

Fajé 68



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**ACTIVIDADES COAGULANTES Y
ANTICOAGULANTES DE PROTEI-
NASAS EN EL VENENO DE *Heloderma
horridum horridum* (HELODER-
MATIDAE), MONSTRUO DE-
CUENTAS**

T E S I S

Que para obtener el Título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

Jaime Manuel González Cano



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	i
GLOSARIO	ii
ANTECEDENTES	iii
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	23
RESULTADOS	28
DISCUSION	47
CONCLUSIONES	53
LITERATURA CITADA	54

" ACTIVIDADES COAGULANTES Y ANTICOAGULANTES (FIBRINOLITICAS) DE PROTEINASAS EN EL VENENO DE Heloderma horridum horridum, Wiegmann, 1829 (Helodermatidae) MONSTRUO DE CUENTAS ".

RESUMEN:

Dos isoenzimas con actividad fibrinolítica indirecta fueron aisladas del veneno de Heloderma horridum horridum. Las isoenzimas, de peso molecular de aproximadamente 22,500 dal. convierten el plasminógeno en su forma activa - plasmina - por lo que se les ha denominado como activadores de plasminógeno. La presencia de los activadores de plasminógeno presentes en un veneno es demostrada por primera vez, al observar y comprobar la actividad fibrinolítica indirecta en geles de agarosa conteniendo fibrina con diferentes concentraciones de plasminógeno. La ausencia de halos de fibrinólisis en estos geles, en ausencia de plasminógeno, permitió identificar dichas isoenzimas.

Ensayos con inhibidores, permitieron identificar a los activadores como enzimas proteolíticas del grupo de las proteasas de serina.

La purificación de las isoenzimas fue llevada a cabo en una columna de Benzamidina-Sefarosa (Cromatografía por afinidad). Para lo cual se utilizó una fracción (F-I) proveniente de una columna de Fenil-Sefarosa, donde se hizo correr el veneno crudo de H. h. horridum.

Los resultados obtenidos demostraron que el veneno, además de la actividad fibrinolítica, posee actividad coagulante y la enzima responsable de esta actividad posee un peso aproximado de 65,000 dal., pero no fue identificada.

En virtud de los resultados obtenidos in vitro, se sugiere que el activador de plasminógeno realmente interviene en el proceso de fibrinólisis y que su presencia en un veneno forma parte del proceso que permite la difusión de otros componentes del veneno que actúan a nivel sistémico. Al parecer, el activador de plasminógeno es sintetizado por las células en la mayoría de los tejidos de vertebrados y parece ser un mecanismo general para la producción de proteólisis extracelular localizada en condiciones normales y patológicas.

G L O S A R I O

Para un mayor entendimiento, se presenta a continuación algunos de los términos más utilizados, su significado y localización:

ENZIMAS:

- Protrombina. Zimógeno de Trombina. (I.1.a.)
- Trombina. Enzima proteolítica activa, que actúa a nivel del fibrinógeno, convirtiéndolo en monómeros de fibrina. (I.1.a.)
- Activador de Plasminógeno. Enzima proteolítica que convierte a su zimógeno - (Plasminógeno), en su forma activa - Plasmina - (I.2)
- Plasmina. Forma activa del plasminógeno. (I.2)
- Urocinasa. Enzima proteolítica (Activador de plasminógeno), - que transforma al plasminógeno en su forma activa - Plasmina - (I.2)
- SUSTRATOS:**
- BAEE. α -N-Benzoil-L-Arginina etil éster. Sustrato sintético utilizado para medir actividad esterásica. (II.7)
- BTEE. α -N-Benzoil-L-Tirosina etil éster. Sustrato sintético utilizado para medir actividad de esterasa. (Antecedentes).
- BAPNA. α -N-Benzoil-L-Arginina P-nitroanilida. Sustrato - sintético para medir actividad proteolítica. (II.8)
- REACTIVOS:**
- ACOH Acido acético. Utilizado en la columna de Benzamida-Sefarosa. (Ver III.3).

ANTECEDENTES

Los venenos encontrados en ciertos organismos han sido objeto de estudio por muchos investigadores. Al principio eran tomados en cuenta solamente desde el punto de vista médico, pero paulatinamente su importancia ha ido cambiando debido a las características de sus componentes, ya que su constitución es relativamente simple comparada con otros compuestos de origen biológico, además de que constituyen una de las fuentes más ricas de enzimas con actividades específicas que actúan sobre sustancias, al intervenir en ciertas reacciones metabólicas y en tejidos que son clave dentro del organismo.

El ritmo con que aumentan dichos estudios es sorprendente y en nuestro país, existe una gran diversidad de reptiles que son fuente de estos venenos. Sin embargo la toxinología se ha dedicado más a la caracterización de las actividades específicas de los venenos de serpientes, dejando resagados los estudios que pudieran hacer se para la familia Helodermatidae.

"El Monstruo de Cuentas" (Heloderma horridum horridum, Wiegmann, 1829) pertenece al orden Squamata (al igual que las serpientes) y a la familia Helodermatidae. Actualmente se conocen solamente dos especies de Heloderma: Heloderma horridum que comprende a su vez tres subespecies, H. horridum horridum; H. horridum alvarezii y H. horridum exasperatum, las cuales son endémicas de las zonas áridas a lo largo del Pacífico mexicano, y comparten este habitat con la otra especie, Heloderma suspectum, constituida por dos subespecies H. suspectum suspectum y H. suspectum cinc-tum distribuidas en el estado de Arizona (E.U.A.) y en el desierto de Sonora, México. Se considera a los organismos que constituyen estas especies como organismos pancrónicos o relictos y se tienen registros fósiles relacionados con H. suspectum, identificados en los depósitos del Oligoceno en el condado de Logan, al noreste de Colorado y también del condado de Morrill en Nebraska, conocido como Heloderma matthewii (Russell y Bogert, 1981).

Los helodermas poseen dientes caniculados y un par de glándulas localizadas a cada lado de la mandíbula inferior, en contraste con las glándulas de las serpientes las cuales se localizan en la mandíbula superior. Estas estructuras son similares en todas las especies y subespecies de Heloderma, aunque el sistema en la conducción del veneno se considera más primitivo que el encontrado en las serpientes, el mismo

resulta ser muy efectivo y se ha observado que es utilizado por los helodermas como un mecanismo de defensa y no juega un papel importante en la obtención de alimento.

Trabajos llevados a cabo por Sumichrast mencionado por Loeb (1913) han reportado algunos efectos fisiológicos del veneno de estos reptiles. Otros (Tinkham, 1956; Bogert y Martín del Campo, 1956; Tu, 1977; Mebs y Raudonat, 1966; Tu y Murdock, 1967; Styblova y Kornalik, 1967) han publicado una caracterización bioquímica del veneno en general, de la especie H. suspectum. Mebs (1972) han reportado para la misma especie, el aislamiento de una enzima que dispara el sistema en la generación de cininas, así como también el de una BAEE-hidrolasa. Actividades de fosfolipasa A, hialuronidasa, BAEE y BTEE hidrolasa han sido reportadas del veneno de las subespecies H. h. horridum y H. h. alvarezi así como también la purificación de N-Benzoil-L-Arginina etil estre-hidrolasa (BAEE) para H. h. horridum (Alagón et al., 1982).

Durante los últimos años, los grupos de Alagón y Possani se han dedicado al estudio de las actividades específicas de las enzimas que forman parte del veneno de H. horridum horridum, algunas de las cuales ya han sido mencionadas.

Como parte de los resultados del presente trabajo, se reporta la metodología utilizada para la purificación a homogeneidad y con altos rendimientos de dos isoenzimas con pesos moleculares de 21,500 y 22,500 dal., con actividad de BAEE-hidrolasa, las cuales poseen actividad fibrinolítica al activar el plasminógeno.

Se sabe que muchos venenos poseen enzimas con actividades específicas que producen sus efectos en el sistema de coagulación sanguínea, acelerando o retardando el proceso. La presencia de estas enzimas determinan que los venenos sean caracterizados como procoagulantes o anticoagulantes (fibrinolíticos).

El veneno de H. h. horridum presenta ambas actividades, siendo identificadas dos enzimas responsables de la actividad fibrinolítica (anticoagulante), al activar al plasminógeno convirtiendo a esta proenzima en su forma activa (plasmina). Si bien en el presente trabajo se demuestra la existencia de activadores de plasminógeno en el veneno de H. h. horridum, son pocos los trabajos donde se considera la posible presencia de dichos activadores, entre los cuales se encuentran venenos del género Bothrops (Rosenfeld, 1964) y el veneno de Bitis nasicornis (MacKay et al., 1970). La forma como éstos actúan activando el plasminógeno, se verá más adelante.

Se sabe que el activador de plasminógeno es sintetizado por la mayoría de los tejidos en vertebrados y parece ser un mecanismo general para la producción de proteólisis extracelular localizada, en condiciones normales y patológicas (Reich, 1978) En condiciones normales dicho activador actúa en los procesos de remodelación del tejido y en la migración celular, tales como el desarrollo embrionario, ovulación, implantación de blastocistos e inflamación. En estos procesos la síntesis del activador de plasminógeno es transitoria y regulada. En condiciones patológicas, la síntesis de esta enzima por células neoplásicas, parece ser constitutivo y permanente. Todo esto permite suponer que la presencia del activador de plasminógeno en venenos forma parte del proceso que permite la difusión de otros componentes del veneno que actúan a nivel sistémico.

Debido a que el mecanismo de coagulación sanguínea es muy complicado, sería necesario entender el proceso para la formación de un coágulo, antes de considerar los efectos coagulantes y anticoagulantes (fibrinolíticos) de las enzimas del veneno de H. h. horridum. Por esta razón, se ha dedicado un capítulo donde se explica en forma resumida los mecanismos de coagulación y fibrinolisis normales. Además, se hace una revisión de los procesos normales y patológicos donde se ha visto que el activador de plasminógeno juega un papel importante. Posteriormente se presenta una revisión sobre los trabajos experimentales que se han hecho con venenos de serpientes en relación con su actividad procoagulante y/o anticoagulante (fibrinolítica), tomando especial atención en aquellos trabajos donde hubiera indicios relacionados con la presencia del activador de plasminógeno

I N T R O D U C C I O N

I.1 COAGULACION SANGUINEA.

La formación de un coágulo depende de una serie de transformaciones donde intervienen más de 14 proteínas diferentes, en lo que puede denominarse una activación en serie de zimógenos. En esta cascada enzimática, la forma activa de un factor cataliza la activación del siguiente. Y se sabe, que pequeñas cantidades de los factores iniciales son necesarios debido a la naturaleza amplificadora del proceso de activación.

La sangre presenta componentes que se disparan dando lugar a la formación de un coágulo en el momento de ser transferida a una superficie anormal, debido a esto, se considera que existe una vía de coagulación intrínseca. También, la coagulación se lleva a cabo al ser añadidos componentes no pertenecientes al plasma, a esta vía, se le conoce como extrínseca. La interacción de ambas vías converge en una en común, que resulta en la producción del coágulo de fibrina.

Los componentes en la coagulación sanguínea, a menudo son referidos por sus nombres comunes, pero es costumbre también utilizar una denominación numérica para las formas precursoras de estos factores. El número romano representa el orden en que su existencia fue reconocida, y todas aquellas enzimas activas son denotadas por un subscrito "a". Para ambas vías (intrínseca y extrínseca) los componentes proteínicos del sistema incluyen a zimógenos por una parte (Factores II, VII, IX, X, XI, XII y XIII); proteínas reguladoras relacionadas con la activación (Factores no proteolíticos, como: Factor V y VIII) y Factores no proteínicos, como: Tromboplastina o (Factor III). En general, las proteínas reguladoras de la activación requieren de la participación de fosfolípidos y de iones Ca^{++} (Ver Fig.1).

Los factores de coagulación, particularmente los zimógenos son ricos en carbohidratos, y éstos, parecen jugar un papel muy importante en su estabilidad en el plasma circulante.

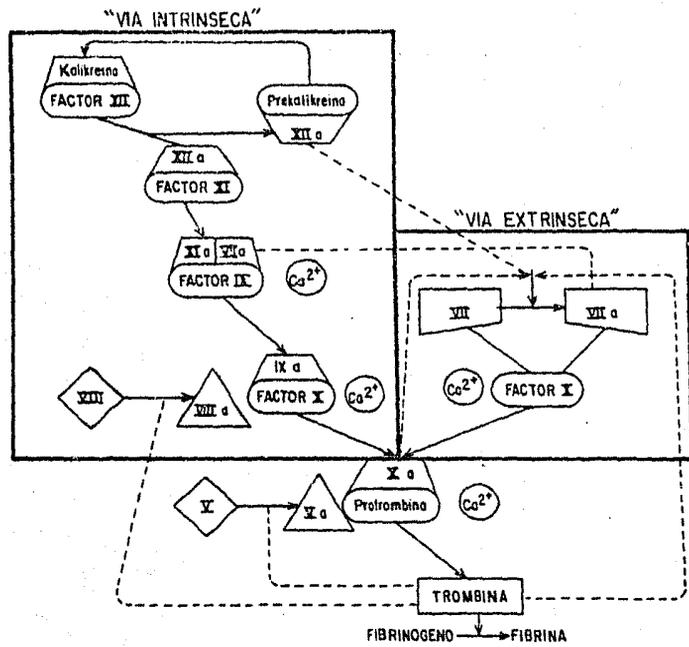


Fig.1. REPRESENTACION DEL SISTEMA DE CASCADA EN LA COAGULACION SANGUINEA. ETAPAS EN LAS CUALES UN PRECURSOR CONVIERTE A UNA PROTEINASA DE SU FORMA INACTIVA EN SU FORMA ACTIVA A TRAVES DE LAS VIAS EXTRINSECA E INTRINSECA. (TOMADO DE: Jackson y Hamerson, 1980)

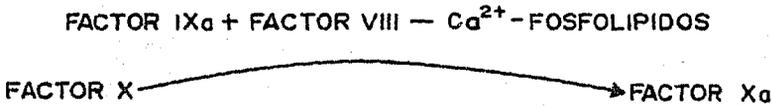
El Factor no-proteínico tisular (Tromboplastina III) inicia la vía extrínseca. Su actividad tromboplastínica es función del tipo de tejido y del organismo del cual proviene. Este Factor, en unión con el Factor VII y de iones Ca⁺⁺, inicia la coagulación activando al Factor X.

El Factor XII (Factor de Hagenan), es una proenzima que una vez activa, inicia el proceso de coagulación, de fibrinólisis y del sistema de generación de cininas, requiriendo de precalicreína y de cininógenos de alto peso molecular.

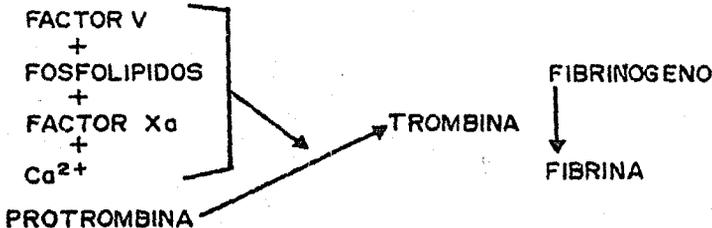
El Factor XI es una glucoproteína del plasma, que participa en las primeras etapas de la vía intrínseca. Su proceso de activación no se conoce, pero una vez activado y en presencia de iones calcio, actúa convirtiendo al Factor IX en su forma activa (IXa). El Factor IX es conocido comúnmente como el Factor de Christmas y

aquellas personas que carecen de éste, sufren de la enfermedad conocida como Hemofilia B.

La parte intermedia de la vía de coagulación intrínseca, se refiere a la interacción entre los Factores IXa, el Factor VIII (Factor antihemofílico), de calcio y fosfolípidos. Componentes cuya interacción conduce a la activación del Factor X (Factor de Stuart), a su forma activa, tal y como se demuestra a continuación:



El Factor X, es una glucoproteína que juega el papel central en la coagulación de la sangre. Está presente en forma de zimógeno en el plasma normal, pero se encuentra inactivo en pacientes que presentan la enfermedad de Stuart. Su importancia radica en ser el punto de unión de la vía extrínseca e intrínseca (Ver Fig. 1). Se sabe que el Factor Xa, activa al Factor VII en la vía extrínseca y modifica al Factor VIII aumentando el efecto del mismo en la vía intrínseca (Fig.1); pero lo más importante es que el mismo Factor Xa, en unión con el Factor V, de Ca^{++} y fosfolípidos, activa a la protrombina, como se ve a continuación:

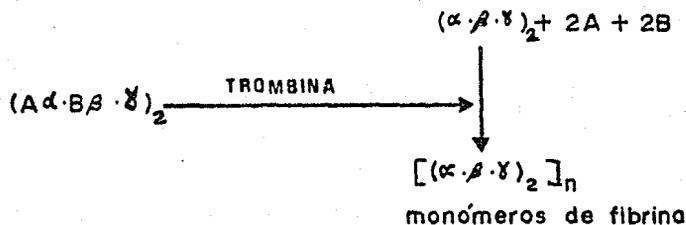


La coagulación sanguínea puede ser vista como un sistema cibernético, el cual ha sido dividido en tres eventos básicos:

- 1) Formación de Autotrombina C (Factor Xa).
- 2) Formación de Trombina.
- 3) Formación de Fibrina.

