

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

03062
2e1.17

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado
Colegio de Ciencias y Humanidades.



HELODERMATIDINA, UNA PROTEASA DEL VENENO DEL MONSTRUO DE CUENTAS
(Heloderma horridum horridum) QUE ACTIVA PLASMINOGENO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Maestro en Investigación Biomédica Básica

P R E S E N T A :

BEATRIZ SOSA PINEDA

México, D.F.

Septiembre de 1988

LIBRO 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.

Presidente: Dr. Alejandro Alagón
Vocal: Dr. Mario Calcagno
Secretario: Dr. Lourival D. Possani
Suplente: Dr. Carlos Arámburo
Suplente: Dr. Jorge Dreyfus

Lugar donde se desarrolló el tema:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

Y

**CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE INGENIERIA GENETICA
Y BIOTECNOLOGIA.**

Sustentante:

Beatriz Sosa Pineda

Asesor del Tema:

Dr. Alejandro Alagón Cano

INDICE

INTRODUCCION.....	1
I: ENZIMAS PROTEOLITICAS EN LOS VENENOS DE REPTILES.....	1
I.A: ACTIVIDADES COAGULANTES Y ANTICOAGULANTES EN VENENOS DE REPTILES.....	2
II: ACTIVADORES DE PLASMINOGENO (AP).....	3
II.A: CARACTERISTICAS DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA DE ACTIVACION DE PLASMINOGENO.....	4
II.B: MECANISMO DE ACTIVACION DEL PLASMINOGENO.....	8
III. EL VENENO DE <u>Heloderma horridum horridum</u>	9
MATERIAL Y METODOS.....	11
A: FUENTE DEL VENENO.....	11
B: MATERIALES.....	11
C: METODOS.....	11
C.1: PREPARACION DE RESINAS DE AFINIDAD.....	11
C.2: DETERMINACION, CONCENTRACION Y DIALISIS DE PROTEINAS.....	12
C.3: ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....	12
C.4: CUANTIFICACION DE HEXOSAS Y PENTOSAS.....	13
C.5: COMPOSICION DE AMINOACIDOS.....	13
C.6: MAPAS PEPTIDICOS CON QUIMOTRIPSINA, TRIPSINA Y PEPSINA.....	13
C.7: ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA.....	13
C.8: ACTIVIDAD ESTEROLITICA MEDIDA CON BAEE COMO SUSTRATO.....	14
C.9: ACTIVIDAD PROTEOLITICA MEDIDA CON HEMOGLOBINA COMO SUSTRATO.....	14
C.10: PURIFICACION DE FIBRINOGENO SIN PLASMINOGENO.....	14
C.11: PURIFICACION DE PLASMINOGENO DE PLASMA HUMANO.....	15
C.12: GELES DE AGAROSA CON FIBRINA PARA LA DETECCION DE LA ACTIVIDAD FIBRINOLITICA.....	16
C.13: GELES DE AGAROSA CON CASEINA PARA DETECTAR ACTIVIDAD CASOINOLITICA.....	17
RESULTADOS.....	18
A: FRACCIONAMIENTO DEL VENENO SOLUBLE.....	18
A.1: CROMATOGRAFIA EN PC-AMINOHEXIL-SEFAROSA 4B.....	18
FIGURA 1.....	19
FIGURA 2.....	20
FIGURA 3.....	21
A.2: ELECTROELUCION DE LAS HELODERMATIDINAS 1 Y 2.....	22
FIGURA 4.....	23
TABLA I.....	24
B: CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE HELODERMATIDINAS.....	25
B.1: DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS.....	25
B.2: ANALISIS DE AMINOACIDOS.....	25
FIGURA 5.....	26
B.3: MAPAS PEPTIDICOS DE LAS HELODERMATIDINAS 1 Y 2.....	27
C: CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LA FRACCION F.1.3.1.....	27
C.1: ACTIVIDAD ESTERASICA Y PROTEOLITICA DE LA FRACCION F.1.3.1.....	27
FIGURA 6.....	28
TABLA II.....	29
C.2: ANALISIS DE LA CONVERSION DE PLASMINOGENO EN PLASMINA.....	30
FIGURA 7.....	32
DISCUSION.....	33
REFERENCIAS.....	38
OTRAS REFERENCIAS.....	42

RESUMEN

Se purificaron dos enzimas (Helodermatidinas) del veneno del Mounstro de Cuentas o Heloderma horridum horridum, con actividad fibrinolítica indirecta o de activador de plasminógeno.

