

**Sección III:
Bioquímica y
Biología Celular**

AISLAMIENTO DE UN PÉPTIDO ANTIBACTERIANO DEL VENENO DE *Hadruroides charcasus*

Flores, Lidia, Rivera, Carlos y Escobar, Enrique

Lab. Bioquímica y Genética Molecular, FCB, UNMSM.
eescobarg@unmsm.edu.pe

El objetivo de este trabajo fue separar las proteínas del veneno de *Hadruroides charcasus* e identificar fracciones con actividad antibacteriana. El veneno se obtuvo por estimulación eléctrica (22 V), de escorpiones adultos de *H. charcasus* (Lambayeque). Las bacterias utilizadas fueron: *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. choleraesuis* ATCC 14028, *K. pneumoniae*, *B. cereus* ATCC 14579 y *S. aureus* ATCC 25923. El veneno (53 mg) fue fraccionado por cromatografía en CM-Sephadex C-25 y UNOsphere Q con acetato de amonio 0,05M pH 7. La proteína se midió por la absorción a 280nm. La pureza se evaluó por PAGE-SDS. La actividad antibacteriana se ensayó en tubos mezclando 1,9mL de cultivo de *E. coli* en medio mínimo ($A_{600}=0,02$) y 0,1 mL de la fracción respectiva. Luego de 12h a 37°C se determinó el crecimiento midiendo la A_{600} . También se hicieron ensayos en placas con discos impregnados con la fracción correspondiente. La actividad hemolítica se ensayó sobre eritrocitos humanos. El perfil cromatográfico en CM-Sephadex C-25 mostró 8 picos proteicos. La actividad antibacteriana se encontró en el primer pico, el cual al pasarse por UNOsphere Q mostró dos picos principales. La actividad antibacteriana se encontró al inicio del segundo pico. La PAGE-SDS de esta fracción mostró dos bandas proteicas de aproximadamente 6kDa. Los ensayos de difusión por disco, mostraron inhibición del crecimiento de *S. aureus* y *P. aeruginosa*. No hubo actividad hemolítica. Se concluye que el veneno de *H. charcasus* posee al menos un péptido antibacteriano.

Palabras clave: veneno, escorpión, antibacteriano, *Hadruroides charcasus*.
 Fuente de financiamiento: Consejo Superior de Investigaciones - UNMSM.

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA DEL ANTIVENENO BOTRÓPICO: NEUTRALIZACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LOS VENENOS DE DOS SERPIENTES DE LA COSTA PERUANAInga, R.¹, Vivas, D.¹, Ruiz, N.¹, Rodríguez, E. ¹, Lazo, F. ¹, y Yarlequé, A.¹

¹Laboratorio de Biología Molecular- FCB, UNMSM.
jhoram_vl@hotmail.com

El presente estudio evaluó la capacidad neutralizante de las actividades enzimáticas de *Bothrops barnetti* y *Bothrops pictus* por el antiveneno botrópico sometido a calentamiento prolongado a 37°C. Se sometió el antiveneno botrópico (INS) a un tratamiento térmico de 37°C por 5 días, para luego ser enfrentado a los venenos de las serpientes costeñas *Bothrops barnetti* y *Bothrops pictus* a cantidades correspondientes a ½, 1 y 2 dosis neutralizantes, inmediatamente se procedió a medir su acción inhibitoria sobre las principales actividades enzimáticas: amidolítica, caseinolítica, coagulante sobre plasma, hialuronidasa, fosfolipasa A₂, y L-amino oxidasa. Los resultados de neutralización para cada actividad fueron comparados con un control de antiveneno no tratado. La neutralización de las actividades caseinolítica y amidolítica de ambos venenos no fue afectada por el tratamiento térmico; mientras que la neutralización de las actividades fosfolipasa A₂ y coagulante registró una pobre reducción especialmente para *B. barnetti*. Por otro lado, la neutralización de la actividad hialuronidasa se vio afectada en un 23 % para *B. barnetti* y tan solo en 2% para *B. pictus*. Asimismo, la neutralización de la actividad L-aminoácido oxidasa fue severamente afectada para ambos venenos con valores de 26.5% y 28% para *B. barnetti* y *B. pictus* respectivamente. El tratamiento térmico al cual fue sometido el suero antibotrópico no afecta significativamente la capacidad neutralizante del mismo sobre las actividades enzimáticas estudiadas para ambos venenos.