La parte más caracterizada en el proceso de coagulación, es la conversión de fibrinógeno en fibrina por acción de la enzima proteolítica trombina. El fibrinógeno

humano presenta una longitud de 460 Å y un peso molecular de 340,000 dal. Está constituido por 3 pares de cadenas polipeptídicas: $A\alpha$, $B\beta$ y γ (dos de cada una). El fibrinógeno es una macromolécula altamente soluble que por acción de la trombina se convierte en un monómero insoluble. Para ello, la trombina rompe cuatro enlaces peptídicos (arg-gli), dando lugar a la liberación de cuatro péptidos del fibrinógeno original. Estos péptidos corresponden a cada una de las cadenas α y β por lo tanto se liberan 2 péptidos "A" de 18 residuos de aminoácidos de cada una de las cadenas α , y dos péptidos "B" de 20 residuos de aminoácidos de cada una de las cadenas β . Sin embargo, se sabe que ningún péptido es removido de las cadenas γ (Blombäck y Yamashina, 1958). Los 4 péptidos liberados (2 A y 2B), se conocen como fibrinopéptidos y la molécula de fibrinógeno que carece de ellos, se le conoce como monómero de fibrina. El monómero de fibrina, está constituido por el 97% de los residuos de aminoácidos del fibrinógeno original y presenta una estructura $(\alpha\beta\gamma)_2$. El paso de fibrinógeno a fibrina por acción de trombina se observa esquemáticamente como sigue:

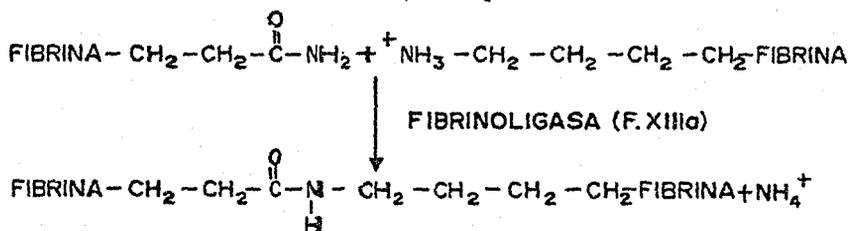


Los monómeros de fibrina así formados, presentan ahora, una menor solubilidad y tienden a asociarse para formar fibrina.

¿ Por qué estos monómeros tienden a agregarse, mientras que las moléculas de fibrinógeno permanecen en solución ?

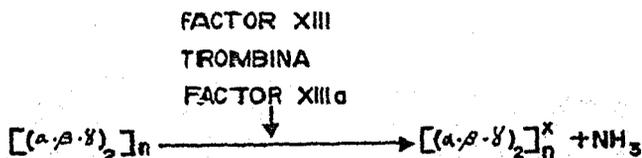
Al parecer los fibrinopéptidos de todas las especies de vertebrados estudiados hasta la fecha, poseen una carga neta negativa. Los residuos de aspartato y glutamato, se encuentran en abundancia y un derivado de tirosina cargado negativamente denominado tirosina-o-sulfato, es encontrado en el fibrinopéptido B. La presencia de éstos y otros grupos cargados en forma negativa, probablemente mantienen a las moléculas de fibrinógeno separadas. Al ser retirados los fibrinopéptidos, los monómeros de fibrina presentan un patrón superficial cargado diferentemente, dando lu-

gar a una agregación específica. El coágulo que se forma, al principio es frágil pero comienza a estabilizarse mediante la formación de enlaces covalentes entre monómeros adyacentes. Tales uniones se establecen gracias a la acción de una enzima denominada fibrinolisasa o Factor XIIIa, que a su vez se activa por la liberación de un péptido (catalizada por la trombina) a partir de un precursor existente en el plasma. La enzima una vez activa, une monómeros vecinos en el polímero de fibrina gracias a la formación de un enlace peptídico entre la glutamina y la lisina de cada uno de los monómeros, como puede observarse a continuación:



La tasa de formación de fibrina es dependiente de pH, de la fuerza iónica del medio, de la concentración de fibrinógeno, de trombina, iones de calcio, temperatura y otras variables (Seegers y Smith, 1942). Todos éstos, a excepción de trombina son mantenidos más o menos constantes en un ambiente fisiológico, siendo la concentración de trombina, el determinante en la tasa de formación de fibrina.

La fibrina formada artificialmente por coagulación de fibrinógeno puro con trombina pura, presenta características que lo distinguen de uno natural (Robbins, 1944). La propiedad más importante de los sistemas purificados (Fibrina-S) es su solubilidad en urea, e insoluble para fibrina de coágulos naturales (Fibrina-I). La conversión de Fibrina-S a Fibrina-I, se lleva a cabo, debido al enlace formado por el Factor XIIIa (Laki y Lorand, 1948). La cual funciona como resultado de la acción proteolítica de trombina a su forma activa: Transamidasa o Factor XIIIa, como se observa:



Debido a su especificidad por enlaces de arg-lis, la trombina sugiere un gran parecido con tripsina, enzima descubierta por Kühne (Leicester, 1975). Todo parece indicarlo, aún cuando se comparan sus secuencias de residuos de aminoácidos. La cadena B es muy similar en secuencia con tripsina, quimiotripsina y elastasa.

I.1.a. FORMACION DE TROMBINA.

La molécula de protrombina (Factor II), constituye la proenzima en mayor concentración en la sangre (0.07 - 0.1 mg/ml). Está constituida por una sola cadena polipeptídica (73,000 dal.) mientras que la trombina es una estructura de menor peso molecular y formada por dos cadenas unidas por un puente disulfuro.

Por muchos años se había pensado que en la formación de trombina, los fragmentos que resultan en la activación de protrombina a trombina eran degradados. Sin embargo, últimamente se ha encontrado las funciones de los restos de la protrombina, los cuales durante la conversión a trombina actúan como activadores (Esmon et al., 1974) o inhibidores (Seegers et al., 1974). Durante la activación existe una serie de eventos complejos que resultan en la pérdida del 42% de la proenzima en profragmentos.

El profragmento 1 es removido por trombina, dando lugar a la formación de pre-trombina 1 (Ver Fig.2) por lo tanto, el profragmento 1 actúa como un activador, - acelerando o retardando el proceso ya que funciona exactamente igual separado de la protrombina, que unido a ésta. Posteriormente interviene el Factor Xa (Autotrombina C) removiendo el profragmento 2 (Fig.2). En un momento dado las condiciones pueden ser establecidas de tal forma que la autotrombina C remueva el fragmento 1 y 2 directamente, dando lugar a la pre-trombina 2, y éste puede ser uno de los eventos principales en la formación natural de trombina. La pre-trombina 2 es una - cadena con una composición de residuos de aminoácidos y un peso molecular (38,000 dal.) igual a trombina, pero ésta se encuentra inactiva. Para su activación, el - Factor Xa rompe un enlace peptídico (tre-ile) entre los residuos 49 y 50 de pre-trombina 2. A pesar de esto, el residuo 49 permanece unido a la cadena más larga - por un puente disulfuro (Fig.2). Esta es la trombina clásica con actividad de esterasa y coagulante, la cual fue cristalizada por primera vez en el año de 1972 - (Tsernoglou et al., 1972).

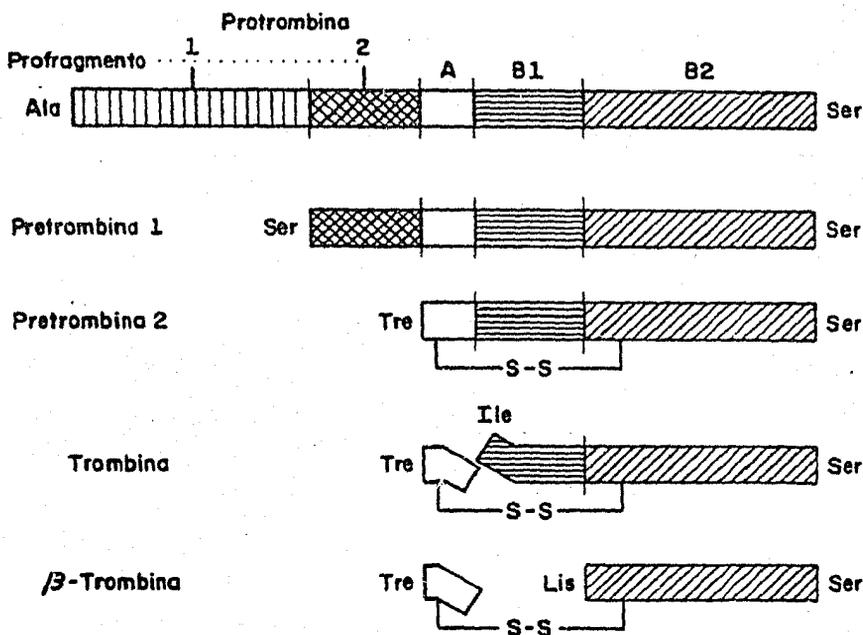


Fig. 2 . La molécula de protrombina se representa como una sola cadena polipeptídica, dividida en profragmento 1, profragmento 2 y los segmentos A, B1 y B2. Como se muestra, la longitud de cada uno de los segmentos es proporcional a su peso molecular. La protrombina tiene un peso molecular de $\sim 73,000$ dal. y la trombina de $\sim 38,000$ dal. El Factor Xa rompe los enlaces de tre-ile de pretrombina 2, produciendo la trombina clásica. Por autólisis, la trombina E (β trombina) se forma por la pérdida del fragmento B1 de la cadena y posee solamente actividad estérica. (Tomado de: Seegers y Andary, 1974).

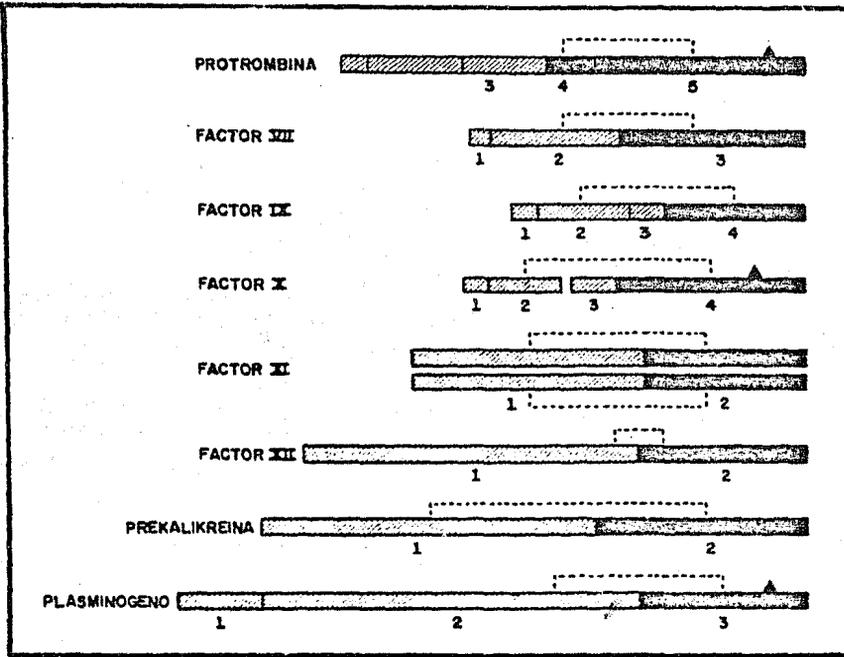


Fig. 3 . Esquema sobre las estructura de zimógenos de proteasas de la coagulación. Cada zimógeno puede ser dividido en una región carboxiterminal de ~ 250 residuos de aminoácidos, que contienen a los residuos del sitio activo (En negro); y una región amino-terminal (Zona cruzada), la cual varía de 150 a 582 -residuos de aminoácidos. La presencia de esta última, distingue a los zimógenos de la coagulación de aquellos del páncreas. En las 4 proteínas K-dependientes (Protrombina, VII, IX y X) la parte amino-terminal es homóloga. El Factor XI, parece ser excepcional entre los zimógenos ya que aparentemente se trata de un dímero con dos cadenas unidas por puentes disulfuro, cada una de las cuales se ajusta al modelo en forma independiente. Las líneas punteadas representan los enlaces disulfuro. Las flechas (▲) el sitio activo "serina". Los componentes individuales y la designación comúnmente utilizada por el comité en Trombosis y Hemostasis para describir varios de los componentes como lo indican los números bajo los diagramas: Protrombina: 1 y 2, protrombina fragmento 1; 3 fragmento 2; 4 cadena A de trombina; 5, la cadena B de trombina. Factor VII: 1 y 2, cadena ligera de VIIa; 3 la cadena pesada de VIIa. Factor IX: 1 y 2 cadena ligera y 4 cadena pesada de IXa; 3 péptido de activación. Factor X: 1 y 2, cadena ligera, 4 pesada y 3 péptido de activación. Factor XI: 1 las cadenas pesadas 2, las cadenas ligeras. Prekalikreina: 1, la pesada; 2, la ligera. Plasminógeno: 1 fragmento; 1.2 péptido de preactivación; 2 de la cadena pesada de plasmina; 3 la cadena ligera de plasmina. (Tomado de: Jackson y Nemerson, 1980).

Como el proceso de activación de protrombina a trombina es dependiente de la vitamina K, en su ausencia solo se producirán protrombinas incompletas. Por otra parte, la trombina sufre autólisis en un medio alcalino y este proceso está asociado con un rompimiento y pérdida de 73 residuos de aminoácidos correspondientes a la cadena B1 (Ver Fig.2), mientras que la cadena B2 permanece unida a la cadena A por el puente disulfuro. Después de la autólisis, la trombina no posee actividad coagulante pero la de esterasa se conserva. Cuando sólo se presenta esta actividad, se le conoce como trombina E o trombina.

Para la activación de protrombina, se ha visto que el calcio es esencial para mantener la integridad del complejo activo (Papahadjahopoulos y Hanahan, 1964). Además, se ha observado que el Factor V y fosfolípidos forman un complejo en ausencia de calcio, pero para que el Factor Xa pueda actuar, se requiere necesariamente de calcio. Cole (1965), demostró que el complejo formado por el Factor Xa y fosfolípidos puede ocurrir en ausencia del Factor V, pero no de calcio.

En la Fig.4, se observa que el fibrinógeno es un camino intermedio en la acción de dos enzimas con actividades contrarias. Hasta este momento, sólo se ha descrito el camino que conduce a la formación del coágulo por la unión de monómeros de fibrina, pero falta por describir la vía por la cual la plasmina actúa a nivel de fibrina y posee actividad fibrinolítica.

1.2 FIBRINOLISIS

Así como en el mecanismo de coagulación existen proenzimas en la vía extrínseca e intrínseca, en la vía fibrinolítica existe una proenzima (el plasminógeno), que resulta ser el precursor inactivo de la enzima proteolítica Plasmina. "Esta enzima es una proteasa con especificidad parecida a tripsina que ataca a la mayoría de las proteínas a excepción de la colágena" (Reich, 1978). El plasminógeno representa una actividad proteolítica en potencia, que puede ser utilizada por las células o por procesos extracelulares autoregulados para cualquier función que requiera de proteólisis extracelular localizada. El plasminógeno es una molécula constituida por una sola cadena, unida por enlaces disulfuro. La plasmina en cambio, una vez activa, presenta una doble cadena polipeptídica con un solo enlace disulfuro entre estas cadenas (Robbins et al., 1967; Sodetz et al., 1972). Además, la plasmina contiene una cadena pesada derivada de la parte amino-terminal del plasminógeno original, y una cadena ligera resultado de la parte carboxiterminal del mismo (Robbins et al., 1967). (Ver Fig. 5 .

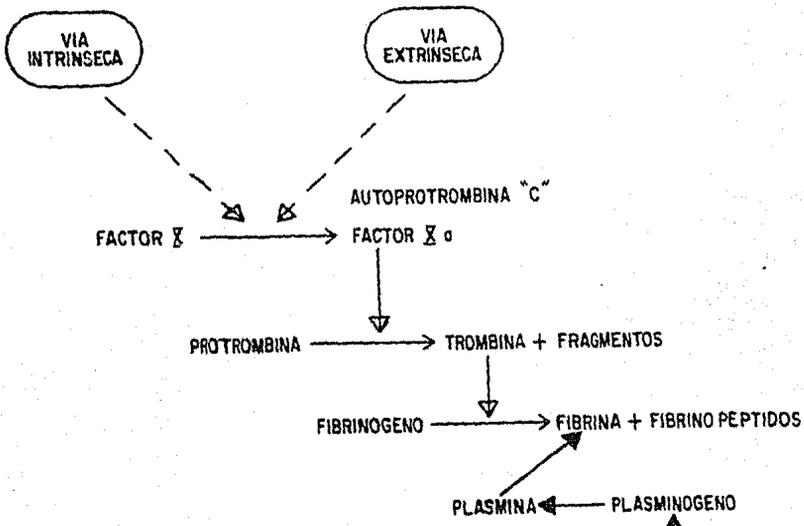


Fig.4. REPRESENTACION DE LAS VIAS EN EL SISTEMA DE COAGULACION (---) Y DEL SISTEMA FIBRINOLITICO (--->), COMO SE PUEDE VER, EL ACTIVADOR DE PLASMINOGENO CONVIERTE AL PLASMINOGENO EN SU FORMA ACTIVA - PLASMINA- RESPONSABLE DE LA ACTIVIDAD FIBRINOLITICA (Δ).

