

00562

2

14-

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE PROTEINASAS DEL
 VENENO DE LA SERPIENTE MEXICANA *Crotalus molossus*
 nigrescens (Gloyd) 1936.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
 MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

PRESENTA

GUILLERMO JULIO RAMIREZ AVILA

00562

S/acto

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

ABREVIATURAS

A.	Askistrodon.
A.	Absorbencia.
Azure	Hide Powder Azure.
B.	Bitis.
BAEE	N-benzoil-arginina etil ester.
C.	Crotalus.
DiFP	Di-isopropil fluoro fosfato.
EDTA	Acido etilendiamino tetraacetico.
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
T.	Trimeresurus.
TRIS	Tris (hidroximetil)-amino metano.
U.A.	Unidades de absorbencia.
U.E.	Unidades de actividad esterastica.
U.P.	Unidades de actividad proteolitica.
V.	Vipera.

INDICE

PAG.

I . INTRODUCCION

A : GENERALIDADES SOBRE SERPIENTES Y SUS VENENOS.

1. Creencias y mitología.	1
2. Sistemática y distribución geográfica.	2
3. Venenos de serpientes.	6
4. Toxinas del veneno de serpientes.	8
4.1 Neurotoxinas.	8
4.2 Toxinas de membrana.	9
5. Relaciones estructurales y evolutivas de las toxinas del veneno de serpientes.	9

B : ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LAS ENZIMAS PRESENTES EN VENENOS DE SERPIENTES.

1. Enzimas presentes en los venenos.	11
2. Proteinásas de venenos.	13
2.1 Enzimas similares a la trombina.	14
2.2 Proteinásas hemorrágicas.	16
2.3 Proteinásas que inactivan a inhibidores de proteinásas.	18
2.4 Enzimas procoagulantes.	20
2.5 Proteinásas que modifican el sistema de complemento.	21
2.6 Colagenasas y elastasas.	22
2.7 Proteinásas inespecíficas.	23
2.8 Fibrinogenolisinas y fibrinolisinásas.	24

C : OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO Y SU JUSTIFICACION. 26

II . MATERIALES Y METODOS.

Pag.

A) Obtencion del veneno.	28
B) Separaciones cromatograficas.	28
C) Pruebas electroforéticas e inmunológicas.	30
D) Determinaciones de actividad enzimática.	30
E) Bioensayos.	33
F) Composición química de las proteinasas.	34
G) Comparación estadística de las composiciones de aminoácidos.	35
H) Determinación de la secuencia de aminoácidos de las proteinasas.	36
I) Cromatografía de afinidad.	36

III . RESULTADOS.

A : CARACTERIZACION GENERAL DEL VENENO.

1. Solubilidad y estabilidad del veneno.	38
2. Toxicidad.	39
3. Actividades enzimáticas del veneno.	41
4. Cromatografía y electroforesis iniciales.	43

B : PURIFICACION DE LAS PROTEINASAS.

1. Separaciones cromatograficas.	48
2. Criterios de pureza.	52

C : COMPOSICION QUIMICA DE LAS PROTEINAS.

1. Determinación de peso molecular.	55
2. Composición de aminoácidos.	56
3. Degradación de Edman.	61
4. Comparación con otras proteinasas.	63

D : PROPIEDADES ENZIMATICAS DE LAS PROTEINASAS.	Paq.
1. Sustratos ensayados.	63
2. Constantes cineticas.	63
3. Optimo de pH.	66
4. Sensibilidad a inhibidores.	67
E : PROPIEDADES BIOLOGICAS DE LAS PROTEINASAS.	69
1. Fibrinolisis.	70
2. Activacion de plasminogeno.	70
3. Coagulacion de fibrinogeno.	70
4. Colagenolisis.	73
5. Actividad hemorragica.	73
6. Inmunodifusion.	73

IV. DISCUSION.

A. Discusion especifica sobre resultados.	
1. Sobre las características generales del veneno.	76
2. Sobre la purificación y estabilidad del veneno.	77
3. Sobre las características estructurales de las enzimas purificadas.	81
4. Sobre las características funcionales de las enzimas purificadas.	84
B: Discusion general: inestabilidad de los componentes purificados debido a autolisis.	86
C: Comentarios finales.	90

	Pag.
V . PERSPECTIVAS.	95
VI . RESUMEN.	97
VII . ANEXOS.	99
VIII . BIBLIOGRAFIA.	102

INDICE DE ILUSTRACIONES

Pag.

Mapa # 1 Distribucion de viperidos en el mundo.	4
Mapa # 2 Distribucion de <i>Crotalus molossus</i> en Mexico.	6
Figura # 1 Filogenia de los generos <i>Crotalus</i> y <i>Sistrurus</i> .	5
Figura # 2 Evolucion de las fosfolipasas, ribonucleasas y toxinas de serpientes.	11
Figura # 3 Solubilidad del veneno en funcion del pH.	39
Figura # 4 Linearidad del ensayo de proteasa.	41
Figura # 5 Actividad proteolitica del veneno soluble en funcion del pH.	43
Figura # 6 Electroforesis del veneno soluble.	44
Figura # 7 Cromatografia inicial por filtracion en gel.	45
Figura # 8 Mapa reftidico de la fraccion V.	46
Figura # 9 Cromatografia de filtracion en gel (Serhadex).	49
Figura # 10 Cromatografia de intercambio ionico de la fraccion ...	50
Figura # 11 Cromatografia de intercambio ionico de la fraccion III.	50
Figura # 12 Cromatografia de ... de la fraccion III.1.	51
Figura # 13 Cromatografia de intercambio ionico de la fraccion III.3.	53
Figura # 14 Cromatografia de intercambio ionico de la fraccion III.9.	53

Figura # 15 Determinación de pesos moleculares de las proteinasas.	56
Figura # 16 Graficas de Lineweaver-Burk de las proteinasas 1, 2 y 3.	66
Figura # 17 pH óptimo de las proteinasas.	67
Figura # 18 Actividad fibrinolítica de las proteinasas.	71
Figura # 19 Actividad coagulante de fibrinógeno de las proteinasas.	72
Figura # 20 Degradación de colágena por las proteinasas.	74
Figura # 21 Inmunodifusión de las proteinasas.	75
Figura # 22 Electroforesis de las enzimas almacenadas.	87
Figura # 23 Purificación de la proteínasa E.	89
Figura # 24 Purificación de una enzima similar a la trombina.	92

TABLAS

Tabla # 1 Enzimas presentes en venenos de serpientes.	12
Tabla # 2 Estabilidad de la actividad proteolítica del veneno en función del pH y tiempo de incubación.	40
Tabla # 3 Composición de aminoácidos de los péptidos presentes en la fracción V.	47
Tabla # 4 Resumen de la purificación de las proteinasas.	54
Tabla # 5 Composición de aminoácidos de la proteínasa # 1.	57

Tabla # 6 Composición de aminoácidos de la proteinasa # 2.	58
Tabla # 7 Composición de aminoácidos de la proteinasa # 3.	59
Tabla # 8 Composición de aminoácidos de la proteinasa # 4.	60
Tabla # 9 Comparación por coeficiente S n.	64
Tabla # 10 Constantes cinéticas de las proteinasas.	63
Tabla # 11 Sensibilidad a inhibidores.	68
Tabla # 12 Secuencia de N-terminal de las proteinasas 1, 2, 3 y E.	86

ANEXOS

Anexo # 1 Programa de comparación S n.	99
Anexo # 2 Tabla de composición de las 49 proteinasas	100

I . INTRODUCCION

A. GENERALIDADES SOBRE SERPIENTES Y SUS VENENOS.

1. Creencias y mitología.

"... y Atoum, la serpiente, después de dejar las aguas primordiales dio el día a los dioses, quienes a su vez crearon Beb y Nout, el aire y la tierra. Atoum era el que permanece." (Boquet, 1979).

Desde el inicio de la civilización las serpientes han estado presentes en casi todas las cosmogonías, un ejemplo es el párrafo anterior tomado de la mitología egipcia. El hombre ha asignado a este reptil una gran variedad de identidades, como el espíritu de la tierra, la vida, la inmortalidad, la sabiduría, la salud y la continuidad, entre otros.

En muchas culturas y religiones, la presencia de este reptil es bastante destacada. Por ejemplo, en Africa encontramos a Ouroboros, la serpiente que muerde su propia cola, fuente de vida, muerte y resurrección. En China, Buddha es protegido por una cobra de 7 cabezas. La Biblia relata como una serpiente persuadió a Eva de tomar el fruto del árbol del conocimiento del bien y del mal.

De su presencia en creencias, tradiciones, cultos y mitos se puede decir que la relación entre hombre y serpiente ha existido desde tiempos muy remotos y que ellas han sido

objeto de culto y temor por su veneno (Boquet, 1979).

2. Sistemática y distribución geográfica.

Las serpientes son reptiles del orden Squamata, que comprende a los saurios (Lacertilia) y a las serpientes propiamente dichas (Ophidia), siendo en conjunto los reptiles con mayor éxito ecológico. En la actualidad los miembros de esta orden suman casi 6,000 especies, mientras que el resto de los reptiles no llega a 300. Los saurios aparecen mucho antes que las serpientes y no es hasta el Cretácico Superior (hace aproximadamente 100 millones de años) que aparecen animales de transición entre los varanoideos (saurios) y los boideos primitivos (Romer, 1968).

Aparentemente las serpientes alcanzan cierta abundancia a partir del Oligoceno (hace 25 - 40 millones de años); como punto de referencia la gran radiación de los mamíferos se dio lugar hace 70 - 50 millones de años (Young, 1968). De acuerdo al registro fósil, la línea de los reptiles se separa de la de los mamíferos hace unos 300 millones de años.

La clasificación y evolución de las serpientes venenosas se considera en términos del cambio de las formas inofensivas, con dentición simple y sin glándulas venenosas en formas peligrosas con un aparato inoculador retractil y con glándulas diferenciadas productoras de veneno (Underwood, 1979).

Dentro de las serpientes superiores hay 4 tipos de

dentición maxilar asociada al manejo del veneno:

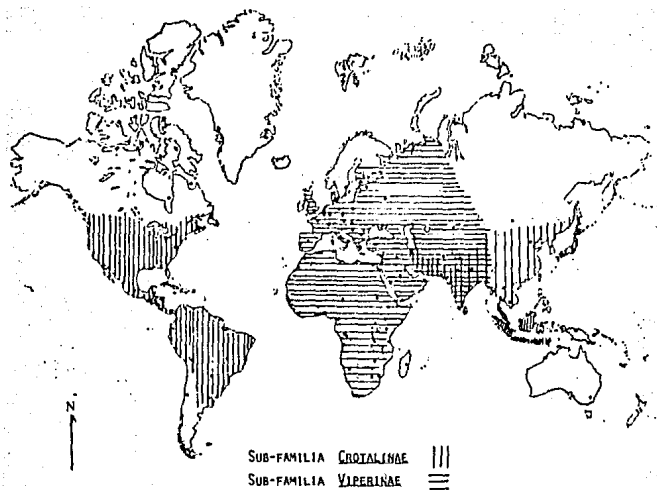
1. Astilifas: Dientes sólidos de igual tamaño.
2. Oristostilifas: Dientes posteriores acanalados para la conducción del veneno. Todas son venenosas pero solo 2 especies conocidas son peliosas al hombre.
3. Proterostilifas: Dientes posteriores acanalados e incluso hiodérmicos. Todas son venenosas y muchas son peliosas.
4. Solenostilifas: Dientes anteriores hiodérmicos y retráctiles, todas son venenosas y muchas son peliosas.

A las serpientes venenosas se les clasifica en tres grandes familias, las Colubridae, Elapidae y Viperidae; sus miembros pertenecen en general, a las oristostilifas, proterostilifas y solenostilifas, respectivamente.

Los colubridos, pese a ser muy abundantes, causan pocos problemas al hombre y prácticamente no han sido estudiados. Los elapidos abarcan 3 subfamilias de las cuales la mayor, Elapinae, está representada en Africa, Asia y Oceanía por cobras, mambas y otras más; las serpientes de coral son los únicos miembros de esta subfamilia que viven en América. Las serpientes marinas que habitan los mares de Asia, Oceanía y la costa Oeste de América también son elapidos.

Los viperidos comprenden principalmente a las

subfamilias Viperinae o víboras del Viejo Mundo, que habitan en Europa, Asia y África; y Crotalinae o serpientes con foseta que viven en Asia y América. (Ver mapa # 1).

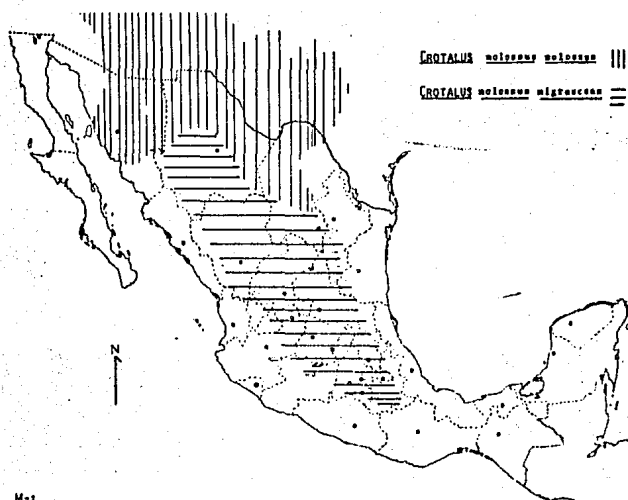


MAPA 1
Distribución de la familia Viperidae en el mundo (Brattstrom, 1964)

La subfamilia Crotalinae está compuesta, a su vez, por 6 géneros entre los que se encuentran las serpientes de cascabel, *Crotalus* y *Sistrurus* que solo habitan en América. De 63 especies y subespecies de crotalinos descritas, 48 habitan en México, el 74% (Russell, 1979). El género *Crotalus* se ha subdividido en 4 grupos por las características morfológicas que presentan sus integrantes:

1. Grupo triceriatus: EJ: *C. triceriatus*.
2. Grupo atrox: EJ: *C. atrox*, *C. adamanteus*, *C. ruber*.
3. Grupo viridis: EJ: *C. viridis*, *C. cerastes*, *C. scutulatus*.

Sur de Coahuila hasta Oaxaca y Veracruz, incluyendo el Valle de México. Se le conoce con el nombre común de serpiente de cascabel de cola negra (Hose, 1971) (Ver mapa # 2).



MAPA 2.
Distribución de *C. molossus* en México, según Hose (1971).

3. Venenos de serpiente.

Las mezclas de compuestos tóxicos conocidos como venenos son producidos por organismos a todo lo largo de la escala filogenética, desde seres unicelulares hasta mamíferos, con la posible excepción de las aves. Dichos compuestos pueden ser compuestos alifáticos químicamente simples o complicadas proteínas de alto peso molecular y de funciones muy especializadas. (Zlotkin, 1973). De la gran variedad de organismos productores de veneno, los más estudiados son las serpientes.

La experimentación con venenos y la búsqueda de

antídotos está documentada en los más antiguos escritos conocidos pero no fue hasta finales del siglo pasado que se abordó el problema científicamente. Ya entonces se sabía mediante observaciones aisladas, que algunos venenos poseían efectos neurotóxicos y otros presentaban características "diestivas" y alteraban la coagulación. A principios de este siglo se conocía la naturaleza proteica de los componentes del veneno y que presentaba algunas actividades biológicas como ser anticoagulantes, coagulantes y hemolíticas. Otras proteínas eran farmacológicamente similares al curare.

El veneno de los víperidos tiene una composición principalmente enzimática, siendo uno de los fluidos biológicos en que se alcanzan las concentraciones de enzimas más elevadas que se conocen. Las enzimas más estudiadas de estas secreciones son las fosfolipasas y las proteinasas. Desde 1884 De Lacaze observó que algunos venenos podían disolver carne y en 1904 Noc reportó la digestión de fibrina y gelatina por ciertos venenos. Los reportes sobre proteasas de venenos abundaron, pero no es sino hasta 1955 cuando Deutsch y Diniz publicaron un estudio sistemático de la actividad proteolítica del veneno de 15 serpientes sobre diferentes sustratos. Se encontró que las enzimas de venenos tenían actividad sobre sustratos naturales y sintéticos. Un ejemplo de estos últimos es el alfa-N-benzoil-arginina etil ester (BAEE), que es considerado un sustrato típico de la tripsina. Además, utilizando como sustrato hemoglobina desnaturalizada, se encontró que la actividad esterásica del

veneno no era paralela a la actividad proteolítica del mismo.

4. Toxinas presentes en el veneno de serpientes.

Las toxinas ocupan un lugar de importancia dentro del veneno de las serpientes por constituir los compuestos mejor estudiados, hasta el momento. Se pueden dividir en dos tipos:

1. Las que interaccionan específicamente con moléculas receptoras del sistema nervioso, llamadas neurotoxinas.
2. Las que interaccionan de manera relativamente inespecífica con algún componente de membrana de diversas células, como las cardiotoxinas, citotoxinas y factores líticos directos. En conjunto son conocidas como toxinas de membrana.

4.1 Neurotoxinas.

Son las proteínas más tóxicas aisladas a partir de veneno de serpientes y pueden actuar en la pre-sinapsis o en la post-sinapsis. Las toxinas pre-sinápticas interfieren específicamente con los procesos membranales responsables del almacenamiento y liberación de los neurotransmisores de las terminales motoras (Napias y Heilbrom, 1980). Estas proteínas están relacionadas evolutiva y estructuralmente con las fosfolipasas A y su toxicidad es mayor que las neurotoxinas post-sinápticas. Las neurotoxinas post-sinápticas se unen con alta afinidad a moléculas receptoras específicas, como el receptor nicotínico de acetilcolina,

previniendo la acción despolarizante del neurotransmisor. Las serpientes de la familia Elapidae poseen un veneno particularmente abundante en estos dos tipos de neurotoxinas.

4.2 Toxinas de membranas.

Son proteínas que modifican de manera relativamente inespecífica la permeabilidad de la membrana a diversos compuestos en gran variedad de células y tejidos, intercalándose en la bicapa y propiciando una acción detergente. Los venenos de elápidos son la única fuente conocida de estas toxinas y aun cuando en algunos casos se han aislado proteínas con similar actividad en el veneno de ciertos viperidos, no se ha encontrado una fuerte relación estructural entre ellas.

5. Relaciones estructurales y evolutivas de las toxinas del veneno de serpientes.

Aun cuando diversos autores consideran que la purificación de estas toxinas no es difícil cuando se utilizan las técnicas adecuadas, además de ser solubles, estructuralmente resistentes y su ensayo biológico fácil y directo (Karlsson, 1979), en la realidad la complejidad de los venenos y la semejanza de las proteínas a separar dificulta en buena medida su aislamiento.

Gruesas similitudes estructurales han permitido dividir a las toxinas de serpientes en dos grandes grupos:

1. El interesado por las neurotoxinas post-sinápticas y

toxinas de membrana, formadas por una cadena compuesta por 75 residuos de aminoácidos y 4 o 5 puentes de disulfuro. A su vez las neurotoxinas post-sinápticas se clasifican en toxinas de cadenas larga y corta, dependiendo del largo de la cadena polipeptídica y de la presencia de un quinto puente de disulfuro.

2. El compuesto por las neurotoxinas pre-sinápticas, las fosfolipasas básicas con actividad neurotóxica y por otros péptidos similares a las fosfolipasas A. Estas toxinas están formadas por 120 a 140 residuos, 6 a 8 puentes de disulfuro y en ocasiones se asocian para formar dímeros y trímeros.

En crotalinos y viperinos solo se han encontrado algunas moléculas similares a las toxinas de membrana como la crotamina y la crototoxina, aisladas del veneno de *C. durissus terrificus*, la toxina Mojave del veneno de *C. scutulatus* (Bieber y Tu, 1975), la conulxina, la girtoxina y la viperotoxina (Lee, 1972). La evidencia presente sugiere que los componentes tóxicos de los elapidos y los viperinos han seguido líneas evolutivas diferentes entre sí.

El avance de los estudios estructurales de las toxinas de elapidos permite sugerir un esquema de su evolución, el cual se presenta en la figura # 2 (Stroym, 1979).

Es interesante hacer notar que las neurotoxinas cortas y largas, y las citotoxinas se encuentran entre las proteínas que más rápido cambian su estructura primaria, junto con los

fragmentos variables de las inmunoglobulinas y con los fibrinogenitos (Wilson, 1978).

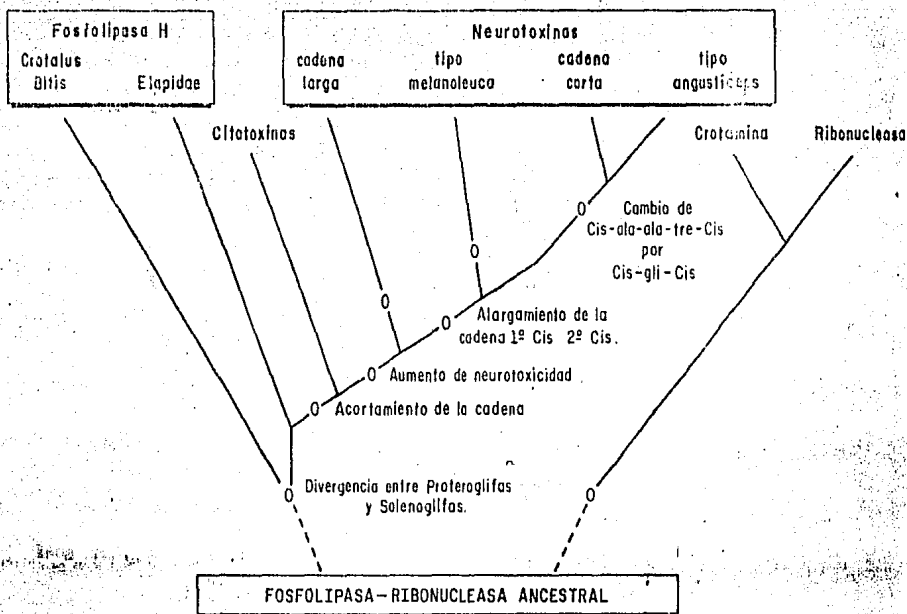


Fig. 2 Evolución de las fosfolipasas, ribonucleasas y toxinas de serpiente.

B. ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE LAS ENZIMAS PRESENTES EN VENENOS DE SERPIENTES.

1. Enzimas presentes en veneno de serpiente.

Todas las serpientes, en su veneno, poseen enzimas que están involucradas, en mayor o menor grado, en la fisiopatología del envenenamiento de las siguientes maneras:

a) Las fosfolipasas, arginina éster hidrolasas, hialuronidasas y proteinasas causan daño local a capilares y necrosis tisular.

b) Las fosfolipasas, proteinasas y Proteinas aglutinantes de plaquetas alteran los procesos hemostaticos y fibrinoliticos normales.

c) Las enzimas liberadoras de cininas, al producir peptidos vasoactivos y alógenos provocan dolor e hipotension.

Las enzimas L-aminoacido oxidasa, desoxirribonucleasa, fosfatasa, fosfolipasa, ribonucleasa, nicotin adenin dinucleotido nucleosidasa y algunas otras, no identificadas aun y presentes en el veneno en menor proporcion no han sido asociadas con algun mecanismo de dano a la victima.

En la tabla # 1 se citan algunas enzimas identificadas en ciertos venenos (Iwanaga y Suzuki, 1979).

TABLA # 1

ENZIMAS PRESENTES EN VENENOS DE SERPIENTES *

ENZIMAS ENCONTRADAS EN :

TODOS LOS VENENOS	ALGUNOS VENENOS	SOLO VIPERIDOS	SOLO ELAPIDOS
FOSFOLIPASA A	TRANSAMINASA GLUTAMICO-PIRUVICA	ENDOPEPTIDASAS	FOSFOLIPASA B
FOSFODIESTERASA	LACTATO DESHIDROGENASA	CININOGENASA	GLICERO FOSFATASA
DESOXIRRIBONUCLEASA	CATALASA	ARGININA ESTER HIDROLASA	ACETILCOLINESTERASA
FOSFOMONOESTERASA	AMILASA	ACTIVADOR DE PRO-TROMBINA	
ADENOSINTRIFOSFATASA	ENZIMA SIMILAR A LA HEPARINASA	ACTIVADOR DE FACTOR X	
L - AMINO OXIDASA	β -GUCOSAMINIDASA	ENZIMA SIMILAR A LA TROMBINA	
HIALURONIDASA			
NICOTIN ADENIN DINUCLEOTIDO NUCLEOSIDASA			
5- NUCLEOTIDASA			
PEPTIDASAS			
ARILAMIDASA			

* ADAPTADA DE IWANAGA Y SUZUKI ,1979.