La caracterización bioquímica de las mismas mostró que se trata de dos glicoproteínas con un peso molecular aproximado de 27 000 y 25 000 daltones, respectivamente. La comparación de su composición de aminoácidos, el patrón de sus péptidos generados por digestión quimotrópica y el mismo tipo de actividad enzimática que comparten, permiten postular que representan dos formas de una misma enzima.

Los estudios sobre la actividad proteolítica de las Helodermatinas mostraron que la misma está restringida en cuanto a sus sustratos, ya que no digieren caseína ni hemoglobina. La conversión de una molécula de plasminógeno la efectúan probablemente a través del mismo mecanismo que opera para la enzima urocinasa, y su velocidad no se ve incrementada por la presencia de fibrina.

La actividad específica de activador de plasminógeno de las Helodermatinas es demasiado baja si se compara con la de otros activadores de plasminógeno; esto sugiere que quizá existan otros sustratos fisiológicos para estas enzimas, cuya posible identificación se discute al final de este trabajo.

GLOSARIO

AP: Activador de Plasminógeno
AP-t: Activador de Plasminógeno Tisular
AP-u: Urocinasa
BAEE: α -N-Benzoil-L-Arginina Etil Ester
DFP: Di-Isopropil-Fluorofosfato
LBTI: Inhibidor de Tripsina de Lima
SBTI: Inhibidor de Tripsina de Soya
TLCK: N- α -p-Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona

INTRODUCCION

I: ENZIMAS PROTEOLITICAS EN LOS VENENOS DE REPTILES.

El veneno de los reptiles está compuesto de aproximadamente un 90% de proteína; en la mayoría, su toxicidad depende de la acción sinérgica de diferentes enzimas y proteínas no enzimáticas, cuya presencia, proporciones y características varían entre las distintas especies.

La presencia de enzimas proteolíticas en algunos venenos fue detectada hace varios años, los que generalmente tienen más de un tipo. Se han caracterizado proteasas relativamente inespecíficas, así como actividades exopeptidásicas (empleando diferentes di y tripéptidos como sustratos), y proteasas altamente específicas (como son los factores liberadores de cininas, los que activan complemento, las que poseen actividad coagulante o anticongelante, y otras).

La actividad de proteasas en los venenos juega un papel muy importante, tanto en la fisiopatología producida por la mordedura de alguno de estos reptiles, como en la dispersión de los demás componentes de los venenos en diferentes órganos y tejidos. En general, ello se debe a:

- 1) El efecto necrótico de algunas proteasas.
- 2) La presencia de proteasas con actividad autofarmacológica. Este efecto se refiere a la liberación en el organismo de sustancias no presentes en el veneno, como las cininas.
- 3) La acción de algunas proteasas sobre componentes del sistema inmune. Por ejemplo, su efecto en la activación de la vía alterna del complemento, y la formación de complejos intermediarios que producen la lisis de eritrocitos.
- 4) La participación de ciertas proteasas en el proceso de la coagulación sanguínea y/o sus efectos anticoagulantes.

I.A: ACTIVIDADES COAGULANTES Y ANTICOAGULANTES EN VENENOS DE REPTILES

Muchos venenos tienen pronunciados efectos en la coagulación, - ya sea acelerando o retardando este proceso; en los mismos, pueden presentarse al mismo tiempo factores coagulantes y anticoagulantes.

Efectos Coagulantes.

Para la formación de un coágulo se requiere de una cascada de - eventos en la cual, mediante la activación secuencial de zimógenos, y a través de un proceso amplificador delicadamente regulado, se convierte al fibrinógeno en fibrina.

