. Proteolytic activity of Elapid and Viperid Snake venoms and its implication to digestion. *J Venom Res.* **1**:18-28.

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

**Camacho, E., E. Villalobos, L. Sanz, A. Pérez, T. Escalante, B. Lomonte, and A. Rucavado.** 2014. Understanding structural and functional aspects of PII snake venom metalloproteinases: Characterization of BlatH1, a hemorrhagic dimeric enzyme from the venom of *Bothriechis lateralis*. *Biochimie.* **101**:145-155.

**Chen, J., C.H. Tung, U. Mahmood, V. Ntziachristos, R. Gyurko, M.C. Fishman, and R. Weissleder.** 2002. *In vivo* imaging of proteolytic activity in atherosclerosis. *Circulation*. **105**:2766-2771.

**Chippaux, J.P.** 1998. Snake-bites: appraisal of the global situation. *WHO Bulletin OMS*. **76**: 515-524.

**Escalante, T.** 2011. Alteraciones de las proteínas de la membrana basal provocadas por las metaloproteinasas de venenos de serpiente y su relación con el mecanismo de lesión de la microvasculatura. Tesis de Doctorado. Universidad de Costa Rica, San José.

**Escalante, T., J. Shannon, A. M. Moura-da-Silva, J. M. Gutiérrez, and J. W. Fox.** 2006. Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: a biochemical and immunohistochemical study. *Arch Biochem Biophys*. **455**: 144-153.

**Escalante, T., A. Rucavado, A.F. Pinto, R.M. Terra, J.M. Gutiérrez, and J.W. Fox.** 2009. Wound exudate as a proteomic window to reveal different mechanisms of tissue damage by snake venom toxins. *J Proteome Res*. **8**:5120-5131.

**Escalante, T., A. Rucavado, J.W. Fox, and J.M. Gutiérrez.** 2011. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *J. Proteomics*. **74**:1781-1794.

**Escalante, T., N. Ortiz, A. Rucavado, E.F. Sanchez, M. Richardson, J. W. Fox, and J.M. Gutiérrez.** 2011. Role of Collagens and Perlecan in Microvascular Stability: Exploring the Mechanism of Capillary Vessel Damage by Snake Venom Metalloproteinases. *Plos One*. **6**: 1-13.

**Fox, J. W., and S.M. Serrano.** 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*. **45**:969-985.

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

**Gutiérrez, J. M., and A. Rucavado.** 2000. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*, **82**:841-850.

**Gutiérrez, J.M., M. Romero, C. Díaz, G. Borkow, M. Ovidia.** 1995. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*. **33**:19-29.

**Gutiérrez J. M., A. Rucavado, F. Chaves, C. Díaz, T. Escalante.** 2009. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*. **54**:958-975.

**Herrera. C, T. Escalante, M.B. Voisin, A. Rucavado, D. Morazán, J.K. Macêdo, J.J. Calvete, L. Sanz, S. Nourshargh, J.M. Gutiérrez, J.W. Fox.** 2015. Tissue Localization and Extracellular Matrix Degradation by PI, PII and PIII Snake Venom Metalloproteinases: Clues on the Mechanisms of Venom-Induced Hemorrhage. *PLoS Negl Trop Dis*. **24**: 1-20.

**Hsu, C. C., and T.F. Huang.** 2011. Biological activities of snake venom metalloproteinases on platelets, neutrophils, endothelial cells, and extracellular matrices, p. 723-732. *In* *Toxins and Hemostasis*. Springer Netherlands.

**Jia, L. G., K.I. Shimokawa, J.B. Bjarnason, and J.W. Fox.** 1996. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Toxicon*. **34**:1269-1276.



**Kalan, E. B., and M. Telka.** 1961. Enzymic Degradation of  $\beta$ -Casein by a Snake Venom Preparation. *J Dairy Sci.* **44**:16-25.

**Kalluri, R.** 2003. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* **3**: 422-433.

**Kohl, T., E. Haustein, and P. Schwille.** 2005. Determining protease activity *in vivo* by fluorescence cross-correlation analysis. *Biophys J.* **89**:2770-2782.

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

**Lomonte, B.** 2007 Manual de Métodos Inmunológicos, 138 pp. Universidad de Costa Rica. Acceso libre en: <http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/>

**Lomonte, B., J. Gutiérrez, G. Borkow, M. Ovadia, A. Tarkowski, and L. Å. Hanson.** 1994. Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH-1 and myotoxin II from Bothrops asper snake venom on capillary endothelial cells *in vitro*. *Toxicon.* **32**:505-510.