2. Proteinasas de veneno de viperidos.

Las enzimas proteolíticas son aquellas que hidrolizan uniones peptídicas y por el tamaño del sustrato que degradan se las clasifica en proteinasas y peptidasas (Barret, 1980). Los venenos de viperidos son particularmente ricos en estas enzimas. En el veneno de crotalinos existe una mezcla compleja de endopeptidasas con una gran variedad de actividades biológicas:

- 2.1 Enzimas similares a la trombina.
- 2.2 Proteinasas hemorrágicas.
- 2.3 Proteinasas que inactivan a inhibidores de proteinasas.
- 2.4 Enzimas procoagulantes.
- 2.5 Proteinasas que modifican el sistema de complemento.
- 2.6 Colagenasas y elastasas.
- 2.7 Proteinasas inespecíficas.
- 2.8 Fibrinogenolisinas y fibrinolisinias.

Los venenos de viperidos poseen actividad esterolítica contra el sustrato BAEE y algunas de las proteínas responsables, una vez purificadas, no presentan actividad proteolítica contra sustratos comúnmente usados como hemoglobina, caseína o Hide Powder Azura. Esta actividad es conocida como ester hidrolasa aunque es factible que algunas de ellas sean verdaderas proteinasas de especificidad muy elevada y cuyo sustrato aun no es identificado.

2.1 Enzimas similares a la trombina:

La trombina es una proteínasa capaz de catalizar varias reacciones durante la coagulación sanguínea; la más conocida es hidrolizar enlaces arginina-glicina en las cadenas A- y B- del fibrinógeno liberando los fibrinopeptidos A y B, iniciando la formación de fibrina; otra reacción es activar el Factor XIII (transamidasa) el cual, a su vez, estabiliza el monómero de fibrina por medio del entrecruzamiento covalente entre residuos de lisina y glutamina. Además, procesa los factores V y VIII, activándolos inicialmente e inactivándolos en etapas tardías. A nivel celular, induce la agregación plaquetaria y la liberación de factores plaquetarios.

Las enzimas que coagulan fibrinógeno son conocidas en la literatura científica como "enzimas similares a la trombina" (thrombin-like enzymes). Se han aislado diversas enzimas que coagulan fibrinógeno a partir del veneno de serpientes como *Aekistrodon acutus* (Ouyang y cols, 1971), *A. contortrix contortrix* (Herzig y cols, 1970) *A. rhodostoma* (ancrod, Arwin 3.4.21.28) (Esnouf y Tunnah, 1967), *Bothrops asper* (asperasa) (Arason y Gubensek, 1978), *Bothrops atrox* (batroxobina, Rertilasa-R 3.4.21.29), (Funk y cols, 1971 y Holleman y Wiess, 1976), *Bothrops colombiensis* (Gabrielejdic y cols, 1982), *Bothrops moojeni* (batroxobina, Defibrasa, 3.4.21.29) (Stoker y cols, 1974), *Crotalus adamanteus* (crotalasa) (Markland y Damuz, 1971), *C. h. horridus* (defibrizima) (Bonilla, 1975), *Lachesis muta* (clotasa) (Masalhanes y cols, 1981), *Trimeresurus gramineus* (Ouyang y

Huana, 1974) y *T. okinavensis* (Andersson, 1972).

En casi todos los venenos de víboras ensayados su actividad ha sido detectada. La mayoría de las enzimas purificadas tiene como sustrato la cadena A- de fibrinogeno y libera fibrinogenido A. Existen ejemplos de enzimas que actúan sobre las cadenas B- del fibrinogeno o sobre ambas.

Todas estas enzimas similares a la trombina aisladas del veneno de crotalinos pertenecen a la clase definida como serina proteasas, pues tienen un residuo de serina como sitio catalítico. Sus pesos moleculares varían entre 31 400 y 67 000 daltones.

Las proteinasas que degradan la cadena A- del fibrinogeno catalizan la formación del monomero de fibrina I que, en la circulación, es rápidamente degradado por la maquinaria fibrinolítica y conduce a un estado de afibrinogenemia. Por este efecto la ancrod (Arwin), la batroxobina (Defibrasa) y otras enzimas son utilizadas como fármacos defibrinogenantes para el tratamiento de enfermedades vasculares oclusivas (Stocker, 1982).

A esta familia de enzimas pertenece la crotalasa, la única proteinasa purificada de veneno de serpiente cuya secuencia parcial de aminoácidos ha sido publicada (Pirke y cols, 1981). El fragmento secuenciado (43 % de la molécula, 115 aminoácidos) tiene mayor similitud con la calicreína glandular porcina (38 % de identidad) que con la trombina

(29 % de identidad) y con otras proteinasas. Posteriormente se encontro que la protalasa posee actividad de calicreinas, es decir, hidroliza la proteina de alto peso molecular llamada cininoseno liberando cininas como la bradicipina y calidina. Una diferencia con la calicreina original es que no activa plasminogeno (Markland y cols. 1982).

2.2 Proteinasa hemorragicas.

La hemorragia es uno de los datos clinicos mas comunes y aparatosos en los casos de mordedura de serpientes de la familia Viperidae. En accidentes leves o moderados la hemorragia se encuentra limitada a los tejidos cutaneo y subcutaneo adyacentes al sitio de la mordedura. En casos severos la hemorragia puede abarcar un area muy grande dañando el tejido muscular subyacente, pudiendo presentarse en organos como cerebro, hígado, pulmon y riñon. (Chaska, 1979). Este efecto puede ser eficazmente controlado mediante la oportuna aplicacion de la correcta dosis de antisuero (Fabiano y Tu, 1981).

Desde 1840 Mitchell habia citado la presencia de factores que dañaban la pared de los vasos y en 1930, Houssey atribuyo a las proteinasas este efecto. Sin embargo, la unica evidencia para relacionar las actividades proteoliticas y hemorragicas era el alto contenido de proteinasas en el veneno de las serpientes (Gitter y De Vries, 1943). Asi, la identificacion de las proteinas responsables resultaba medicamente importante. Posteriormente se encontraron dos tipos de proteinas hemorragicas:

a) Las que poseían actividad proteolítica como las aisladas de *Aekistrodon halys blomhoffi* (Iwanasa y cols, 1965); de *Trimeresurus flavoviridis*, la proteinasa HR1 (Omori-Satoh y Ohsaka, 1970); de *Crotalus atrox* (Bjarnason y Tu, 1978); de *Crotalus viridis viridis* (Fabiano y Tu, 1981) y de *Crotalus horridus* (Civello y cols, 1983) a y b.

b) Las que carecen de actividad proteolítica contra los sustratos ensayados como las proteínas HR2a y HR2b de *Trimeresurus flavoviridis* (Takahashi y Ohsaka, 1970)b, *Vipera palestinae* (Grotte y cols, 1967) y otras (Toom y cols, 1969).

Las proteinasas hemorrásicas tienen pesos moleculares entre 22 000 (Bjarnason y Tu, 1978) y 115 000 (Fabiano y Tu, 1981). Algunas han sido caracterizadas como metaloenzimas que contienen zinc y que son inhibidas por EDTA y orto-fenantiolina; su actividad hemorrásica es acompañada en ocasiones por actividad mionecrótica como en el caso de la viriditoxina (Fabiano y Tu, 1981) y la toxina hemorrásica b (Bjarnason y Tu, 1978).

Es interesante notar que no hay una correlación entre la actividad proteolítica y la hemorrásica, aunque esto puede explicarse en base a la especificidad de la "enzima-toxina" por los diferentes sustratos.

El mecanismo de acción de la proteinasa hemorrásica HR1 de *T. flavoviridis* ha sido estudiada por varios autores (Fulton y cols, 1956 y Ohsaka, 1975), encontrándose salida de

eritrocitos del lecho capilar sin ruptura aparente del endotelio, a través de las uniones de las células endoteliales gracias a la remoción de la membrana basal adyacente.

Existen otros compuestos de bajo peso molecular sin actividad enzimática, que son capaces de producir mionecrosis coagulativa similar a la producida por algunas proteinasas hemorrágicas, por lo que, probablemente las proteinasas hemorrágicas no sean las únicas responsables de los daños causados por el veneno total (Omby y cols, 1976).

2.3 Proteinasas que inactivan a inhibidores de proteinasas.

La presencia de enzimas que inactivan catalíticamente a todos los inhibidores de proteinasas con excepción de la alfa-2 macroglobulina, constituye un mecanismo altamente sofisticado de desquiciar los sistemas de regulación proteolítica de la víctima.

Se ha publicado que en el veneno de colubridos, viperinos y crotalinos existen factores capaces de inactivar algunos inhibidores de proteinasas presentes en el suero de mamíferos (Kress y Paroski, 1978). En este trabajo, el inhibidor alfa 1 de proteinasas es hidrolizado por las proteinasas de los venenos ensayados en un fragmento inactivo de 50 Kdal. y un péptido de 4 Kdal. Las enzimas responsables de dicha inactivación son metaloenzimas inhibidas por EDTA pero no por fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF). La inactivación es realizada al reaccionar la enzima

de manera catalítica con el inhibidor.

Del veneno de *C. adamanteus* se aislaron dos proteínas que inactivan al inhibidor alfa 1 de suero humano, correlacionando la digestión del inhibidor con la desaparición de la actividad de anti-tripsina. Estas proteínas tienen 207 y 214 residuos, correspondiendo su peso molecular a 24 571 y 23 749 dal, no son inhibidas por diisopropil-fluorofosfato (DFP) pero sí por EDTA, cisteína glutatión reducido y 2-mercaptoetanol (Kurecki y cols. 1978). El sitio de proteólisis es único y específico, cercano al sitio cortado por otras proteínas al reaccionar con el inhibidor (Kress y cols. 1979).

Siendo la antitrombina III el inhibidor más importante de los sistemas de coagulación (Heimbürger, 1979), se ensayo la capacidad de 14 venenos para inactivarlo. Se encontraron enzimas con esta característica en colubridos, viperinos y crotalinos pero no en elapidos, ellas son inhibidas por EDTA. El producto de proteólisis limitada disminuye su peso molecular en 3 Kdal (Kress y Catanese, 1980)a.

La heparina tiene un efecto de modulación de la degradación de la antitrombina III por la proteína II de *Crotalus adamanteus*: la adición de heparina a la mezcla de reacción acelera la hidrólisis del inhibidor. En ausencia de heparina no ocurre un corte en la región N-terminal de la molécula y la velocidad de proteólisis, así como la pérdida de actividad inhibitoria son bastante menores que en

ausencia de ella (Kress y Catanese, 1981). El inhibidor alfa 1 anti-quimotripsina tambien es inactivado por venenos de crotalinos, viperinos y colubridos (Kress y Kurecki, 1979).

Ademas de inactivar a la mayor parte de los inhibidores de proteinasas del suero de mamiferos, la proteinasa II de *Crotalus adamanteus* interacciona estequiometricamente con el inhibidor alfa 2 macroglobulina en una proporcion de 1.7 moles de enzima por mol de inhibidor. El complejo resultante es proteoliticamente inactivo, aunque inestable en presencia de suero o de fracciones de alto peso molecular purificadas del veneno del mencionado reptil, las cuales hacen que se libere por un lado la enzima activa y por el otro el inhibidor, que ahora es incapaz de reasociarse con la enzima (Kress y Kurecki, 1980).

Siendo la alfa 2 macroglobulina la molecula mas similar a un inhibidor "universal" de proteinasas, formando con ellas un complejo estequiometrico y estable (Heimbarger 1979), su capacidad para inhibir la actividad proteolitica presente en el veneno de algunas serpientes fue ensayada por Kress y Catanese (1981) b. De las 13 especies probadas, 4 poseen enzimas ligera o medianamente resistentes a la inactivacion por la alfa-2 macroglobulina.

2.4 Proteinazas Procoagulantes.

Algunos venenos de serpientes tienen enzimas que actuan sobre el sistema de coagulacion en sitios diferentes a las enzimas similares a la trombina. La actividad procoagulante

de algunos venenos es debida aparentemente a enzimas muy especificas, como los activadores del factor X (Kisiel, 1976) y del factor V (Schiffman, 1969) asi como de los activadores de protrombina (Morita, 1976).

Esta ultima ha sido usada para estudiar la conversion de protrombina en trombina. El activador de protrombina de *Deiuranus scutellatus scutellatus* tiene un peso molecular aproximado de 400 kdal, es insensible a DFP, EDTA, PMSF y β -cloromercuribenzoato, es capaz de hidrolizar el péptido sintético S-2222 (sustrato del factor Xa) y realiza dos cortes en la molecula de protrombina (Walker, 1980). Otro activador de protrombina fue purificado del veneno de *Echis carinatus*, siendo este sensible a EDTA. (Rhee y cols, 1982).

2.5 Proteinazas que modifican el sistema de complemento.

Las proteinazas presentes en los venenos de serpientes pueden modificar el sistema de complemento de 3 maneras conocidas :

- a)Activando la via alterna del complemento.
- b)Hidrolizando algunos componentes del complemento.
- c)Incrementando la actividad hemolitica dependiente de anticuerros.

La primera actividad ha sido estudiada principalmente en venenos de serpientes del genero *Naja*, siendo la responsable una glucoproteina llamada factor de veneno de cobra. Esta actua como un analogo del tercer factor del

complemento: (C 3), el cual, al asociarse con el factor B forma un complejo enzimático muy activo, consumiendo los componentes terminales del complemento por medio de la vía alterna. En el veneno de *Crotalus atrox* se ha identificado una proteína de 125 kdal que está inmunológicamente relacionada con el factor de veneno de cobra y con el componente C 3 de serpientes (Minta y Man, 1980).

La segunda actividad, la destrucción de factores del complemento, ha sido documentada en el veneno de *Crotalus atrox*, reportándose la purificación de 4 componentes "anticomplementarios" con actividad proteolítica, teniendo pesos moleculares de 12 500, 14 500, 20 000 y 60 000, siendo tres de ellos inhibidos por EDTA (Man y Minta, 1977).

Por último, el aumento de la actividad hemolítica dependiente de anticuerpos ha sido descrita en *Crotalus scutulatus scutulatus* (Rathburn, 1982) pero no se ha reportado el aislamiento de el o los factores responsables.

2.6 Proteinasas que degradan elastina y colágena.

La presencia en venenos de proteinasas que degradan las proteínas estructurales elastina y colágena está bien documentada (Perez-Tamayo, 1978, pag.523; Simpson, 1971; Simpson y Rider, 1975; Bendick y Simpson, 1976). La asignación del nombre colagenasa a la proteinasa responsable de la degradación de colágena presente en venenos de serpientes está aun en discusión. Algunos autores como Iwanaga y Suzuki (1979) opinan que la enzima degradada

otras enzimas además de colagena nativa y por tanto no es una verdadera colagenasa. Otros autores, como Werb y cols. (1976) y Perez-Tamayo (1978) consideran a estas enzimas como colagenasas de menor especificidad.

Como quiera que sea, estas degradan colagena nativa en condiciones fisiológicas de pH, temperatura y concentración de sales: son metaloenzimas y son inhibidas por los mismos compuestos que las "verdaderas colagenasas" presentes en mamíferos.

También se ha demostrado la capacidad de ciertos venenos de degradar fibras de elastina, utilizando como sustrato fragmentos de aorta de rata (Bernick y Simpson, 1976). Dichos estudios han sido realizados con veneno sin fraccionar y, hasta donde se sabe, las enzimas responsables de ambas actividades no han sido purificadas.

2.7. Proteinazas inespecíficas.

Con este nombre se conoce a un grupo de proteinazas cuya actividad enzimática no está asociada con algún sustrato fisiológicamente importante, sino que han sido caracterizadas utilizando sustratos generales como caseína y hemoglobina. En general, los venenos de elaridos carecen de este tipo de actividad aun cuando algunos poseen actividad peptidásica.

Las proteinazas mencionadas tienen como características comunes ser metaloenzimas, con una especificidad dirigida

hacia residuos hidrofobicos como leucina y fenilalanina. La remocion del zinc causa una perdida de la actividad proteolitica y en algunos casos, desnaturalizacion irreversible de la misma. El pH optimo de ellas se encuentra en el rango alcalino.

Se han aislado proteinasas del veneno de diversas serpientes como *Akistrodon halys blomhoffi* (Oshima y cols. 1968), *A. piscivorus leucostoma* (Waener y cols. 1968) *Trimmesurus flavoviridis* (Takahashi y Ohsaka, 1970)b, *Vipera russelli* (Dimitrov, 1971), *Bitis arietans* (Van der Walt y Joubert, 1971) y *Crotalus atrox* (Pfleiderer y Sumyk, 1961).

Al revisar el tema, Iwanasa y Suzuki (1979) comentan que la multiplicidad de formas puede deberse a la degradacion proteolitica de otra proteina de mayor peso molecular y / o una microheterogeneidad causada por la glucosilacion de las proteinasas.

2.8 Proteinazas involucradas en fibrinogenolisis y fibrinolisis.

Dentro de los componentes poco estudiados de los venenos de crotalinos se encuentran los anticoagulantes y los deocoagulantes. Las proteinasas anticoagulantes degradan selectivamente alguna o ambas cadenas del fibrinogeno, impidiendo su posterior polimerizacion. Las proteinasas deocoagulantes atacan a la fibrina polimerizada permitiendo la disolucion del coagulo.

Las fibrinogenasas de *Trimacrusurus mucrosquamatus* (Ouvans y cols. 1977) y de *T. spaminus* (Ouvans y Huana, 1977) han sido aisladas y purificadas. Son proteínas de aproximadamente 200 residuos de aminoácidos y por la cadena de fibrinogeno que degradan han sido llamadas alfa y beta fibrinogenasas.

Las alfa fibrinogenasas son termosensibles, inhibidas por EDTA y cisteína y no poseen actividad contra ésteres de arginina. Las beta fibrinogenasas son relativamente termoestables, inhibidas por PMSF y poseen una potente actividad esterásica. La tripsina y la plasmina degradan también el fibrinogeno, aunque atacan las cadenas alfa, beta y aun la gamma.

La enzima responsable de la degradación de fibrina de *Aekistrodon acutus* fue purificada, encontrándose una metaloproteínasa de 208 residuos de aminoácidos, peso molecular de 23 920, pH óptimo de 7.4, inhibida por EDTA y cisteína (Ouvans y Huana, 1976 y 1977).

Más recientemente se ha trabajado con veneno de *Aekistrodon c. contortrix*, *A. s. piscivorus*, *Bitis gabonica*, *Crotalus adamanteus*, *C. atrox* y *C. viridis helleri* (Bajwa y cols. 1980, 1981 y 1982) identificando la presencia de factores fibrinolíticos en el veneno de estas serpientes pero sin publicar su purificación o su caracterización.

C : OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO Y SU JUSTIFICACION.

La serpiente de cascabel de cola negra, *Crotalus molossus nigrescens* (Gloyd) 1936, está ampliamente distribuida en México. Se sabe que su conducta no es agresiva. Aparentemente no constituye un problema de salud en el país. Además, como sucede con casi toda la fauna venenosa de la República, muy poco ha sido estudiado acerca de la composición molecular de su veneno. Esta especie, en particular, no ha sido estudiada bioquímicamente. Solo existe un reporte clínico que sugiere que la actividad fibrinolítica de este veneno es más prominente que el veneno de otros crotalinos (Hardy y cols, 1962).

Por esta razón, entre los principales objetivos de esta tesis está la caracterización bioquímica del veneno soluble de la serpiente de cascabel de cola negra. Se describe la estrategia desarrollada para la purificación de cuatro proteinasas. Estas enzimas proteolíticas fueron estudiadas en relación a su estructura química, su actividad enzimática y sus propiedades biológicas.

El conocimiento bioquímico de estas enzimas tiene una importancia académica que justifica el presente trabajo, puesto que contribuye a la descripción de las estructuras moleculares y al entendimiento de los mecanismos de acción de los venenos que causan toxicidad y daño tisular a las víctimas atacadas por animales venenosos.

También podemos mencionar que algunas enzimas

proteolíticas obtenidas del veneno de serpientes tienen importancia médica en el tratamiento de enfermedades tromboembólicas (Stoker y cols, 1982). Además, se han usado como herramientas en la identificación de la estructura primaria de proteínas y han sido utilizadas para la elucidación de ciertos eventos moleculares en los que se requiere un procesamiento proteolítico.

Se sugiere la utilización de las proteinasas caracterizadas en este trabajo para estudios futuros.

II. MATERIALES Y METODOS

A. Obtención del veneno.

El veneno fue obtenido por estimulación mecánica de las glándulas venenosas de varios ejemplares adultos de *Crotalus molossus nigrescens* colectados en el Valle de México (ver Arradecimientos). Este líquido fue clarificado por centrifugación y el sobrenadante fue liofilizado. El polvo obtenido fue almacenado a -20°C hasta el momento de su utilización.

Este veneno liofilizado fue pesado y disuelto en solución amortiguadora de fosfatos de sodio, 5 mM a pH de 5.5, centrifugado 15 minutos a $21\,000 \times g$ y el sobrenadante procesado inmediatamente. A menos que se especifique lo contrario, todo el manejo del veneno y sus fracciones fue realizado a 4°C , incluyendo las separaciones cromatográficas.

B. Separaciones cromatográficas.

La cromatografía por filtración en gel fue realizada utilizando gel de Sephadex G-75 (Farmacia) hidratado y empacado de acuerdo a las instrucciones del fabricante en una columna de 2.5×200 cm en solución amortiguadora de fosfatos de sodio, 5 mM a pH 5.5 y eluido a presión constante usando un reservorio de Mariotte.

Las cromatografías de intercambio iónico se realizaron

en Dietil-amino-etil-celulosa (DEAE-Celulosa) microgranular tipo DE-32 (Whatman) procesada previamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente la resina fue empacada en columnas de 0.9 x 30 cm bajo 1 atmósfera de presión de nitrógeno.

Los amortiguadores usados fueron de tris-(hidroximetil)-amino metano (TRIS) (Merck) a una concentración 20 mM ajustando el pH a 7.6 y 8.9 con HCl concentrado. El flujo del eluyente en estas columnas fue regulado con una bomba de pistón marca MILTON ROY modelo Mini-Pump y fue de 30 ml por hora. La presión fue vigilada durante las corridas y las columnas se reemplazaban cuando la presión excedía los 3.5 kilogramos por centímetro cuadrado.

Las proteínas fueron eluidas mediante diversos gradientes lineales de Cloruro de Sodio, formados por dos vasos comunicantes iguales. La conductividad fue medida en las fracciones usando un conductímetro marca Radiometer, modelo CDM 2 d.

Las fracciones cromatográficas fueron recogidas mediante un colector marca LKB modelo Ultrarac 7000 y su absorbencia determinada durante la corrida con un detector Uvicord II (LKB) a 277 nm. En la mayoría de los tipos colectados, su absorbencia a 280 nm fue medida utilizando un espectrofotómetro ZEISS modelo PMW 11.

Las fracciones fueron dializadas usando membrana

Espectrógrafo 3 (límite de exclusión aproximado de 3 500 Mr) contra 50 volúmenes de solución de amortiguador, cambiando este cada 30 minutos, por 4 o 5 veces.

C) Pruebas Electroforéticas e Inmunológicas.

La pureza de las fracciones fue monitoreada mediante la técnica de electroforesis discontinua en gel de poli(acrilamida) en placas de 7 x 5 x 0.2 cm. Se utilizaron dos tipos:

- 1) En condiciones nativas, al 7.5 % de acrilamida a pH de 8.3 según Jovin y cols., 1964.
- 2) En presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.1%, en acrilamida al 12.5 % y en presencia y ausencia de 2-mercaptoetanol según Laemmli, 1970.

Las fracciones de bajo peso molecular fueron analizadas mediante la técnica de mapeo de péptidos, es decir, cromatografía y electroforesis combinadas en placas de celulosa (Eastman), descritas por Fossani y cols. (1980).

Se realizaron inmunodifusiones en agarosa 1 % en TRIS-HCl, pH 8.0 (Bio-Rad), utilizando antisuero polivalente anti víperino comercial, sujeto a digestión proteolítica controlada (MNH, lote V-78004).