En algunos venenos, ciertas proteínas inducen la coagulación -- sanguínea porque:

- 1) Activan a los factores X, V ó protrombina.
- 2) Tienen actividad tromboelastínica.
- 3) Poseen actividad directa de trombina.

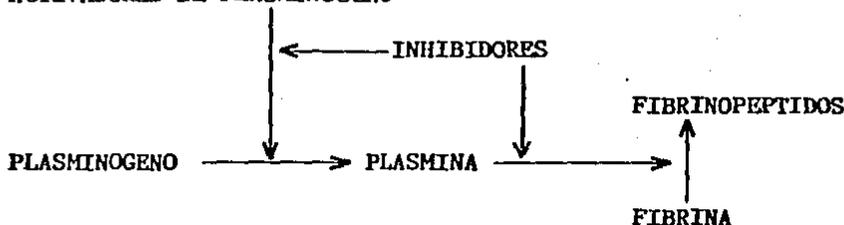
Efectos Antihemostáticos.

Los venenos pueden interferir en dos niveles distintos alterando la coagulación:

- 1) Evitando la formación del coágulo sanguíneo, al inhibir o -- destruir específicamente algún factor que preceda a la formación de fibrina, i.e., actividad fibrinogenolítica, e inhibidores de trombina y del activador de trombina.
- 2) Destruyendo el coágulo formado directamente (actividad de -- plasmina), o directamente al producir plasmina a partir de plasminógeno.

Fibrinolisis.- Este proceso se refiere a la disolución de coágulos de fibrina, por un sistema enzimático presente en la sangre. En el sistema fibrinolítico participan la plasmina, su zimógeno o plasminógeno, los activadores de plasminógeno, e inhibidores tanto de estos últimos, como de plasmina. Su interrelación para lograr la destrucción de fibrina se esquematiza a continuación:

ACTIVADORES DE PLASMINOGENO



Como se ha mencionado anteriormente, en los venenos de reptiles es común encontrar presentes simultáneamente, factores coagulantes y anticoagulantes que actúan a varios niveles, lo cual dificulta su estudio cuando se emplea el veneno crudo. De aquí la importancia del aislamiento y caracterización de los factores responsables de estas actividades, así como su ensayo y reconstitución en sistemas definidos "in vitro" e "in vivo".

Una de las actividades de las proteasas purificadas en este trabajo, es la conversión de plasminógeno en plasmina (con la subsecuente fibrinolisis). Por ello, a continuación se describirá este proceso, haciendo mención de los activadores de plasminógeno más estudiados, sus características y los papeles que se les han asignado en otros procesos fisiológicos, además del fibrinolítico.

II: ACTIVADORES DE PLASMINOGENO (AP)

Históricamente, el interés en la plasmina y en los AP se ha derivado de su papel en la fibrinolisis. Los primeros estudios, a principios de este siglo, verificaron la existencia de una proteína plasmática inactiva (plasminógeno), que por un factor estreptococal (estreptocinasa) era convertido en una proteasa activa (plasmina). Esta última es, a la vez, responsable de la degradación de fibrina.

Los estudios iniciales en este campo, asumieron que el papel principal de la plasmina era la lisis de fibrina; sin embargo, también se reconoció que, de las muchas enzimas proteolíticas generadas en el plasma, aquella es única por su amplia especificidad. En la actualidad, se reconoce que la proteólisis catalizada por plasmina, es capaz de

alterar la función de los sistemas efectores de proteínas plasmáticos mas importantes: coagulación y fibrinólisis, activación de complemento y liberación de cininas (Barret,A.T., 1977).

Con el descubrimiento de los inhibidores plasmáticos de plasmina, se postuló la existencia de otros factores que regularían la fibrinólisis, es decir, AP endógenos. A la fecha, su presencia se ha detectado en casi todos los tejidos estudiados, en el plasma, en el endotelio vascular y en varios fluidos corporales (incluyendo la orina). También se ha verificado que la actividad fibrinolítica de células en cultivo, está mediada por AP's sintetizados y secretados por ellas mismas.