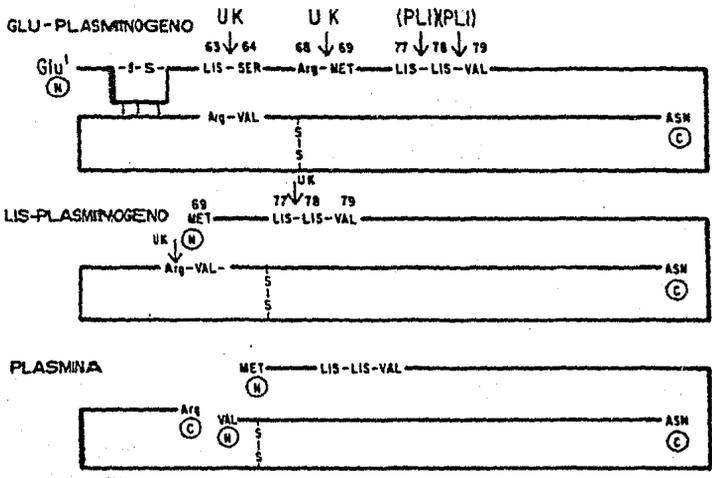


Fig.5. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL MODELO DE 2 PASOS EN LA ACTIVACION DE PLASMINOGENO POR UROKINASA. SE INDICAN LOS ENLACES SENSIBLES A UROKINASA (UK) Y PLASMINA (PLI). (N) Y (C) DESIGNAN LA PARTE AMINO Y CARBOXI-TERMINAL. LA INTERACCION NO-COVALENTE-SE INDICA POR LAS LINEAS PUNTEADAS. (Tomado de: Wallén y Wikman, 1970)

El plasminógeno es una cadena polipeptídica susceptible a una ligera proteólisis en ciertos enlaces. Debido a ésto, ha sido posible detectar 2 tipos de plasminógeno humano diferentes. Ambos difieren en estructura a nivel de la parte aminoterminal original. Uno posee "solamente ácido glutámico" (Bergstrom y Wallén, 1963; Wallén y Wiman, 1970) y la otra presenta "principalmente lisina" (Robbins et al., 1967), los cuales son conocidos respectivamente como plasminógeno "A" o glu-plasminógeno y "B" o lis-plasminógeno. Estudios recientes llevados a cabo para saber cómo la proteólisis de algunos enlaces conduce a la formación de plasmina sugiere que dicho proceso puede efectuarse en presencia de plasmina activa, urocinasa y estreptocinasa, siendo necesario que el glu-plasminógeno se convierta por proteólisis en lis-plasminógeno, para después ser convertido en plasmina. Se ha demostrado que en la conversión de un plasminógeno al otro (glu a lis plasminógeno), está asociado un incremento en el radio de Stokes (4.3 a 4.5 Å), corroborado con estudios donde la constante de sedimentación (S_{20}^0, W) decrece de 5.10 a 4.80 y el punto isoeléctrico difiere de 6.2 - 6.6 para el primero y 7.2 - 8.3 para el segundo (Summaria et al., 1972 y 1973).

El proceso para la formación de plasmina activa sugiere que se trata de una reacción en dos pasos, durante la cual se genera un plasminógeno intermedio (lis-plasminógeno). La secuencia met---lis-lis-val que se observa en la Fig. 5, es de interés ya que provee la conexión entre el glu y lis plasminógeno (Robbins et al., 1972; Walther et al., 1974), lo cual indica que por acción proteolítica de plasmina se obtiene lis-plasminógeno a partir del anterior.

Se sabe que por el rompimiento de los enlaces lis 63/ ser 64 y arg 68/ met 69, dos péptidos son liberados, dando por resultado el plasminógeno intermedio. Estos rompimientos pueden ser producidos por plasmina, pero al menos uno de ellos, arg 68 met 69 parece ser específico de urocinasa. Por lo tanto, la urocinasa libera un fragmento de 81 residuos de aminoácidos de la parte aminoterminal del glu-plasminógeno (Wallén y Wiman, 1970; Wiman, 1972 y 1973) dando lugar a la formación del plasminógeno intermedio. La formación de plasmina a partir de glu-plasminógeno es un proceso muy lento, mientras que la activación de lis-plasminógeno se lleva a cabo a una tasa mucho más rápida. Esto demuestra que el primer paso está limitado y debido a que el glu-plasminógeno es fácilmente degradado a lis-plasminógeno por la plasmina (Claeys et al., 1973), podría esperarse un incremento continuo en la ta sa de activación.

Se sugiere que a partir de lis-plasminógeno, la activación hacia plasmina consiste en el rompimiento de un solo enlace arg-val sin pérdida de material peptídico (Robbins et al., 1967). El rompimiento de este enlace, está asociado con los cambios conformacionales que dan lugar a la plasmina activa, aunque existe un desacuerdo en cuanto a la hidrólisis de este enlace y su importancia para la formación de la enzima activa (Robbins et al., 1972; Wallén y Wiman, 1973).

El peso molecular de ambos plasminógenos resulta ser muy similar (83,000 y - 82,000 dal. respectivamente), siendo el glu-plasminógeno mayor por 1000 dal. (Robbins et al., 1975); diferencia que puede ser explicada por la pérdida de material en su transformación a lis-plasminógeno.

El mecanismo para la activación de plasminógeno a plasmina, probablemente sea el mismo para todos los activadores presentes en mamíferos. En la orina, la urocinasa es capaz de transformar proteolíticamente el plasminógeno a su forma activa, la plasmina. Esta observación fue descrita por vez primera por Williams y posteriormente por Astrup, Stendorff y Sobel et al. (Williams, 1951; Astrup y Stendorff, 1952; Sobel et al., 1958), recibiendo el nombre de urocinasa por este último grupo. Esta enzima parece tener dos formas moleculares (White et al., 1966). Sin embargo, los estudios han demostrado un peso molecular de $34,500 \pm 2,000$ dal. Aunque la urocinasa tiene un gran parecido con tripsina y plasmina en su actividad con sustratos sintéticos, actúa solamente sobre plasminógeno.

I.3 FUNCIONES DEL ACTIVADOR DE PLASMINOGENO.

La activación de plasminógeno provee un mecanismo general, para la generación de proteólisis localizada en microambientes que rodean íntimamente a la célula en condiciones ya sean normales o patológicas.

El descubrimiento de que la célula puede producir actividad fibrinolítica fue llevada a cabo por Carrel y Burrows en 1911, observando que fragmentos de sarcoma disolvían coágulos del plasma, los cuales proveían el soporte semi-sólido para los cultivos en aquella época. Posteriormente Fischer (1925), correlacionó la lisis que se producía en coágulos con tejidos en estado neoplásico, pero no tuvo éxito ya que no pudo demostrar si se debía a una contribución enzimática o celular. Si bien, la lisis de los coágulos es un proceso enzimático, el trabajo de Fischer sugería la existencia de una diferencia enzimática entre tejidos normales y sus derivados malignos. Las implicaciones de los trabajos de Fischer son importantes porque condu-

cen a reexaminar dicho planteamiento.

I.3.a. TUMORES ASOCIADOS CON FIBRINOLISIS: ACTIVADOR DE PLASMINOGENO SECRETADO POR CELULAS TRANSFORMADAS POR VIRUS Y POR OTRAS CELULAS MALIGNAS.

Las observaciones de Fischer (1925) han podido ser confirmadas visual y cualitativamente. Cultivos celulares en geles de fibrina conteniendo fibroblastos transformados por el virus Sarcoma de Rous (VSR), producen una actividad fibrinolítica aproximadamente veinte veces mayor que aquellos conteniendo fibroblastos normales. La actividad fibrinolítica requiere de la interacción de dos factores: Uno pertenece al plasma en el medio de cultivo, y otro que debe ser secretado por las células. Ambos factores, pudieron ser aislados y caracterizados usando procedimientos para purificación de proteínas. De esta forma el factor del plasma fue identificado como plasminógeno (Quigley et al., 1974) y el factor celular resultó ser una proteasa con especificidad por arginina, que actúa convirtiendo el plasminógeno en plasmina (Unkeless et al., 1974).

Al parecer el activador de plasminógeno solo es acumulado en células transformadas por VSR, sugiriendo una asociación estrecha entre la transformación viral y la producción del activador, lo cual constituye un proceso único entre los cambios bioquímicos que acompañan las transformaciones oncogénicas (Unkeless et al., 1973; Rifkin et al., 1975; Dano y Reich, 1978).

Por otra parte se ha considerado que la especificidad catalítica del activador de plasminógeno producido en células transformadas por VSR, está determinado por la célula huésped y no por el virus (Ossowski et al., 1973).

La correlación entre el activador y las transformaciones malignas ha sido reforzada por los trabajos llevados a cabo con sustancias que promueven la formación de tumores. La acción de estos agentes promotores está definida por sus efectos en el establecimiento del desarrollo tumoral. Es decir, que durante la fase inicial, - la síntesis enzimática será dependiente del estímulo, mientras que todo el desarrollo del tumor es autónomo.

¿Cuál es el significado en la producción de dicha enzima para el fenotipo de las células malignas ?

Los tumores malignos, presentan características que están al parecer íntimamente relacionadas. Por una parte el aumento en la producción del activador de plasminógeno confiere a los tumores la capacidad de invasión local, de migrar y de implantarse en sitios distantes y la segunda característica, se debe a que permite la identificación de los tumores y su diagnóstico patológica, debido a la arquitectura que presenta el tejido anormal.

Ninguno de estos procesos está limitado a la formación de tumores, muchas células normales son invasoras durante el desarrollo embrionario y en la vida adulta. - Se ha seguido un gran número de eventos celulares que pueden ser vistos como modelos normales en el fenotipo maligno, en búsqueda de una unidad bioquímica para la correlación enzimática de la remodelación de tejidos y migración celular, y los resultados que se han obtenido apoyan la suposición de que dicha unidad en realidad existe.

I.3.b. PRODUCCION DEL ACTIVADOR DE PLASMINOGENO POR CELULAS INFLAMATORIAS.

Por su habilidad al cruzar barreras de tejido y de migrar a través del cuerpo - los macrófagos y granulocitos se asemejan a las células malignas. Para entrar al torrente circulatorio después de su maduración en el tejido hematopoyético, las células inflamatorias deben crear discontinuidades que les permiten surgir de este tejido al penetrar entre células endoteliales adyacentes.

El mismo proceso se repite cuando estas células escapan de la circulación al ser agrupadas en sitios de inflamación tisular. Por tanto, en el transcurso de sus ciclos de vida normal, "los macrófagos y granulocitos reproducen el comportamiento celular asociado con la diseminación de tumores metastásicos" (Reich, 1978). Además, estas células resultan ser atractivas como modelos experimentales, al definir correlaciones bioquímicas de migración, ya que los glucocorticoides y una variedad de agentes inflamatorios se sabe que modulan su migración tanto in vivo como in vitro. La producción del activador, por macrófagos de ratón y granulocitos humanos, está íntimamente relacionado con la respuesta de estas células con moduladores de la inflamación (Vassalli et al., 1978; Granelli-Piperno et al., 1978). Los macrófagos peritoneales obtenidos de ratones que habían sido inyectados con sustancias inflamatorias tales como: endotoxina, aceite mineral, etc.; producen grandes cantidades de activador de plasminógeno, mientras que aquellos animales no inyectados no lo producen (Unkeless, 1974). La producción del activador por macrófagos y granulocitos puede ser inducido in vitro por promotores tumorales, y pueden ser inhibidos por -

agentes antiinflamatorios tales como glucocorticoides y compuestos antimitóticos. El efecto inhibitorio es rápido, reversible y ocurre a concentraciones hormonales, comparables a aquellas presentes en los fluidos corporales, bajo condiciones fisiológicas. El efecto de los glucocorticoides refleja su potencialidad como antiinflamatorio in vivo y su acción en la producción del activador de plasminógeno es selectivo en vista de que es la única función afectada entre muchas de las que fueron probadas. La administración de estos glucocorticoides, produce rápidamente un decremento en la circulación de monocitos y previene la aparición de macrófagos y granulocitos en los exudados inflamatorios, pero no bloquean la multiplicación de precursores de leucocitos, sugiriendo que previenen la migración de células inflamatorias del tejido hematopoyético dentro de la circulación y de ahí a los sitios de inflamación.

Tomando en cuenta lo anterior, se ha sugerido que en la asociación con su migración en el cuerpo, las células requieren de un mecanismo enzimático que digiere algunas de las estructuras de los vasos sanguíneos y de tejido conectivo.

Se ha propuesto que la plasmina al actuar en la superficie de células endoteliales y tejido conectivo de pequeños vasos sanguíneos, constituye una parte esencial de las bases enzimáticas para la migración, y que esta enzima es generada localmente por síntesis celular y por la secreción del activador de plasminógeno. Se cree que al aplicar glucocorticoides se podría prevenir la migración de células inflamatorias y por tanto, suprimir el componente celular de inflamación. Si esto probara ser correcto, no implicaría que los efectos antiinflamatorios de los esteroides pudieran atribuirse únicamente a la represión en la síntesis del activador de plasminógeno.

I.3.c. PRODUCCION DEL ACTIVADOR DE PLASMINOGENO POR TROFOBlastOS.

Las primeras etapas en el desarrollo embrionario de los vertebrados ofrece numerosos ejemplos en la remodelación de tejidos y migración celular, permitiendo probar experimentalmente los procesos que están correlacionados con la producción celular del activador de plasminógeno.

Debido a que los trofoblastos son células que invaden la pared uterina durante la implantación del embrión (Kirby, 1965), un estudio llevado a cabo con embriones

de ratón durante las primeras etapas del desarrollo, dieron a conocer los siguientes resultados:

- a) La producción del activador de plasminógeno no pudo ser detectado antes de la diferenciación de la mórula en blastocisto.
- b) Todos los blastocistos producían activador, presente intracelularmente y en el medio condicionado por éste.
- c) La presencia de la enzima es función del día de gestación y no del tiempo en el cultivo.
- d) El curso seguido en la producción del activador en cultivos puros con células de trofoblastos, coincidían con la fase de invasión - en el útero.

Los resultados mostraron que el activador de plasminógeno era inducido por trofoblastos y que su producción estaba regulada.

Los trofoblastos son células con características invasoras, debido a que pueden invadir y destruir la mayoría de los tejidos, incluyendo aquellos encontrados normalmente en el útero. Algunas veces se les ha comparado con células tumorales, si bien, la invasión está limitada a un período en su ciclo de vida. Estos hallazgos, sugieren que la secreción del activador de plasminógeno contribuye en la implantación del blastocisto.

I.3.d. ACTIVADOR DE PLASMINOGENO EN OVARIO: RELACION CON LA OVULACION Y REGULACION HORMONAL.

El folículo ovárico maduro en mamíferos consiste de una cavidad llena de líquido, rodeada por células granulosas en las cuales el óvulo y estructuras asociadas se encuentran unidas. Las células granulosas están rodeadas por una membrana basal, la cual a su vez, se encuentra encapsulada por tejido conectivo denso y grueso conocida comúnmente como teca. El óvulo, para poder escapar de ésta, y entrar en el oviducto en donde es fertilizado, requiere de una degradación de la pared folicular. Los eventos que ocurren durante la ovulación son uno de los ejemplos más notables de la remodelación de tejido en mamíferos adultos. Se sabe que los cambios morfológicos que siguen a la inyección de tripsina en forma intrafolicular, se parecen a aquellos que ocurren durante la ovulación (Espey, 1974). Sin embargo, no se sabía

la relación exacta que había entre la actividad proteolítica y la ovulación. La ubiquidad de plasminógeno, del activador de plasminógeno y la presencia de plasminógeno en el fluido folicular, sugiere un papel de estas enzimas en la ovulación. Un sistema experimental adecuado para probar lo anterior, ha sido desarrollado por Crisp y Denys (1975).

Las células granulosas, aisladas de folículos antes de 8 horas o más antes del tiempo esperado para la ovulación, producían casi nada de activador de plasminógeno. En el intervalo de 8 horas que precede a la ovulación, el número de dichas células que producían grandes concentraciones del activador de plasminógeno y la tasa en la formación de la enzima aumentaba. Además, se observó que aquellas células preparadas para la ovulación producían dicho activador, pero podían ser inducidas a sintetizar y secretar grandes cantidades de esta enzima al ser expuestas a concentraciones picomolares de hormonas gonadotrópicas y algunas prostaglandinas. También se observó, en cultivos de células granulosas de ovarios sexualmente maduros; que en el ciclo normal, las ratas producen cantidades significativas del activador de plasminógeno solamente cuando son colectadas de los folículos en la noche de proestro, es decir, inmediatamente antes del tiempo esperado para la ovulación, pero aquellas que se encontraban en estro o diestro, producían cantidades ínfimas o no se producía el activador de plasminógeno. Quedando así demostrada una correlación entre el activador de plasminógeno de las células granulosas y la ovulación.