D) Determinaciones de actividad enzimática.

La actividad proteolítica fue medida utilizando el sustrato insoluble Hide Powder Azure (Calbiochem),

incluyendo algunas modificaciones al método descrito originalmente por Steyn y Delaierre (1974), las cuales consistieron en disminuir la cantidad de sustrato (a 5 mg) y del volumen de la reacción (a 1 ml). Se definió una unidad de actividad proteolítica (U.P.) como la cantidad de enzima que causa el aumento de una unidad de absorbencia a 595 nm por minuto en el sobrenadante de la reacción, en las condiciones antes mencionadas (TRIS-HCl 0.1 M, pH 7.95) (Kureki y cols. 1978).

La actividad esterasica de las fracciones fue medida espectrofotométricamente utilizando el método descrito originalmente para tripsina de Schwert y Eisenberg citado en Wirck (1965). Para estas determinaciones se empleó un espectrofotómetro marca Gilford modelo 222 con un graficador acoplado. El sustrato utilizado fue el N-benzoil-arginina etil ester (Sigma) y se definió una unidad de actividad esterasica como la cantidad de enzima que hidroliza una micromol de sustrato por minuto, a un pH de 7.95 y con una concentración de sustrato 1 mM. Para todas las determinaciones enzimáticas, se cuidó que las reacciones se encontraran en su velocidad inicial.

Se probaron diversos inhibidores de proteasas:

- | | | | |
|-----|-------------------------------|---------|------|
| 1 : | Fenilmetil sulfonyl fluoruro | (Sigma) | 2 mM |
| 2 : | Para-amino benzamida | (Sigma) | 2 mM |
| 3 : | Acido -aminocaproico | (Sigma) | 1.0% |
| 4 : | Inhibidor de tripsina de soya | (Sigma) | 1.0% |

5 : L - Cisteína	(Calbiochem)	2 ml
6 : Ac Iodoacético	(Sigma)	2 ml
7 : N-etil maleimida	(Sigma)	2 ml
8 : Ac.Etilendiamin tetraacético	(Sigma)	2 ml
9 : o-fenantrolina	(Merck)	2 ml

Los inhibidores fueron preparados antes de usarse, disolviéndose la mayoría en amortiguador fosfatos 0.01 M, pH 8.0, excepto PMSF en butanol 5% en agua, N-etil maleimida en fosfatos 0.01 M, pH 6.0, ácido iodoacético en NaOH 0.1 N y o-fenantrolina en 50% metanol en fosfatos 0.01 M, pH 8.0. Las enzimas fueron incubadas en presencia de los inhibidores a las concentraciones finales indicadas arriba, a 37.C por una hora y su actividad ensayada inmediatamente después.

La actividad colagenolítica fue identificada de acuerdo a Dehm y cols.1974. Las enzimas fueron incubadas con colágena nativa, obtenida según Masso, método modificado de Rokkind (1979) (ver Agradecimientos). La digestión se llevó a cabo en amortiguador TRIS-HCl pH 7.6 a 37 .C por 18 horas, en presencia o ausencia de o-fenantrolina. La reacción fue terminada hirviendo 15 minutos y la degradación de la colágena fue identificada mediante electroforesis discontinua en geles de acrilamida al 6%, 0.1% SDS y 0.1 M de urea.

Las actividades coagulante de fibrinogeno, fibrinolítica y de activador de Plasminogeno fueron determinadas de acuerdo a Granelli-Pierno y Reich (1978).

Los sustratos utilizados fueron fibrinogeno bovino, 75 % de proteina coagulable (fraccion I de Sigma) y fibrinogeno, (fraccion I de Sigma) purificado segun Laki, 1951 y Mosesson, (1962) a mas del 95 % de la proteina coagulable, libre de plasminogeno (ver Agradecimientos). Para la obtencion de sales de fibrina comercial y fibrina purificada, se anadieron 0.4 unidades de trombina humana (Sigma) a la solucion de fibrinogeno.

La actividad de fosfolipasa fue medida titulometricamente de acuerdo a Shiloah y cols. (1973), la de desoxirribonucleasa, una tecnica espectrofotometrica, de acuerdo a Kunitz (1950) y el ensayo de hialuronidasa por el metodo turbidimetrico de Tolksdorf (1949). Las enzimas acetilcolinesterasa, fosfatasa, fosfodiesterasa, ribonucleasa y tirosina ester hidrolasa fueron medidas empleando los metodos recopilados por Bergmeyer, (1965).

E) Bioensayos.

Las pruebas de toxicidad fueron realizadas en ratones de cepa local mexicana, mediante la inyeccion intraperitoneal del veneno o sus fracciones. Para la determinacion de la dosis letal media (LD 50) fueron usadas 10 dosis de veneno (de 5 a 100 μ g de veneno por 20 g de raton), empleandose 10 animales para cada dosis. Las pruebas de hemorragia fueron llevadas a cabo inyectando por via intradermica las fracciones o las enzimas puras y observando las lesiones producidas 12 horas despues. Metodo modificado de Kondo.

cols. citado en Ohsaka, 1979).

F) Composición química de las proteinasas.

Los análisis de aminoácidos fueron realizados en HCl 6 N (Pierce) 0.5 % de fenol v/v (Baker), sellados a una presión menor a 25 mTorr e hidrolizados por 20, 48 y 72 horas a 110.0 según Moore y Stein, 1963. La cisteína fue oxidada con ácido performico para cuantificarla como ácido cisteico según Moore, 1963. La determinación de triptofano se llevó a cabo mediante hidrólisis con ácido mercaptoetanesulfónico 3 N (Pierce) según Penke y cols, 1974.

Las cuantificaciones se realizaron en un analizador de aminoácidos marca Durrum modelo D-500 Mark 1 (Ver Agradecimientos). Las áreas reportadas fueron integradas en una microcomputadora Apple II plus (ver Agradecimientos) en base a estándares de aminoácidos (Beckman), usando un promedio de 4 ensayos. Para todas las determinaciones se emplearon entre 8 y 15 microgramos de proteína. Paralelamente se hidrolizó lisozima pura (Sigma) como control, estimándose una precisión del 3% para una determinación.

Con el fin de eliminar la contaminación de TRIS que no fue removida por la diálisis y que interfería en la cuantificación de histidina de las preparaciones homogéneas de las proteinasas, algunos análisis fueron realizados con muestras previamente cromatografiadas en Bio Gel P-30 (BioRad) en una columna de 0.7 x 25 cm en amortiguador de acetato de amonio 0.1 M, pH 7.0 con NaCl 0.16 M. Los

valores de treonina y serina fueron extrapolados a tiempo inicial de hidrólisis y los de valina e isoleucina fueron estimados utilizando el máximo valor obtenido de los análisis a 20, 48 y 72 horas.

G) Comparación estadística de las composiciones de aminoácidos.

La comparación estadística de las 4 proteínas y 46 proteínas fue realizada calculando el coeficiente de diferencia S_n , desarrollado por Cornish-Bowden, 1978 y definido como:

$$S_n = 1/2 \left(\frac{n_i}{A} - \frac{n_i}{B} \right) - 0.035 (NA - NB) + 0.535 \frac{NA - NB}{N}$$

donde:

n_i = El número de residuos del aminoácido i en la proteína A.

n_i = El número de residuos del aminoácido i en la proteína B.

NA = El total de aminoácidos de la proteína A.

NB = El total de aminoácidos de la proteína B.

Se desarrolló un programa para calcular el coeficiente mencionado usando una microcomputadora Apple II Plus (ver Agradecimientos) y se lista en el apéndice I.

La interpretación de los cálculos se realizó de la siguiente manera, sugerida por Cornish-Bowden (1981):

Cada pareja de proteínas probablemente están relacionadas si $S_n < 0.42 N$; la evidencia no es conclusiva si $0.42 N < S_n < 0.93 N$; y probablemente no lo estén si $S_n > 0.93 N$.

H) Determinación de la secuencia de aminoácidos.

Las proteinasas 1 y 2 fueron reducidas y carboximetiladas según Crestfield y cols. (1963). En el caso de las proteinasas 3 y 4, como alternativa a la alquilación con ácido iodoacético, se empleó la vinilpiridilación con 2-vinilpiridina como fue descrito por Possani y cols. (1981). Posteriormente las muestras fueron dializadas, liofilizadas y almacenadas a -20°C . La degradación secuencial de aminoácidos se realizó de acuerdo a Edman y Berg (1967) en un secuenciador marca Beckman 890 C (ver Agradecimientos) utilizando el programa para muestras proteicas N. 122974 (Beckman). Las fracciones así obtenidas se identificaron en un cromatograma líquido de alta presión marca Hewlett Packard modelo 1084 A.

G) Cromatografía de afinidad.

El inhibidor de proteinasas para-amino benzamida fue inmovilizado a un soporte de agarosa, a través de un brazo espaciador de 6 átomos de carbono.

A 80 ml de Sepharosa 4 B (Pharmacia) en 80 ml de agua, se le añadieron 8 gramos de bromuro cianogéneo (Merck), manteniendo el pH de la suspensión a 11.0 con NaOH 5 N. Esta resina se lavó con bicarbonato de sodio 0.1 N, pH 9.0 y se le añadieron 1.2 g de ácido -amino caproico. Después de 3 horas de incubación a temperatura ambiente, se lavó la resina con agua y con amortiguador de cacodilato 0.1M a un pH de 4.75. Para finalizar, se añadieron a la mezcla 400 mg

de p-amino benzamida (Sigma) y 4 g de 1-etil-3 (3-dimetil-aminopropil) carbodimida HCl (Sigma). Esta mezcla se incubó toda la noche, se lavó y equilibró con un amortiguador TRIS-HCl 0.1 M, 0.2 M NaCl, pH 8.0.

RESULTADOS

A. Caracterización general del Veneno.

1. Solubilidad y estabilidad del veneno.

El veneno fresco al ser colectado, tiene un aspecto opalino, dado por la presencia de partículas en suspensión, las cuales son removidas fácilmente por centrifugación. El material sedimentado se estima en un 10 % del peso del veneno fresco. Al disolver el veneno liofilizado es necesario recentrifugar la solución para eliminar una pequeña cantidad de precipitado presente. (aproximadamente 1 %).

La solubilidad del veneno fue estimada al medir el aumento de la absorbencia a 660 nm causado por la presencia de sólidos en suspensión. La solubilidad del veneno disminuye a valores de pH ácidos y este no llega a disolverse completamente a pH de 8.0, el más alto valor probado. La concentración de veneno fue de 6.2 mg/ml. (Ver figura # 3).

El veneno soluble (1 mg/ml) fue incubado a 4 valores de pH entre 4.7 y 8.0, a una temperatura de 4.0 hasta por 19 horas. La actividad proteolítica remanente fue medida a diferentes tiempos (ver tabla # 2). Se observó que a las 19 horas hay un ligero descenso de la actividad proteolítica entre el 20 y el 30 %. La disminución es más acentuada cuando el pH es de 4.7.

2. Toxicidad.

La Dosis letal media fue estimada en 47 μ g de veneno por 20 gramos de ratón.

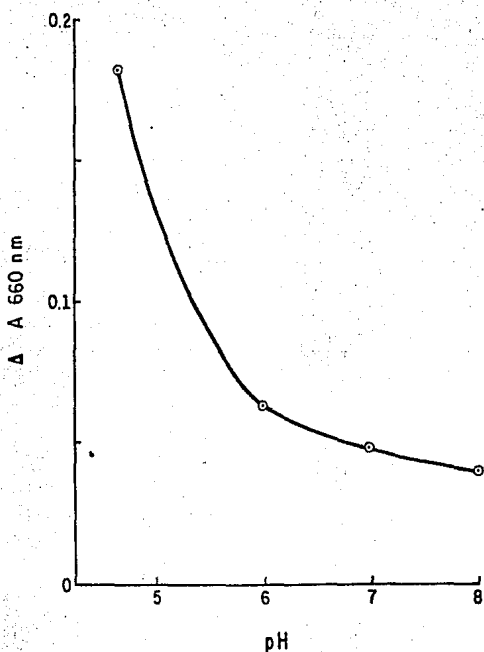


Fig. 3. Solubilidad del veneno en función del pH.

Veneno liofilizado fue resuspendido en amortiguadores de acetato de amonio y de fosfato de sodio a los valores de pH indicados (Concentración de veneno = 6.2 mg / ml). Después de una hora, se midió la variación de absorbencia a 660 nm.

Ratones inyectados con 50 a 100 μ g del veneno soluble presentan una conducta de inmovilidad, que es opuesta a la observada en animales inoculados con otros venenos, como el de alacran, que presentan una conducta excitada. A la necropsia, todo el contenido de la cavidad abdominal se

TABLA # 2

Efecto de la incubación del veneno
a diferentes valores de pH.

Tiempo, de incubación	pH			
	4.7	6.0	7.0	8.0
0	0.068	0.073	0.072*	0.070
1 hora	0.066	0.072*	0.075	0.069
3 horas	0.058	0.066	0.066	0.064
19 horas	0.049	0.053	0.056	0.056
% de actividad perdida (19 hrs)	28	27	22	20

Actividad expresada en Unidades de Proteasa por μ g de proteína.

La concentración del veneno fue de 1 mg por ml.

Promedio de 2 experimentos independientes.

La variación obtenida fue del orden de 3 %. En dos casos excepcionales llegó al 10 % (*)

encontró con zonas hemorrágicas diseminadas, además, estaba presente un líquido sanguinolento.

Los datos de toxicidad de las fracciones cromatográficas serán presentados en la sección A.4.

3. Actividades enzimáticas del veneno.

En el veneno soluble se encontraron las siguientes actividades: hidrolasa de ésteres de arginina, desoxirri-

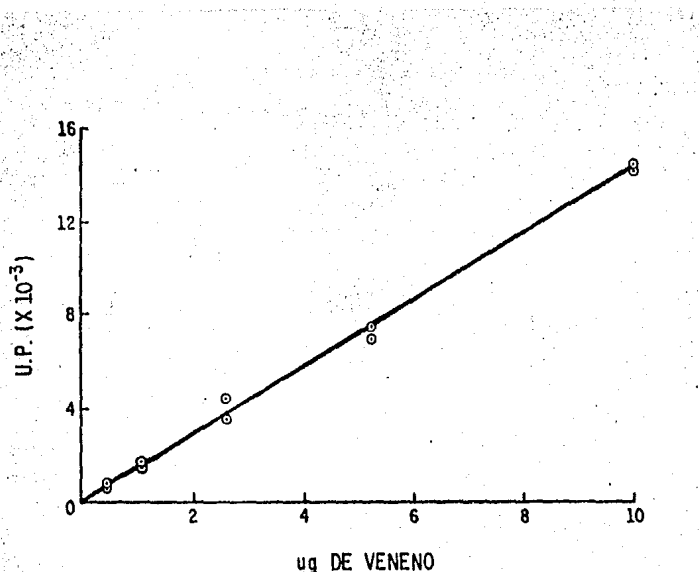


Fig. 4. Linealidad del ensayo de actividad proteolítica.

Se utilizaron 5 mg del sustrato insoluble Azure, suspendidos en 700 ul de amortiguador TRIS-HCl 0.1 M, pH 7.95. El veneno soluble (las cantidades indicadas, en 100 ul de amortiguador) fueron añadidas, incubadas 1 hora bajo agitación constante y centrifugadas.

U.P. significa Unidades de Actividad Proteolítica.

benucleasa, fosfodiesterasa, fosfolipasa y proteinasa. Sin embargo, otras actividades no fueron detectadas utilizando hasta 50 microgramos de veneno. Estas actividades fueron acetilcolinesterasa, amilasa, hialuronidasa, fosfatasa, ribonucleasa y hidrolasa de ésteres de tirosina.

Se determinó el intervalo en que existe una relación lineal entre el cambio de absorbencia y la concentración de las enzimas en la reacción. Para el ensayo de proteasas, la actividad es lineal entre 0.083 y 15 U.P., correspondientes a 0.05 y 10 microgramos de veneno por ml. Para el ensayo de la ester hidrolasa, la actividad es lineal entre 0.30 y 9.3 U. E., correspondientes a 0.04 y 5.5 microgramos de veneno soluble.

Se midió la dependencia de la actividad proteolítica en función del pH en el rango de 4.7 a 9.0, encontrándose una mayor actividad en los valores alcalinos (Ver figura # 5).

El veneno soluble, así como las fracciones I, II y III fueron incubadas con PMSF y *o*-fenantrolina (1 y 5 mM respectivamente, concentraciones diferentes a las descritas en Materiales y Métodos), diluidas y ensayadas para actividad proteolítica. Los resultados se muestran a continuación y están expresados como porcentaje de actividad remanente respecto al control.

Inhibidor	Veneno	Fracc I	Fracc II	Fracc III
-----	100	100	100	100
PMSF	90	81	78	96
<i>o</i> -fenantrolina	1	3	24	17

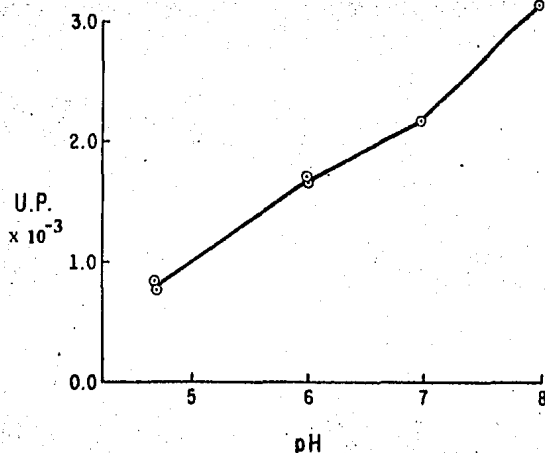


Fig. 5. Actividad proteolítica del veneno soluble en función del pH. Veneno soluble (5 µg) fue ensayado para actividad proteolítica con Azura en las mismas condiciones que en la figura 4. Los amortiguadores empleados fueron acetato de amonio para pH 4.7 y fosfato de sodio para pH 6.0, 7.0 y 7.95, todos a una concentración de 0.1 M.

U. P. = Unidades de Actividad Proteolítica.

4. Cromatografía y electroforesis preliminares.

El veneno soluble aplicado en gel de poliacrilamida separa por lo menos, 18 componentes que se muestran en la figura # 6. De estos, los números 1, 2, 7, 9, 10, 14 y 17 dan bandas fuertes, los números 3, 4, 5, 8, 11, 12, 16 y 18 son de mediana intensidad y los números 6, 13 y 15 son bandas débiles.

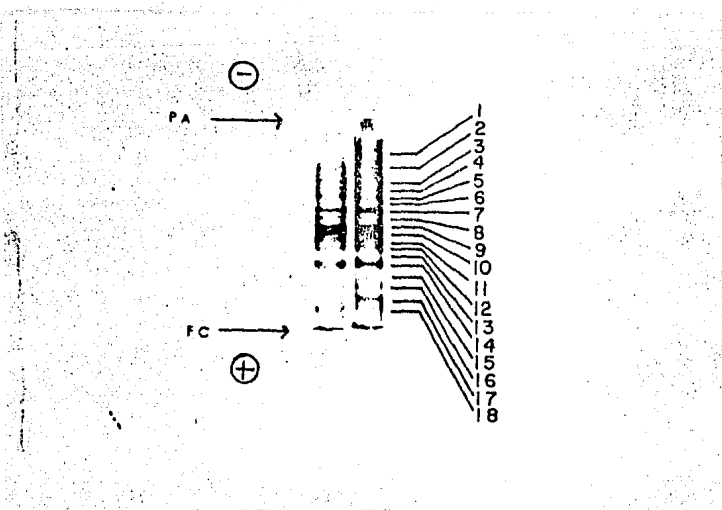


Fig. 6. Electroforesis del veneno soluble.

Veneno soluble de *C. molossus nivescens* fue sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida, según Jovin y cols., 1964. (gel iza. = 100 us. gel den. = 200 us de proteína).
 F.C.=Frente de migración del colorante. P.A.= Punto de aplicación.

El perfil cromatográfico obtenido del veneno soluble en Sephadex G-75, eluido a temperatura ambiente se muestra en la figura # 7. En ella también se indica la posición de varios marcadores proteínicos, la posición de las actividades de fosfodiesterasa y desoxirribonucleasa, y los perfiles de actividad fosfolifásica y proteásica. Todas las actividades enzimáticas medidas y los componentes letales se encuentran en las fracciones I, II y III.

La actividad de fosfodiesterasa se encontró en la fracción I, la de desoxirribonucleasa entre las fracciones I y II, la de fosfolifasa en la fracción II y las de proteasa y arginina esterasa en las fracciones I, II y III.

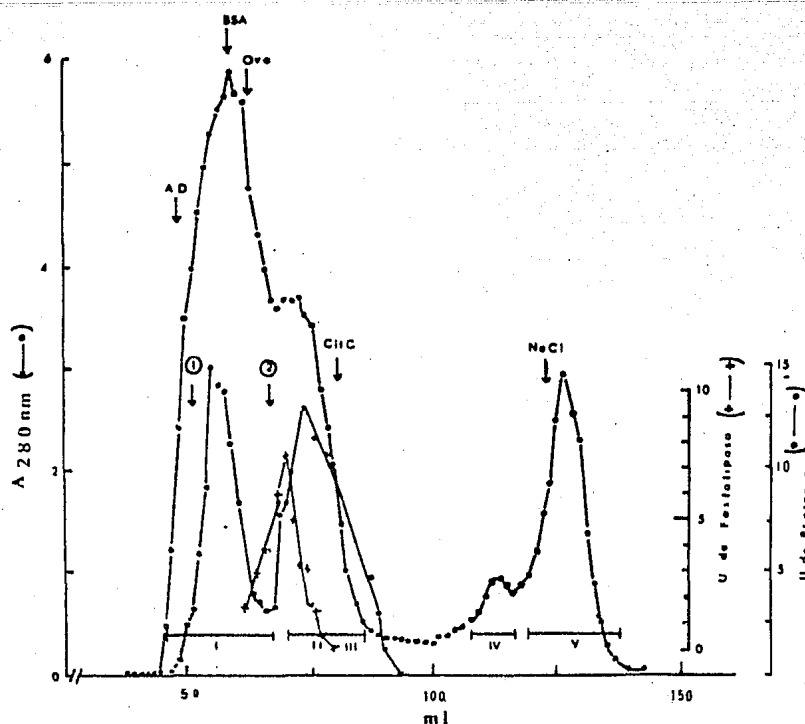


Fig. 7. Cromatografía inicial por filtración en gel.

200 ms de veneno soluble (1.4 ml) fueron aplicados a una columna de Sephadex G-75, en amortiguador de fosfato de sodio 2 mM, pH 7.0 a temperatura ambiente. (flujo=16 ml/hr). Los tubos colectados (1.4 ml) se mezclaron como lo indican las líneas horizontales. 1 indica la presencia de actividad de fosfodiesterasa y 2 la de desoxirribonucleasa. Se emplearon Azul de Dextrán (AD), Albumina Bovina (BSA), Ovalbumina (OVA), Citocromo C (CIT C) y NaCl como marcadores de peso molecular, en una corrida previa.

Las fracciones I, II y III obtenidas de la cromatografía en gel de Sephadex G-75, tanto las mencionadas en la sección A.4 como en la E.1, causaban la muerte de ratones con los

mismos datos que el veneno soluble. Las fracciones IV y V, en dosis de hasta 400 microgramos por 20 gramos, no causaron alteraciones observables en los animales inoculados. Las fracciones IV y V, de bajo peso molecular, están constituidas de péptidos que no son visibles en los sistemas de electroforesis normales, pero si se detectan en sistemas como el mapeo de péptidos. En la figura 8 se muestra el

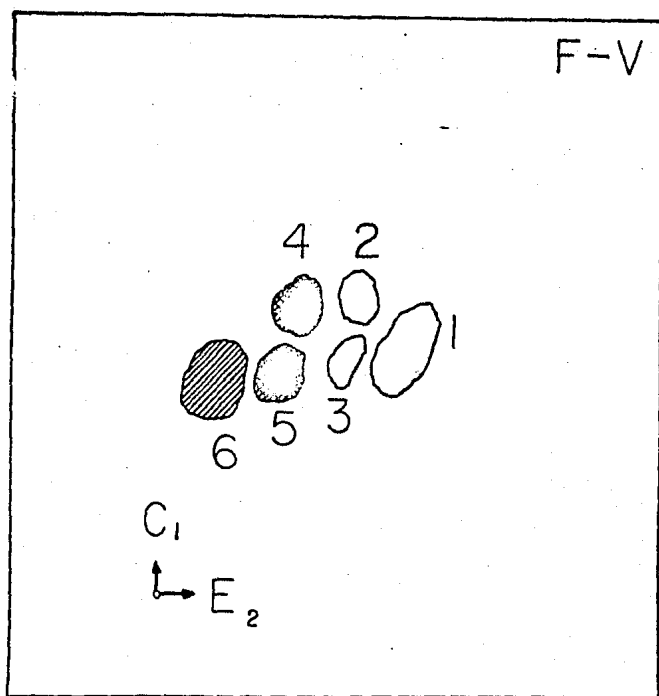


Fig. 8. Mapa de péptidos de la fracción V. La fracción V, obtenida por filtración en gel fueron disueltos en NH_4OH 0.1 M, aplicados (10 μl) en una placa de celulosa y sometidos a cromatografía (C_1) en butanol:piridina:ácido acético:agua (15:10:3:12). Terminada esta se realizó electroforesis (E_2) (450V, 15 mA, 80 min) y se reveló con ninhidrina.