La distribución ubicua de tales activadores, y la asociación de su actividad con procesos de vascularización durante la cicatrización de heridas, procesos inflamatorios(Unkeless, J.,et.al., 1974; Reich,E., 1978), e infiltración de células tumorales (Dano, K.,et.al.,. 1985; Mignatti,P.,et.al., 1986), llevó a la hipótesis de que la deposición de fibrina y su subsecuente lisis, juegan un papel muy importante en la homeostasis de los organismos.

Asimismo, se ha sugerido que estas enzimas también participan en otros procesos, ademas del fibrinolítico y de la coagulación; entre éstos se mencionan: la involución de la glándula mamaria (Ossowski,L.,et.al., 1979), la ovulación (Strickland,S. y Beers,W.H., 1976), y la implantación del blastocisto en el útero (Strickland,S. y Mahdavi,V., 1978).

II.A.CARACTERISTICAS DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA DE ACTIVACION DE PLASMINOGENO.

La interacción del plasminógeno con diferentes AP's se ha estudiado desde hace ya varios años; una vez que las secuencias amino-terminales del plasminógeno y la plasmina generada fueron descifradas, los eventos moleculares que comprenden esta reacción de activación comenzaron a conocerse. Para su descripción, es necesario mencionar las propiedades mas relevantes de sus componentes.

Plasminógeno.

Esta molécula se encuentra a una concentración relativamente alta (180 µg/ml) en el plásmo humano; en el mismo, aproximadamente un 40% es extravascular. También se ha detectado su presencia en: fluído folicular bovino, yema de huevo, fluído de ascitis tumoral murino, líquido uterino humano y porcino, saliva, membrana basal de epidermis humana e hígado de rata, entre otros.

El plasminógeno humano consiste de una sola cadena polipeptídica con un PM de aproximadamente 95 000 daltones; este último varía, dependiendo de la presencia de ciertos carbohidratos en la molécula. El residuo de aminoácido en el extremo amino-terminal de todas las formas de plasminógeno es ácido glutámico, y el carboxilo terminal es asparagina - (Castellino, F.J., 1981). Debido a la presencia de proteasas en la fuente de la cual se obtiene el plasminógeno, cuando éste se purifica pueden presentarse formas alternativas de la molécula, con diferentes residuos de aminoácido en el extremo amino-terminal.

Plasmina.

La forma nativa de plasmina se genera como consecuencia de, al menos, la hidrólisis de dos enlaces peptídicos en la molécula de plasminógeno. Uno de ellos (Arg560-Val561), es esencial para la generación de la actividad catalítica. El otro resulta de la autólisis en el enlace Lis76-Lis77, con la subsecuente liberación de un péptido de 76 residuos de aminoácido del extremo amino-terminal. La molécula de plasmina consiste entonces, de dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro, cuyos pesos moleculares aproximados son: 63 000-58 000 daltones, para la cadena pesada, y 25 000 daltones, para la cadena ligera.

Esta serina proteasa es sensible a inhibición por: LBTI, SBTI, Aprotinina, Trasilol, DFP y TLCK; también existen importantes inhibidores de su actividad en el plasma (α -2-macroglobulina y α -2-antiplasmina). Su especificidad es semejante a tripsina, hidrolizando enlaces peptídicos con lisina y arginina; también posee actividades esterásica y amidolítica, sobre ésteres y amidas de aminoácidos básicos, respectivamente.

El sitio activo de la molécula se localiza en la cadena ligera; como ya se ha mencionado, esta proteasa hidroliza enlaces peptídicos en

una gran variedad de proteínas, con excepción de la colágena nativa; entre sus sustratos se cuentan: caseína, protamina, proteínas menores de membranas celulares, inmunoglobulinas, hormonas peptídicas, - algunos componentes del sistema de complemento y del sistema de la - coagulación.