I.4 VENENOS EN REPTILES.

La mayoría de los venenos están constituidos en un 90 a 95% por proteínas, las cuales son responsables de las actividades biológicas. Las fracciones proteínicas que se obtienen de los venenos, contienen toxinas, enzimas y también proteínas no tóxicas. La mayoría de las enzimas son hidrolíticas (Tu, 1977), y se piensa que su acción en los tejidos de la presa, constituye una exodigestión y en algunos casos se considera que estas enzimas juegan un papel importante como mecanismos de defensa. Resulta difícil definir exactamente el papel de cada una de las enzimas en los venenos, por lo que se hace necesario su identificación y purificación, con el objeto de conocer su contribución al efecto total del veneno.

Algunos venenos tienen efectos característicos en el sistema de coagulación sanguínea, ya que poseen enzimas coagulantes y anticoagulantes (fibrinolíticas) -

que aceleran o retardan este proceso. Su efecto dependerá de la concentración de las mismas y de las cantidades que puedan ser introducidas en la víctima.

El efecto que tiene un veneno en el mecanismo de coagulación es extremadamente complicado y por ello se ha hecho una distinción de los distintos mecanismos que inducen a la coagulación o anticoagulación (fibrinolisis) de la sangre.

Un veneno puede actuar como coagulante por las siguientes razones:

- 1) Porque posee alguna enzima con actividad de Trombina.
- 2) Porque contiene un activador del Factor X.
- 3) Porque puede activar al Factor V.
- 4) Porque puede activar a protrombina.
- 5) Porque posee una actividad de Tromboplastina (Factor tisular no-proteínico. Tromboplastina o Factor III).

Igualmente el veneno puede actuar como anticoagulante por las razones siguientes:

- 1) Conteniendo alguna enzima con actividad fibrinogenolítica.
- 2) Porque tiene actividad fibrinolítica.
- 3) Porque puede activar plasminógeno dando como resultado plasmina.
- 4) Porque tenga acción inhibitoria o destructiva hacia alguno de los factores de coagulación sanguínea, que preceden a la formación de trombina, - por ejemplo: venenos que puedan inhibir a los Factores II, III y V, o a la trombina misma.
- 5) Porque tienen acción de antitrombina.

Para un mejor entendimiento de las causas por las cuales los venenos actúan en forma coagulante y anticoagulante, se hará alusión de algunos ejemplos demostrativos de las actividades que presentan ciertas enzimas en algunos venenos. Además, - cabe mencionar que los trabajos reportados para los venenos de Bitis nasicornis - (MacKay et al., 1970) y del género Bothrops (Rosenfeld, 1964) mencionan en forma in directa la posible presencia del activador de plasminógeno, el cual aunque ha sido considerado como una de las causas para que un veneno pueda actuar en forma anticoagulante (fibrinolítica), su presencia no había sido demostrada.

En 1938, Haunt trabajando con Naja tripudians, observó que el veneno era capaz de inactivar a la trombina in vitro, suponiendo que esto sucedía por acción antitrombínica del veneno. Existen muy pocos reportes sobre la presencia de esta actividad - por lo que actualmente no se tiene claro si los venenos realmente poseen este principio.

Aunque se considera que el veneno de las cobras es primordialmente neurotóxico, se ha observado una acción anticoagulante en los venenos de Naja melanoleuca, N. nigricollis y Ophiophagus hannah debido a su efecto en la vía extrínseca y por la inhibición del mecanismo de tromboplastina de la sangre (MacKay et al., 1968 y 1969). En Bothrops jararaca, el veneno es coagulante y dos mecanismos diferentes intervienen para ello. Un factor activa al Factor X y el otro posee actividad de trombina (Denson y Rousseau, 1970). El veneno de Agkistrodon acutus, posee actividad coagulante y anticoagulante (Ouyang, 1957). La acción coagulante se debe a la actividad de trombina mientras que la actividad anticoagulante resulta de la inactivación de protrombina, tromboplastina y actividad fibrinolítica. Cuando las fracciones coagulante y anticoagulante fueron separadas (Cheng y Ouyang, 1967), tres principios anticoagulantes fueron encontrados: dos asociados con actividad caseinolítica, pero ninguna de las tres fracciones poseía actividad de esterasa. Ouyang y Teng (1973), separaron una de las enzimas responsables de la actividad anticoagulante del mismo veneno (Agkistrodon acutus) y observaron que poseía un peso molecular de ~20,650 dal. un punto isoeléctrico de 4.7, lo cual indicaba que se trataba de una glucoproteína termolábil (Tu, 1977), la cual una vez purificada no presentaba actividad caseinolítica, actividad de Tosil-J-arginina etil ester esterasa (BTEE), ni tampoco actividad fibrinolítica directa. El mecanismo anticoagulante de ésta, se debe a la interacción con protrombina, pero no a la destrucción de protrombina o de los factores de la activación de protrombina (Ouyang y Teng, 1973). Esta enzima no digiere fibrinógeno ni fibrina y tampoco inactiva trombina.

El veneno de Bitis nasicornis, posee actividad anticoagulante (MacKay et al., 1970), debido al efecto en el mecanismo de tromboplastina en las vías extrínseca e intrínseca de la sangre. Se observó que posee actividad proteolítica y caseinolítica y que es capaz de activar al plasminógeno, aumentando la acción de plasmina. El veneno de Bitis arietans es anticoagulante (Brink y Steytler, 1974) y su acción es de tipo fibrinolítica y también fibrinogenolítica. Rosenfeld (1964) consideraba que el efecto fibrinolítico en venenos del género Bothrops, se debía a la activación de plasminógeno en lugar de la acción directa en fibrina (en el caso de que hubiera sido plasmina).

Los venenos de Agkistrodon piscivorus y A. contortrix no poseen efecto en la activación de plasminógeno. Por lo tanto, su actividad fibrinolítica se debe a la acción de proteasas presentes en el veneno, y se cree que su acción se deba a que digieren el fibrinógeno y que en lugar de tener actividad fibrinolítica sea ésta fibrinogenolítica.

Por lo que se puede observar, la actividad anticoagulante podría ser explicada por la presencia de diferentes compuestos presentes en los distintos venenos, - pero más específicamente la actividad fibrinolítica directa, sí podía ser explicada por la acción de plasmina, pero la actividad fibrinolítica indirecta se suponía que podía deberse a la presencia de alguna enzima (proteasa) que activara al plasminógeno convirtiéndolo en su forma activa (plasmina), pero dicha suposición, por lo visto anteriormente no había sido demostrada.

I.5 VENENO DE HELODERMA.

Santesson (1897) fue uno de los primeros que se dedicaron al estudio de la naturaleza química del veneno de Heloderma, demostrando que aunque el veneno fuera hervido no disminuía su toxicidad, hecho que fue posteriormente corroborado por Cooke y Loeb (1913) y Alsberg (1913).

Zarafonitis y Kallas (1962) reportaron actividades de L-amino oxidasa y serotonina en extractos del veneno de Heloderma horridum: Mebs y Raudonat (1967) observaron que el veneno de Heloderma contenía actividades de fosfolipasa A, proteasas, hialuronidasa y la posibilidad de que el veneno posea una sustancia que dispare el sistema de generación de cininas. Tu y Murdock (1967) confirmaron algunos de los hallazgos de trabajos anteriores, observando que a través de una columna de Sephadex G-75 podían ser separados dos picos donde la fracción proteolítica correspondía al componente letal. Casi al mismo tiempo Styblova y Kornalik (1967), demostraron que el veneno no poseía actividad de "coagulasa" y que sus actividades enzimáticas eran bajas al comparar éste con el veneno de ciertos víperidos y crotálicos, pero su actividad de hialuronidasa era superior al de Crotalus durissus terrificus.

Mebs (1970) reportó el aislamiento de una enzima que dispara el sistema en la generación de cininas, así como también de BAEE-hidrolasa para H. suspectum. Las actividades de fosfolipasa A, hialuronidasa, BAEE y BTEE-hidrolasa han sido reportadas del veneno de H. horridum horridum (Alagón et al., 1982).

Existe cierta similitud entre los resultados encontrados por Mebs (1972), Tu y Murdock (1967), Styblova y Kornalik (1967), para H. s. suspectum y los encontrados para H. h. horridum (Alagón et al., 1982) ya que ambas especies poseen el mismo tipo de actividades.

Para otras especies, entre ellas de avispas y serpientes (Tu, 1977), existen

variaciones en la proporción de algunos componentes del veneno de acuerdo a la estación del año. El patrón de H. h. horridum, estudiado electroforéticamente en geles de poliacrilamida, muestran al menos 18 bandas proteínicas con un patrón constante para el mismo individuo durante los doce meses de un año (Alagón et al., 1982) aunque entre los organismos pueden presentarse ligeras variaciones.

Los resultados obtenidos por el grupo de Alagón (1982), utilizando una columna de Sefadex G-75, demostraron la presencia de dos picos con actividad de BAEE-hidrolasa (Fig.6). Siendo, que el menor de ellos estaba dado por la presencia de una enzima de peso molecular de $\sim 65,000$ dal. la cual fue aislada a homogeneidad y con altos rendimientos (Alagón et al., 1982), actualmente se sabe que es una calicreína (Alagón, comunicación personal), pero falta por describir (determinar) si la fracción correspondiente al pico de mayor actividad de BAEE-hidrolasa está dada por una de las dos o ambas enzimas de peso molecular de $\sim 22,500$ dal. presentes en dicha fracción y si esta actividad está dada por la presencia de alguna esterasa o de alguna enzima proteolítica parecida a tripsina.

El objetivo del presente trabajo, consiste en determinar las actividades coagulantes y anticoagulantes (fibrinolíticas), del veneno de Heloderma horridum horridum y aislar una de las enzimas de peso molecular de $\sim 22,500$ dal. para saber si posee actividad de esterasa únicamente o si se trata de alguna enzima proteolítica que intervenga de alguna forma en el mecanismo de coagulación y fibrinólisis de la sangre.

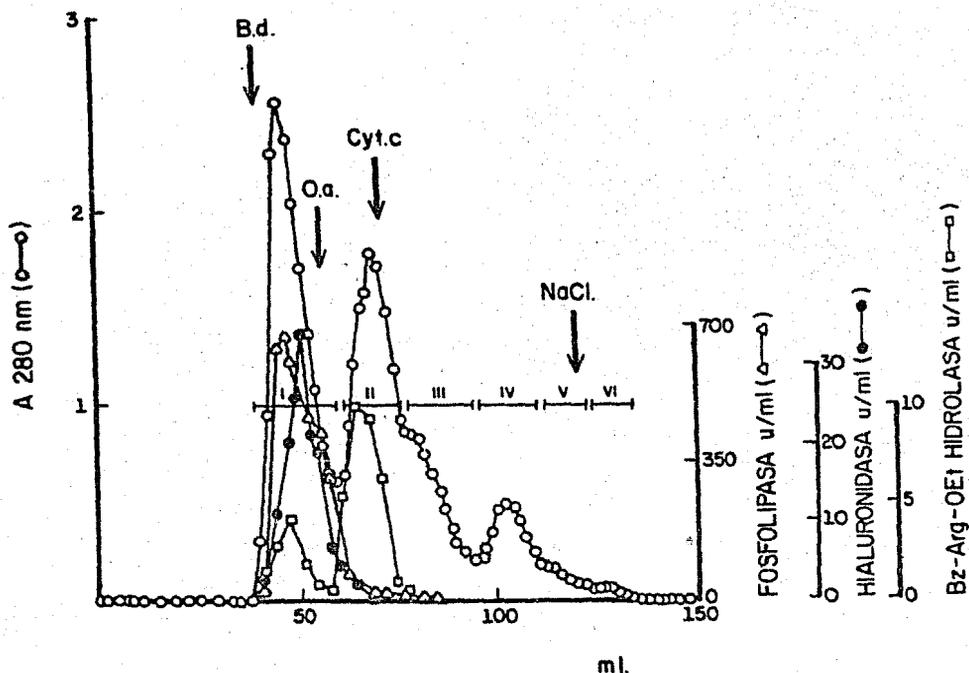


Fig. 6 . Separación del veneno de *H. h. horridum* en una columna de Sefadex G-75. El sobrenadante (S) del veneno soluble (65 mg) después de una precipitación con ácido, fue aplicada a una columna de Sefadex G-75 (0.9 x 200 cm) y corrido con amortiguador de fosfato de potasio 25 mM (pH=7.6). Los tubos conteniendo 1.9 ml fueron colectados y agrupados como fracciones I - VI (barras horizontales). Las fracciones I, II y III contienen respectivamente 92.1, 7.5 y 0.4% de la actividad total de fosfolipasa. Las fracciones I y II contienen respectivamente el 95.2 y 4.8% de la actividad total de hialuronidasa. Las fracciones I, II y III poseen 27.2, 71.0 y 1.8% de la actividad total de BAEE-hidrolasa. (Tomado de: Alagón et al., 1982).

MATERIAL Y METODOS

II.1 Fuente del veneno

El veneno de H. h. horridum se obtuvo a partir de ejemplares adultos (mantenidos en cautiverio), colectados en la estación de Biología Experimental de Chabela, Jal. El veneno fue pipeteado directamente de la boca de los saurios, por la técnica descrita por Loeb (1913). El veneno recién extraído fue centrifugado a 10,000 - rpm por 15 minutos en una centrifuga Sorvall (rotor SS-34 r_{max} = 10.8 cm). El sobrenadante (veneno soluble), fue liofilizado y guardado a -20 °C hasta el momento de ser utilizado.

II.2 Materiales

El Sefadex G-25 y la Fenil-Sefarosa CL-4B fueron obtenidos de Pharmacia, la - Lisina-Sefarosa 4B de Sigma y la Aminocaproil-p-amino Benzamidina-Sefarosa 4B de - Pierce. El fibrinógeno bovino, la trombina (humana), el α -N-benzoil-L-arginina etil éster (BAEE), el azure acoplado a piel pulverizada ("Hide powder azure") y el α -N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) fueron de Sigma. Los inhibidores: p-amino benzamidina (P-AB), Diisopropil fluorofosfato (DIFP), y Cisteina fueron de Sigma. El inhibidor de tripsina de soya (SBTI) de Millipore. Los demás solventes y reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Los detalles experimentales para la obtención de plasminógeno humano y de fibrinógeno bovino libre de plasminógeno se dan en forma pomenorizada en las secciones II.3 y II.4.

II.3 Procedimiento para aislar Fibrinógeno libre de Plasminógeno

El fibrinógeno bovino fue precipitado con sulfato de amonio (100% de saturación) (Laki, 1951), y vuelto a precipitar dos veces con etanol en presencia de lisina, para remover el plasminógeno contaminante (Mosesson, 1962); para esto, se procedió de la siguiente manera: 2 g de fibrinógeno comercial (coagulable en 88%) (Fibrinógeno 0) fueron disueltos en 100 ml de amortiguador de fosfato de sodio 0.1 Molar (pH=6.4) y el volumen fue llevado al doble con agua; la solución se dejó reposar a 4 °C durante una noche. El precipitado que se formó, fue removido por fil-

tración y al filtrado (Fibrinógeno I) se le añadió 1/3 de volumen de una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

El fibrinógeno precipitado fue recuperado por centrifugación, resuspendiendo en 60 ml de NaCl 0.3 M, y dializado contra la misma solución (3 cambios de 1 hora cada uno) (Fibrinógeno II). Al fibrinógeno II dializado se le añadieron 300 ml de una solución de L-lisina 0.12 M en amortiguador de fosfatos 5 mM (pH= 7.0) y se dejó enfriar en hielo por 30 minutos, al cabo de los cuales se añadieron lentamente y bajo agitación constante 27 ml de etanol absoluto frío; después de 10 minutos el fibrinógeno precipitado fue recuperado por centrifugación y resuspendido en 40 ml de NaCl 0.3 M (Fibrinógeno III), repitiéndose la precipitación etanólica en presencia de lisina. El fibrinógeno de esta última precipitación fue resuspendido en 40 ml de PBS (NaCl 0.15 M + amortiguador de fosfatos 15 mM pH=7.2), y dializado exhaustivamente contra PBS (Fibrinógeno IV libre de plasminógeno contaminante). La concentración final del fibrinógeno IV fue de 5.7 mg/ml (E $\frac{1 \text{ mg/ml}}{280} = 1.59$).

El fibrinógeno II fue utilizado en algunos experimentos para lo cual se dializó contra PBS y su concentración se ajustó a 5.7 mg/ml. Los rendimientos a partir de 2 g de fibrinógeno 0, fueron de 439 y 249 mg para los fibrinógenos II y IV respectivamente.