TABLA # 3

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LOS PEPTIDOS
PRESENTES EN LA FRACCION V .

	PEPTIDO #				
	1	2	3	4	5
ASX	3	2	3	5	3
TRE	2	0	1	1	1
SER	6	3	5	3	2
GLX	6	3	4	29	20
PRO	N.D.	N.D.	4	7	4
GLI	13	4	6	6	3
ALA	4	1	2	2	1
VAL	1	0	1	1	1
MET	1	0	0	0	0
ILE	1	0	1	1	1
LEU	2	1	1	1	1
TIR	2	1	1	3	2
FEN	3	1	1	1	0
HIS	5	3	6	2	1
LIS	5	1	2	15	10
ARG	5	1	2	9	7
TOTAL	59	21	40	86	57

Analisis realizados del mapa de peptidos mostrado en la figura 8
Muestras hidrolizadas por 20 horas en HCl 6 N a 110 °C.

esquema de la fracción V sometida a esta técnica, identificándose 6 péptidos revelados por ninhidrina. De estos 6 péptidos, se determinó la composición de aminoácidos de 5 de ellos, estando compuestos de 59, 21, 40, 86 y 57 residuos de aminoácidos, respectivamente (ver tabla 3).

Tomando en cuenta los resultados antes referidos, así como la abundancia de enzimas proteolíticas en el veneno, se decidió iniciar la purificación del veneno en las siguientes condiciones: pH 5.5, en amortiguador de fosfatos 5 mM, a 4 °C y minimizando el tiempo empleado en el proceso de purificación.

B. Purificación de las Proteinerasas.

1. Separaciones cromatográficas.

La filtración en gel de Sephadex G-75 mencionada en la sección A.2 fue modificada a las condiciones mencionadas en Materiales y Métodos. En la figura # 9 se muestra el resultado de la cromatografía de un gramo de veneno liofilizado, donde se detectan 5 picos de proteínas, por lo menos. Las actividades proteolíticas y esterasicas se encuentran asociadas a las tres primeras fracciones. Siendo este perfil cromatográfico similar al obtenido en la sección A.2 se conservó la nomenclatura de las fracciones. La recuperación de la columna fue del 97 % en proteína (por U. de Absorbencia) y del 114 % en actividad proteolítica. La distribución de proteína y actividad proteolítica en esta cromatografía se muestra en la tabla # 4. En la figura # 9 también se muestra la electroforesis a pH 8.3 en condiciones

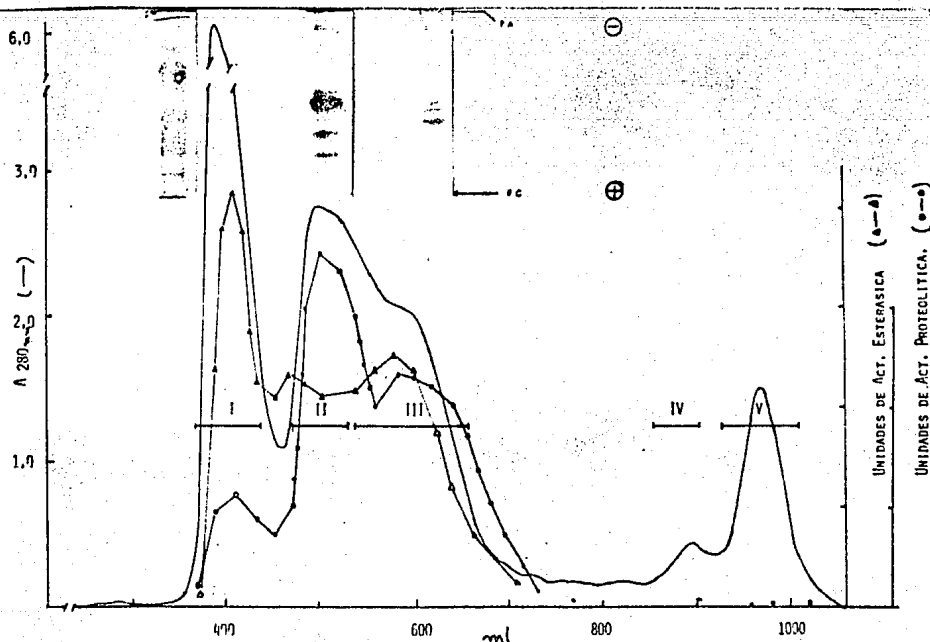


FIG 9. Cromatografía de filtración en gel del veneno soluble. Veneno liofilizado (1 gr) fue disuelto en 10 ml de amortiguador de fosfato de sodio 10 M, pH 5.5, centrifugado y aplicado a una columna de Sephadex G-75 (2.5 x 200 cm). Esta columna fue eluida con el mismo amortiguador a un flujo de 25 ml/hr. Los tubos se mezclaron como lo indican las líneas horizontales para dar las fracciones I a V. En el inserto se muestran electroforesis de las fracciones I, II y III (40 μg) en el sistema de Jovin y Cols (1964) como se muestra en la figura 6.

nativas de las fracciones I, II, III.

Las fracciones II y III del paso anterior, correspondientes al 20.8 y 29.6 %, respectivamente, en U. de Absorbancia, fueron sometidas a cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa a pH de 7.6, aluyendo las fracciones con un gradiente salino de 0 a 0.25 M de NaCl. En las figuras # 10 y 11 se muestran los resultados de estas, correspondiendo a las fracciones II y III. En la figura 10 se observa que el sistema cromatográfico resuelve 8 subfracciones, de las cuales las denominadas II.1, II.3 y II.8 presentaron la mayor actividad proteolítica. La figura 11 muestra la presencia de 9 subfracciones, estando la

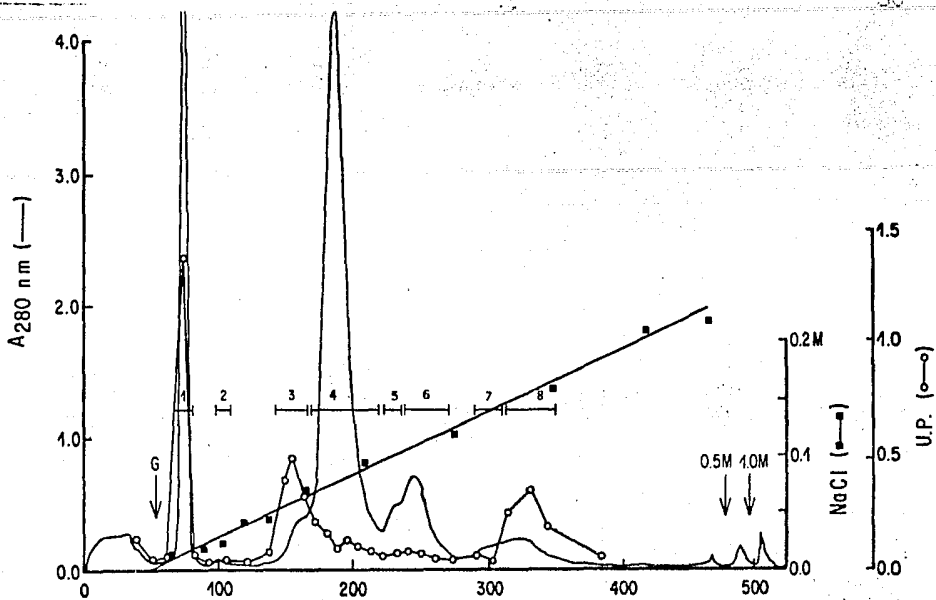


FIG. 10. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DE LA FRACCION II. 200 U. DE ABSORBENCIA (U.A.) DE LA FRACCION II DE G-75 FUERON APLICADOS A UNA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA (0.9 x 30 CM) EQUILIBRADA CON AMORTIGUADOR TRIS-HCl 20 M, PH 7.6. DICHA COLUMNA FUE ELUIDA CON UN GRADIENTE SALINO LINEAL (250 ML DE AMORTIGUADOR + 250 ML DE NaCl EN 0.25 M EN AMORTIGUADOR) A 40 ML/HORA DE FLUJO. LAS SUBFRACCIONES FUERON MEZCLADAS DE ACUERDO A LAS BARRAS HORIZONTALES. U.P. SIGNIFICA UNIDADES DE PROTEINASA.

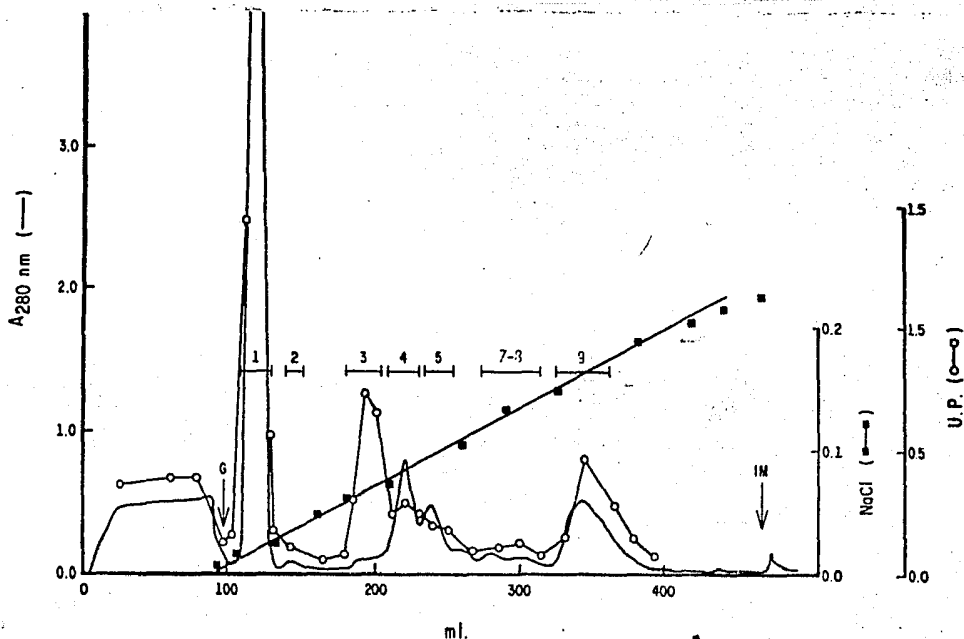


FIG. 11. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DE LA FRACCION III. LA FRACCION III DE G-75 (150 U. A.) FUERON APLICADOS A UNA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA (0.9x30 CM) EQUILIBRADA CON AMORTIGUADOR TRIS-HCl 20 M, PH 7.6. DICHA COLUMNA FUE ELUIDA CON UN GRADIENTE SALINO LINEAL (MISMAS CONDICIONES QUE EN LA FIGURA 10). LAS SUBFRACCIONES FUERON MEZCLADAS DE ACUERDO A LAS LINEAS HORIZONTALES. U.P. SIGNIFICA UNIDADES DE ACTIVIDAD PROTEINASA.

actividad proteolítica asociada a las III.1, III.3 y III.9.

La recuperación de la cromatografía de la fracción II (Fig 10) fue del 84 % en proteína (U.A., 280 nm) y del 11 % en actividad proteolítica; la recuperación de la fracción III (Fig 11) fue del 85 % en proteína (U.A., 280 nm) y del 61 % en actividad proteolítica. Tomando en cuenta la pérdida de actividad proteolítica después de la cromatografía en DEAE-Celulosa de la fracción II, solo se procesa la fracción III.

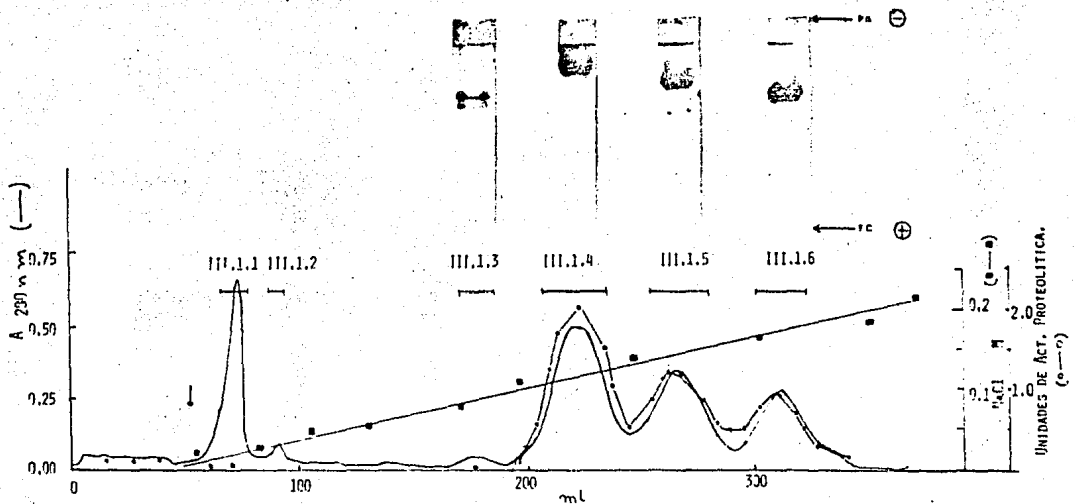


FIG. 12. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DE LA FRACCION III.1. LA FRACCION III.1 (80 U.A.) FUE APLICADA A UNA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA (0,9 x 30 CM) EQUILIBRADA EN AMORTIGUADOR TRIS-HCl 20 M, PH 8,9 Y ELUIDA CON UN GRADIENTE SALINO LINEAL DE 0 A 0,25 M DE HCl. 400 ML TOTALES A UN FLUJO DE 30 ML/HR. EN EL INSERTO SE MUESTRAN ELECTROFORESIS DE LAS FRACCIONES, MEZCLADAS DE ACUERDO A LAS LINEAS HORIZONTALES, EN EL MISMO SISTEMA Y CON LA NONECLATURA DE LA FIGURA 6.

Las fracciones III.1, III.3 y III.9, correspondientes al 37 % de la proteína (U. A., 280 nm) y al 84 % de la

actividad proteolítica recuperada fueron dializadas y sometidas a cromatografía en DEAE-Celulosa a pH 8.9. Aunque el pI íntimo de algunas de las enzimas presentes se encuentra cercano a este valor, fue la única condición en la que se logró separar satisfactoriamente a las proteínas. Los perfiles cromatográficos se muestran en las figuras # 12, 13 y 14. Un resumen del esquema de purificación se muestra en la tabla # 4.

Las fracciones III.1.4, III.1.6, III.3.2 y III.9.2 fueron procesadas independientemente. Con estos pasos cromatográficos, las proteínas se obtuvieron en forma homogénea como se describirá en el inciso 2.

Las fracciones arriba mencionadas fueron divididas en 2 lotes: el más pequeño, que consistió de 2 mg de proteína fue usado para la determinación de pureza, composición de aminoácidos y propiedades enzimáticas y biológicas. El segundo fue empleado para la determinación de la secuencia de aminoácidos. Este último, por su mayor volumen y cantidad fue sometido a una manipulación más extensa, esto es, se dializó exhaustivamente y se liofilizó.

2. Criterios de pureza.

La pureza de las fracciones III.1.4, III.1.6, III.3.2 y III.9.2 fue demostrada en las tres condiciones electroforéticas mencionadas en Materiales y Métodos, obteniéndose una sola banda en todos los experimentos, como se muestra en los insertos de las figuras 12 a 15. Para

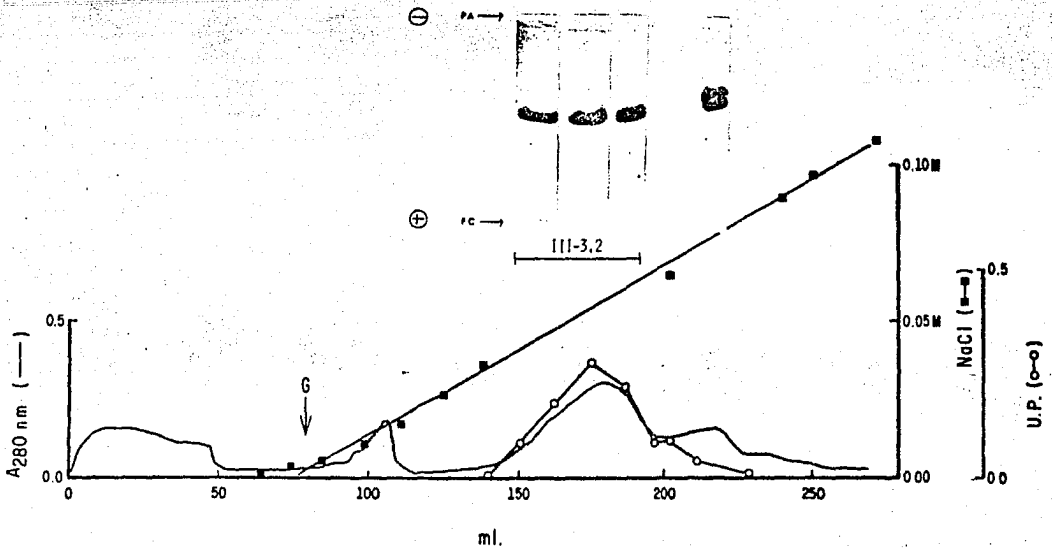


FIG. 13. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DE LA FRACCION III.3. LA FRACCION III.3 (5.7 U.A.) FUE CROMATOGRAFIADA EN CONDICIONES SIMILARES A LAS DE LA FIGURA 13, EXCEPTO QUE EL GRADIENTE FUE DE 0 A 0.15 M DE NaCl. EN EL INSERTO SE MUESTRA EL PATRON ELECTROFOPETICO DE LAS DIFERENTES REGIONES DEL CROMATOGRAMA (APROXIMADAMENTE 70 μg DE PROTEINA POR CARRIL), DE ACUERDO A LAS CONDICIONES SEÑALADAS EN LA FIGURA 6.

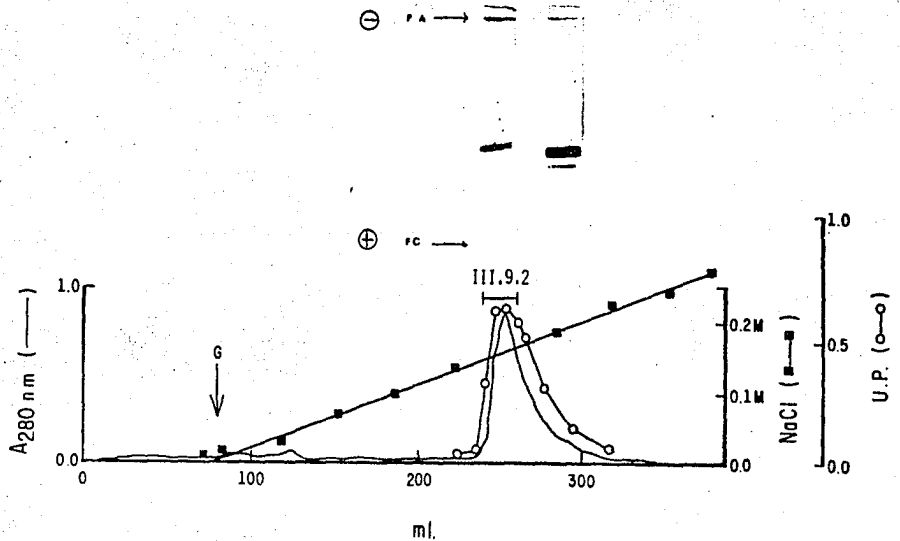


FIG. 14. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DE LA FRACCION III.9. LA FRACCION III.9 (30 U. A.) FUE CROMATOGRAFIADA EN CONDICIONES SIMILARES A LAS DE LA FIGURA 13, EXCEPTO QUE EL GRADIENTE FUE DE 0 A 0.27 M DE NaCl. EN EL INSERTO SE MUESTRA EL PATRON ELECTROFOPETICO DE 2 SUBFRACCIONES DEL CROMATOGRAMA (APROXIMADAMENTE 50 Y 70 μg DE PROTEINA), DE ACUERDO A LAS CONDICIONES SEÑALADAS EN LA FIGURA 6.

TABLA # 4

RESUMEN DE PURIFICACION DE LAS PROTEINASAS

FRACCION	PROTEINA (U.A.280nm)	PROTEINA (%)	ACTIVIDAD (en U.P.)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U.P./A ₂₈₀)	PROPORCION DE PURIFICACION
VENENO SOLUBLE	1087.0	100.0	240.7	0.221	1.0
SEPHADEX G-75 I	312.0	28.7	70.0	0.224	1.0
SEPHADEX G-75 II	226.0	20.8	106.3	0.470	2.1
SEPHADEX G-75 III	322.0	29.6	99.0	0.307	1.4
DEAE-C (pH 7.6) III.1	81.9	7.5	43.0	0.525	2.4
DEAE-C (pH 7.6) III.3	5.9	0.5	2.3	0.393	1.8
DEAE-C (pH 7.6) III.9	31.1	2.9	5.7	0.184	0.8
DEAE-C (pH 8.9) III.1.4	18.0	1.7	10.7	0.595	2.7
DEAE-C (pH 8.9) III.1.6	18.7	1.7	8.1	0.435	2.0
DEAE-C (pH 8.9) III.3.2	4.2	0.4	1.7	0.410	1.9
DEAE-C (pH 8.9) III.9.2	13.4	1.2	3.3	0.249	1.1

aplicaron alrededor de 70 μ g de cada proteína y para las electroforesis con SDS se utilizaron, por lo menos, 40 μ g de cada una. Tomando en cuenta la sensibilidad del método (0.5 μ g), es posible afirmar que cada proteinasa corresponde, por lo menos, al 98 o 99 % de la proteína presente en la solución.

Como criterio de pureza adicional, se mezclaron solo los tubos de los perfiles cromatográficos cuya actividad específica fuera constante.

Un tercer criterio de pureza fue obtenido por inmunodifusión en contra de un antisuero polivalente comercial. Este experimento reveló una sola línea de precipitación con cada proteinasa (ver figura 21). En la sección E.6 se presentaran otros datos derivados de este experimento.

En base a los resultados antes mencionados, las fracciones III.1.4, III.1.6, III.3.2 y III.9.2 se consideraron homogéneas y se denominaron proteinasas 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

C. Composición de las Proteinastas.

1. Determinación de pesos moleculares.

El peso molecular de las proteinastas 1, 2, 3, y 4 fue determinado por electroforesis en poliacrilamida con SDS y en presencia o ausencia de β -mercaptoetanol obteniéndose valores de 23 600, 22 800, 23 200 y 22 000 daltones.

respectivamente (ver figura 15).

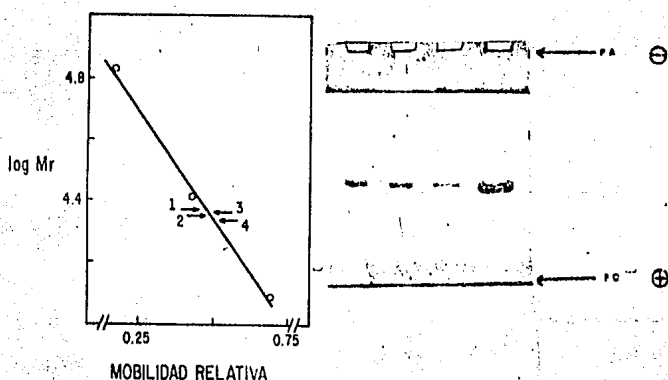


Fig. 15. Determinación del peso molecular de las proteinasas.