**Markland Jr, F. S., and A. Perdon.** 1986. Comparison of two methods for proteolytic enzyme detection in snake venom. *Toxicon.* **24**:385-393.

**Markland Jr, F. S., and S. Swenson.** 2013. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon.* **62**:3-18.

**Mook, O. R., C. Van Overbeek, E.G. Ackema, F. Van Maldegem, and W.M. Frederiks.** 2003. In situ localization of gelatinolytic activity in the extracellular matrix of metastases of colon cancer in rat liver using quenched fluorogenic DQ-gelatin. *J. Histochem. Cytochem.* **51**:821-829.

**Morazán, D.** 2012. Efecto de las metaloproteinasas hemorrágicas de venenos de serpiente sobre algunos componentes de membrana basal: Estudio comparativo de metaloproteinasas

con distinta actividad hemorrágica. Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica, San José.

**Moreira, L., Gutiérrez, J.M., Borkow, G., Ovidia, M.** 1992. Ultrastructural alterations in mouse capillary blood vessels after experimental injection of venom from the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Exp. Mol. Pathol.* **57**: 124-133.

**Rucavado, A., T. Escalante, C. F. P. Teixeira, C. M. Fernández, C. Díaz and J. M. Gutiérrez.** 2012. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Mediat Inflamm.* **11**: 121–128.

**Sánchez, E.E., A. Rodríguez-Acosta, E. Cantu, and B. Guerrero.** 2010. Antivenoms and Coagulation, p. 711-722. *In* R. Manjunatha-Kini, F.S. Markland, M.A. McLane, and T. Morita (ed), *Toxins and Hemostasis*. Springer New York.

**Sandhya, C., A. Sumantha, and A. Pandey.** 2006. Proteases, p. 319-333. *In* A, Pandey., C, Webb., C.R., Soccol and C, Larroche (ed.). *Enzyme Technology*. Springer Science+Business Media, Inc., New York, NY.

**Saravia-Otten, P., B. Robledo, T. Escalante, L. Bonilla, A. Rucavado, B. Lomonte, R. Hernández, J. Flock, J.M. Gutiérrez and S. Gastaldello.** 2013. Homogenates of skeletal muscle injected with snake venom inhibit myogenic differentiation in cell culture. *Muscle Nerve.* **47**: 202-212.

**Sasa, M., and S. Vazquez.** 2003. Snakebite envenomation in Costa Rica: a revision of incidence in the decade 1990–2000. *Toxicon.* **41**:19-22.

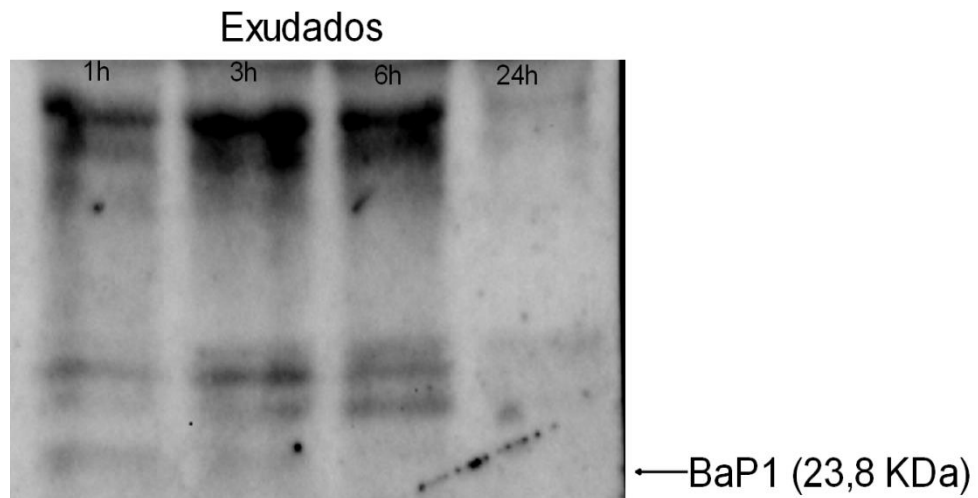
**Vandooren, J., N. Geurts, E. Martens, P.E. Van den Steen, and G. Opdenakker.** 2013. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nature methods.* **10**:211-220.

**Warner, R. L., N. Bhagavathula, K.C. Nerusu, H. Lateef, E. Younkin, K.J. Johnson, and J. Varani.** 2004. Matrix metalloproteinases in acute inflammation: induction of MMP-3 and MMP-9 in fibroblasts and epithelial cells following exposure to pro-inflammatory mediators *in vitro*. *Exp. Mol. Pathol.* **76**:189-195.