II.4 Procedimiento para purificar Plasminógeno de plasma humano

Se utilizó cromatografía por afinidad de acuerdo al método de Deutsch y Mertz (1970), procediéndose de la siguiente manera: se obtuvo sangre venosa de 4 voluntarios (210 ml) con EDTA como anticoagulante y fue centrifugada para obtener el plasma (105.6 ml). El plasminógeno fue purificado a través de una columna (2.1 x 5.4 - cm) de Lisina-Sefarosa 4B (5.5 μ moles de lisina/ml).

Se hicieron cuatro corrimientos cromatográficos aplicando a la columna 25 ml de plasma diluidos con un volumen igual de amortiguador 0.1 M de fosfato de sodio (pH= 7.4). Los contaminantes fueron lavados con 0.3 M del mismo amortiguador hasta obtener una lectura $A_{280}=0.01$. Para eluir al plasminógeno se pasaron 30 ml de ácido ϵ -aminocaproico 0.2 M en el mismo amortiguador. El plasminógeno fue separado del ácido ϵ -aminocaproico a través de una columna de Sefadex G-25 (2.5 x 54 cm), para lo cual se pasaron alícuotas de 30 ml de plasminógeno ($A_{280}= 0.512$) y se eluyó con amortiguador de fosfato de sodio 5 mM (pH= 7.2). El rendimiento final fue de aproximadamente 12 mg.

II.5 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

La electroforesis se llevó a cabo en geles (7.5%) en placa de poliacrilamida (0.1 x 10 x 10 cm) en amortiguador de Tris (Jovin et al., 1964), o en geles (12.5%) en presencia de lauril sulfato de sodio (Laemmli, 1970). Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie R-250 de acuerdo a Swank y Munkres (1971). Para detectar las actividades coagulantes y fibrinolíticas de las proteínas separadas por electroforesis, los geles sin teñir fueron colocados sobre la superficie de geles de agarosa conteniendo fibrinógeno o fibrina, respectivamente.

II.6 Geles de agarosa con fibrinógeno o fibrina utilizados para detectar actividades coagulantes y fibrinolíticas

Se siguió el procedimiento de Granelli-Piperno y Reich (1978) con algunas modificaciones. Los geles con fibrinógeno fueron preparados usando las siguientes soluciones: (a) 1% de agarosa en amortiguador de Tris/HCl 0.025 M (pH= 7.2); la agarosa fue disuelta en un baño María y mantenida posteriormente a 42 °C; (b) fibrinógeno (5.7 mg/ml) en PBS calentado a 42 °C. Se mezclaron rápidamente 3 ml de cada una de las soluciones y la mezcla fue vaciada sobre una tira de acetato de celulosa (7 x 11 cm) y distribuida homogéneamente evitando la formación de burbujas. Después de la gelificación, la tira fue colocada dentro de una caja de Petri conteniendo papel absorbente humedecido con el fin de evitar su desecación.

Para preparar geles con fibrina se procedió de igual manera que para los anteriores, pero a la mezcla de soluciones se le añadió 0.5 unidades NIH de trombina humana (sigma), en 50 μ l de NaCl 0.5 M y amortiguador de citrato de sodio 0.05 M (pH= 7.2). Con esta actividad enzimática, el fibrinógeno fue convertido en fibrina en aproximadamente 5 minutos. En algunos casos los geles de fibrina fueron suplementados con plasminógeno purificado (10 μ g/ml de mezcla).

Los geles indicadores fueron empleados de dos maneras para detectar las actividades coagulantes y fibrinolíticas.

La primera fue en combinación con los geles de poliacrilamida (superpuestos - el uno al otro), y la segunda, siguiendo la difusión radial de la actividad, cuando las muestras por probarse se aplicaron en pocillos (3 mm de diámetro) hechos en el gel de agarosa. La actividad coagulante fue seguida por la formación de fibrina

insoluble en los geles de agarosa con fibrinógeno; la fibrinolítica por la lisis - producida en los geles de agarosa con fibrina. Para visualizar con mayor nitidez - los efectos anteriores, después de dejar incubando los geles a temperatura ambiente por el tiempo necesario (generalmente 24 horas), los geles de agarosa fueron lavados con NaCl 0.15 M y teñidos durante 5 minutos con negro de anido 0.1% en metanol 70% y ácido acético 10% y destañados en metanol 70% y ácido acético 10%.

II.7 Medición de la actividad proteolítica con (BAEE)

Esta actividad fue medida espectrofotométricamente con un espectrofotómetro - Gilford 250 acoplado a un registrador automático. Los ensayos se llevaron a cabo - a 25 °C añadiendo la enzima en solución a una celda de cuarzo conteniendo 2 ml de α -N-benzoil-L-arginina etil éster (BAEE) 1 mM en amortiguador de Tris/HCl 0.1 M - (pH= 7.95) y midiendo el cambio en absorbancia a 255 nm por 5 minutos. Una unidad - de actividad enzimática se define como la cantidad de proteína que se requiere para hidrolizar 1 μ mol de sustrato en 1 minuto en las condiciones definidas arriba.

II.8 Medición de la actividad proteolítica con BAPNA

A 1 ml de una solución de BAPNA 1 mM en amortiguador de fosfatos (pH=7.0), se le añadió 100 μ l de la enzima a probar; se dejó incubar 15 min. a temperatura ambiente y la reacción fue inhibida por la acidificación del medio de reacción a través de la adición de 200 μ l de ácido acético glacial. El sustrato hidrolizado se midió espectrofotométricamente a una absorbancia de 410 nm. La actividad del veneno fue - comparada contra un estándar de tripsina. Una unidad de actividad enzimática es definida como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar la misma cantidad de - BAPNA que 1 μ g de tripsina en las condiciones mencionadas.

II.9 Medición de la actividad de proteinasa con azure acoplado a piel pulverizada (Rinderknecht et al., 1968)

En este caso se utilizó un sustrato colorido insoluble de la siguiente manera: a tubos de ensayo (0.9 x 7.5 cm) se les añadió la enzima y el sustrato (10 mg) en 1.5 ml de Tris/HCl 0.1 M (pH= 7.95) junto con una perla de vidrio de 3 mm de diámetro para mejorar el mezclado. Los tubos fueron rotados con una inclinación de 45° - por el tiempo requerido (~19 h.) y el colorante solubilizado fue seguido a 595 nm.

Para la cuantificación de la actividad se construyó una curva estándar correlacionando la A_{595} nm de cantidades conocidas de sustrato digeridas por tripsina. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 mg de sustrato en 20 h. bajo las condiciones descritas.

RESULTADOS

III.1 PROPIEDADES GENERALES DEL VENENO SOLUBLE.

El veneno de *H. h. horridum* contiene un gran número de proteínas. El patrón - electroforético del veneno (Fig.7) en geles de poliacrilamida en amortiguador de tris (Jovin et al., 1964) y en presencia de lauril sulfato de sodio (Laemmli, 1970) (Ver II.5), manifiesta que el veneno contiene por lo menos 18 componentes.

Además de las actividades enzimáticas ya reportadas (Alagón et al., 1982), - se cuantificaron otro tipo de actividades utilizando BAPNA y azure acoplado a piel pulverizada como sustratos (Tabla 1). La actividad sobre BAEE, fue medida de nuevo la diferencia encontrada con el valor previamente reportado puede ser debida a que se trata de lotes de veneno distintos.

Cabe aquí mencionar que la BAEE hidrolasa purificada anteriormente (Alagón et al., 1982) es una enzima proteolítica con actividad de calicreína (Alagón, comunicación personal). Se sabía ya de la presencia de otra(s) BAEE hidrolasa(s) de menor peso molecular (alrededor de 25,000 dal.) En este trabajo se muestra que son 2 las BAEE hidrolasas de bajo peso molecular y que poseen la capacidad de producir fibrinólisis indirecta a través de la activación de plasminógeno.

TABLA 1. Actividades Enzimáticas Presentes en el Veneno de *Heloderma horridum horridum*.

Tipo de actividad	Unidades/mg	Referencia
Fosfolipasa	68.0	Alagón et al., 1982
Hialuronidasa	6.6	Alagón et al., 1982
BAEE-hidrolasa	2.7	Alagón et al., 1982
	7.6	Este trabajo
BTEE- hidrolasa	0.1	Alagón et al., 1982
BAPNA- hidrolasa	2.3	Este trabajo
Proteinasa (a)	3.1	Este trabajo

(a) Medida con "azure acoplado a piel pulverizada"

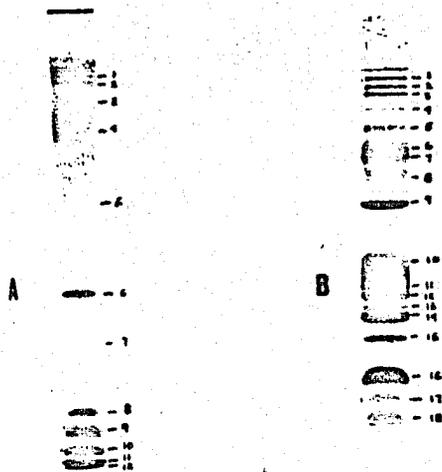


Fig. 7. Electroforesis del veneno de Heloderma horridum horridum en geles (7.5%) en placa de poliacrilamida (0.1 x 10 x 10) en amortiguador de Tris pH 8.3, de acuerdo al método de Jovin et al (1964) (muestra A), y en geles (12.5%) en presencia de lauril sulfato de sodio, (Laemmli, 1970)(muestra B). Ambos geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie R-250. Las muestras A y B contienen 25 y 78 μ g respectivamente. 12 bandas fueron detectadas en A y 18 en B.

III.2 PROPIEDADES COAGULANTES Y ANTICOAGULANTES (FIBRINOLÍTICAS) DEL VENENO SOLUBLE.

Se emplearon dos tipos de geles en dos maneras distintas (Ver II.6). Por una parte se siguió la actividad por difusión radial y por otra se sobrepusieron geles de poliacrilamida a geles que contenían fibrinógeno o fibrina. Se consideró que - aquellas muestras que tuvieran enzimas con actividad coagulante darían lugar a la formación de halos de microcoágulos de fibrina en aquellos geles conteniendo fibrinógeno. En el caso contrario, los halos transparentes que se forman por degradación en geles conteniendo fibrina, indicarían la presencia de enzimas con actividad fibrinolítica. Esta última, a su vez, puede deberse a la acción directa de enzimas - con actividad de plasmina o en forma indirecta por enzimas capaces de activar plasminógeno presente en el medio. Bajo estas consideraciones, se supuso que lo mismo sucedería por sobreposición de geles de poliacrilamida a geles de agarosa conteniendo fibrinógeno o fibrina. El área teñida - por coagulación - o transparente - por fibrinolisis - permitiría identificar las bandas con actividad.

Por las técnicas anteriores, se observó que el veneno de H. h. horridum presenta actividad coagulante y anticoagulante (fibrinolítica). Como resultado de la aplicación de alícuotas de veneno soluble aplicadas a pozos de geles conteniendo - fibrinógeno 0, se pudo observar la formación de un halo de fibrina, el cual pasado un lapso de tiempo (~ 4 h.), fue degradándose paulatinamente dando por resultado la formación de un halo interno por actividad fibrinolítica (Fig.8.1). La presencia de este último halo, debida a la actividad anticoagulante (fibrinolítica) de - alguna enzima presente en el veneno, fue comprobada en geles de agarosa conteniendo fibrina 0 (Fig.8.2)

Hasta este momento, no se sabía si la actividad anticoagulante se debía a la acción directa de alguna enzima con actividad de plasmina o en forma indirecta, al activar el plasminógeno contaminante presente en ambos geles.

Para ver si la actividad fibrinolítica era directa o indirecta, se llevaron a cabo los mismos ensayos, pero esta vez se hicieron con la inclusión de fibrinógeno y fibrina con menor concentración de plasminógeno contaminante. Debido a esto fueron utilizados fibrinógeno II y IV, y fibrina II y IV.



Fig. 8. (1) Halos de actividad coagulante y fibrinolítica resultado de la aplicación de alícuotas de veneno soluble a pozos de gels conteniendo fibrinógeno "0". (2) Halo fibrinolítico debido a la presencia de alguna enzima presente en el veneno de H. n. horridum al ser aplicado a pozos de gels con fibrina "0". En ambos casos los gels fueron teñidos con negro de amido 0.1%.

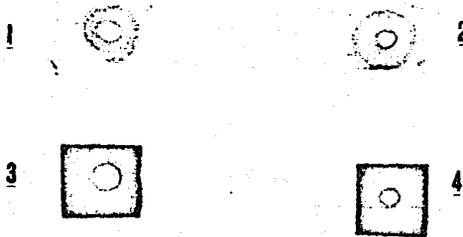


Fig. 9. Observación de la actividad coagulante y fibrinolítica indirecta en gels conteniendo fibrinógeno o fibrina II y IV. En fibrinógeno - II (1) y IV (2), se observa que el halo de actividad coagulante no cambió en su diámetro, en cambio en gels de fibrina II (3) se observa que el halo fibrinolítico se redujo, desapareciendo en aquellos conteniendo fibrina IV (4). La presencia y la ausencia del halo fibrinolítico, se explica por la presencia y la ausencia de plasminógeno contaminante en cada uno de los medios.

En fibrinógeno II y IV se observó que el halo de actividad coagulante no cambió en su diámetro (Fig. 9. 1 y 2). En cambio se observó que el halo fibrinolítico se redujo en geles de fibrina II y desapareció en aquellos geles conteniendo fibrina IV (Fig. 9. 3 y 4).

Estos resultados fueron corroborados al ser añadido plasminógeno puro (Ver. - II.3) en geles de fibrina II y IV. Los halos fibrinolíticos que no se presentaban en geles de fibrina IV, se presentaron por reconstitución de plasminógeno en el medio (Fig.11.2.) y lo mismo sucedió con geles de fibrina II, en los cuales la presencia de una mayor concentración de plasminógeno permitió observar un incremento en el diámetro del halo fibrinolítico (Fig.11.1). Los resultados con distintos tipos de fibrina con o sin plasminógeno exógeno se representan en la Fig.12.

Para la identificación de las bandas con actividad coagulante o fibrinolítica del veneno, se sobrepusieron geles de tris conteniendo veneno soluble sobre geles de fibrinógeno 0, o fibrina 0. Como puede observarse en la Fig.10. los dos tipos de actividades pudieron distinguirse ya que su movilidad electroforética fue muy diferente: la actividad coagulante migró mucho menos que la fibrinolítica. Con incubaciones a tiempos largos (~ 18 h), y con las cantidades de veneno utilizadas, tanto la zona de formación de fibrina como la de degradación de la misma, fueron muy extensas; con tiempos más cortos (2 h) y menor cantidad de plasminógeno en el sistema (fibrina II) se pudo observar que la actividad fibrinolítica podía ser asignada a dos componentes con movilidades electroforéticas muy parecidas, fenómeno que no ocurrió en la formación de fibrina (Fig.13).

En la misma forma, se sobrepusieron geles en presencia de lauril sulfato de sodio (Laemmli, 1970), que contenían veneno soluble, a geles de agarosa con fibrinógeno o fibrina. Algunos de estos geles antes de ser sobrepuestos, fueron lavados durante 10 minutos en presencia de Tris/HCl 0.1 M (pH= 7.95), y a otros se les hizo el mismo tratamiento, pero añadiendo tritón al 0.5%. En los tres casos los resultados fueron negativos, al no producirse áreas de microcoágulos de fibrina ni tampoco áreas de fibrinolisis.

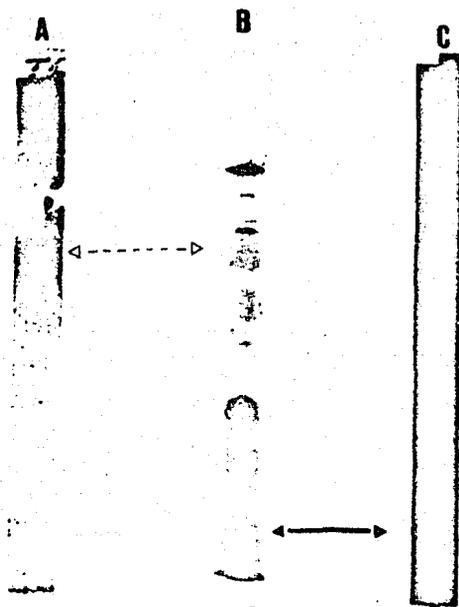


Fig. 10. Identificación de las bandas con actividad coagulante y fibrinolítica del veneno de *H. h. horridum*, por sobreposición de geles de tris a geles de agarosa conteniendo fibrinógeno o fibrina "0" (A y C respectivamente). La formación de un coágulo de fibrina en A, muestra que la actividad coagulante dada por una sola banda - al comparar con B - migró menos que el área de fibrinólisis en C. En todos los casos se aplicaron 143 μ g de veneno y se incubó durante 18 h.