Activadores de Plasminógeno (AP)

Dentro de los AP de vertebrados descritos a la fecha, y para los cuales se han asignado posibles papeles en procesos relacionados con la generación de plasmina, se encuentran:

1) Urocinasa (AP-u).-- Esta enzima se purificó por primera vez de la orina humana (Lesuk,A., et.al., 1965). La enzima cristalizada posee un PM aproximado de 54 000 daltones, existiendo una variante - enzimática producida por proteólisis, cuyo PM es cercano a 30 000 -- daltones. Hasta la fecha, se han descrito otras formas de urocinasa en la orina (Stump,D.C., et.al., 1986) y formas precursoras producidas por células en cultivo (Kohno,T. et.al., 1984 y Stump,D.C. et.al. 1986).

La literatura que existe actualmente sobre urocinasa es extensa, abarcando estudios relacionados con la regulación de su síntesis (Queenan,J.T., 1987), la clonación de sus genes y su expresión en -- Escherichia coli (Holmes,N.E., 1985), la purificación de inhibidores de urocinasa en orina humana (Stump,D.C., et.al., 1986), y la des- - cripción de formas inmunológicamente relacionadas, en plasma y fluido seminal humanos (Dano,K. et.al., 1985).

La cinética de activación de plasminógeno por urocinasa, ha - sido ampliamente estudiada (Peltz,S.W., et.al., 1982; Lijnien,H.R., - et.al., 1986; Collen,D., et.al., 1986). Se ha sugerido que, además - de plasminógeno, esta enzima podría tener otros sustratos celulares, aunque existen evidencias muy escasas al respecto.

La actividad esterolítica de urocinasa sobre ésteres de arginina y lisina, y la activadora de plasminógeno, no son inhibidas por Trasilol, Aprotinina, SBTI ó LBTI; DFP, p-aminobenzamidina y algunos péptidos sintéticos de arginina sí la inhiben.

2) Activadores de plasminógeno tisulares (AP-t).-- Se han purificado una serie de activadores de plasminógeno de diversos tejidos, no

relacionados inmunológicamente con urocinasa: de corazón y glándula salival porcinas: riñón, ovario y útero humanos; tejido endotelial, eritrocitos, leucocitos y fluido de cultivos celulares condicionados; líneas tumorales y líneas celulares transformadas por virus oncogénicos (Dano, K. et. al., 1985).

El PM aproximado de estos AP es de 70 000 daltones; son glicoproteínas con una o dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. Su único sustrato proteico conocido es el plasminógeno, y su mecanismo de activación es semejante al de urocinasa, excepto por su alta dependencia por fibrina para llevar a cabo este proceso (Hoylaerts, M. et. al., 1982).

Su actividad es inhibida por los mismos inhibidores sintéticos empleados por la urocinasa, aunque su susceptibilidad a los mismos, es diferente.

Los estudios estructurales con estas proteasas, han sugerido la presencia de tres dominios involucrados en su interacción con fibrina, lo que explica su gran afinidad por la misma (Van Zonneveld, A.J., et. al., 1986 y 1986a; Verheijen, J.H., et. al., 1986; Holveet, P., et. al., 1986).

Existe también una extensa literatura relacionada con la caracterización de distintos AP-t, la cual incluye: su actividad en diferentes tejidos, estudios de cinética, de activación en presencia de fibrina, tanto para formas endógenas como recombinantes (Zamarron, C., et. al., 1984), la purificación de inhibidores proteicos (Wagner, O.F. y Binder, B.R., 1986), y el diseño de proteínas de fusión, conteniendo dominios tanto de urocinasa como de AP-t (Pierald, L., et. al., 1987; Gheysen, D., et. al., 1987).

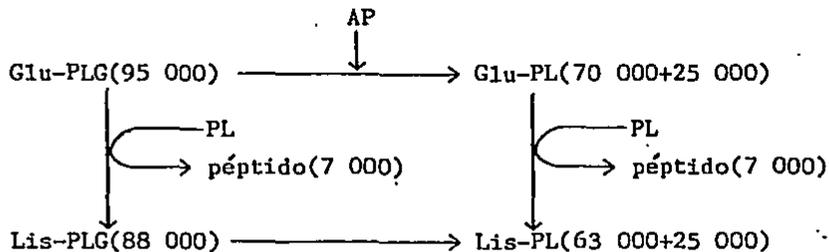
3) Desmocinasa.— En 1966, Hawkins y Hellerman reportaron la presencia de AP en las secreciones digestivas de algunos animales hematófagos. El más potente de ellos, se describió en la saliva del vampiro Desmodus rotundus, y se conoce como Desmocinasa (Hawkey, C.M., 1966).