Gel de poliacrilamida (12.5%) en presencia de SDS y mercaptoetanol (Laemmli, 1971) de las proteinasas 1, 2 y 3 (15 μ s) y 4 (30 μ s). Paralelamente se aplicaron marcadores de peso molecular (Albumina bovina, quimotripsinogeno y lisozima).

2. Composición de aminoácidos.

Las proteinasas en solución fueron sometidas a diversas hidrólisis ácidas para determinar su composición de aminoácidos (ver Material y Métodos). Los resultados están resumidos en las tablas 5 a la 8. Una muestra de cada enzima fue pasada por BioGel P-30 (resultados no presentados) para eliminar el amortiguador TRIS-HCl presente que interfería en la cuantificación de histidina.

Los pesos moleculares calculados en base a la composición de aminoácidos para las proteinasas 1, 2, 3 y 4 son

TABLA # 4 COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA PROTEINASA # 1

	a	Tiempo de Hidrolisis					d	e	f
		Biogel	20 h	48h	72h	20h			
ASX	10.60	26.79	23.17	23.94	24.35				24
TRE	4.70	11.87	10.90	10.75	10.54	10.86			12
SER	7.83	19.79	19.44	15.38	14.32	21.07			19-20
GLX	6.15	20.60	18.30	18.29	19.79	20.18			19
PRO	1.13	2.86	-	1.7	1.76	1.17			1
GLI	6.03	15.25	13.40	13.52	14.05	15.38			14
ALA	3.56	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	7.94		9
CIS						6.23*			6
VAL	4.20	10.62	10.01	10.94	11.47	10.28			12
MET	2.41	6.09	6.52	3.04	1.61				6
ILE	3.74	9.46	9.86	10.91	11.44	7.49	9.29		12
LEU	9.14	23.09	21.33	21.47	22.05	21.98	22.00		22
TIR	3.76	9.51	8.98	8.78	9.15		8.03		9
FEN	2.81	7.10	6.91	6.66	7.03		6.21		7
HIS	3.34	8.44							8
LIS	3.04	7.68	8.32	9.59	12.21	7.44			8
ARG	5.42	13.69	12.32	12.01	12.64	12.55			12-13
TRP						5.18			5
TOTAL									205-207

- a. - Ejemplo de los valores obtenidos directamente del analizador.
- b. - Muestra purificada en Biogel P-30 (hidrolizada 20 hrs).
- c. - Promedio de dos experimentos independientes.
- d. - Muestra oxidada con acido performico.
- e. - Muestra hidrolizada con ac mercaptoetanesulfonico para determinar triptofano.
- f. - Valor entero mas cercano obtenido tomando ALA como 9.

TABLA # 5 COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA PROTEINASA # 2

	Tiempo de Hidrolisis							f
	a	b	c	d	e	f		
	nmoles	Biogel	20h	72h	110h	20h	22h	Entero
ASX	10.75	21.00	21.00	21.00	-	-		21
TRE	4.83	9.43	9.72	8.84	8.72	9.63	8.91	10
SER	8.24	16.10	16.27	12.47	11.25	16.82	16.56	17
GLX	9.27	18.10	17.43	16.70	16.83	18.27	17.77	18
PRO	0.95	1.86	-	-	-	0.77	2.60	1
GLI	6.40	12.50	11.55	11.42	12.19	12.00	-	12
ALA	3.53	6.90	6.96	6.81	6.96	6.69	8.43	7
CIS						4.51*		4-5
VAL	5.32	10.40	9.25	9.55	10.07	9.73	7.85	10
MET	2.68	5.24	5.44	3.41	2.91			5
ILE	4.85	9.48	8.69	9.32	9.69	5.55	9.00	10
LEU	10.58	20.66	18.68	18.58	17.16	18.55	18.76	19
TIR	4.38	8.55	7.90	7.47	7.71		8.00	8
FEN	2.82	5.51	5.18	4.58	4.89			5
HIS	4.28	8.36						8
LIS	3.34	6.53	7.19	5.51	5.78	6.42		7
ARG	4.94	9.65	8.70	8.57	8.37	9.64		10
TRP							18.09	18

TOTAL

191

- a. - Ejemplo de los valores obtenidos directamente del analizador.
- b. - Muestra purificada en Biogel P-30 (hidrolizada 20 hrs).
- c. - Promedio de dos experimentos independientes.
- d. - Muestra oxidada con ácido performico.
- e. - Muestra hidrolizada con ácido mercaptoetanesulfónico para determinar triptofano.
- f. - Valor entero más cercano tomando ASX como 21.

TABLA # 5 COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA PROTEINASA # 2

	a	Tiempo de Hidrolisis						f
		b	c	d	e			
	nmoles	Biogel	20h	72h	110h	20h	22h	Entero
ASX	10.75	21.00	21.00	21.00	-	-		21
TRE	4.83	9.43	9.72	8.84	8.72	9.63	8.91	10
SER	8.24	16.10	16.27	12.47	11.25	16.82	16.56	17
GLX	9.27	18.10	17.43	16.70	16.83	18.27	17.77	18
PRO	0.95	1.86	-	-	-	0.77	2.60	1
GLI	6.40	12.50	11.55	11.42	12.19	12.00	-	12
ALA	3.53	6.90	6.96	6.81	6.96	6.69	8.43	7
CIS						4.51*		4-5
VAL	5.32	10.40	9.25	9.55	10.07	9.73	7.85	10
MET	2.68	5.24	5.44	3.41	2.91			5
ILE	4.85	9.48	8.69	9.32	9.69	5.55	9.00	10
LEU	10.58	20.66	18.68	18.58	19.16	18.55	18.76	19
TIR	4.38	8.55	7.90	7.47	7.71		8.00	8
PEN	2.82	5.51	5.18	4.58	4.89			5
HIS	4.28	8.36						8
LIS	3.34	6.53	7.19	5.51	5.78	6.42		7
ARG	4.94	9.65	8.70	8.57	8.37	9.64		10
TRP							18.09	18
TOTAL								191

- a. - Ejemplo de los valores obtenidos directamente del analizador.
- b. - Muestra purificada en Biogel P-30 (hidrolizada 20 hrs).
- c. - Promedio de dos experimentos independientes.
- d. - Muestra oxidada con ácido performico.
- e. - Muestra hidrolizada con ácido mercaptoetanesulfónico para determinar triptofano.
- f. - Valor entero más cercano tomando ASX como 21.

TABLA # 7 COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA PROTEINASA # 4

Tiempo de Hidrolisis

e	a		b			c		d
	nmoles	Biogel	20h	48h	72h	20h	22h	
Entero								
ASX	11.02	23.00	23.00	23.00	23.00			23
TRE	4.28	8.94	9.89	9.86	9.22	8.46	8.20	10
SER	8.08	16.88	15.75	14.47	13.13			17
GLX	9.39	19.60	20.15	20.05	20.10	20.00	20.00	20
PRO			1.91	2.19	2.54		4.90	2
GLI	5.63	11.75	10.66	10.94	10.66	11.77		11
ALA	3.33	6.95	6.78	6.85	6.81	6.54	6.12	7
CIS						5.68 ^c		6
VAL	4.14	8.65	9.26	10.58	10.98	8.22	9.84	11
MET	2.15	4.49	4.44	2.39	4.86		6.16	5
ILE	4.06	8.47	9.68	10.80	11.12		10.29	11
LEU	9.69	20.24	15.54	19.88	20.20		18.98	20
TIR	2.92	6.09	7.30	7.53	7.61		7.18	8
PEN	2.13	4.44	5.35	5.44	5.47		5.49	5
HIS	3.98	8.32						8
LIS	1.56	3.25	3.29	3.69	3.70	3.23		4
ARG	5.28	11.02	10.80	11.25	11.48	10.12		11
TRP							9.38	9
TOTAL								
188								

a.- Ejemplo de los valores obtenidos directamente del analizador.

b.- Muestra purificada en Biogel P-30 (hidrolizada 20 hrs).

c.- Muestra oxidada con ac. performico, corregida su integracion por el rendimiento de la reaccion en proteina standard.

23 480, 22 900, de 23 280 a 23 500 y 21 950, respectivamente. Las absorbencias de una solución al 1% a 280 nm de las proteinasas 1, 2, 3 y 4 son de 15.2, 12.7, 14.2 y 14.5, respectivamente.

La composición de aminoácidos de las proteinasas tratada con mayor amplitud en la sección A. 3 de la Discusión.

3. Degradación de Edman.

Las proteinasas liofilizadas (100 a 250 nmoles) fueron reducidas y carboximetiladas o piridiladas y sujetas a varios ciclos de degradación automática de Edman (ver Materiales y Métodos).

Para la proteinasa 1, el primer ciclo correspondiente al extremo amino terminal, fue identificado como asparagina, aun cuando estaban presentes otros aminoácidos como valina, ácido glutámico, lisina y leucina. El segundo ciclo no pudo ser identificado con certeza debido a la presencia de valina y leucina en cantidades equivalentes, además de estar presentes ácido glutámico y treonina. Los tercer y cuarto ciclos se encontraron en la misma situación que el segundo; en el tercero se encontró valina y ácido glutámico, además de leucina y una menor cantidad de ácido aspártico. En el cuarto ciclo se identificaron ácido glutámico y valina, además de ácido aspártico.

Proteinasa 1: ASN - VAL/LEU - VAL/GLU - GLU/VAL - - -

La proteinasa 2 fue sometida a 10 ciclos de degradación automática. Como extremo amino terminal fue identificado leucina, con la presencia de tirosina, metionina y valina. En el segundo ciclo se obtuvo valina como el aminoácido más abundante, con la presencia de leucina y fenilalanina o isoleucina o lisina. En el tercero, leucina y como contaminantes fenilalanina o isoleucina o lisina, alanina y tirosina. El cuarto, leucina y contaminación de glicina, fenilalanina o isoleucina o lisina y ácido aspártico. El quinto, valina y además, leucina, fenilalanina o isoleucina o lisina. En el sexto no predomina algún aminoácido, no fue posible identificar el residuo correspondiente. Los ciclos séptimo y octavo fueron identificados como leucina, con contaminación de valina, ácido aspártico y glutamina. Los ciclos noveno y décimo no pudieron ser identificados.

Prot. 2 : LEU- VAL- LEU- LEU- VAL- X - LEU- LEU- - -

De la proteinasa 3 se realizaron 6 ciclos de degradación, el primero fue identificado como metionina, con leucina y ácido glutámico; el segundo, valina y además, ácido glutámico y fenilalanina o isoleucina o lisina; el tercero, fenilalanina o isoleucina o lisina, junto con valina, ácido aspártico y treonina; el cuarto, ácido aspártico y además, fenilalanina o isoleucina o lisina y valina; el quinto, glicina o glutamina, además de ácido aspártico y valina.

Proteinasas 3: MET - VAL - FEN o ILE o LIS - ASP - GLI/GLN - -

4. Comparacion con otras Proteinas.

En base a la definicion de S_n se obtuvieron los valores de este coeficiente para 46 proteinas relacionadas y no relacionadas con las cuatro proteinasas aisladas. Una lista de los valores calculados de S_n/N se presenta en la tabla # 9 (Ver siguiente pagina). En la seccion de Discusion se tratara este punto con mas detalle.

D. Propiedades enzimaticas de las Proteinasas.

1. Sustratos ensayados.

Las cuatro proteinas purificadas fueron seguidas por su capacidad de hidrolizar el sustrato Azure, identificando una actividad proteolitica inespecifica. Sin embargo, las proteinasas 1, 2 y 3 son capaces de hidrolizar simultaneamente el sustrato BAEE. Los resultados con otros sustratos especificos como fibrina, colágena y plasminogeno seran presentados en el inciso E de esta seccion.

2. Constantes cineticas.

Se determinaron las constantes de Michaelis y velocidad maxima (Ver figura # 16), para las proteinasas 1, 2 y 3 a un pH de 8.0. Los resultados se presentan en la tabla # 10.

TABLA # 10

Proteinasas	K_m (μM)	V_{max} (μM)
1	44.5	241.0
2	27.4	38.2
3	39.9	74.6

Tabla # 9 CALCULO DE S Delta N/N

No.	Proteina	McMatrix	Prot.1	Prot.2	Prot.3	Prot.4
1	C.atrox b	1	0.28	0.69	0.39	0.31
2	C.atrox c	2	0.56	1.16	0.66	0.58
3	C.atrox d	3	0.61	1.21	0.72	0.62
4	C.atrox e	4	0.84	1.38	1.0	0.82
5	C.adamant (P I)	5	0.31	1.04	0.46	0.47
6	C.adamant (P II)	-	0.30	1.03	0.55	0.38
7	C.adamant Crtsaa	37	1.79	2.44	1.84	1.85
8	C.v.vir (virtx)	7	115	116	111	112
9	A.rhod (Ancred)	35	1.33	2.04	1.59	1.37
10	A.p.leuc (P. A)	28	0.37	0.92	0.5	0.48
11	A.acut (alfa F)	43	0.59	0.98	0.6	0.63
12	T.gram (alfa F)	41	0.87	1.43	1.11	1.04
13	T.gram (beta F)	44	1.1	1.66	1.16	1.14
14	T.mucl (alfa F)	42	0.62	0.74	0.61	0.57
15	T.mucl (beta F)	45	1.52	1.46	1.23	1.47
16	C.scut (Tox)	6	4.1	3.5	3.9	3.2
17	Tripsina (bov)	20	1.87	2.47	1.77	2.19
18	Tripsina (acoc)	9	1.71	2.57	1.7	2.02
19	Elastasa (porc)	33	1.46	2.08	1.47	1.66
20	Elastasa (alce)	34	1.81	2.45	1.73	2.11
21	Calicr (saliv)	10	4.9	4.3	4.4	3.8
22	Calicr (gland)	39	1.2	1.6	1.11	1.26
23	Trombina (bov)	36	1.31	2.06	1.3	1.63
24	Plasmina (hum)	38	1.52	2.01	1.5	1.64
25	Colagea (Uca p)	27	2.95	3.55	3.0	3.0

TABLA NO. 9 (CONTINUACION).

No.	Proteina	NoMatriz	Prot.1	Prot.2	Prot.3	Prot.4
26	Colagasa(Uca p)	40	3.15	3.7	2.72	3.25
27	F.Cr.Nerv (gama)	8	1.48	1.99	1.49	1.75
28	Pro-CPD A	11	8.8	10.6	8.7	9.5
29	Pept de activ.28	12	2.48	2.15	2.36	1.82
30	P II a (Bombix)	13	1.43	2.35	1.43	1.69
31	P II b (Bombix)	14	1.21	2.14	1.27	1.43
32	P II c (Bombix)	15	1.19	2.12	1.25	1.39
33	P III a (Bombix)	16	1.87	2.76	1.89	2.2
34	P III b (Bombix)	17	2.68	3.67	2.73	3.1
35	P III c (Bombix)	18	2.16	3.07	2.13	2.52
36	Coconasa	19	1.58	2.44	1.72	1.86
37	Subtilisina BPN	21	5.4	6.44	5.2	5.9
38	Aspergilocept B	29	2.18	3.04	2.1	2.6
39	Aspergilocept C	30	1.70	2.22	1.60	1.94
40	Pr alfa (Myxobac)	31	2.46	2.93	2.35	2.61
41	Pr alc (Arthrob)	32	2.83	3.31	2.50	3.11
42	Fosfolip A (cobra)	22	3.42	4.4	3.48	3.66
43	Fosfolip A " "	23	3.44	4.41	3.51	3.68
44	Fosfolip A " "	24	3.01	3.55	2.93	3.05
45	Fosfolip A " "	25	3.53	4.02	3.56	3.49
46	Fosfolip A (porc)	26	3.15	4.02	3.23	3.38
Proteinasa	1		0.0	0.53	0.15	0.16
Proteinasa	2		0.55	0.0	0.23	0.24
Proteinasa	3		0.16	0.23	0.0	0.15
Proteinasa	4		0.17	0.25	0.15	0.0

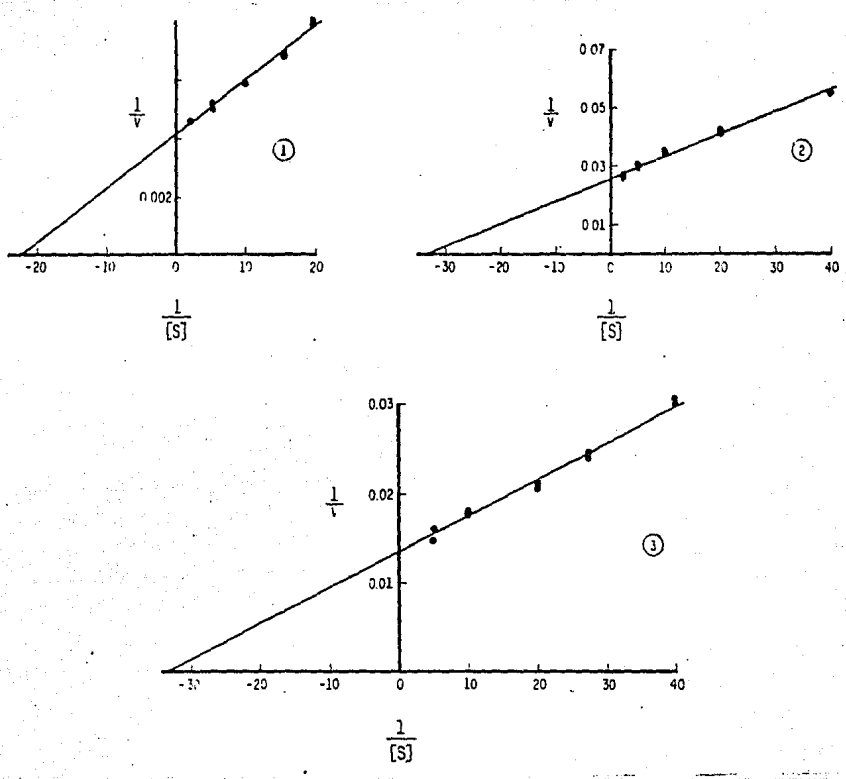


Fig. 13. Graficas de Lineweaver-Burk de las Proteinasas 1 a 3. Sustrato empleado: BAEE disuelto en metanol (5%) en TRIS-HCl 0.1 M a pH 8.0. Las enzimas fueron diluidas en el amortiguador con 0.15 M de NaCl.

3. Optimo de pH.

Con el sustrato Azure se determino el pH optimo de la actividad proteolitica (ver figura # 17) encontrandose los valores de 8.9, 8.0, 8.7 y 7.2 , para las proteinasas 1, 2, 3 y 4 , respectivamente.

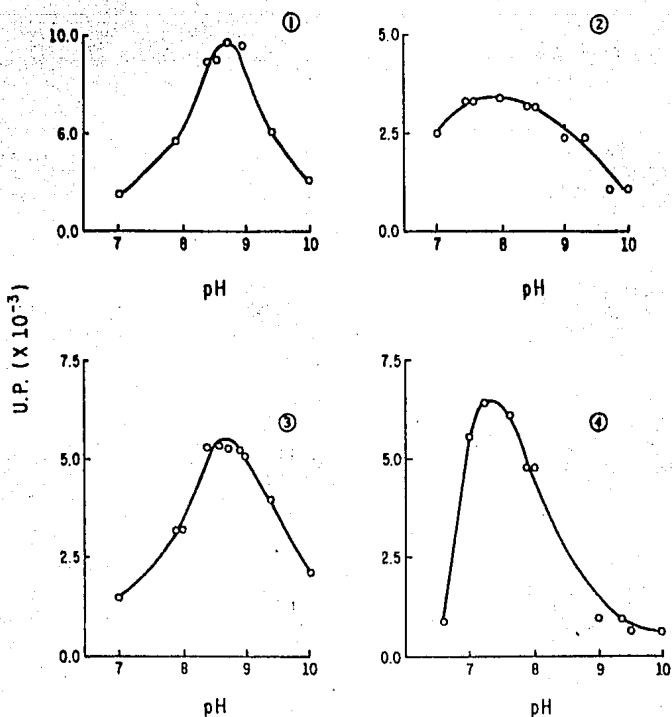


FIG 17. DETERMINACION DE pH OPTIMO DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA.
EL SUSTRATO AZURE FUE INCUBADO CON LAS ENZIMAS A LOS VALORES DE
pH INDICADOS, EMPLEANDO AMORTIGUADORES TRIS-HCl 0.1 N.

1 : PROTEINASA 1

2 : PROTEINASA 2

3 : PROTEINASA 3

4 : PROTEINASA 4

4. Sensibilidad a inhibidores.

Para determinar la clase de proteinasas a la cual pertenecen las enzimas aisladas se midió la actividad proteolítica y esterolítica en presencia de inhibidores de proteinasas. Los resultados se muestran en la tabla # 11. Se observa que las dos actividades presentan diferente sensibilidad a ciertos inhibidores; aunque la acción definitiva y constante de los agentes sueltos permite clasificar a estas proteinasas como metaloproteasas.

TABLA # 11

EFECTO DE INHIBIDORES SOBRE LAS PROTEASAS

Inhibidor	Proteinasa # 1		Proteinasa # 2		Proteinasa # 3		Proteinasa # 4
	Azure	BAEE	Azure	BAEE	Azure	BAEE	Azure
Control	100	100	100	100	100	100	100
Inhibidor de tripsina de frijol de soya	179	87	120	100	121	81	109
Ac.ξ-aminocaproico	63	76	87	65	105	52	100
p-amino benzamidina	63	0	84	12	103	81	105
Fenil metil sulfonil fluoruro	97	5	85	81	110	19	103
N-etil maleimida	83	93	92	30	128	79	99
Ac.Iodoacético	74	54	96	95	106	55	98
L-cisteina	52	94	82	88	73	79	87
E D T A	3	95	2	37	10	70	1
O-fenantrolina	3	0	3	0	1	0	0

E. Propiedades Biológicas de las proteinasas.

La presencia de algunas actividades enzimáticas en el veneno tiene importancia biológica, pues actúa sobre sustratos que encuentran en organismos que son víctimas potenciales de esta serpiente. Para la identificación de algunas de estas actividades enzimáticas específicas se utilizaron los sustratos fibrinogeno o fibrina inmovilizados en una matriz de agarosa, como se describió en Materiales y Métodos.

La fibrina es una proteína insoluble y es tenida intensamente por colorantes como el negro de amido. Sin embargo, al ser hidrolizada por plasmina u otras proteinasas con actividad fibrinolíticas, los productos de degradación se solubilizan y son fácilmente eliminados por los lavados a que se somete el gel. Así, se observan halos claros en las zonas en que hubo ataque enzimático. Esta acción enzimática puede ser resultado directo de la proteinasa añadida o de la activación de un precursor de la plasmina, el plasminogeno, presente en la fibrina comercial. Para diferenciar entre uno y otro proceso se utiliza fibrina sin plasminogeno contaminante (Figura 18.1 y 18.2).

Por otro lado, el fibrinogeno embebido en agarosa es soluble y fácilmente eluido de la matriz. Al ser polimerizado por la trombina o alguna enzima con actividad similar a esta, se convierte en fibrina insoluble. Este producto aparece como un halo oscuro al ser tenido el gel.

alrededor de los pozos en que se coloca una enzima con esta actividad (Figura 19).

1. Fibrinolisis.

En la figura # 18.1 se muestra la digestión de fibrina comercial por las cuatro enzimas y algunas fracciones de acuerdo a lo expuesto en el párrafo anterior, se observa que el veneno soluble, las fracciones I, II, III y las proteinasas puras poseen actividad fibrinolítica.

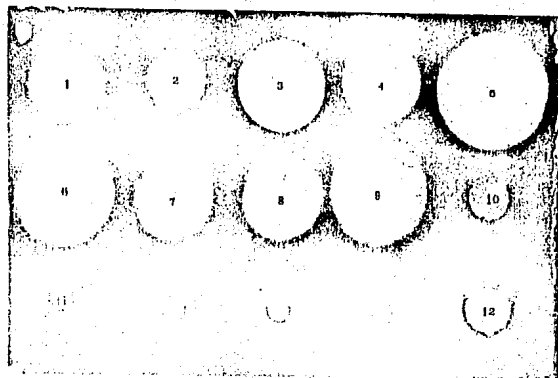
2. Activación de Plasminógeno.