Fig. 11. Comprobación de la actividad fibrinolítica indirecta del veneno de H. h. horridum, por reconstitución de plasminógeno en el medio. - (1) Por reconstitución de plasminógeno en geles de fibrina II, se obtiene un halo de diámetro mayor al obtenido en la Fig. 9.3. (2) Por reconstitución se presentau un halo de fibrinolisis en geles conteniendo - fibrina IV, que en su ausencia no se presentaba (Ver Fig. 9.4.).

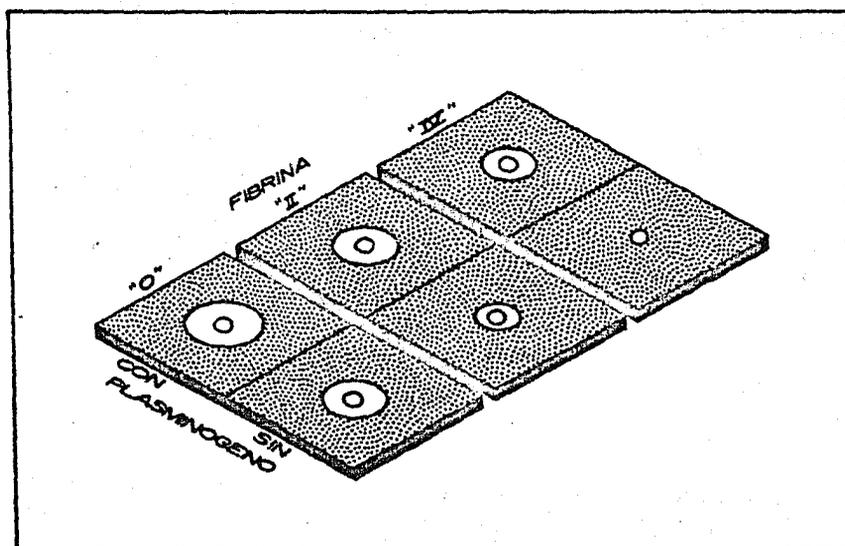


Fig. 12. TAMAÑO DEL HALO FIBRINOLITICO OBTENIDO POR INTERACCION DE LOS 3 TIPOS DE FIBRINA EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE PLASMINOGENO, OBSERSE LA AUSENCIA DE HALO EN LA INTERACCION - FIBRINA IV Y LA AUSENCIA DE PLASMINOGENO).

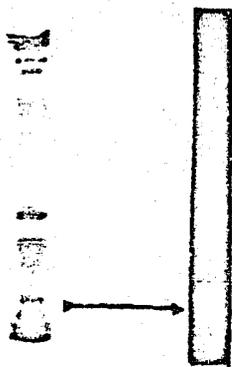


Fig.13. Identificación de dos bandas responsables de la actividad fibrinolítica indirecta presentes en el veneno de H. h. horridum. El gel en placa de poliacrilamida con amortiguador de tris (Jovin et al., 1964) conteniendo el veneno soluble (143 μ g) fue superpuesto a un gel de agarosa conteniendo fibrina II (menor cantidad de plasminógeno en el sistema). La presencia de dos áreas fibrinolíticas en forma horizontal, fueron comparadas con el gel teñido con azul de Coomassie R-250, encontrando dos componentes con -movilidades electroforéticas muy parecidas responsables de la fibrinolisis.

III.3 FRACCIONAMIENTO DEL VENENO SOLUBLE.

El veneno de H. h. horridum se hizo pasar a través de una columna de Fenil-Sefarosa con el objeto de purificar una enzima con actividad de fosfolipasa (Motivo de otro trabajo del laboratorio). Para ello, el veneno crudo fue disuelto en amortiguador de NaPO_4 10 mM pH=6.8 y el sobrenadante se aplicó a la columna, eluyendo con el mismo amortiguador y finalmente se hizo correr un gradiente de 200 ml de NaPO_4 10 mM pH=6.8 vs 200 ml de NaPO_4 10 mM pH= 6.8 + Etilenglicol 60%.

La fracción F-I que se obtuvo a partir de la columna de Fenil-Sefarosa (Fig. 14), además de que poseía todos los componentes presentes en el veneno soluble a excepción de la fosfolipasa, poseía toda la actividad proteolítica medida con BAEE (como sustrato). Además, se pudo comprobar que la misma fracción contenía a las enzimas responsables de las actividades procoagulante y fibrinolítica.

Por lo novedoso y por ser la primera vez que se demostraba la presencia de activador(es) de plasminógeno en el veneno soluble, nuestro interés se enfocó hacia su purificación. Se pensó, que el activador de plasminógeno además de ser una enzima con actividad de esterasa, podría tener actividad como tripsina, razón por la cual se utilizó una columna de Benzamídina-Sefarosa (inhibidor de enzimas con actividad de tripsina).

La fracción F-I fue aplicada a la columna de Benzamídina-Sefarosa a la que posteriormente se hizo correr un gradiente de fosfatos (100 ml de NaPO_4 0.02 M vs 100 ml de NaPO_4 0.02 M + NaCl 0.8 M pH= 7.2), seguido de una solución de ácido acético (ACOH) 75 ml 0.1 M, neutralizada con 500 μl de Tris/HCl 1.0 M (pH= 7.95) por cada tubo. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de actividad de BAEE hidrolasa a lo largo de las fracciones I.3, I.4 e I.5 (Fig.15). En la fracción denominada I.6, se observó un pico de actividad de BAEE hidrolasa correlacionado con el pico de absorbancia obtenido como resultado de la aplicación de la solución de ácido acético (ACOH) 0.1 M. Posteriormente se pudo determinar que la actividad de BAEE hidrolasa en las fracciones I.3, I.4 e I.5 correspondía a la enzima con peso molecular de 65,000 dal. purificada por el grupo de Alagón (1982). Y por otra parte se observó que el pico de actividad de BAEE hidrolasa era resultado de dos enzimas con peso molecular de 21,500 y 22,500 dal. respectivamente.

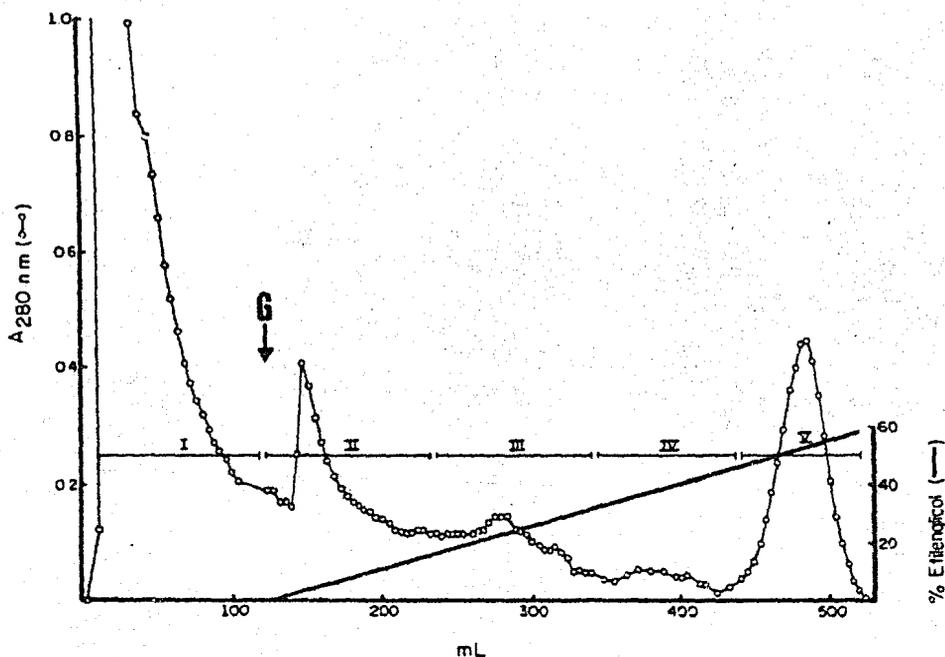


Fig. 14 . Cromatografía por afinidad del veneno soluble de *H. h. horridum*, en una columna de Fenil-Sefarosa. Obteniendo 5 fracciones, de las cuales la F-I fue utilizada para fines del presente trabajo. El sobrenadante del veneno total (10 ml), fue aplicado a la columna, eluyendo con ≈ 120 ml de NaPO_4 10 mM pH=6.8 y finalmente se corrió un gradiente (G) (200 ml de NaPO_4 10 mM pH=6.8 vs 200 ml de NaPO_4 10 mM pH=6.8 + Etilenglicol 60%). La fracción F-V contiene a la Fosfolipasa (Motivo de otro trabajo).

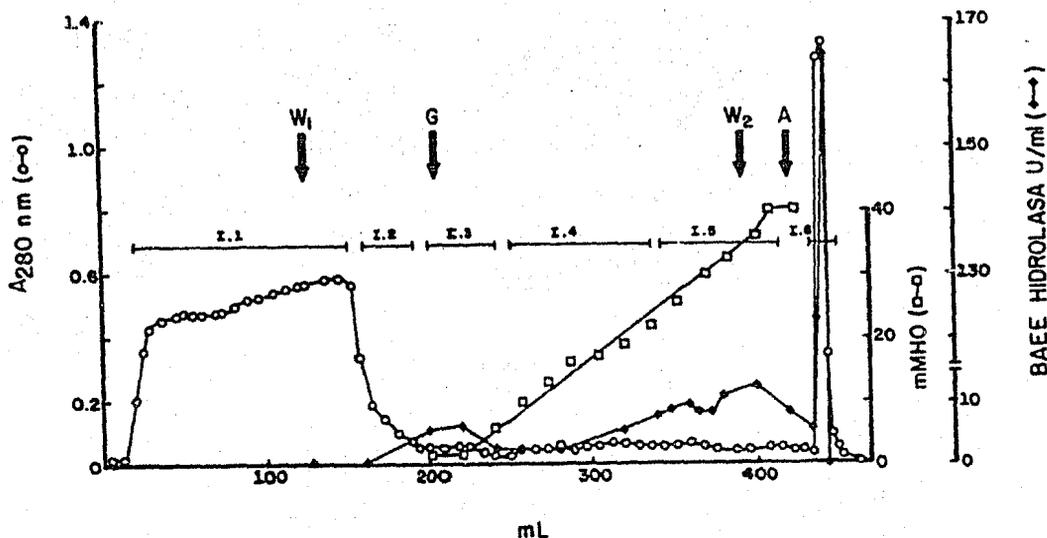


Fig. 15 . Cromatografía por afinidad de la fracción F-I en una columna de Benzamidina-Sefarosa. Obteniendo una fracción (I.6), la cual contiene a dos isoenzimas (activadores de plasminógeno). La fracción F-I, fue aplicada a la columna eluyéndose con ~ 100 ml de NaPO_4 0.02 M (pH=7.2) (W_1), posteriormente se hizo correr un gradiente de fosfatos (100 ml de NaPO_4 0.02 M vs 100 ml de NaPO_4 0.02M + NaCl 0.8M pH=7.2) (G); seguido de una elución con el mismo amortiguador (20 ml de NaPO_4 0.02M + NaCl 0.8M pH=7.2) (W_2); por último, se aplicó una solución de 75 ml de ACOH 0.1 M (A) neutralizada con 500 μl de 1.0 M de Tris/HCl (pH=7.95) por cada tubo, y que corresponde a las enzimas de $\sim 22,500$ dal. (activadores de plasminógeno). Se observa la presencia de actividad de BAEE hidrolasa a lo largo de las fracciones I.3, I.4 y I.5. En la fracción I.6 se observa un pico de actividad de BAEE-hidrolasa correlacionado con el pico de absorbancia a A_{280} nm.

Para la determinación de los pesos moleculares, se hizo un corrimiento de la fracción I.6 en geles de lauril sulfato de sodio (Laemmli, 1970), comparando con tres estándares de peso molecular conocido (BSA, Ovoalbúmina y Ribonucleasa), - (Fig.16.). La presencia de dos bandas conspicuas permitió determinar su peso molecular. Por otra parte, el corrimiento de la misma fracción (I.6) en geles de Tris (Jovin et al., 1964) mostraron la presencia de dos bandas que pudieron ser correlacionadas con aquellas cuyo peso molecular había sido determinado.

Las bandas de la fracción I.6 presentaron un punto isoeléctrico muy parecido (4.6), razón por la cual se dificultaba su separación. A pesar de esto, se hicieron varias corridas intentando separarlas. Para ello, una vez aplicado el gradiente de fosfatos, se intentó su separación por medio de dos pasos (ácido acético - ACOH a 0.02 M y 0.05 M) respectivamente. También, aplicando un gradiente de NaPO_4 20 mM (pH=7.2) vs ACOH 80 mM, y por último aplicando un gradiente de ACOH 5 mM vs ACOH 50 mM. En los tres casos se neutralizó con 500 μl de Tris/HCl 1.0 M pH=7.95; los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, razón por la cual se decidió - trabajar con ambas enzimas.

La fracción I.6 se probó en geles conteniendo fibrina 0 y IV, los resultados obtenidos indicaron la capacidad de una o ambas enzimas de producir fibrinolisis indirecta a través de la activación de plasminógeno en geles de fibrina 0 (Ver - Fig.17). Recuerde que al igual que con veneno soluble, la presencia de plasminógeno en el medio era determinante para que la actividad fibrinolítica se llevara a cabo.

Posteriormente, se comprobó por sobreposición de geles de tris conteniendo a la fracción I.6, que ambas enzimas son activadores de plasminógeno (Fig.18). Y debido a su semejanza en cuanto a peso molecular, punto isoeléctrico y por ser ambas enzimas activadores de plasminógeno, se les ha considerado como isoenzimas.

Para corroborar la presencia de activadores de plasminógeno en el veneno de H. h. horridum y en la fracción I.6 se incluyeron muestras conteniendo urocinasa y calicreína en un gel de agarosa con fibrina "0". Los halos obtenidos en los pozos 2 y 12 (Fig.17), son el resultado de la activación de plasminógeno por urocinasa en el medio, en cambio se puede observar que calicreína, aunque posee actividad de BAEE-hidrolasa, no presenta actividad fibrinolítica. Los halos 5, 7, 10, - 11 y 15 corresponden al veneno soluble y los halos 3, 8 y 13 son el resultado de las isoenzimas presentes en la fracción I.6.

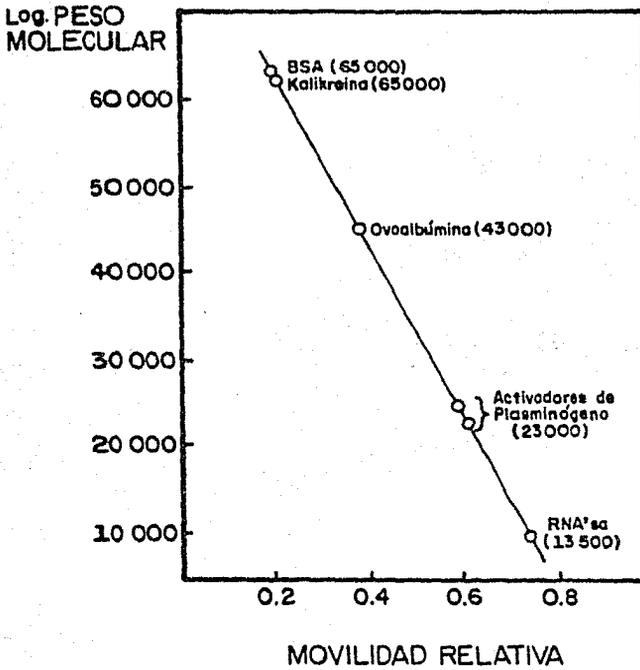


Fig. 16. Determinación del peso molecular de los Activadores de Plasminógeno, comparándolos con estándares de peso molecular conocido (BSA, albúmina de suero bovino 65,000 dal.; Ribonucleasa, RNA'sa 13,500 dal. y Ovoalbúmina 43,000 dal.). Fueron corridos en geles de poliacrilamida en (12.5%) de lauril sulfato de sodio (Laemmli, 1970) y tenidos con azul brillante de Coomassie R-250.

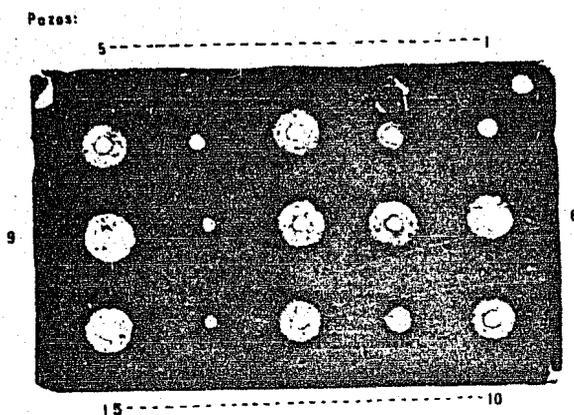


Fig. 17. Comprobación de la presencia de activadores de plasminógeno en el veneno de H. h. horridum, al comparar con halos fibrinolíticos producidos por urokinasa en el mismo gel (fibrina "6"). Se indican los pozos a los que corresponden cada una de las muestras: 5,7,10,11 y 15 corresponden a los halos fibrinolíticos producidos por el veno no soluble; 2,3 y 13 son halos producto de las isoenzimas presentes en la fracción I. ó (Ver. III.3); 2 y 12 por la presencia de urokinasa; - 4,9 y 14 que corresponden a kalikreína no presentan actividad fibrinolítica. Período de incubación 18 h.