La disolución de coágulos de fibrina por esta enzima, es mucho más efectiva que la producida por estreptocinasa ó urocinasa, lo cual se debe quizá a una gran afinidad por fibrina. Por lo mismo, se especula que estructuralmente esté relacionada con los AP-t.

La Desmocinasa ha sido parcialmente purificada y caracterizada (Cartwright, T., 1974). Su PM es de aproximadamente 150 000 daltones, y su actividad es inhibida por DFP, ácido ξ -aminocapróico y BAEE, además de ser completamente dependiente de fibrina.

II.B. MECANISMO DE ACTIVACION DEL PLASMINOGENO

El mecanismo de activación del plasminógeno humano se ha estudiado con varios activadores. En general, se describe de la siguiente manera:



La mayoría de los activadores, incluyendo a la urocinasa y los AP-t, se inscriben dentro de este mecanismo; la cinética de esta activación, sin embargo, es diferente debido a la estricta dependencia de estos últimos por fibrina. Asimismo, se conoce que la liberación del péptido amino-terminal en el Glu-plasminógeno, mediada por plasmina, regula la velocidad de conversión de dicha molécula; esto se debe a un cambio conformacional, que también puede ser inducido por ácido ξ -aminocapróico o lisina en el medio de reacción, y que facilita la hidrólisis del enlace Arg560-Val561 en el plasminógeno. Aparentemente, el ión Cl^- tiene un efecto inhibitorio en esta activación (Urano, T., et al., 1987).

En la actualidad, se conocen otras proteasas que también activan al plasminógeno; en muchos casos, el mecanismo de este proceso se desconoce, aunque se postula que los sitios de hidrólisis en la molécula de plasminógeno, sean análogos a los que ya se han descrito. Entre las serina-proteasas que se sabe activan al plasminógeno, se encuentran: calicreína (Colman, R.W., 1969), trombina (Engel, A. et al., 1966), y los factores de la coagulación XIIa y XIa (Goldsmith, G.H., et al., 1978;

Maude, R.J. y Kaplan, A.P., 1979). Sin embargo, la velocidad de conversión de la molécula en plasmina, es extremadamente baja cuando se compara con la de urocinasa (aproximadamente 10^{-4} veces).

III: EL VENENO DE Heloderma horridum horridum

El Monstruo de Gila (Heloderma suspectum) y el Monstruo de Cuentas (Heloderma horridum), representan a la única familia de lagartos venenosos que actualmente existe. La distribución de estos animales se limita a: el Sur de los Estados Unidos y Norte de México, para la especie H. suspectum, y la costa Occidental de México hasta la frontera con Guatemala, para la especie H. horridum.

En estos saurios, la glándula venenosa se localiza en la mandíbula inferior. La toxicidad del veneno que secretan es relativamente alta (i.p. LD 50 en ratón = 2 mg/kg), y en él se han detectado varias actividades enzimáticas y una toxina.

Los primeros estudios sobre los efectos fisiológicos producidos "in vivo" por mordedura de este reptil, se realizaron con la especie H. suspectum. En ellos se reporta que la administración del veneno en perros producía: vasodilatación general, inhibición de la coagulación y falla progresiva de la coordinación muscular (Patterson, R.A., 1967). El suministro de dosis letales del veneno en ratones, ocasionaba hemorragias masivas en varios tejidos (Styblova, Z. y Kornalik, F., 1967). En estos estudios, el reporte de los efectos de este veneno sobre el sistema de coagulación es contradictorio, sugiriéndose que la extensa hemorragia podría ser consecuencia de una interferencia con el sistema de la coagulación, o bien, por un efecto en el sistema vascular periférico.

La caracterización bioquímica de algunos de los componentes del veneno de ambas especies, sugiere la composición de los mismos es prácticamente igual (Mebs, D., 1968).