**Watanabe, L., J.D. Shannon, R.H. Valente, A. Rucavado, A. Alape-Girón, A.S. Kamiguti, and R.K. Arni.** 2003. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. *Prot Sci.* **12**:2273-2281.

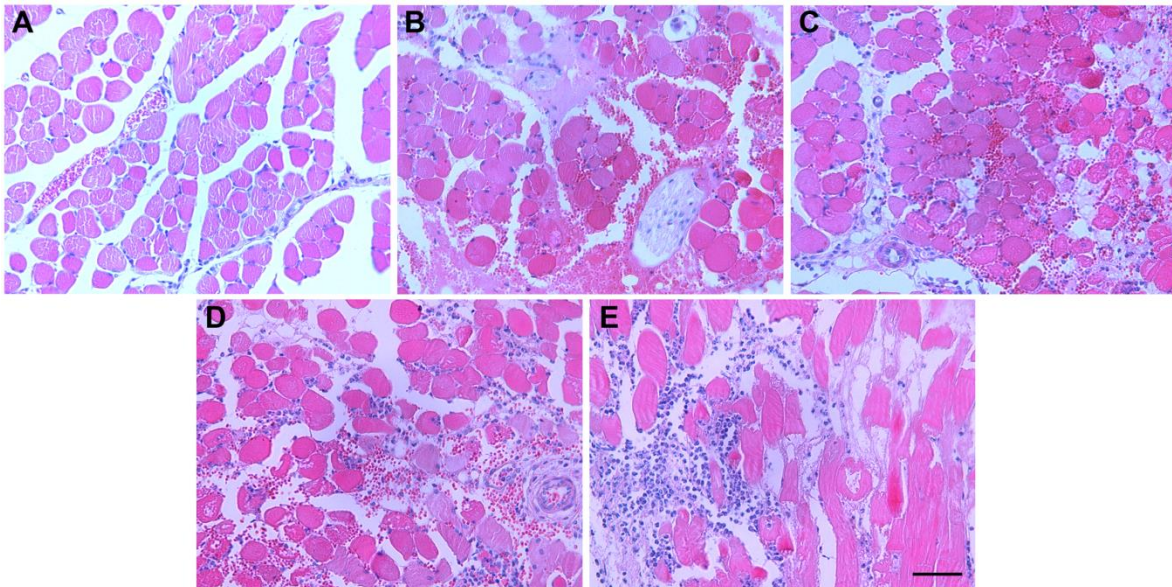
# APÉNDICES

**Fig. 1**



**Detección de la metaloproteínasa BaP1 en exudado de herida de mediante western blot.** Con el fin de determinar la presencia de la metaloproteasa BaP1 del veneno de *Bothrops asper* en el exudado a diferentes períodos de tiempo se utilizó la técnica de western blot. Para ello, se cuantificó la concentración de proteína en los exudados para ajustar todas las muestras a la misma concentración y se realizó una electroforesis SDS-PAGE en un gel al 10%, seguido de una transferencia a membrana de nitrocelulosa. Para la inmunodetección la membrana se incubó con una solución bloqueadora (leche en polvo descremada al 5% en PBS), seguido de la incubación con anticuerpos monovalentes contra la BaP1. Posteriormente se aplicó un conjugado anti-inmunoglobulina/peroxidasa y se reveló la reacción con un sustrato quimioluminiscente. Se determinó el peso molecular de la banda de proteína que migró cerca del peso molecular de la BaP1 y comparó con un control de veneno de *B.asper*

**Fig. 2**



Micrografías de secciones de músculo gastronemio de ratones inyectado i.m. con PBS(A) o con 50  $\mu$ g de veneno de *B. asper*, disuelto en 50  $\mu$ L PBS (B,C,D,E). Los grupos de ratones inyectados con veneno fueron sacrificados luego de 1 hora (B), 3 horas (C), 6 horas (D), o 24 horas (E), mientras que los ratones que recibieron PBS se sacrificaron a las 24 horas. El tejido muscular inyectado se disecó, se fijó en 10% de formalina, y se procesó de rutina para inclusión en parafina. Secciones de tejido fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina. Una apariencia histológica normal se observa en (A),mientras que el tejido de ratones que recibió veneno muestra hemorragia, mionecrosis y la presencia de exudados hialinos en el espacio intersticial en todos los intervalos de tiempo. Un infiltrado inflamatorio, con predominio de neutrófilos polimorfonucleares, se observa en el espacio intersticial y dentro de algunas fibras necróticas a las 3 horas, pero especialmente a las 6 h y 24 h. La barra representa 100  $\mu$ m.