Fig.18. Comprobación de dos isoenzimas (Activadores de plasminógeno) presentes en el veneno de H. h. horridum. El gel en placa de poliacrilamida en amortiguador de tris (Jovin et al. , 1964) conteniendo a la fracción I.6 en todos los carriles, fue sobrepuesto a un gel de agarosa con fibrina "0". Las isoenzimas fueron separadas y sobrepuestas en el gel, quedando así demostrada su actividad fibrinolítica indirecta. El gel sobrepuesto fue teñido con negro de amido 0.1%.

La ausencia de halos fibrinolíticos en la muestra aplicada de la fracción I.6 en presencia de inhibidores tales como: Diisopropil fluorofosfato (DIFP), inhibidor de tripsina de soya (SBTI) y p-aminobenzamida (P-AB) (Ver Fig.19), confirman la suposición de que los activadores de plasminógeno son enzimas proteolíticas del grupo de las proteasas de serina y de ahí que se explique además su actividad de BAEE hidrolasa. Además, se pudo comprobar espectrofotométricamente, que el Diisopropil - fluorofosfato inhibía por completo a los activadores de plasminógeno, para ello fueron empleados 50 μ l de DIFP 5 mM y 50 μ l de la fracción I.6. Por otra parte, la falta de inhibición con ácido Iodo acético (IAA) y con Cisteína, demostraron que no se trataban de proteasas de cisteína, y lo mismo sucedió con Etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) y 1-10 Ortofenantrolina (1-10 FT), en el caso de que se hubiera tratado de Metalo-proteinasas.

Por último, se presenta a continuación un resumen en el procedimiento que se siguió en la purificación de las dos isoenzimas -activadores de plasminógeno- (Ver Fig.20), así como también una tabla (Tabla 2), donde se muestran en forma resumida las recuperaciones de actividad enzimática obtenida a través de los distintos pasos cromatográficos.

TABLA 2. RESUMEN DE LAS RECUPERACIONES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA A TRAVÉS DE LOS DISTINTOS PASOS CROMATOGRAFICOS DEL VENENO DE (*Heloderma horridum horridum* L.

Fracción	Origen de la fracción	Proteína (mg) ^a	Actividad Total (Unidades) ^b	Actividad Específica (U/mg)	Rendimiento	Veces de purificación
Veneno Crudo	Veneno Liofilizado	100.0	760.0	7.6	100.0	1
F-I	Fenil-Sacarosa	65.0	786.5	12.1	103.5	1.6
I.6	Benzamida-Sacarosa	5.4	626.4	116.0	82.4	15.3

^a Asumiendo que 1 unidad de absorbancia a 280 nm es igual a 1mg/ml.

^b Actividad medida con BAEE como sustrato; la definición de unidad aparece bajo Material y Métodos.

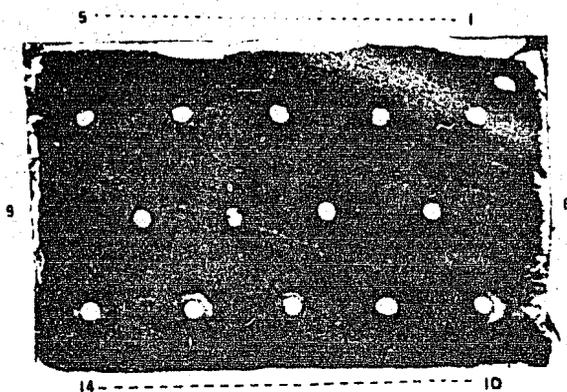


Fig. 19. Identificación de los activadores de plasminógeno como enzimas proteolíticas del grupo de las proteasas de serina. La ausencia del halo fibrinolítico indica que las enzimas presentes en la fracción I.6 fueron inhibidas por: Diisopropil fluorofosfato (DIFF) pozos 5 y 11, inhibidor de tripsina de soya (STI) pozo 8 y P-amino-benzamidina (P-AB) pozo 1. Se presentan también los pozos donde no hubo inhibición: con ácido Iodo acético (IAA) pozos 3, 5 y 10; Cisteína pozos 2 y 14; Etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) pozos 4 y 7; 1-10 ortofenantrolina (1-10 FT) pozo 9. Como control, en los pozos 12 y 13 fueron aplicadas alícuotas de la fracción I.6 en ausencia de inhibidores.

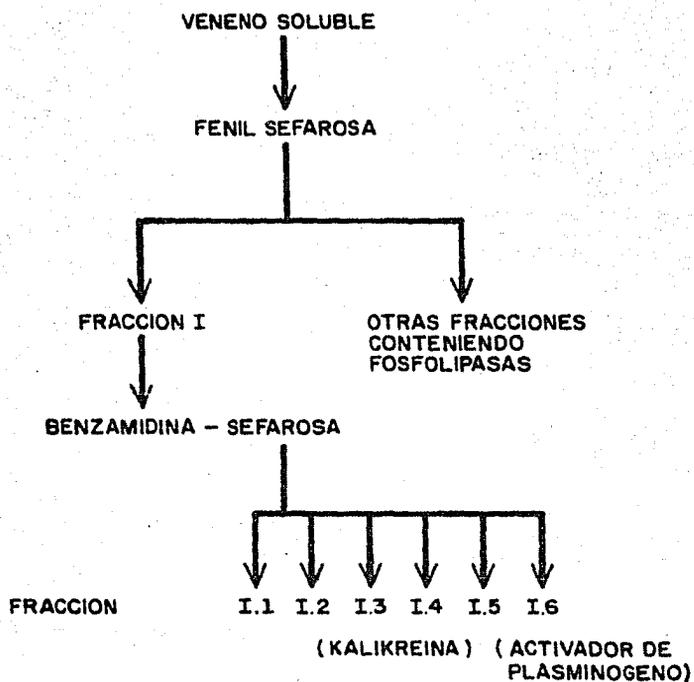


FIG20. Estrategia seguida con el objeto de purificar las enzimas (activadores de plasminogeno) del veneno de Meloderma horridum horridum.

DISCUSION

La presencia de una enzima en un veneno puede ser determinada en un principio por ciertas características peculiares - actividades - que comparte con uno o más grupos de enzimas. Posteriormente, por ensayos más específicos, se hace posible - llegar a identificar con mayor exactitud el grupo al que pertenece, debido al conjunto de características que presenta.

Las enzimas con actividad de BAEE-hidrolasa pueden denominarse como esterases, ya que su actividad está confinada a enlaces ésteres que presentan los sustratos - sintéticos como el α -N-benzoil-arginina etil éster (BAEE). Pero existe también un tipo de enzimas parecidas a tripsina que pertenece al grupo de las proteasas de serina, las cuales poseen especificidad por arginina y lisina (Stroud, 1974). Todas aquellas enzimas que sean parecidas a tripsina, poseen actividad proteolítica y - también pueden presentar actividad esterásica en sustratos sintéticos. En cambio - las esterases al parecer no poseen actividad proteolítica.

De esta forma, los resultados obtenidos por el grupo de Alagón (1982), utilizando una columna de Sefadex G-75, demostraron la presencia de dos picos con actividad de BAEE-hidrolasa (Fig.6). Siendo que el menor de ellos, estaba dado por - la presencia de una enzima de peso molecular de $\sim 65,000$ dal. tratándose de una callicreina (Alagón, comunicación personal), pero faltaba por determinar si la fracción correspondiente al pico de mayor actividad de BAEE-hidrolasa, estaba dado por una de las dos o ambas enzimas de peso molecular de $\sim 22,500$ dal. presentes en dicha fracción y si esta actividad se debía a la presencia de alguna esterasa simplemente o de alguna enzima proteolítica parecida a tripsina. Por otra parte, se pensó que en el caso de ser una enzima proteolítica, tal vez podría intervenir en el sistema de coagulación sanguínea en forma procoagulante o anticoagulante (fibrinolítica). En un principio se supuso que de ser así, tendría que ser en forma procoagulante al actuar como trombina. Bajo estas suposiciones se sabía que benzamidi_n inhibe en forma competitiva a aquellas enzimas parecidas a tripsina. La columna de Benzamidi_n-Sefarosa en ese caso podría dar buenos resultados.

Tomando en cuenta todo lo anterior, se procedió a la purificación de una de las enzimas, pero paralelamente al desarrollo de este trabajo se llevaba a cabo la purificación de fosfolipasa presente en el mismo veneno. Por este motivo, el veneno se hacía correr a través de una columna de Fenil-Sefarosa (Cromatografía por afinidad), obteniéndose 5 fracciones (Fig.14), de las cuales se tomó la fracción F-I, encontrándose toda la actividad de BAEE hidrolasa. El hacer pasar el veneno por esta columna, para nada afectaba los pasos siguientes.

La fracción F-I, se lavaba por la columna de Benzamidina-Sefarosa (Cromatografía por afinidad) (Ver III.3). Como resultado de medir la actividad de BAEE hidrolasa, se observó que existe correlación entre el pico de actividad esterásica y el pico de absorbancia a A_{280} nm, que corresponde a la fracción I.6 (Fig.15) en la cual se encuentran contenidas las dos enzimas de peso molecular de $\sim 22,500$ dal. Suponiendo en un principio, que una de las bandas o posiblemente las dos poseían dicha actividad.

Como ya se ha mencionado, al cominezo del proceso de purificación se pensaba que dichas enzimas poseían actividad de trombina, y se procedió a la elaboración de ensayos que condujeran a probar esta hipótesis (Ver II.6). Al hacer el ensayo por difusión radial en los dos tipos de geles: fibrinógeno y fibrina "0", se observó que nuestra hipótesis no se comprobaba y que la presencia de un halo transparente con actividad fibrinolítica nos condujo a aceptar la hipótesis alternativa, es decir, que una o ambas poseían actividad fibrinolítica.

Con veneno soluble, se observó en geles de agarosa con fibrinógeno 0, que la formación de microcoágulos de fibrina por acción de alguna enzima con actividad de trombina precedía a la fibrinolítica (Fig.8.1). Por otra parte, se consideró que el fibrinógeno bovino (Sigma Co.) podía presentar contaminantes que interviniesen como factores de confusión en los resultados. Por lo anterior, se pensó que tal vez la presencia de plasminógeno, aunque en concentraciones bajas, pudiese ser activado y de ahí, que se explicara la actividad fibrinolítica en los ensayos. Esto nos condujo a la purificación del fibrinógeno (Ver II.3).

Se pensó también, que si las bandas poseían actividad de plasmina per se, al disminuir las concentraciones de plasminógeno contaminante, la actividad fibrinolítica

tica debería permanecer constante - si bien con ligeras variaciones - pero la desaparición paulatina de dicha actividad al cambiar de fibrina "0" - "II" - "IV" (Con geles de poliacrilamida y por difusión radial), demostró todo lo contrario (Fig. 8.2; 9.3 y 9.4; 12).

Los resultados obtenidos dieron a conocer, que no se trataba con enzimas que - tuviesen actividad de plasmina independientemente de la presencia o ausencia de plasminógeno en el medio, sino al contrario, que para que se pudieran llevar a cabo la actividad fibrinolítica, se necesitaba de plasminógeno y de la presencia de enzimas que lo activaran. Fue ésta, la primera vez que se consideró la presencia de activador(es) de plasminógeno en el veneno de H. h. horridum, correspondiendo a una o ambas bandas.

Para corroborar lo anterior, se pensó en purificar plasminógeno humano (Ver - II.4). Suponiendo que al añadir fracciones (10 µg/ml) de dicho plasminógeno, en geles conteniendo fibrina "II" y "IV", halos (difusión radial) con actividad fibrinolítica se presentarían como resultado de la activación de plasminógeno por la acción de una o ambas bandas (Activadores de plasminógeno).

Los resultados así obtenidos, pueden ser observados en la Fig.12, donde se considera que la presencia o ausencia de plasminógeno corresponde a cada uno de los niveles de tratamiento de ese factor, en relación con los tres tipos de fibrina (0, II y IV). Quedando así demostrada la presencia de activadores de plasminógeno en el veneno soluble.

Al parecer se trataba con dos activadores. Los resultados (Fig.18), demuestran que en realidad las dos bandas poseen dicha actividad. Esto, junto con la similitud de sus pesos moleculares: 21,500 y 22,500 dal. (Fig.16) parecían suponer la existencia de dos isoenzimas con una actividad biológica específica común.

Para corroborar los resultados obtenidos por las diferentes muestras (Fracciones del veneno), fueron incluidas dentro de los mismos geles, muestras conteniendo urocinasa, demostrando así la presencia de activadores de plasminógeno en el veneno. También se incluyeron muestras de calicreína para demostrar que aunque esta última posee actividad de BAEE hidrolasa, no posee la actividad propia de las bandas de

nuestro interes. Estos ensayos se hicieron en forma cualitativa, sin embargo, pueden llegar a determinarse cuantitativamente, ya que se ha observado una relación lineal entre el diámetro de la zona de lisis y el logaritmo de la concentración - de urocinasa humana, dentro de un rango que va de 1 a 1000 U/ml. La sensibilidad de este método está limitada a 1 U/ml de urocinasa humana.

Para que se pudiera identificar el tipo de proteasas al que corresponden las dos bandas, se realizó un ensayo (Ver III.3). De los resultados obtenidos, se observa que 3 de los 5 inhibidores (DIFP, SBTI y P-AB) dieron respuestas positivas (inhibición), identificando a las dos bandas como proteasas de serina.

Además, en la Tabla 2. se puede observar que los resultados obtenidos a partir del veneno total para la fracción F-I y I.6, fueron buenos y que en la purificación de este tipo de proteasas existe una gran similitud con el veneno de Elápidos, en los cuales las enzimas puras presentan actividad específica mayor que el veneno total (Chang y Lee, 1963).

Al parecer no se había demostrado antes la presencia de activadores de plasminógeno en un veneno. Esto conduce a cuestionarse si aquellos veneno que se han reportado conteniendo enzimas con actividad de plasmina, se deba ésta a la acción directa o en forma indirecta - análoga al veneno de H. h. horridum - a la presencia de activadores de plasminógeno.

Por otra parte, podría pensarse que la acción del veneno depende del sitio - donde fuera inflingida la mordedura, y dependiendo de esto, se podría entender como lo hace Bogert y Martín del Campo (1956), que la respuesta no es predecible a menos de que se tome en cuenta el desarrollo sistémico que sigue a una mordedura. Por una parte la acción directa del veneno en contacto con un vaso principal, permitiría que aquella enzima con actividad de trombina precipitara a la actividad del activador de plasminógeno, produciendo al final de cuentas una fibrinopenia como en los datos observados por Rosenfeld (1964), para el veneno de las serpientes - pertenecientes al género Bothrops y por otra, la presencia del activador de plasminógeno permitiría la difusión de otros compuestos y que la hemorragia que en algunos casos se presenta, fuera explicada por la presencia paulatina de plasmina. En ésta forma empieza a haber una explicación para algunos de los síntomas que se presentan a partir de una mordedura y que anteriormente no se podía entender.

Esto podría estar relacionado con los reportes de algunos de los efectos de mordeduras de serpientes en donde se muestra que los efectos principales en las víctimas eran: sangre incoagulable y a pesar de esto no sangraba mucho (Reid, 1963) y que el fibrinógeno como tal, por lo general se extinguía por coagulación y estaba asociado con fibrinolisis (Reid et al., 1963 a y b).

Reich (1978), menciona que no existe ninguna evidencia a favor o en contra sobre si el plasminógeno participa en la fisiología de la fibrinolisis. Los resultados en este trabajo, demuestran que in vitro, tanto el plasminógeno como su activador realmente participan en la fibrinolisis.

Por último, el activador de plasminógeno es sintetizado por la mayoría de los tejidos en vertebrados y parece ser un mecanismo general para la producción de proteólisis extracelular. Tasas elevadas de secreción de esta enzima son observadas en asociación con procesos que requieren proteólisis en un microambiente local. Estos incluyen remodelación del tejido y migración celular en función de tejido normal, tales como el desarrollo embrionario, ovulación, implantación de blastocisto e inflamación, en los cuales la síntesis del activador de plasminógeno es transitória y regulada. La síntesis de esta enzima en células neoplásicas parece ser constitutivo y permanente. Por todo ésto, no es de extrañarse que el activador de plasminógeno se presente en el veneno de Heloderma horridum horridum y quizá también se presente en las otras dos subespecies: H. h. exasperatum y H. h. alvarezii con anterioridad se había observado, que los venenos de serpientes poseían actividad anticoagulante (fibrinolítica) debida quizá a un compuesto capaz de activar al plasminógeno, pero esto no pudo ser demostrado (MacKay et al., 1970; Rosenfeld, 1964).