En 1982, Alagón et al. reportaron la caracterización bioquímica parcial del veneno de H. h. horridum; en ésta se incluye la cuantificación de actividades de: fosfolipasa A, hialuronidasa y BAEE-esterasa. En dicho trabajo, se distinguen dos actividades esterásicas: la minoritaria ha sido caracterizada como una enzima con actividad liberadora de cininas (Alagón, A. et al., 1986). La actividad esterásica mayoritaria fue parcialmente purificada y descrita en otro trabajo de este mismo grupo (González,

J.C., 1983) en el cual se reporta que, la fracción aislada poseía actividad fibrinolítica únicamente si había plasminógeno presente, y era debida a la presencia de dos enzimas en el veneno con un PM de aproximadamente 25 000 daltones.

El objetivo de este trabajo, consistió en la purificación de -- las enzimas responsables de la actividad fibrinolítica indirecta o de activador de plasminógeno en el veneno de Heloderma horridum horridum, y su caracterización parcial.

MATERIAL Y METODOS

A: FUENTE DEL VENENO

El veneno de H. h. horridum se obtuvo de ejemplares adultos, mantenidos en cautiverio en el laboratorio. El mismo, fue pipeteado directamente de su boca, mediante la técnica descrita por Loeb, L. (1983). - El veneno recién extraído, fue centrifugado a 10 000 rpm durante 15 minutos (centrífuga Sorvall; rotor SS-34; $r_{max}=10.8$ cm). El sobrenadante o veneno soluble, fue liofilizado y guardado a -22°C hasta el momento de su uso.

B: MATERIALES

El Sefadex G-75, la Sefarosa CL-4B 200 y la L-Fenil-Sefarosa CL-4B de Pharmacia. La Aminocaproil-p-aminobenzamidina-Sefarosa 4B, de Pierce. La Sefarosa CL-4B activada con bromuro de cianógeno, fue de Sigma. La DE-32 Celulosa, fue de Whatman. La resina de afinidad empleada para purificar la Fosfolipasa (PC-Sefarosa), se preparó en un trabajo descrito anteriormente (Sosa, B.P. et al., 1986). El fibrinógeno bovino; trombina y urocinasa humanas; tripsina, quimotripsina, pepsina y hemoglobina; el α -N-benzoyl-L-arginina etil éster (BAEE), p-aminobenzamidina, ácido ξ -aminocaprónico, L-fenilalanina, L-tirosina-HCl y la 1-etil-3(3 dimetilaminopropil-carbodiimida)-HCl, fueron de Sigma. La L-lisina-HCl fue de Merck. El bromuro cianógeno fue de Aldrich. Como sustrato para caseína, se empleó leche en polvo descremada comercial (Carnation). El inhibidor pancreático bovino de tripsina (BPTI) fue de Sigma. Los demás reactivos y solventes empleados, fueron de grado analítico.

C: METODOS

C.1: PREPARACION DE RESINAS DE AFINIDAD.

La preparación de L-fenilalanina Sefarosa CL-4B, se llevó a cabo empleando la resina comercial activada, siguiendo el protocolo descrito

por el fabricante. El gel seco (4 g), fue resuspendido y lavado con HCl 1 mM. La L-fenilalanina (82.6 mg), fue disuelta en 8 ml de etilenglicol 50%, en NaHCO₃ 0.1 M, pH 9.3. La resina se resuspendió en 20 ml de este mismo amortiguador, y se mezcló con el ligando, agitando suavemente durante dos horas, a 25°C. El rendimiento final fue de aproximadamente 35 μ moles L-Fen/ml resina.

La preparación de Aminocaproil-p-aminobenzamida-Sefarosa se llevó a cabo en dos etapas:

Primero, se acoplaron 20 g de ácido ϵ -aminocaproico con 20 ml de Sefarosa CL-4B, activada con bromuro de cianógeno, según el método descrito por Cuatrecasas, P. et al. (1968).