En la figura 18.2, se muestra la digestión de fibrina purificada, sin plasminógeno contaminante, por las mismas muestras que en el inciso anterior. Todas las fracciones que fueron capaces de degradar fibrinas, la hidrolizan sin la absoluta dependencia de plasminógeno.

3. Coagulación de Fibrinógeno.

En la figura # 19 se muestra la actividad coagulante de fibrinógeno de las enzimas purificadas. En la fracción II, se observa la actividad de la trombina pero la actividad fibrinolítica es tan abundante que es difícil observarla. Este hecho hace que no se descarte la presencia de enzimas coagulantes en el veneno soluble ni en las fracciones I y III. El pozo # 12 es una enzima similar a la trombina aislada del mismo veneno (ver Discusión), y de hecho, se encuentra en la fracción I de Serhadet 8-75.

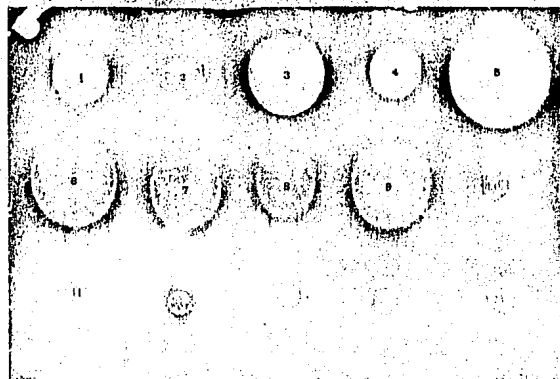
Fig 18 . 2



Gel de fibrina comercial (con plasminógeno) en agarosa al 1%, pH 7.4.
El veneno soluble, algunas fracciones y las 4 proteinasas fueron incubadas por 24 horas y teñidas con Negro de Anido.

1: Veneno soluble	10 ug	7: Proteínasa 2	2.5 ug
2: Fracción I, tubo 7	"	8: Proteínasa 3	"
3: Fracción I, tubo 14	"	9: Proteínasa 4	"
4: Fracción II	"	10: Activador de Plasminógeno.	1 ug
5: Fracción III	"	11: Coagulante de Fibrinógeno.	"
6: Proteínasa 1	2.5 ug	12: Activador de Plasminógeno.	"

Fig 18 . 1



Gel de fibrina purificada (sin plasminógeno) en agarosa 1%, pH 7.4.
El veneno soluble, algunas fracciones y las 4 proteinasas fueron incubadas por 24 horas y teñidas con Negro de Anido.

1: Veneno soluble	10 ug	7: Proteínasa 2	2.5 ug
2: Fracción I, tubo 7	"	8: Proteínasa 3	"
3: Fracción I, tubo 14	"	9: Proteínasa 4	"
4: Fracción II	"	10: Activador de Plasminógeno.	1 ug
5: Fracción III	"	11: Coagulante de Fibrinógeno.	"
6: Proteínasa 1	2.5 ug	12: Activador de Plasminógeno.	"

Fig. 19



Gel de fibrinógeno comercial (con plasminógeno) en agarosa 1 %, pH 7.4. El veneno soluble, algunas fracciones y las 4 proteinasas fueron incubadas por 24 horas y teñidas con Negro de Amido.

1: Veneno soluble	10 ug	7: Proteinasa 2	2.5 ug
2: Fracción I, tubo 7	"	8: Proteinasa 3	"
3: Fracción I, tubo 14	"	9: Proteinasa 4	"
4: Fracción II	"	10: Activador de Plasminógeno	"
5: Fracción III	"	11: Coagulante de Fibrinógeno	"
6: Proteinasa 1	2.5 ug	12: Activador de Plasminógeno	"

Con los ensayos realizados se muestra que las 4 enzimas tienen actividad fibrinolítica (similar a la plasmina), no siendo activadores de plasminogeno y careciendo de actividad coagulante de fibrinogeno.

4. Colagenolisis.

Se probó la capacidad de las enzimas para degradar colasena nativa. En la figura # 20 se observa que solo la proteinasa # 1 es capaz de degradar completamente la colasena, mientras que las otras 3 no la atacan mayormente, si se comparan con los controles. La o-fenantirolina inhibe la actividad de colagenasa de la proteinasa # 1 (resultados no presentados).

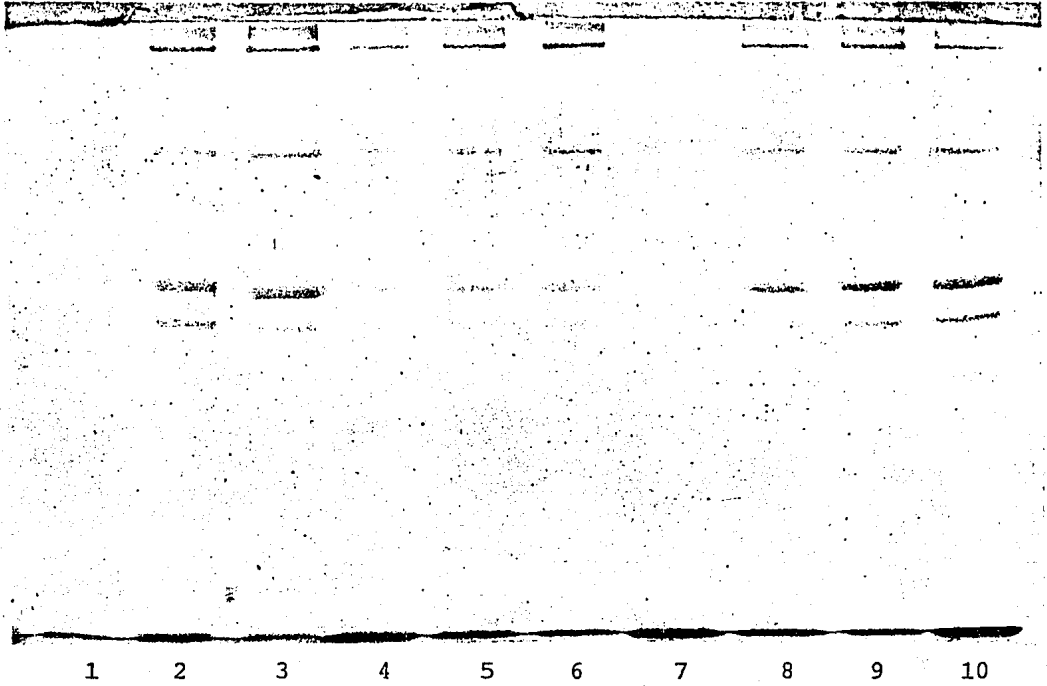
5. Actividad hemorrágica.

La actividad hemorrágica de las proteinasas purificadas fue negativa en dosis de hasta 5 ue administrados por vía intradérmica a ratones. Como punto de referencia, las dosis hemorrágicas medias de algunos venenos de crotalidos se encuentran en el rango de 0.4 a 1.2 ue (Ohsaka, 1979).

6. Inmunodifusión.

Se realizó una inmunodifusión de las 4 proteinasas contra un antisuero polivalente anti-viperino comercial. Los resultados se muestran en la figura # 21: solo se presenta una línea de precipitación con cada proteinasa. En el caso de las parejas de proteinasas 1 - 2, 2 - 4 y 3 - 4, la forma de la precipitación indicó cruce inmunológico. En

Fig. 20



Electroforesis de los productos de digestión de colágena nativa.

Colágena (25 ug) fue incubada 18 horas en TRIS-HCl, pH 7.4 con 15 - 20 ug de las proteinasas 1, 2, 3 y 4.

Carril 1 Colagenasa bacteriana.

Carril 2 Colagenasa bacteriana + o-fenantrolina.

Carril 3 Colágena.

Carril 4 Proteinasas 1 (preparación A) 15 ug

Carril 6 Proteinasas 2 (preparación A) 15 ug

Carril 7 Proteinasas 1 (preparación B) 20 ug

Carril 8 Proteinasas 2 " "

Carril 9 Proteinasas 3 " "

Carril 10 Proteinasas 4 " "

cambio las papeles de papel filtro (Fig. 21) y los precipitados forman una zona de coincidencia. Si esto sucede suiere una identidad inmunologica parcial.

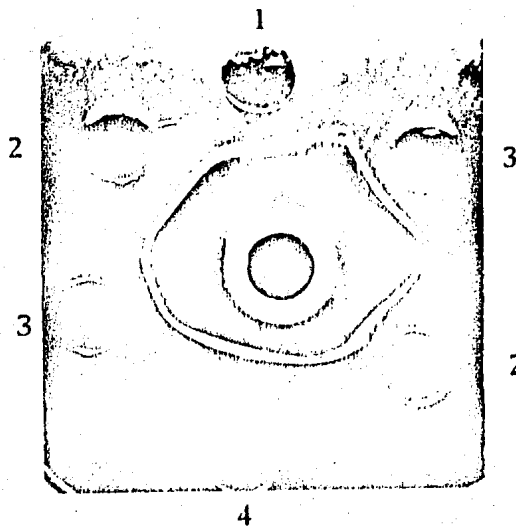


Fig. 21. Inmunodifusión de las proteinasas.

Inmunodifusión en agar de las 4 proteinasas (6 a 8 us en 10 ul) que fueron incubadas por 30 horas a 4 °C. Pozo central = Suero antiviverino comercial diluido (100 us/ 10 ul).

1 = Proteinasa 1.

2 = Proteinasa 2.

3 = Proteinasa 3.

4 = Proteinasa 4.

IV. DISCUSION

A. Discusión específica sobre resultados.

1. Sobre las características generales del veneno.

La serpiente *Crotalus molossus niarensis* posee un veneno moderadamente tóxico, tomando como parámetro la dosis letal media estimada en 47 μg por 20 g de ratón. Este valor es prácticamente igual que el estimado por Hardy y cols. (1982) para la *C. molossus molossus* (50 μg / 20 g de ratón), que es la subespecie típica.

Como comparación, los crotalinos altamente tóxicos tienen LD 50 en el orden de 3 a 6 μg / 20 g de ratón como la *Crotalus durissus terrificus* y la *Bothrops atrox* (Ohsaka, 1979). Por otro lado, los crotalinos menos tóxicos tienen LD 50 elevadas, como *A. contortrix*, *A. piscivorus* y *C. ruber* (210, 102 y 134 μg / 20 g de ratón, respectivamente) (Tu, 1977). *C. horridus*, la serpiente filogenéticamente más cercana a *C. molossus niarensis*, tiene una LD 50 de 58 μg / 20 g de ratón.

Estos valores de LD 50 deben ser comparados con precaución puesto que pueden existir diferencias de sensibilidad entre las diferentes especies de ratones empleados, pero sin duda existe una potencia diferente entre *C. molossus* y *C. durissus terrificus*, por ejemplo. Esta última posee una importante cantidad de neurotoxinas en su veneno (Hendon y Frankel-Conrat, 1971).

El veneno de la *C. m. nigrescens* tiene una gran actividad proteolítica, que se manifiesta biológicamente como un factor coagulante, decoagulante y hemorrágico. Estos datos son observados al inocular animales de experimentación con veneno soluble y con las fracciones I, II y III, obtenidas de filtración en gel.

Por otro lado, la presencia y ausencia de las actividades enzimáticas descritas en Resultados está de acuerdo con la distribución general de enzimas en los venenos de las serpientes venenosas (ver tabla 1), con la excepción de la hialuronidasa.

Al añadir inhibidores de serina proteinasas y metaloproteinasas al veneno soluble y a las fracciones I, II y III, se puede observar que la mayor parte de la actividad proteolítica medida con Azure (por lo menos el 75 %), es debida a metaloproteinasas.

2 . Sobre la purificación y estabilidad del veneno.

El veneno liofilizado se solubiliza mejor en soluciones alcalinas que ácidas; de manera similar las enzimas que predominan en el veneno soluble son más activas a valores de pH cercanos a 8.0. Cuando se incubó el veneno soluble a diferentes valores de pH, su pérdida de actividad proteolítica es pequeña (cerca del 20 %), elevándose ligeramente (hasta 30 %) a pH de 4,7 .

Comparando la cromatografía en gel de Sephadex a temperatura ambiente y pH 7.0 con las realizadas a 4 .C y pH

5.5. se observa que las fracciones de bajo peso molecular se encuentran presentes en mayor proporción cuando el veneno es procesado a temperatura ambiente y pH 7.0. Este hecho sugiere un procesamiento proteolítico del veneno, pudiendo tener una función de degradación, de activación o ambas; de una extensión y localización desconocidas.

Se había esperado que durante el proceso de purificación, algunos componentes del veneno fueran objeto de proteólisis. Tratando de disminuir al máximo este fenómeno, se eligió trabajar a 4 °C de temperatura, a valores de pH lo más alejados del óptimo observado en el veneno soluble que permitiera el esquema de purificación, manteniendo un compromiso entre la solubilidad de algunos componentes, y por último, en el menor tiempo posible.

Las proteinasas se intentaron purificar utilizando resinas de intercambio aniónico y catiónico a diferentes valores de pH en el rango de 5.0 a 9.0 y cromatografías de afinidad empleando resinas con anticuerpos e inhibidores, como la α -amino benzamidina, inmovilizados. Sin embargo, en las condiciones en que se realizaron estos experimentos, las proteinasas no pudieron ser purificadas por estos métodos, por que fueron realizadas a valores de pH en que su atracción por el intercambiador era similar entre ellas, por que la afinidad por el inhibidor era baja y/o similar y por que existe una semejanza entre los determinantes antígenicos, además del problema de degradación de los anticuerpos por

Las proteinasas.

Una vez establecido el esquema de purificación, una sola persona puede procesar 1 gramo de veneno y obtener las 4 proteinasas homogéneas en una semana de trabajo.

La fracción I, obtenida de filtración en gel, es relativamente inestable, observándose la formación de un precipitado blanquecino después de ser eluida, por lo que no fue procesada en este trabajo.

La fracción II, que tenía la mayor actividad específica proteolítica, fue cromatografiada en DEAE-celulosa, pH 7.6 (ver figura 10). En este paso se perdió cerca del 85 % de la actividad proteolítica. La fracción III, al ser cromatografiada en las mismas condiciones, obtuvo una recuperación de cerca del 60 % de la actividad proteolítica, repartida principalmente en tres picos, los denominados III.1, III.3 y III.9 (ver figura 11). Estos, al ser sometidos a cromatografía en DEAE-celulosa a pH 8.9, permitieron obtener enzimas homogéneas. El pico III.1, que es retenido poco a pH 7.6, es separado a pH 8.9 en tres componentes bien definidos (ver figura 12). En las 3 gráficas de DEAE-celulosa a pH 8.9 se observan pequeños componentes que no pudieron visualizarse en las condiciones de electroforesis empleadas, suponiéndose que se trata de fragmentos de autólisis de las proteinasas.

Es difícil estimar la cantidad de cada una de estas proteinasas en el veneno, pues existe una mala resolución de

los picos II y III en Sephadex. De hecho, al comparar las gráficas de DEAE-celulosa de esas fracciones es notoria su semejanza, variando aparentemente en las fracciones II-III, 1, II-III, 4 - 5 y II-III, 8.

La inestabilidad de la fracción II podría explicarse en términos de la presencia de un componente de peso molecular ligeramente mayor que pudiera degradar a las demás proteínas en la fracción o a la presencia de un inhibidor de proteinasas enriquecido en la fracción III.

El incremento de la actividad específica conforme avanza la purificación, no es muy aparente y, en ocasiones, como en el caso de la fracción III.9, se observa un descenso de dicha actividad. Este fenómeno puede ser debido a varios factores: la falta de discriminación del ensayo por las diferentes proteinasas presentes en el veneno, la presencia en la mezcla de especies de proteinasas con mayor y menor actividad específica y el procesamiento proteolítico de las proteinasas.

No es posible obtener el porcentaje en que cada enzima está presente en el veneno soluble, pues el sustrato es hidrolizado por varias enzimas. Por otro lado, algunas proteínas están presentes en 2 o más fracciones, por su cercanía en el sistema de cromatografía; así, los valores presentados en el resumen de purificación (tabla # 4) son válidos al esquema de purificación presentado.

3. Sobre las características estructurales de las enzimas purificadas.

La electroforesis de las proteinasas en presencia de detergentes, con y sin agentes reductores, es congruente con la existencia de moléculas de una sola cadena polipeptídica, con pesos moleculares en el rango de 22 000 a 24 000 daltones. Las proteinasas purificadas tienen actividad fibrinolítica, y tienen características estructurales similares a otras enzimas similares aisladas de venenos de crotalinos. Los pocos datos existentes en la literatura son los obtenidos por Duxans y cols. (1976, 1977 y 1979) para las alfa-fibrinogenasas de *T. mucrosquamatus* y *T. eramineus* (23 360 y 23 500) y para el principio fibrinolítico de *A. acutus* (23 920) .

Trabajando con fracciones semipurificadas de *C. atrox* y *A. c. contortrix*, Bajwa y cols. (1979, 1980 y 1982) han estimado los pesos moleculares de las fracciones fibrinolíticas en 21 500 y 25 000 daltones.

Las 4 proteinasas del veneno de esta serpiente son proteínas compuestas de 188 a 205 residuos de aminoácidos (ver tablas 5 a 8). De estos, el 20 al 23 % lo forman los ácidos aspártico y glutámico y del 25 al 27 % lo constituyen isoleucina, leucina, tirosina y valina. Las secuencias de aminoácidos del extremo amino terminal de las proteinasas, son altamente hidrofóbicas, y no se han encontrado secuencias similares en otras proteínas relacionadas y no relacionadas,

al ser buscadas en el Diccionario de Secuencia de Proteínas (Dayhoff, 1978) (ver tabla 12).

TABLA 12.

SECUENCIA N-TERMINAL DE LAS PROTEINASAS.

PROTEINASA 1	ASN	<u>VAL</u> LEU	<u>VAL</u> GLU	<u>GLU</u> VAL	-	-	-			
PROTEINASA 2	LEU	VAL	LEU	LEU	VAL	X	LEU	LEU	-	-
PROTEINASA 3	MET	VAL	#	ASP	&	-	-	-		
PROTEINASA E*	FEN	LIS	TIR	<u>VAL</u> TRP	GLX	LEU	VAL	ILE	<u>ALA</u> SER	-

: Fenilalanina, Isoleucina o Lisina.

& : Glutamina o Glicina.

* : Proteínasa purificada por otro método (ver Discusión).

Estos resultados también podrían ser explicados por la presencia de varias cadenas polipeptídicas que tienen un residuo común en el extremo amino terminal. Una posibilidad es que las muestras empleadas para secuenciación hayan sufrido autólisis durante la manipulación.

En textos, artículos y manuales poco o nada se menciona sobre cuidados especiales que deben tomarse para someter proteínas a estudios de secuenciación. Este parece ser un problema que se presenta solo en ciertas enzimas. Por otro lado, es notorio que siendo tan abundantes e interesantes, no haya publicaciones sobre la determinación de la estructura primaria de proteínas de venenos. Solo la crotalasa, enzima similar a la trombina de *C. adamanteus* ha

sido parcialmente secuenciada. (Pirke y cols, 1981).

La existencia de metaloproteinasas con especificidad para hidrolizar uniones peptídicas inmediatas a aminoácidos hidrofóbicos como leucina y fenilalanina (-X-Leu-, -X-Fen-) en venenos de serpiente es bien conocida (Iwanaga y Suzuki, 1979). Si fuera el caso de que las proteinasas descritas aquí tuvieran esa especificidad, el hecho de que, por composición de aminoácidos leucina sea el segundo residuo más abundante, haría a estas proteinasas muy susceptibles a degradación autolítica. Este fenómeno se ha observado en la evolución de la tripsina, donde se nota que la enzima de herbívoros comparada con otros animales en la escala evolutiva, tiene el más alto contenido de lisina y arginina en su molécula y esta se relaciona con una mayor velocidad de inactivación. (Muller y Zwillina, 1976).

Por otro lado, las cromatografías en gel de Sephadex G-75 a temperatura ambiente y a 4 °C tienen, entre otras diferencias, una fracción peptídica V más abundante en el experimento realizado a temperatura ambiente (ver figuras 7 y 9). Por lo tanto, existe la posibilidad de que los péptidos aislados y caracterizados de esa fracción sean fragmentos de degradación de otras proteínas, más que componentes independientes del veneno.

El cálculo de S_n, aun cuando es de relativo valor experimental, indica semejanzas que pueden verificarse posteriormente de manera experimental. Así, las proteinasas

1, 3 y 4 tienen aparente relación con las proteinas denominadas "toxinas hemorroidicas" (1, 2, 3, 4) de *Crotalus molossus* y *Crotalus adamanteus* y con las fibrinogenolisinas alfa de *A. scutellatus* y *T. mucrosquamatus*. Como cabia esperar, no parece haber mucha relacion entre las metaloproteinasas de *C. molossus* y las serina proteinasas, como tampoco con otras metaloproteinasas de mamiferos, de hongos y de bacterias.

La semejanza estructural parece estar ausente al compararse con otras proteinas presentes en el veneno de serpientes como las fosfolipasas del veneno de elapidos (ver tabla 9).

Por otro lado, la comparacion de las 4 proteinasas entre si indica que las enzimas 1, 3 y 4, por un lado, y 2, 3 y 4 por otro, son mas parecidas entre si que las proteinasas 1 y 2. Llama la atencion que, comparando las proteinasas I y II de *C. adamanteus* se obtenga un coeficiente de 0.04, es decir, la semejanza estructural que se debe esperar es muy grande.

4. Sobre las características funcionales de las enzimas purificadas.

Como se ha revisado, las enzimas proteolíticas presentes en el veneno de serpientes que tienen un peso molecular cercano a 25 000 daltones, son muy abundantes y se les ha

asociado una gran diversidad de actividades biológicas. Casi todas ellas han sido identificadas como metaloproteinasas, con excepción de las enzimas similares a la trombina y, posiblemente, las cininogenasas. En base a la sensibilidad de las actividades proteolítica y esterásica a los inhibidores (tabla # 11), el efecto de la orto-fenantrolina permite clasificar a las proteínas purificadas de *C. m. niarensis* también como metaloproteinasas.

Las actividades proteolítica y esterásica son inhibidas en diferente grado por los compuestos empleados. Las proteínas 1 y 2, por ejemplo, tienen sus actividades esterásicas inhibidas por la ϵ -aminobenzamidina, un inhibidor de serina proteinasas, afectándose poco la actividad proteolítica. Por otro lado, la actividad de proteína de las enzimas 1 y 3 son inhibidas por EDTA, pero su actividad de esterasa mantiene buena parte de actividad. Las dosis de inhibidores usadas son relativamente altas, por lo que se esperaba un efecto de todo o nada sobre las actividades. Los efectos de una unión peptídica deben de ser similares; aunque una posibilidad remota es la presencia de cantidades importantes de serina proteinasas como contaminación.

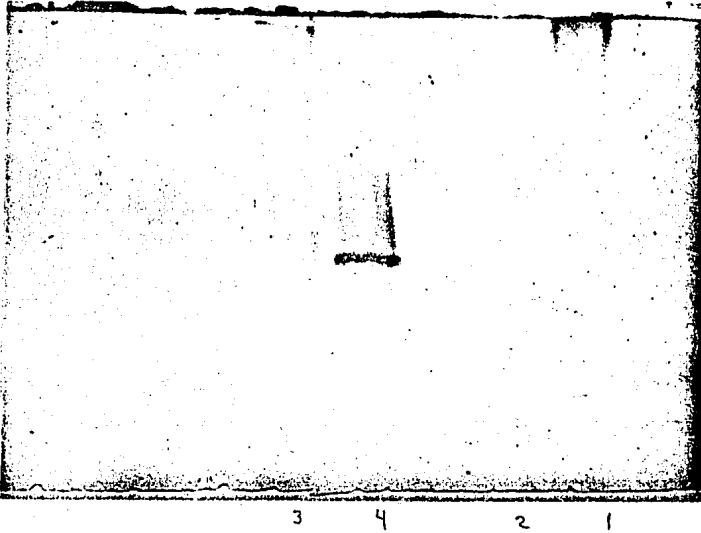
Por otro lado, la afinidad de la enzima por un sustrato grande como el Azure y por uno pequeño como el BAEE puede afectarse de manera diferente por la presencia o ausencia de

iones divalentes como el calcio. Se ha mencionado que el calcio estabiliza la conformación de las metaloproteinasas pero el zinc interviene directamente en el mecanismo catalítico (Sriekerman y cols, 1973 y Oshima y cols, 1971). En ese caso, el EDTA tendría una acción desnaturalizante, más que inhibitoria.