Con ésto, el activador de plasminógeno no solo adquiere la función remodeladora de tejidos y de migración celular, sino también un mecanismo que permita la difusión de compuestos y activación de una proenzima (plasminógeno), en el mecanismo de coagulación sanguínea, como resultado de su introducción, al estar presente en el veneno de Heloderma horridum horridum.

Los venenos comparten características entre sí, debidas a la presencia de compuestos que con cierta similitud desempeñan actividades semejantes. La presencia de estos compuestos y sus modificaciones no pueden ser aisladas de un medio que está subordinado a diferentes niveles cualitativos. Por tanto, siempre se hace necesario

crear ideas que conduzcan a un mayor entendimiento de los fenómenos naturales. En este caso pensaríamos que, no solamente se trata de purificar un compuesto y obtener información de sus propiedades. También se debería tratar de entender el porque se encuentra ahí. Con ese objeto, deberíamos trascender y encontrarnos con el organismo que contiene al compuesto en cuestión, y tratar de entender que el mismo, se encuentra como resultado de la interacción con diferentes niveles cualitativos, y - que sus propiedades le han permitido manifestarse continuamente con variaciones, pero sin limitaciones de tiempo. Su presencia y la fluctuación de sus concentraciones se podría pensar que responde a la interacción en todos niveles: glándula, organismo, clima, predador, presa, densodependencia del predador, presa y de la misma población, etc..; y por tanto, dicho compuesto no es inmutable, ni constante en cuanto a su concentración y nos permite - como ya se dijo antes - un mayor entendimiento de los fenómenos naturales.

CONCLUSIONES

- El veneno de Heloderma horridum horridum, posee actividad coagulante y fibrinolítica.
- Aunque el título de esta tesis menciona que se trata de las actividades coagulantes y anticoagulantes, ésta última se debe a la actividad fibrinolítica presente en el veneno de H. h. horridum.
- La actividad coagulante está dada por una enzima de peso molecular de $\approx 65,000$ dal. pero no fue identificada.
- La actividad fibrinolítica, está dada por dos isoenzimas de peso molecular de $\approx 22,500$ dal. las cuales convierten el plasminógeno en su forma activa -plasmina- por lo que se les ha denominado Activadores de Plasminógeno, y su presencia en un veneno, es demostrada por primera vez en este trabajo.
- La presencia de los activadores de plasminógeno, demuestra que si existe una evidencia directa in vitro, del plasminógeno en la fisiología de la fibrinólisis.
- Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la presencia de activadores de plasminógeno en un veneno, forma parte del proceso que permite la difusión de otros componentes del veneno que actúan a nivel sistémico.
- Por último, que el procedimiento cromatográfico seguido para la purificación de los activadores de plasminógeno, dió buenos resultados.

BIBLIOGRAFIA:

- ALAGON, A.C., MALDONADO, E.A., JULIA, J.Z., SANCHEZ, C.R., POSSANI, L.D. (1982) Venom from two sub-species of Heloderma horridum horridum (Mexican beaded lizard): General characterization and purification of N-benzoyl-L-Arginine Ethyl ester Hydrolase. Toxicon 20: 463-475.
- ALSBERG, G.L. (1913) Biochemical studies upon the venom of Heloderma suspectum. In the venom of Heloderma. p.231 (LOEB, L., Ed) Washington, D.C. Carnegie Institution.
- ASTRUP, T. and STERNDOORFF, I. (1952) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 81: 675.
- BERGSTROM, K. and WALLEN, P. (1963) Purification and properties of plasminogen. In the proceedings of the 9th Congress of the European Society of Haematology (Lisbon). p.1325 S. Karger, Basel.
- BLOMBACK, B., YAMASHINA, I. (1958) On the N-terminal aminoacids in fibrinogen - and fibrin. Arkiv. Kem. 12: 229-319.
- BRINK, S. and STEYTLER, J.C. (1974) Effects of puff-adder venom on coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation in the baboon S.A. Med. Tyd. Skr. 48:1205
- BOGERT, C.M. and MARTIN DEL CAMPO, R. (1956) The gila monster and its allies. The relationships, habits and behaviour of lizards of the family Helodermatidae.- Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 109: 1
- CARREL, A. and BURROWS, M.T. (1911) J. Exp. Med. 13: 751
- CLAEYS, H., MOLLA, A. and VERSTRETE, M. (1973) Digestion of human plasminogen by human plasmin. In the proceedings of the 4th International Congress on Thrombosis and Haematosiis (Vienna) p.187 G. Gistel & Cie., Vienna.
- CLAEYS, H. and VERMYLEN, I. (1974) Physico-chemical and proenzyme properties of NH₂-terminal glutamic acid and NH₂-terminal lysine human plasminogen. Influence of 6-amino hexanoic acid. Biochim. Biophys. Acta 342: 351
- COLE, E.R., KOPPEL, J.I. and OLWIN, J.H. (1965) Thromb. Diath. Haemorrh. 14: 431
- CRISP, T.M. and DENYS, F.R. (1975) In: "Electron Microscopic concepts of Secretion" (M. Hess, Ed.). John Wiley and Sons. New York.

- CHENG, H.C. and OUYANG, C. (1967) Isolation of a coagulant and anticoagulant - principles from the venom of Agkistrodon acutus. Toxicon 4: 235
- DANO, K. and REICH, E. (1978) J. Exp. Med. 147: 745
- DENSON, K.W.E. and ROUSSEAU, W.E. (1970) Separation of the coagulant components of Bothrops jararaca venom. Toxicon 8: 15
- DEUTSCH, D.G. and MERTZ, E.T. (1970) Plasminogen: Purification from human plasma by affinity chromatography. Science 170: 1095-1096
- ESMON, C.T. and JACKSON, C.C. (1974) The conversion of Prothrombin to IV. The function of the fragment 2 region during activation in the presence of factor VI. Biol. Chem. 249: 7791-7797
- ESPEY, L.L. (1974) Biol. Reprod. 10: 216
- FISCHER, A. (1925) Arch. Entwickl. Lungs. 104: 210
- GRANELLI-PIPERNO, A., VASALLI, J-D. and REICH, E. (1978) J. Exp. Med. 146: 1693
- HALAMI, C.J. (1938) Contribution a l'étude des effets du venin de Naja tripudians (cobra) sur la coagulation sanguine. Arch. Int. Physiol. 47: 345.
- JACKSON, C.M. and NEMERSON, Y. (1980) Blood coagulation. Ann. Rev. Biochem. 49: 765-811
- JOVIN, T., CHRAMBACH, A. and NAUGHTON, M.A. (1964) An apparatus for preparative temperature regulated polyacrilamide gel electroforesis. Anal. Biochem. 9: 351-369.
- KIRBY, D.R.S. (1965) The early conceptus, normal and abnormal (W.W. Park Ed.) University of St. Andrews Press Edinburgh.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage "T4". Nature 227: 680-685
- LAKI, K. and LORAND, L. (1948) On the solubility of fibrin clots. Science 108: 280.

- IAKI, K. (1951) The polymerization of Proteins: The action of Thrombin on - fibrinogen. Arch. Biochem. Biophys. 32: 317-324.
- LEICESTER, H.M. (1975) Development of Biochemical concepts from ancient to Modern times. Massachusetts-London:Harvard University Press.
- LOEB, L. (1913) In: The venom of Heloderma (LOEB, L. Ed.) Carnegie Institution of Washington-Washington.
- MACKAY, N., FERGUSON, J.C. and McNICOL, G.P. (1968) Effects of three mamba venoms on the haemostatic mechanism. Br. J. Haematol 15:549
- MACKAY, N., FERGUSON, J.C. and McNICOL. (1969) Effects of three cobra venoms on blood coagulation, platelet aggregation, and fibrinolysis. J. Clin. Path. 22: 304-311
- MACKAY, N., FERGUSON, J.C. and McNICOL, G.P. (1970) Effects of the venom of the rhinoceros horned viper (*Bitis nasicornis*) on blood coagulation, platelet aggregation and fibrinolysis. J. Clin. Pathol. 23: 789
- MEBS, D. and RAUNDONAT, H.W. (1966) Biochemical investigations on Heloderma - venom. Mens. Inst. Butantan. 33: 907
- MEBS, D. and RAUNDONAT, H.W. (1967) Biochimie des Giftes der Krustenechsen - Heloderma suspectum und Heloderma horridum. Naturwiss enchaften. 18: 1
- MEBS, D. (1970) Biochemistry of Kinin-releasing enzymes in the venom of the viper Bitis gabonica and of the lizard Heloderma suspectum. In: Bradykinin and related Kinins: Cardiovascular, Biochemical and Neutral actions (SICUTERI, F., Ed.) New York:Plenum Press.
- MEBS, D. (1972) Biochemistry of Heloderma venom. In: Toxins of animal and - plant origin. Vol.2 (DE VRIES, A and KOCHVA, E., Eds.) New York:Gordon and Breach.
- MOSESSON, N.W. (1962) The preparation of human fibrinogen free of plasminogen. Biochim. Biophys. Acta 57: 204-213
- NELSESTUEN, G.L., ZYTKOVICZ, T.H. and HOWARD, J.B. (1974) The mode of action of vitamin K. Identification of -carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. J. Biol. Chem. 249: 6437-6350

- OSSOWSKI, L., UNKELESS, J.C., TOBIA, A., QUIGLEY, J.P., RIFKIN, D.B. and REICH, E. (1973) An enzymatic function associated with transformation of fibroblasts by oncogenic viruses, *J. Exp. Med.* 137: 112
- OUYANG, C. (1957) The effects of formosan snake venoms on blood coagulation - in vitro. *J. Formosan. Med. Assoc.* 56: 435
- OUYANG, C. and TENG, C.M. (1973) The effect of purified anticoagulant principle of Aqkistrodon acutus venom on blood coagulation. *Toxicol* 11: 287
- OUYANG, C. and HUANG, T.F. (1976) Purification and characterization of the fibrinolytic principle of Aqkistrodon acutus venom. *Biochim. Biophys. Acta.* 439: 146
- PAPAIOPOULOS, D. and HANAHAN, D.J. (1964). *Biochim. Biophys. Acta.* 90: 436
- QUIGLEY, I.P., OSSOWSKI, L. and REICH, E. (1974) Plasminogen the serum proenzyme activated by factors from cells transformed by oncogenic viruses. *J. Biol. Chem.* 249: 4306
- REICH, E. (1978) Activation of plasminogen: A general mechanism for producing localized extracellular proteolysis. Rockefeller University, Internal communication.
- REID, H.A. (1963 I) Treatment of snake bite poisoning. *Brit. Med. J.* 1675
- REID, H.A., CHAN, K.E., THEAN, P.C. (1963 bi) Prolonged coagulation defect - (defibrination syndrome) in Malayan viper bite. *Lancet* 621-626
- REID, H.A., THEAN, P.C., CHAN, K.E. and BAHARAM, A.R. (1963 3aI) A clinical effects of bites by Malayan viper (Ancistrodon rhodostomata) *Lancet.* 617.
- RIFKIN, D.B., BEAL, L. and REICH, E. (1975) Proteases and Biological control (E. Reich, D.B. Rifkin and E. Show Eds.) Cold Spring Harbor Conferences on cell proliferation, Cold Spring Harbor.
- INDERKNECHT, H., GEOKAS, M.C., SILVERMAN, P. and HAVERBACK, B.J. (1968) A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clinica Chim. Acta.* 21: 197-203.
- ROBBINS, K.C. (1944) A study on the conversion of fibrinogen to fibrin. *Amer. J. Physiol.* 142: 581-588

- ROBBINS, K.C., SUMMARI, L., HSIEH, B. and SHAH, R.J. (1967) The peptide chains of human plasmin. Mechanisms of activation of human plasminogen to plasmin. *J. Biol. Chem.* 242: 2333
- ROBBINS, K.C., BERNABE, P., ARZADON, L. and SUMMARI, L. (1972) The primary structure of human plasminogen. I. The NH₂-terminal sequences of human plasminogen and the s-carboxymethyl. Heavy (A) and light (B) chain derivatives of plasmin. *J. Biol. Chem.* 247: 6757
- ROSENFELD, G. (1964) Fibrinolysis by snake venoms. *Sangre* 9:352
- RUSSELL, F.E. and BOGERT, CH.M. (1981) Gila Monster: Its Biology, venom and bite. a review. *Toxicon* 19(3):341-359
- SANTESSON, C.G. (1897) Uber das Gift von *Heloderma suspectum* Cope, einer giftigen Eidesche. *Nordiskt. Med. Arkiv.* 30: 1
- SEEGER, W.H. and SMITH, H.P. (1942) Factors which influence the activity of purified thrombin. *Amer. J. Physiol.* 137:348-354
- SEEGER, W.H. and ANDARY, T.J. (1974) Formation of prethrombin-E, thrombin and thrombin-E and their inhibition with antithrombin and enzyme inhibitors. *Thrombos. Res.* 4: 869-874
- SILVERMAN, S., BERNIK, M.B., POTTER, E.U. and KWAN, H.C. (1973) Effects of Ancrod (Arvin) in mice: studies of plasma fibrinogen and fibrinolytic. *Br. J. Haematol.* 24: 101
- SOBEL, G.W., MOHLER, S.R., JONES, N.W., DOWDY, A.B. and GUEST, M.M. (1958) *Am. J. Physiol.* 171:768
- SODETZ, J.M., BROCKWAY, W.J. and CASTELLINO, F.J. (1972) Multiplicity of rabbit plasminogen physical characterization. *Biochemistry* 11: 4451
- STENFLO, J., FERLUND, P., EGAN, W., ROEPSTORFF, P. (1974) Vitamin K-dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Washington)* 71: 2730-2733
- STROUD, R.M. (1974) A family of protein-cutting proteins. *Sci. Amer.* 231(1):24
- STYBLOVA, Z. and KORNALIK, F. (1967) Enzymatic properties of *Heloderma suspectum* venom. *Toxicon* 5: 139

- SUMMARIJA, L., ARZADON, L., BERNABE, P. and ROBBINS, K.C. (1972) J. Biol. Chem. 247: 4691
- SUMMARIJA, L., ARZADON, L., BERNABE, P. and ROBBINS, K.C. (1973) Isolation, characterization and comparison of the S-carboxymethyl heavy (A) and light (B) chains in derivatives of cat, dog, rabbit and bovine plasmins. J. Biol. Chem.
- SWANK, R.T. and MUNKRES, K.D. (1971) Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrilamide gel with sodium dodecyl sulfate. Anal. Biochem. 39: 462-477
- TSENOGLOU, D., WALZ, D.A., Mc COY, L.E and SEEGER, V.H. (1972) A new thrombin: Purification, aminoacid composition and crystallization. Thrombos Res. 1:533
- TU, A.T. (1977) In: Venoms. Chemistry and Molecular Biology. (Tu.A.T. Ed.) - New York: John Wiley.
- TINKHAM, E.R. (1956) The deadly nature of Gila Monster venoms. In: Venoms. (Buckley, E.E. and Porges, N. Eds.) Washington, D.C.: Am. Assoc. Adv. Sci. publication 44.
- TU, A.T. and MURDOCK, D.S. (1967) Protein nature and some enzymatic properties of the lizard, Heloderma suspectum suspectum (Gila Monster) venom. Comp. - Biochem. Physiol. 22:389
- UNKELESS, J.C., DANO, K., KELLERMAN, G. and REICH, E. (1974) Fibrinolysis associated with oncogenic transformation. J. Biol. Chem. 249: 4295
- VASSALLI, J.D., HAMILTON, J. and REICH, E. (1978) J. Exp. Med. 146: 1693
- WALLEN, P. and WIMAN, B. (1970) Characterization of human plasminogen. I. On the relationship between different molecular forms of plasminogen demonstrated in plasma and found in purified preparations. Biochim. Biophys. Acta. 221:20
- WALLEN, P. and WIMAN, B. (1973) On the formation and properties of an intermediate form of human plasminogen generated during activation with urokinase. Proceeding of the 4th International Congress on Thrombosis and Haemostasis (Vienna). Gistel & Cie, Vienna.
- WALTHER, P.J., STEINMAN, H.M., HILL, R.L. and MACKEE, D.A. (1974) Activation of human plasminogen by urokinase. Partial characterization of a pre-activation peptide. J. Biol. Chem. 249:1173

- WHITE, W.R., BARLOW, G.H. and MOZER, M.M. (1966) The isolation and characterization of plasminogen activators (urokinase) from human urine. *Biochemistry* 5: 2160
- WILLIAMS, J.R.B. (1951) *Br. J. Exp. Pathol.* 32: 530
- WIMAN, B. (1972) On the structure of the N-terminal fragment of human plasminogen obtained after cleavage with cyanogen bromide. *Thromb. Res.* 1: 89
- WIMAN, B. (1973) Primary structure of peptides released during activation of human plasminogen by urokinase. *Eur. J. Biochem.* 39: 1
- ZARAFONETIS, C.J.D. and KALAS, J.P. (1962) Serotonin degradation by homogenates of tissues from Heloderma horridum. The Mexican beaded lizard. *Nature* 195:707