Palabras clave: Bothrops, veneno, suero, tratamiento térmico, neutralización.
 Fuente de financiación: PROCYT N°

EVALUACIÓN DE LOS DAÑOS BIOLÓGICOS CAUSADOS POR EL ENVENENAMIENTO DE LA SERPIENTE *Bothrops atrox* «JERGON»Inga, R.¹, Sandoval, G.¹, Mendoza, J.¹, Vivas, D.¹, Medina, S.¹, Severino, R.² y Yarlequé, A.¹¹Laboratorio de Biología Molecular- FCB, UNMSM.²Laboratorio de Zoología de Invertebrados-FCB, UNMSM.
rosalin_47@hotmail.com

Se evaluó experimentalmente la toxicidad así como los daños locales y sistémicos que causa el veneno de *Bothrops atrox* sobre ratones albinos del tipo Balb-c (18-20 g). Para los ensayos toxicológicos se inyectó diluciones del veneno a los ratones por diferentes vías, haciendo uso del manual de métodos para la determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes del Instituto Cloromido Picado. Se evaluaron los siguientes efectos biológicos: letalidad, hemorragia, miotoxicidad y defibrinante. Los resultados fueron analizados por métodos estadísticos computarizados. La intensidad de los efectos biológicos fue dependiente de la dosis de veneno inoculado. Se obtuvo como dosis letal media (DL50) 3,33 µg/ g de ratón, la dosis hemorrágica mínima (DHM): 4,10±0,64 µg, la dosis miotóxica mínima (DMM): 30,2±2,5 µg; la dosis coagulante mínima (DCM): 4,50±0,6 µg y la dosis defibrinante mínima (DDM) 8 µg. Los daños biológicos producidos por el veneno de *Bothrops atrox* afectan principalmente el sistema hemostático así como el sistema muscular. Teniendo una letalidad elevada para el género *Bothrops*.

Palabras clave: *Bothrops atrox*, veneno, hemorragia, miotóxica, coagulante.
Fuente de financiamiento: PROCYT**PATRONES ELECTROFORÉTICOS COMPARATIVOS DE LOS VENENOS DE SERPIENTES PERUANAS DEL GÉNERO *Bothrops***Mendoza, J.¹, Gonzales, E.¹, Ruiz, N.¹, Arbaiza, L.², Severino, R.³ y Yarlequé, A.¹¹Laboratorio de Biología Molecular- FCB, UNMSM.²Laboratorio de Biología Celular -FCB, UNMSM.³ Laboratorio de Zoología de Invertebrados-FCB, UNMSM.
sfexryu@hotmail.com

Se estableció el patrón electroforético típico de 5 venenos de serpientes del género *Bothrops*: *B. atrox*, *B. barnetti*, *B. brazili*, *B. hyoprora* y *B. pictus*, procedentes del serpentario «Oswaldo Meneses» de la UNMSM, tomando como criterio la disposición de bandas proteicas por PAGE-SDS. La cantidad de proteína se determinó en cada muestra por el método de Lowry, obteniéndose para cada veneno expresado en porcentaje de: 78% (*B. atrox*), 74% (*B. barnetti*), 83% (*B. brazili*), 93% (*B. hyoprora*) y 69% (*B. pictus*). El análisis electroforético se efectuó en geles de poliacrilamida al 12% revelando las bandas con Azul Brillante de Coomassie R-250. Las proteínas marcadoras de peso molecular estuvieron en un rango de 14300 Da (Lizosima) y 66000 Da (Albúmina sérica bovina). Los patrones electroforéticos fueron característicos para cada veneno, observándose que para *B. barnetti* el número de bandas fue catorce, tres de ellas menores de 66 kDa, mientras que el veneno de *B. brazili* tuvo un número de siete bandas menores a 45 kDa. Puede considerarse que el patrón electroforético para este género, constituye un número rápido y específico para identificarlos y para su posterior caracterización.

Palabras clave: *Bothrops*, serpiente, veneno, SDS-PAGE.
Fuente de financiamiento: PROCYT N°

PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS DEL VENENO DE *Centruroides margaritatus*

Rivera, Carlos, Flores, Lidia y Escobar, Enrique

Lab. Bioquímica y Genética Molecular, FCB, UNMSM.
eescobarg@unmsm.edu.pe

El objetivo de este trabajo fue identificar péptidos con actividad antibacteriana en el veneno del escorpión *Centruroides margaritatus*. El veneno se obtuvo por estimulación eléctrica (22V), de escorpiones adultos de *C. margaritatus* (Tumbes). Las bacterias utilizadas fueron: *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. choleraesuis* ATCC 14028, *K. pneumoniae*, *B. cereus* ATCC 14579, *E. faecalis* y *S. aureus* ATCC 25923. La proteína se midió por la absorción de luz ultravioleta a 280nm. El veneno (50,6mg), fue fraccionado en una columna de CM-Sephadex C-25 (1,1x17cm) con acetato de amonio 0,05M pH 7. Las proteínas retenidas fueron eluidas con el buffer conteniendo NaCl 0,25M y 0,6M. Se realizó PAGE-SDS, utilizando lisozima (14,3kDa) y aprotinina (6kDa) como proteínas estándares. La actividad antibacteriana se ensayó en microplacas, con 90µL de cultivo bacteriano en medio mínimo ($A_{600}=0,02$) y 10µL de la fracción respectiva. Luego de 24h a 37°C se determinó el crecimiento por la turbidez desarrollada. La actividad hemolítica se ensayó sobre eritrocitos humanos. El perfil cromatográfico mostró 7 picos proteicos. El pico II (7,5µg) inhibió el crecimiento de *S. aureus*; los picos III (7,6µg), IV (3,1µg), V (4µg) y VI (2,7µg) inhibieron a *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *B. cereus* y el pico VII (4,7µg) inhibió a *P. aeruginosa*. La PAGE-SDS de cada pico mostró una o dos bandas proteicas. Los péptidos antibacterianos son de naturaleza básica, con excepción del correspondiente al pico II. Se concluye que el veneno de *C. margaritatus* posee al menos 6 péptidos antibacterianos.