La inmunodifusión realizada indica que las enzimas comparten determinantes antígenicos y cruzan entre sí. Además, las enzimas son reconocidas por anticuerpos en contra de venenos de otras especies de *Crotalus* y *Bothrops*, lo cual sugiere que los antígenos presentes en estas proteinasas deben de existir en proteínas presentes en el veneno de otras especies de crotalinos (ver figura 21).

B. Discusión general: Inestabilidad de los componentes purificados debido a procesos autolíticos.

Los datos obtenidos de la secuenciación del extremo amino terminal de las proteinasas pueden ser explicados de dos maneras: Las enzimas no estaban homogéneas por los criterios mencionados en Resultados o estas proteínas fueron degradadas autolíticamente durante la preparación para la secuenciación. Para apoyar la segunda hipótesis, las proteinasas 1, 3 y 4 fueron sometidas a electroforesis en poliacrilamida en condiciones nativas a pH 8.3. Una pequeña cantidad de estas había sido almacenada en solución por 9 meses a -10°C . Este gel se presenta en la figura 22 y se observa la presencia de varias bandas y de zonas de barrido donde antes aparecía una banda única y bien definida.



Fis. 22. Electroforesis de las proteínas purificadas.

Las enzimas fueron almacenadas en solución a -10°C . Se aplicaron 10, 5, 10 y 25 μg de las enzimas 1 a 4, respectivamente, a un gel de poliacrilamida según Jovin (1964).

La presencia de aminoácidos hidrofóbicos como valina y leucina en el extremo amino terminal hace pensar que las regiones secuenciadas son producto de autólisis, pues se conoce que las metaloproteinasas de veneno de crotalinos hidrolizan uniones peptídicas en las que intervienen aminoácidos hidrofóbicos.

Por otro lado, siguiendo un esquema similar al presentado aquí, se logró obtener una proteinasa homogénea a partir del mismo veneno. La purificación de esta enzima, denominada proteinasa E, se logró mediante filtración en gel

de Sephadex G-75 a pH 7.0 y dos cromatografías en DEAE-celulosa a pH 7.6 y 8.3, realizadas a temperatura ambiente en un periodo de tiempo mayor (2 meses). Esta proteinasa tiene un peso molecular de 21 160, su composición de aminoácidos es ASX 21, TRE 10, SER 20, GLX 18, PRO 6, GLI 16, ALA 8, CIS 5, VAL 10, MET 5, ILE 9, LEU 18, TIR 8, FEN 6, HIS 7, LIS 7 y ARG 10; en total 184 aminoácidos. Su secuencia amino terminal fue determinada y tiene un residuo unico, siendo los primeros 9 :

Fen - Lis - Tir - Val/Tre - Glx - Leu - Val - Ile - Ala/Ser -

(ver figura 23, tabla 12 y Agradecimientos).

La posición de elución de esta proteinasa E es cercana a la de la proteinasa 3 descrita en el presente trabajo. Aparentemente la proteinasa E es bastante estable y resistente a la autodiaestion. Llama la atención que trabajando en mejores condiciones se obtengan productos inestables.

Siendo las proteinasas del veneno de crotalinos tan agresivas hacia los tejidos de las víctimas de mordedura, una pregunta a contestar es : ? cual es el mecanismo que tiene la glandula venenosa de las serpientes para evitar una autólisis tisular ?

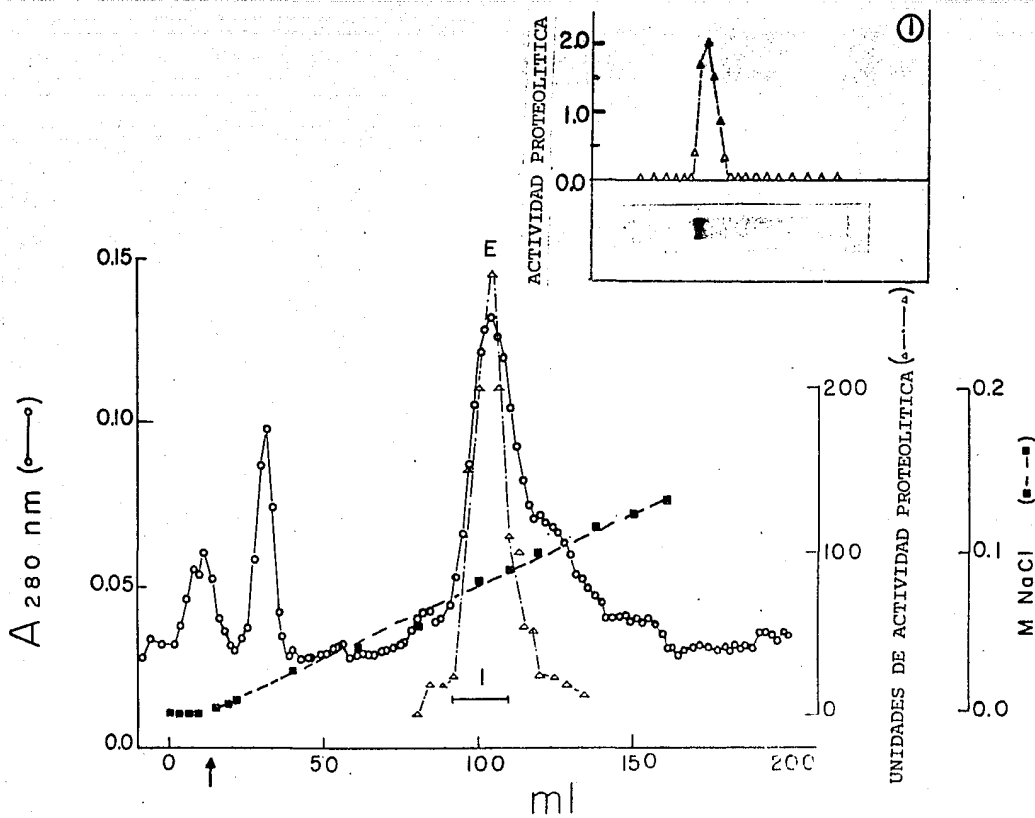


Fig 23. Purificación de la proteinasa E.

filtración en Sephadex (G-75) e intercambio
 (DEAE-celulosa, pH 7.6). La fracción denominada como E fue
 dializada y recromatografiada en DEAE-celulosa, pH 8.3 y
 eluida con un gradiente salino de 0 a 0.3 M de NaCl en
 amortiguador TRIS-HCl 15 mM. El inserto muestra la
 electroforesis de la zona mezclada indicada por la barra
 horizontal (Jovin, 1964). El gel fue cortado longitudinalmente
 siendo tomada una mitad y la otra seccionada en fragmentos
 de 1.2 mm y ensayada su actividad proteolítica con Azure.

El ejemplo mejor comprendido de este proceso es el pancreas exocrino. Se sabe que esta glándula posee dos mecanismos para evitar la autólisis: la síntesis de proteinasas como proenzimas inactivas y la síntesis de inhibidores de proteinasas. Sin embargo, en la glándula venenosa de las serpientes solo se ha descrito la presencia de inhibidores de proteinasas, y únicamente en algunas serpientes.

Por otro lado se sugiere que existe la posibilidad de que algunas preparaciones de proteínas de venenos con alto contenido de enzimas proteolíticas pueden estar alteradas por los procesos de degradativos ocurridos durante la preparación. Algunos autores inician la purificación con pasos de diálisis exhaustivos, como en el caso de la proteína coagulante del veneno de *V. russelli* (Furie y Furie, 1976). Esta posibilidad también había sido mencionada por Markland (1976), al obtener dos formas de enzimas similares a la trombina, una de *C. adamanteus*, la crotalasa, y otra, 10 000 daltones menor, del veneno de *C. h. horridus*.

C : Comentarios finales.

En el veneno de *C. m. nigrescens* se ha identificado la presencia de las enzimas fosfolipasa, fibrinolisisina, coagulante de fibrinógeno y "colagenasa". Esta mezcla, en la que predomina la actividad fibrinolítica, es capaz de producir efectos letales de experimentación. De este veneno se aislaron 4 proteinasas que degradan el sustrato insoluble y heteroséneo Hide Powder Azure. Estas proteinasas

presentan actividad fibrinolítica independiente de activación de Plasminogeno. Una de ellas, la proteinasa # 1 es capaz de degradar completamente colágena nativa en condiciones fisiológicas, además de degradar fibrina. Por otro lado, se ha purificado una enzima similar a la trombina a partir del mismo veneno.

Esta enzima fue purificada por dos pasos sucesivos, el primero de cromatografía de afinidad con p-amino benzamidina (ver Materiales y Metodos) y el segundo por cromatografía en DEAE-celulosa a pH 8.0. Esta enzima tiene un peso molecular de 75 000 daltones, una sola cadena polipeptídica y una composición de aminoácidos ASX 70, TRE 38, SER 80, GLX 82, PRO 46, GLI 75, ALA 50, CIS 25, VAL 43, MET 5, ILE 35, LEU 51, TIR 20, FEN 22, HIS 24, LIS 25, ARG 27 y TRP 12, haciendo un total de 730 residuos (ver figura 24 y Agradecimientos).

Como se muestra en la figura 19, la actividad coagulante del veneno soluble, así como de la fracción I, es más baja que la fibrinolítica. Solo en la fracción II es posible observar la actividad coagulante, lo que indica que en la fracción II debe existir otra enzima con esta actividad, de peso molecular alrededor de 30 000 daltones. Estos resultados indican que el veneno de la *C. molossus nigrescens* tiene como principal actividad biológica, de entre las ensayadas, la fibrinolítica.

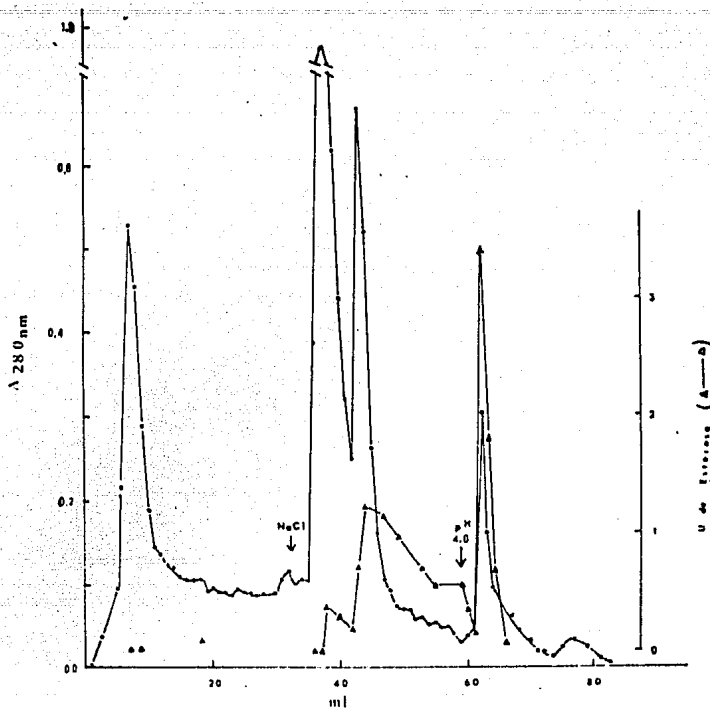


Fig. 24 Purificación de una enzima similar a la trombina. A) 20 mg de veneno fresco fueron aplicados a una columna de 5 ml de Sepharosa-benzamidina en amortiguador TRIS-HCl 20 mM, pH 8.0. Esta fue lavada con 0.5 M de NaCl en el mismo amortiguador y eluida con formato de amonio, 20 mM, pH 4.0. Las fracciones eluidas fueron recibidas en TRIS-HCl 1 M (100 μ l), pH 8.0.

El hecho de que coexistan fibrinógeno y coagulantes de fibrinógeno en un líquido que sirve como medio de defensa y predación, permite desquiciar el sistema de coagulación de la víctima independientemente de causar otras alteraciones. Además, la presencia de "colagenasa" permite dispersar más efectivamente otros componentes del veneno.

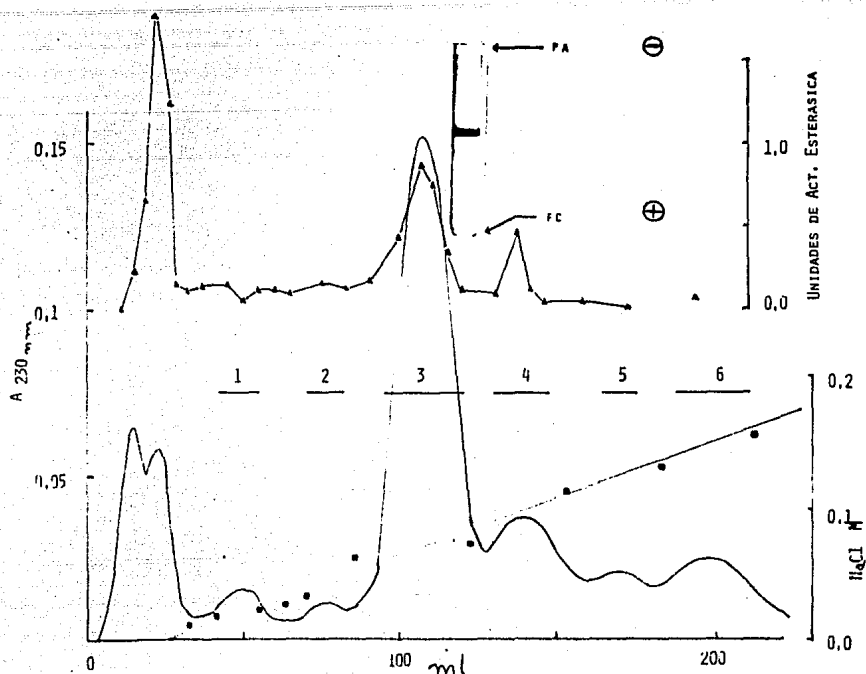


Fig. 24 B) La fracción eluida a pH 4.0, fue dializada y aplicada a DEAE-celulosa (0.7x20 cm) en TRIS-HCl 20 mM, pH 8.0. Las fracciones se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl (0 a 0.25 M, 200+200 ml). El inserto muestra la electroforesis de 30 μ g de la enzima (numerada como 3). La técnica y condiciones son las mismas que en la figura 6.

Hasta el momento se han identificado 2 clases de proteinasas en los venenos de serpientes: las serina proteinasas como la enzima similar a la trombina, la calicreina y algunas arginina esterasas; y las metaloproteiniasas colagenolíticas, hemorrágicas, que degradan complemento, fibrinogenolíticas, fibrinolíticas y que inactivan a inhibidores de proteinasas (ver Introducción).

? Que diferencia estructural habrá entre las múltiples proteinasas para que presenten actividades biológicas tan variadas?

Un indicio lo representa la estimación estadística de las diferencias en la secuencia de dos proteínas, estimada en base a la composición de aminoácidos. Es necesario hacer énfasis en la validez orientadora de esta prueba, sin que represente una evidencia experimental directa.

Sin embargo, el hecho de encontrar una relación entre las fibrinolisinias de esta serpiente, las toxinas hemorrágicas, las proteinasas que degradan inhibidores de proteinasas y proteinasas " inespecíficas ", hace tentadora la tarea de buscar características comunes entre ellas.

Por otro lado, los datos presentados respecto a la estructura primaria de estas proteinasas son escasos. El conocimiento de la estructura primaria de las proteinasas presentes en el veneno de las serpientes es demasiado escaso para permitir cualquier análisis serio sobre el asunto.

V. PERSPECTIVAS

En esta sección, prefiero plantear las perspectivas en forma de preguntas que presentarlas en forma de relato.

El trabajo descrito en las páginas anteriores, me permite plantear algunas preguntas relacionadas con la evolución de las metaloproteinasas y su papel fisiológico en organismos superiores.

? Existen en el veneno de los crotalinos, zimógenos de estas metaloproteinasas, tal como los conocemos? Si este es el caso, cual es el mecanismo de activación?

Se ha mostrado que en el veneno existen varias proteinasas con diversas actividades enzimáticas y biológicas, cual es la relación estructural entre ellas?

Las metaloproteinasas del veneno de serpientes evolucionaron hasta los crotalinos. ? La evolución de estas enzimas continuo en organismos como los mamíferos, es decir, se encuentra alguna enzima similar en las glándulas salivales de animales superiores?

La evolución de las proteinasas de serina se conoce con cierto detalle, sin embargo de los otros tipos de proteinasas poco se ha estudiado de dicho proceso. Existen metaloproteinasas intracelulares de órganos específicos de mamíferos. Estas se han involucrado en el procesamiento de

enzimas y neuropéptidos, (Conboy y cols, 1982 y Benuck y cols, 1982). ¿ La evolución de las metaloproteinasas ha seguido una línea común, o es un fenómeno de evolución convergente?

Para poder intentar resolver estas y otras preguntas similares sería muy ventajoso poder emplear un enfoque técnico más completo. Las metodologías de purificación y de química de proteínas clásicas, al ser apoyadas por enfoques propios de la genética molecular y la inmunología, tales como la clonación de genes y la inmunohistoquímica, serían las herramientas que propendría para contestar estas interrogantes.

VI. RESUMEN

En el presente trabajo se ha descrito la caracterización bioquímica general del veneno de la serpiente mexicana *Crotalus molossus nigrescens* (Gloyd) 1936.

El veneno tiene una acción predominantemente enzimática, y sus dosis letal media es de 47 $\mu\text{g}/20 \text{ g}$ de ratón. El veneno es más soluble a pH alcalino, y en él se encuentran actividades de desoxirribonucleasa, fosfodiesterasa, fosfolipasa, proteasa y BAEE hidrolasa. Además están presentes actividades de fibrinolisisina, colagenasa y coaguladora de fibrinógeno.

Se purificaron a homogeneidad 4 proteínas mediante pasos sucesivos de filtración en Sephadex G-75 a pH 5.5 e intercambio iónico a pH 7.6 y 8.9. A estas proteínas se les denominaron proteínas 1 a 4, sus pesos moleculares son 23 480, 22 900, 23 400 y 21 950, respectivamente, calculados por análisis de aminoácidos. Los aminoácidos más abundantes son los residuos ácidos y los hidrofóbicos.

Estas enzimas son metaloproteinasas inhibidas por EDTA y o-fenantrolina y las proteínas 1, 2 y 3 tienen, al mismo tiempo, actividad de esterasa (contra el sustreato BAEE). Las constantes de Michaelis para estas tres enzimas, determinada con BAEE son 44, 27 y 40 μM con velocidades máximas de 241, 38 y 74 $\mu\text{M}/\text{min}$, respectivamente. Sus valores

de pH óptimo son, con Azure como sustrato, de 8.9, 8.0, 8.7 y 7., para la 1 a la 4, respectivamente.

La secuenciación del extremo amino terminal dio resultados que se pueden calificar como preliminares, pues estaban presentes varios aminoácidos en diferentes proporciones. Este hecho puede ser producido por una degradación autolítica de las proteínas puras, pues éstas, almacenadas en congelación por 9 meses, presentaron este fenómeno.

Al compararse estadísticamente con otras proteínas, las enzimas mostraron similitud con varias metaloproteinasas presentes en veneno de serpientes, como proteinasas que degradan inhibidores de proteinasas, proteinasas inespecíficas, fibrinogenasas y proteinasas hemorrágicas.

Las cuatro enzimas degradan fibrina, de manera independiente a la activación de plasminógeno y no coagulan fibrinógeno. La proteínasa 1, además, degrada colágena nativa. A las dosis ensayadas, ninguna presentó actividad hemorrágica.

Por similitud de las acciones que comparten con las proteinasas antisepticas, estas se compararon con las presentes en el veneno de otros crotalinos.

ANEXO 1

PROGRAMA PARA EL CALCULO DE SAN/N.

LIST

```

5  REM  CALC DE S DELTA N PARA 4 PROT VS 50 PROT DE 18 AA
10  DIM A(18,4),B(18,50),DE(4,50)
11  DIM SE(50)
12  D$ = CHR$(4):P$ = "PROTEASAS": PRINT D$;"OPEN";P$: PRINT D$;"READ";P$
    : FOR I = 1 TO 49: FOR J = 1 TO 18: INPUT B(J,I): NEXT : NEXT : PRINT
    D$;"CLOSE"
15  STOP
30  FOR I = 1 TO 4: FOR J = 1 TO 18: READ A(J,I): NEXT : NEXT
35  FOR I = 1 TO 4: FOR J = 1 TO 18: SA(I) = SA(I) + A(J,I): NEXT : NEXT
40  FOR I = 1 TO 49: FOR J = 1 TO 18: SE(I) = SE(I) + B(J,I): NEXT : NEXT
50  FOR J = 1 TO 49: FOR I = 1 TO 4: SUMA = 0
60  FOR K = 1 TO 18
71  Z = A(K,I) - B(K,J)
73  SUMA = SUMA + Z * Z: NEXT
74  DI = SA(I) - SE(I)
75  SUMA = (SUMA * 0.5) - 0.035 * (DI(I) * DI(I)) + 0.535 * (ABS(DI(I)))
76  IF SA(I) > SE(I) THEN MA = SA(I): GOTO 80
78  MA = SE(I)
80  DE(I,J) = SUMA / MA
85  NEXT : NEXT
93  PRINT : PRINT "SELECCIONE SALIDA": PRINT : PRINT "(1) PANTALLA      (2)
    )IMPRESORA"
95  INPUT RR: IF RR = 2 THEN PR# 1: PRINT ""
100 FOR I = 1 TO 49: PRINT "      ": FOR J = 1 TO 4: PRINT DE(J,I),: NEXT :
    PRINT "": NEXT
110 PR# 0: GOTO 93
150 DATA 24,12,19,19,1,14,9,6,12,6,12,22,9,7,8,8,12,5
160 DATA 21,10,17,18,1,12,7,5,10,5,10,19,8,5,8,7,10,18
170 DATA 24,11,20,20,2,15,9,4,10,4,10,21,9,6,6,8,11,11
180 DATA 23,10,17,20,2,11,7,6,11,5,11,20,8,5,8,4,11,9

```

ANEXO 2

COMPOSICION DE 49 PROTEINAS UTILIZADA PARA EL CALCULO DE S DELTA N

1	26	7	14	16	6	13	8	4	11	5	12	19	7	7	8	10	12	4
2	33	11	15	24	6	9	10	2	11	5	17	25	7	7	8	7	10	5
3	33	10	16	25	6	9	9	2	11	5	18	25	7	7	8	7	11	5
4	30	10	14	26	8	14	7	8	12	8	21	14	11	6	9	9	8	4
5	30	8	18	21	7	14	9	4	13	6	15	21	8	7	6	9	15	3
6	21	9	9	18	6	18	9	24	3	3	9	9	15	9	3	12	9	0
7	22	11	18	24	7	13	11	11	11	4	8	12	7	11	5	17	7	4
8	29	17	12	14	16	20	12	10	12	7	9	23	9	8	6	18	3	6
9	30	16	19	20	10	30	16	6	19	2	14	17	12	9	5	5	2	3
10	30	0	12	72	60	48	3	0	6	0	3	9	0	3	3	3	6	0
11	19	15	16	24	10	16	15	2	11	3	14	15	9	12	6	8	8	5
12	18	4	8	36	10	12	12	0	20	4	14	20	2	14	6	12	10	4
13	29	13	23	18	7	30	16	2	15	1	8	16	5	3	8	2	15	0
14	31	13	21	17	6	27	15	3	15	1	9	17	5	3	7	1	17	0
15	32	13	20	17	7	26	15	3	15	1	9	17	6	3	7	1	17	0
16	26	20	26	14	4	33	11	2	11	2	9	13	2	9	10	2	15	0
17	29	29	25	10	4	34	10	2	10	1	11	13	3	10	8	2	17	0
18	28	18	27	13	4	36	10	2	10	1	10	13	3	9	9	2	15	0
19	24	18	19	13	9	30	17	6	18	2	10	15	8	4	12	3	9	0
20	22	10	33	14	9	25	14	12	17	2	15	14	10	3	3	14	2	4
21	28	13	37	15	14	33	37	0	30	5	13	15	10	3	6	11	2	3
22	40	10	10	18	10	22	24	24	8	2	8	12	20	8	2	14	12	0
23	40	10	10	16	10	22	24	24	8	2	8	12	20	8	2	14	12	0
24	40	10	12	16	10	20	22	24	8	2	10	10	18	8	2	10	10	6
25	40	12	12	12	8	18	22	28	8	2	12	6	18	8	6	8	12	6
26	46	12	20	14	10	12	16	24	4	4	10	14	16	10	6	18	8	2
27	28	22	14	12	12	27	20	24	6	3	17	13	7	8	4	1	4	4
28	29	15	18	19	6	12	11	6	15	5	10	19	5	6	9	10	6	4
29	25	14	25	16	6	25	29	0	15	2	11	12	7	6	5	12	3	0
30	21	13	23	13	5	21	23	0	16	1	10	10	4	6	4	12	3	2
31	15	17	19	13	5	31	24	6	19	2	8	10	4	6	1	2	12	4
32	24	19	27	12	12	29	23	4	12	4	5	8	15	10	2	9	1	5
33	24	19	22	19	7	25	17	8	27	2	10	18	11	3	6	3	12	7
34	23	11	33	16	7	26	17	10	22	2	13	15	11	3	5	9	3	5
35	30	7	9	14	12	16	11	13	8	5	17	14	6	6	7	10	18	0
36	28	13	14	29	14	21	12	6	16	4	11	24	10	10	5	18	17	6
37	31	14	16	23	22	20	11	14	17	2	18	21	7	3	9	11	12	6
38	16	15	17	24	17	24	13	12	20	2	9	20	6	7	7	11	12	6
39	27	14	14	23	16	22	13	10	10	4	12	19	7	10	8	10	3	7
40	32	12	23	29	9	39	20	12	7	2	8	15	11	8	4	2	2	7
41	26	13	11	16	9	10	9	8	16	7	10	17	7	7	8	19	8	2
42	23	14	14	21	7	9	9	6	16	6	9	17	6	5	7	15	6	8
43	25	11	23	21	8	12	12	8	10	6	15	12	10	5	7	11	7	5
44	27	9	15	19	15	17	12	12	11	5	12	11	12	7	5	11	9	2
45	26	10	13	15	16	24	12	9	15	3	11	19	8	6	5	11	7	14
46	24	12	19	19	1	14	9	6	12	6	12	22	9	7	8	8	12	5
47	21	10	17	18	1	12	7	5	10	5	10	19	8	5	8	7	10	18
48	24	11	20	20	2	15	9	4	10	4	10	21	9	6	6	8	11	11
49	23	10	17	20	2	11	7	6	11	5	11	20	8	5	8	4	11	9

VIII. BIBLIOGRAFIA

Andersson, L. Isolation of thrombin-like enzyme activity from the venom of *Trimeresurus okinavensis*. *Haemost.* 1:31-453, 1972.

Aragon-Ortiz, F. y Gubensek, F. Characterization of a thrombin-like proteinase from *Bothrops asper* venom. in *Toxins: Animal, plant and microbial*. Rosenberg, F. Editor. Pergamon Press, London. 1978. pp.107-111.

Bajwa, S.S., Markland, F. S. y Russell, F. E. Characterization of fibrinolytic enzyme from Western Diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. (Abstract). *Fed. Proc.* 38 : 808, 1979

Bajwa, S. S., Markland, F. S. y Russell, F. E. Fibrinolytic enzyme(s) in the Western Diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. *Toxicon* 18 : 100-104, 1980.

Bajwa, S. S., Markland, F.S. y Russell, F.E. Fibrinolytic and fibrinogen-clotting enzymes present in the venom of the Western Diamondback rattlesnake, *Crotalus adamanteus* and

the Gaboon viper (*Bitis gabonica*) Eastern
moccasin (*Askistrodon P. piscivorus*) and Southern
Copperhead (*Askistrodon c. contortrix*) snakes. *Toxicon*
20:427-432, 1982.

Barret, A. J. The many forms and functions of cellular
proteases. *Fed. Proceedings* 39: 9-14, 1980.

Benuck, M., Berg, M.J. & Marks, N. Rat brain and kidney
metalloendopeptidase: enkephalin heptapeptide conversion to
form a cardioactive neuropeptide. Phe-Met-Arg-Phe-Amide
Biochem. Biophys. Res. Comm. 107:1123-1129, 1982.

Berameyer, H. U. Editor, *Methods of Enzymatic Analysis*,
Verlag Chemie Weinheim and Academic Press, 1965.

Bernick, J. J. & Simpson, J. J. Distribution of
elastase-like enzyme activity among snake venoms. *Comp.*
Bioch. Phys 54 (b):51, 1976 .

Bieber, A. L., Tu, T. & Tu, A. T. Studies of an acidic
cardiotoxin isolated from the venom of Mojave rattlesnake
(*Crotalus scutulatus*). *Biochim. Biophys. Acta* 400:178-188,
1975.

Bjarnason, J. B. & Tu, A. T. Hemorrhagic toxins from
Western Diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom:
isolation and characterization of five toxins and the role
of zinc in hemorrhagic toxins. *Biochemistry* 17:3395-3404.

1978 .

Bonilla, C. A. Defibrinating enzyme from Timber rattlesnake (*Crotalus h. horridus*) venom: a potential defibrinogenating enzyme for therapeutic defibrination. I . Purification and properties. *Thrombos. Res.* 6:151-169, 1975.

Boquet, F. History of snake venom research. in Snake venoms, Lee, Chen-Yuan, Editor. *Handbook of Experimental Pharmacology* Vol. 52, Springer-Verlag, Berlin, 1979. pp 3-14.

Brattstrom, B. H. Evolution of pit vipers. *Transact. of the San Diego Society of Natural History* 13:185-268, 1964.

Civello, D.J., Duong H.L. y Geren C.R. Isolation and characterization of a hemorrhagic proteinase from Timber rattlesnake venom. *Biochemistry* 22:749-755 , 1983, a.

Civello, D.J., Moran J.B., Geren , C.R. Substrate specificity of a hemorrhagic proteinase from Timber rattlesnake venom. *Biochemistry* 22:755-762 , 1983, b.

Convoy, J. G., Fenton, W. A. y Rosenberg, L. E. Processing of pre-ornithine transcarbamylase requires a Zinc-dependent protease localized to the mitochondrial matrix. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 105:1-7, 1982.

Cornish-Bowden, A. How reliably do aminoacid composition

comparisons predict sequence similarities between proteins?

J. Theor. Biol. 76:369-386, 1979.

Cornish-Bowden, A. Interpretation of aminoacid compositions. Trends in Biochem. Sci. 6:217-219, 1981.

Crestfield, A. M., Moore, S. & Stein, W. H. The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins. J. Biol. Chem. 238: 622-627, 1963.

Dehm, P., Olsen, B. R. & Prockop, D. J. Antibodies to chick tendon collagen. European J. Biochem. 46:107 . 1974.

Dimitrov, G. D. Purification and partial characterization of two proteolytic enzymes from the venom of *Vipera russelli*. Toxicon 9:33-44, 1971.

Edman, P. & Begg, G. A protein sequenator. Eur. J. Biochem. 1:80-91, 1967.

Esnouf, M. P. & Tunnah, G. W. The isolation and properties of the thrombin-like activity from *Ancistrodon rhodostoma* venom. Brit. J. Haematol. 13:581-590, 1967.

Fabiano, R.J. & Tu, A.T. Purification and biochemical study of viriditoxin, tissue damaging toxin, from Prairie rattlesnake venom. Biochemistry 20:21-27 ,1981 .

Fulton, G. P., Lutz, B. R., Shulman, M. H. & Arendt, K. A. Moccasin venom as a test for susceptibilty to petechial formation in the horse. in Buckley, E. E. & Forges, N.

(Eds). *Venoms*. pp 303-310; Washington, D.C., Amer. Assoc. for the Advancement of Science, 1956.

Funk, C., Gmur, J., Herold, R. y Straub, P. W. *Reptilasa-R*: A new reagent in blood coagulation. *Brith. Journal of Haematol.* 21:43-52, 1971.

Gabriejelcic, D., Drujan B. y Gubensek, F. Coagulant proteinase from *Bothrops colombianus* venom. *Toxicon* 20:275-279, 1982.

Blanchard, J. M. *et al.* (1981) Treatment of bites by the Eastern Copperhead and North

Isolation of *Vipera palaestinae* venom between its hemorrhagic and proteolytic activities. *Biochem. Biophys. Acta* 133:356-362, 1967.

Hardy, D.L., Jeter, M. y Corriean, J.J.Jr. Envenomation by the Northern Blacktail rattlesnake (*Crotalus molossus molossus*): report of two cases and the in vitro effects of the venom on fibrinolysis and platelet aggregation. *Toxicon* 20:487-493, 1982.

Heimbürger, N. The mechanism of blood coagulation and its control by proteinase inhibitors. in *Proteases And Hormones*. M. K. Asarwal, Editor, Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1979. pp 47 - 65

Herzia, R. H., Ratnoff, O. D. y Shainoff, J. R. Studies on a procoagulant fraction of Southern copperhead snake venom. The preferred release of fibrinopeptide B. *J. Lab. Clin. Med.* 76:451-465, 1970.

Hose, A. R. y Romano, S. A. R. W. D. Neotropical Pit Vipers Sea snakes and Coral snakes. in Buchert, W. y Buckley, E. E. (Eds). *Venomous animals and their venoms*. Vol 2 pp 211-293 New York. Academic Press, 1971.

Holleman, W. H. y Weiss, L. J. The thrombin-like enzyme from *Bothrops asper* snake venom. *J. Biol. Chem.* 254 : 1663-1669. 1976 .

Iwanaga, S., Omori, T., Oshima, G. y Suzuki, T. Studies on snake venoms. XVI Demonstration of a proteinase with hemorrhagic activity in the venom of *Akistrodon halys blomhoffii*. *J. Biochem.* 57: 392-401. 1965.

Iwanaga, S. y Suzuki, T. Enzymes in snake venoms. in *Snake venoms*, Lee, Chen-Yuan, Editor. *Handbook of Experimental Pharmacology* Vol. 52, Springer-Verlag, Berlin, 1979. pp 61-158.

Jovin, T., Chrambach, A. y Nausthon, M. A. An apparatus for preparative, temperature regulated,

polyacrilamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 9:351-369, 1964.

Karlsson, E. Chemistry of Protein toxins in snake venoms. in Snake venoms. Lee, Chen-Yuan, Editor. Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 52. Springer-Verlag, Berlin, 1979. pp 159-212.

Kisiel, W., Hermodson, M. A. y Davies, E. W. Factor X activating enzyme from Russell's viper venom. Isolation and characterization. Biochemistry 15:4901-4906, 1976.

Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H., Murata, R. y Ohsaka, A. Studies on the quantitative method for the determination of haemorrhagic activity of Habu snake venom. Japan J. med. Sci. Biol. 13: 43-51, 1960. citado por Ohsaka, 1979.

Kress, L.F. y Catanese, J.J. Identification of the cleavage sites resulting from the enzymatic inactivation of human antithrombin III by *Crotalus adamanteus* proteinase II in the presence and absence of heparine. Biochemistry 20: 7432-7438. 1981, a.

Kress, L. F. y Catanese, J. J. Effects of human plasma alpha 2 macroglobulina of the proteolytic activity of snake venoms. Toxicon 19 (4): 501-507, 1981, b.

Kress, L.F. y Kurecki, T. Studies on the complex between human alpha 2 - macroglobulin and *Crotalus adamanteus* Proteinase II. Release of active proteinase from the

complex. *Biochem. Biophys. Acta.* 613: 469-475 .1980 .

Kress, L.F., Kurecki, T., Chan, S.K., Laskowski, M.Sr.
Characterization on the inactive fragment resulting from
limited proteolysis of human alfa 1 - proteinase inhibitor
by *Crotalus adamanteus* proteinase II. *J. Biol. Chem.*
254(12) :5317-5320 . 1979 .

Kress, L.F. y Paroski, E.A. Enzymatic inactivation of
human serum proteinase inhibitors by snake venom proteinases.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 83(2): 649-656. 1978 .

Kunitz, M. Crystalline desoxyribonuclease: II. Digestion
of thymus nucleic acid (DNA). The kinetics of the
reaction. *J. General Physiol.* 33: 363 . 1950.

Kurecki, T., Laskowski, Sr.M., Kress, L.F. Purification
and some properties of two proteinases from *Crotalus*
adamanteus venom that inactivate human alfa 1 proteinase
inhibitor. *J. Biol. Chem.* 253(22):8340-8345 . 1978 .

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

Laki, K. The polymerization of proteins: the action of
the active site. *Biochem. Biophys.* 32:317. 1951.

Magalhaes, A. De. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme of the Bushmaster snake, *Lachesis muta noctivaga*. *Toxicon* 19 :279-294 .1981 .

Man, D. P., y Minta, J. O. Purification and characterization and analysis of the mechanism of action of four anti-complementary factors in *Crotalus atrox* venom. *Immunochemistry* 14 :521-527 .1977 .

Markland, F. S. y Damus, P. S. Purification and properties of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus*. (Eastern diamondback rattlesnake). *J. Biol. Chem.* 246:6460-6473. 1971.

Markland, F. S., Kettner, C., Schiffman, S., Shaw, E., Bajwa, S. S., Reddy, K. N. N., Kirakossian, H., Palkos, G. B., Theodor, I., y Pirkle, H. Kallikrein-like activity of crotalasa, a snake venom enzyme that clots fibrinogen. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 79:1688-1692 . 1982 .

Minta, J. O., y Man, D. P. Immunological, structural and functional relationships between and anti-complementary protein from *Crotalus atrox* venom, cobra venom factor and human C 3 . *Immunology* 39: 503-509 . 1980 .

Moore, S. y Stein, W. H. The chromatographic determination of aminoacids by use of automatic recording equipment. in *Methods in Enzymol.* Vol VI, Colowick, S.P. y Kaplan, N.O. (Editores). pp. 819-831. Academic Press. New

York, 1963.

Moore, S. On the determination of cysteine as cysteic acid. *J. Biol. Chem.* 238: 235-237, 1963.

Morita, T. W. The mechanism of activation of bovine prothrombin by an activator isolated from *Echis carinatus* venom and characterization of the new active intermediates. *J. of Biochemistry*, 79:1089-1108, 1976.

Mosesson, M. W. The preparation of human fibrinogen free of plasminogen. *Biochem. Biophys. Acta.* 57: 204, 1962.

Muller, K. γ Zwillins, R. Akkumulation basischer Aminosäureester, Autolyse-rate und relative Darmtätigkeit in der Trypsin-Evolution. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 356:1173-1175, 1975.

Nafias, C. γ Heilbronn, E. Phospholipase A2 activity and substrate specificity of snake venom presynaptic toxins. *Biochemistry* 19:1144-1151, 1980.

Omori-Sato, T. γ Ohsaka, A. Purification and some properties of hemorrhagic principle 1 in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *Biochim. Biophys Acta* 207: 432-444, 1970.

Oshima, G., Matsuo, Y., Iwanaga, S. γ Suzuki, T. Studies on snake venoms. XIX. Purification and some physicochemical properties of proteinases from *Aekistrodon halys blomhoffii*. *J. Biochem.* 64:227-238, 1968.

Oshima, G., Iwanaga, S., y Suzuki, T. Some properties of proteinase b in the venom of *Aekistrodon halys blomhoffii*. *Bioch. Biophys Acta* 250: 416-427 . 1971 .

Ohsaka, A., Just, M., y Habermann, E. Action of snake venom hemorrhagic principles on isolated glomerular basement membrane . *Biochem. Biophys. Acta* 323: 415-428 . 1973 .

Ohsaka, A., Suzuki, K. y Ohashi, M. The spurtine of erythrocytes through junctions of the vascular endothelium treated with snake venom. *Microvasc. Res.*, 10:208-213. 1975.

Ohsaka, A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. in *Snake Venoms*, Lee, Chen-Yuan, Editor. *Handbook of Experimental Pharmacology* Vol. 52, Springer-Verlag, Berlin, 1979. pp 480-546.

Omby, C. L., Cameron, D., y Tu, A. T. Isolation of myotoxic component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Amer. J. Pathology* 85: 149-157 . 1976.

Ouyang, C., Hing, J. S. y Teng, C. M. Purification and properties of the thrombin-like principle from *Aekistrodon acutus* venom and its comparison with bovine thrombin. *Thrombos. Diathes. Haemorrh.* 26:224-234, 1971

Ouyang, C. y Yang, F. Y. Purification and properties of the thrombin-like enzyme from *Trimeresurus gramineus*. *Biochim. Biophys. Acta* 351:354-363, 1974.

Ouyang, C. y Huang, T. F. Purification and

characterization of the fibrinolytic principle of *Askistrodon acutus* venom. *Biochim. Biophys. Acta* 439: 146-153, 1976.

Ouyang, C. y Huang, T. F. The properties of the purified fibrinolytic principle from *Askistrodon acutus* snake venom. *Toxicon* 15:161-167, 1977.

Ouyang, C., Teng, C. M. y Chen, Y. C. Physicochemical Properties of alpha and beta fibrinogenases from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *Biochim. Biophys. Acta* 481: 622-630, 1977.

Ouyang, C. y Huang, T. F. alpha and beta fibrinogenases from *Trimeresurus gramineus* snake venom. *Biochim. Biophys. Acta* 571:270-283, 1979.

Penke, B., Ferenczi, R. y Kovacs, K. A new acidimetric method for the determination of tryptophan in peptides and proteins. *Anal. Biochem.* 60:1-5, 1974.

Perez-Tamayo, R. The pathology of collagen degradation. *Amer. J. Pathology* 92: 509-566, 1978.

Pfleiderer, G y Sumik, G. Investigation on snake venom enzymes. I. Separation of the fibrinolytic and cellulosic activities of the venom of *Askistrodon acutus*. *Biochim. Biophys. Acta* 51:482-493, 1961.

Pirkle, H., Markland, F. S., Theodor, I., Baumsartner, R., Bajwa, S. S. y Kirakossian, H. The primary structure of crotalase, a thrombin-like venom enzyme exhibits closer

homology to kallikrein than to other serine proteases.
Biochim. Biophys. Res. Comm. 99: 715-721, 1981.

Possani, L.D., Fletcher, P. L. Jr., Alagon, B. C.,
Alagon, A. C. y Julia, J. Z. Purification and
characterization of a mammalian toxin from the venom of
the Mexican scorpion *Centruroides limpidus tecomanus*
(Hoffmann). *Toxicon*, 18: 175-183, 1980.

Possani, L. D., Dent, M. A. R., Martin, B. M., Maeticke,
A. y Svensden I. The aminoacid sequence of several toxins
from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius*
Hoffmann. *Carlsberg Res. Comm.* 46: 207-214, 1981.

Posner, P., Mac Intosh, B. R. y Gerencser, G. A. Effects
of Western Diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom on
heart muscle. *Toxicon* 19:330-333, 1981

Rathbun, E. A. y Heim, L. R. The dual nature of
complement enhancement by venom from the Mojave rattlesnake
(*Crotalus scutulatus scutulatus*) *Toxicon* 20: 495-499, 1982.

Rhee, Moo-J., Morris, S. y Kosow, D. P. Role of
Meizothrombin and Meizothrombin-(des F1) in the conversion
of Prothrombin to thrombin by the *Echis carinatus* venom
coagulant. *Biochem.* 21: 3437-3443, 1982.

Rojkind, M., Ciambone, M.A. y Biempica, L. Collagen
types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology*
26:710-719. 1979.

Romer, A. S. Notes and comments on vertebrate paleontology. Capitulo 10 : Lepydosaurian reptilians. U. of Chicago Press, pp. 117-125. 1968.

Russell, F. E. The clinical problem of crotalid snake venom poisoning. in Snake Venoms. Lee, Chen-Yuan, Editor. Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 52, Springer-Verlag, Berlin, 1979. pp. 978-996.

Schwert, G. W. y Eisenberg, M. A. J. Biol. Chem. 172:221. 1948 citado en Rick, W. Triessin, en Methods in Enzymatic Analysis. (Bergmeyer, H. Editor) Academic Press, 1965.

Schiffman, S., Theodor, I. y Rappaport, S. I. Separation from Russell's viper venom of one fraction reacting with factor X and another reacting with factor V. Biochemistry 8:1397-1405, 1969.

Shiloah, J., Klibansky, C., de Vries, A. y Berser, A. Phospholipase B activity of a purified phospholipase A from *Vipera palestinae*. J. Lipid Res. 14: 267-278. 1973.

Sifford, D. H. y Johnson, B. D. Fractionation of *Aspistrodon bilineatus* venom by ion exchange chromatography. 231-242 .

Simpson, J. W. Collagenolytic activity of snake venom : the absence of collagenolytic activity in the trypsin-like enzyme from *Crotalus atrox* venom. Comp. Bioch. Physiol. 40 b: 633-636 .1971 .

Simpson, J. W. Distribution of collagenolytic enzyme activity among snake venoms. *Comp. Bioch. Physiol.* 51 b: 425-428 . 1975 .

Simpson, J. W. & Rider, L. J. Collagenolytic activity from venom of the rattlesnake *Crotalus atrox* . *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137:893-895 .1971 .

Speikerman, A. M., Fredericks, K. K., Wagner, F. W., & Prescott, J. M. Leucostoma peptidase A :a metalloprotease from snake venom. *Biochim. Biophys Acta* 293 :464-475 .1973.

Steyn, K. & Delpierre, G. R. The determination of proteolytic activity of snake venom by means of a chromogenic substrate . *Toxicon* . 11 :103-105 . 1973.

Stoker, K., Christ, W. & Leloue, P. Characterization of the venoms of various Pithecius species by immunoelectrophoresis and reaction with fibrin agarose. *Toxicon* 12:415-417, 1974.

Stoker, K., Fisher, H., & Meier, J. Thrombin-like snake venom proteinases. *Toxicon* 20 (1) : 265-273 . 1982 .

Strydom, D. J. The evolution of toxins found in snake venoms. in *Snake Venoms*. Lee, Chen-Yuan, Editor. *Handbook of Experimental Pharmacology* Vol. 52, Springer-Verlag, Berlin. 1979. pp 258-275.

Takahashi, T. & Ohsaka, A. Purification and some properties of two hemorrhagic principles (HR2a and HR2b) in

the venom of *Trimeresurus flavoviridis*: complete separation of the principles from proteolytic activity. *Biochim. Biophys. Acta* 207:65-75, 1970. a.

Takahashi, T. y Ohsaka, A. Purification and characterization of a proteinase in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *Biochem. Biophys. Acta* 198: 293-307, 1970. b.

Tolksdorf, S., Mc Cready, M. H., Mc Gullach, D. R. y Schwenk, E. The turbidimetric assay of hyaluronidase. *J. Lab. Clin. Med.* 34: 74-89 . 1949.

Toom, P. M., Squire, P. G., y Tu, A. T. Characterization of the enzymatic and biological activities of snake venoms by isoelectric focusing. *Biochim. Biophys. Acta.* 181: 339-341 . 1969 .

Tu, A. T. *Venom: Chemistry and Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York, 1971.

Tu, A. T., Nikai, T. y Baker, J. D. Proteolytic specificity of "hemorrhagic toxin a" isolated from Western Diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. *Biochem.* 20: 1104-1107, 1968.

Underwood, G. Clasification and distribution of venomous snakes in the world. in *Snake venoms*, Lee, Chen-Yuan, Editor. Handbook of Snake Venoms, Academic Press, New York, 1971.

van der Walt, S. J. y Joubert, F. J. Studies on puff adder (*Bitis arietans*) venom. I. Purification and properties of protease A. *Toxicon* 9: 153, 1971.

Wagner, F. W., Spiekerman, A. M. y Prescott, J. M. Leucostoma peptidase A. Isolation and physical properties. *J. Biol. Chem.* 243:4486-4493, 1968.

Walker, F. J., Owen, W. G. y Esmon, C. T. Characterization of the prothrombin activator from the venom of *Oxyuranus scutellatus scutellatus* (Taipan venom). *Biochem.* 19:1020-1023, 1980.

Werb, Z., Burleigh, M., Barrett, A. J. y Starkey, P. M. The interaction of alpha 2 macroglobulin with proteases. Binding and inhibition of mammalian collagenases and other metal proteinases. *Biochem. J.* 139: 359-368, 1974.

Wilson, A. C., Carlson, S. S. y White, T. J. Biochemical evolution. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 573-639, 1977.

Zlotkin, E. Chemistry of animal venoms. *Experientia* 29:1453-1466, 1973.