Palabras clave: veneno, escorpión, antibacteriano, *Centruroides margaritatus*.
 Fuente de financiamiento: Consejo Superior de Investigaciones - UNMSM.

ALGUNOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA L-AMINOÁCIDO OXIDASA DEL VENENO DE *Bothrops atrox* «JERGÓN»

Ruiz, N., Sandoval, G., Mendoza, J., Lazo, F., Rodríguez, E., Málaga, O. y Yarlequé, A.

Laboratorio de Biología Molecular- FCB, UNMSM.
norlsruiz@gmail.com

Establecer los principales parámetros cinéticos de la L-aminoácido oxidasa de *Bothrops atrox* con diferentes sustratos y valores de pH, fue el principal objetivo de este trabajo. Previamente la enzima fue purificada a partir del veneno crudo de *Bothrops atrox* mediante dos pasos cromatográficos en Sephadex G-75 y CM-Sephadex-C-50. La actividad enzimática fue ensayada sobre varios aminoácidos entre ellos: L-leucina, L-metionina y L-arginina según el método descrito en el Worthington Enzyme Manual (1993). Los parámetros cinéticos de Km y Kcat fueron estimados mediante regresión lineal de los datos cinéticos (V_0 , $V_0/[S_0]$) utilizando la representación de Eadie-Hosftee (Eadie, 1942 ; Hofstee, 1959). Los resultados obtenidos muestran que a pH 8,5 los valores de Km determinados para L-leucina, L-metionina y L-arginina fueron de 0,182, 0,282 y 1,311 mM. Asimismo, se obtuvieron valores de Kcat/Km de 118747,3; 30656,9; y 6020.6 respectivamente; determinándose que entre los L-aminoácidos ensayados, L-leucina es el mejor sustrato, concluyéndose que el análisis cinético sugiere la existencia de una región apolar en el sitio activo de la enzima, la cual facilitaría la unión a sustratos hidrofóbicos.

Palabras clave: L-aminoácido oxidasa, *Bothrops atrox*, Km, Kcat
 Fuente de financiamiento: PROCYT

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL SUERO ANTILACHÉSICO SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DEL VENENO DE *Lachesis muta* «SHUSHUPE»Vivas, D.¹, Inga, R.¹, Lazo, F.¹, Arbaiza, L.², Málaga, O.¹, y Yarlequé, A.¹¹Laboratorio de Biología Molecular- FCB, UNMSM.² Laboratorio de Biología Celular – FCB, UNMSM.

jhoram_vl@hotmail.com

Conocer la capacidad inhibitoria del suero antilachésico vigente y vencido sobre las actividades enzimáticas del veneno de *Lachesis muta* mediante análisis *in Vitro* fue el principal objetivo de este trabajo, para lo cual el veneno de la serpiente *Lachesis muta* fue obtenido de especímenes mantenidos en cautiverio en el serpentario «Oswaldo Meneses» de la UNMSM y los antivenenos procedieron del Instituto Nacional de Salud- Lima. Se evaluó la acción del antiveneno (½, 1 y 2 dosis neutralizantes) sobre las actividades hialuronidasa, coagulante sobre plasma, amidolítica, fosfolipasa A₂, caseinolítica y L-aminoácido oxidasa (LAO). Para los ensayos se incubó previamente el veneno con el antiveneno respectivo a 37°C x 30 min y luego de la reacción enzimática se calcularon los porcentajes de inhibición para cada actividad. Ambos tipos de antivenenos (1 y 2 dosis) neutralizaron al 100% las actividades LAO y coagulante y en un 90%, la actividad amidolítica. El antiveneno vencido (2 dosis) neutralizó en un 94% la actividad fosfolipasa mientras que con el vigente se obtuvo un valor de 26%. La actividad hialuronidasa fue neutralizada por el suero vencido en un 100% a las tres dosis usadas y en cuanto a la actividad caseinolítica dicho antiveneno a 2 dosis redujo la actividad a 50 %. Determinándose que el suero antilachésico vencido mantiene su eficacia de neutralización de las actividades enzimáticas de *Lachesis muta*.

Palabras clave: *Lachesis muta*, antilachésico, neutralización, enzimas.

Fuente de financiamiento: PROCYT N°