Después, la misma resina fue lavada con NaCl 0.5 M y agua bidestilada; se resuspendió en una solución de p-amino-benzamida (312 mg), en 20 ml de agua bidestilada. El pH se ajustó a 4.5 con HCl 0.1 N, y se añadieron 288.4 mg de 1-etil-3(3-dimetil-aminopropil-carbodiimida)-HCl. El pH se mantuvo en 4.5 por 24 horas, a 25°C y en agitación constante. Se lavó la resina con NaCl 0.5 M y amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7.2. La titulación de la misma mostró que tenía 41 μ moles de p-aminobenzamida/ml, por lo que se diluyó con Sefarosa CL-4B, hasta obtener una concentración final de aproximadamente 12 μ moles de ligando/ml.

C.2: DETERMINACION, CONCENTRACION Y DIALISIS DE PROTEINAS.

La cuantificación de la concentración de proteína se hizo espectrofotométricamente, asumiendo que 1 A280 = 1 mg/ml. Las soluciones de proteína fueron concentradas por ultrafiltración con membranas PM-10 de AMICON. Para diálisis se empleó membrana Visking 8/E 32 (corte 8 000 daltones).

C.3: ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

La electroforesis se llevó a cabo en geles (11.25 y 20%) en placa de poliacrilamida (0.1x10x10 cm), en presencia de lauril sulfato de sodio (SDS), según Laemli, U.K. (1970), y empleando β -mercaptoetanol, para reducir los puentes disulfuro. Los geles fueron teñidos con Azul Brillante de Comassie R-250, de acuerdo a Swank, R.T. y Munkres, K.D. (1971).

Para la electroelución de enzimas, se emplearon dos sistemas de electroforesis: el primero consistió en un gel (7.5%) en placa de poli acrilamida (0.2x10x10 cm), en amortiguador de Tris (Jovin, T., et.al., - 1964); para el segundo, se emplearon geles (7.5%) en tubo (7.0 x 0.7 - cm) de poliacrilamida, en el mismo amortiguador; los mismos tenían una membrana de diálisis (Visking 8/32; corte 8 000), atada en el extremo inferior para retener las proteínas eluidas del gel.

C.4: CUANTIFICACION DE HEXOSAS Y PENTOSAS.

El contenido de carbohidratos en las glicoproteínas, excluyendo amino-azúcares, se determinó por el método del Orcinol-Ácido sulfúrico, descrito por Tsugita, A. y Akaboni, S. (1959).

C.5: COMPOSICION DE AMINOACIDOS.

La composición de aminoácidos, se llevó a cabo por el método de hidrólisis de Moore, S. y Stein, W.H. (1963). Duplicados de las muestras de proteína se hidrolizaron al vacío, en tubos sellados individualmente, con CH₁ 6 M conteniendo fenol 0.5%, a 110°C durante 24 horas. No se determinaron ácido cistéico ni triptofano. El análisis de los hidrolizados se llevó a cabo en un analizador de aminoácidos - Durrum, D-500.

C.6: MAPAS PEPTIDICOS CON QUIMOTRIPSINA, TRIPSINA Y PEPSINA.

En el ensayo de digestión con tripsina y quimotripsina, se empleó un amortiguador de Tris-HCl 20 mM, pH 7.95, conteniendo CaCl₂ 5 mM. Con pepsina, el amortiguador fue glicina 20 mM, pH 3.7 (ajustado con ácido acético). La concentración final de cada proteasa en el ensayo fue de 0.1 mg/ml. Para control de la digestión, se empleó una caseína como sustrato. Brevemente, la mezcla de proteasa y sustrato se incubó 2 horas a 37°C; después de ello, se añadió el amortiguador de muestra para la electroforesis (Tris-HCl 20 mM, pH 6.8, conteniendo β-mercaptoetanol 1%, c.f.), con lo cual se detuvo la reacción. Esta mezcla fue calentada 5 minutos a 90°C, antes de aplicarse en el gel de poliacrilamida, preparado para analizar los productos de digestión.

C. 7: ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA.

Se empleó el método titulométrico de Shiloah J., et.al. (1973), empleando yema de huevo como sustrato, y titulando la liberación de -- ácidos grasos con una solución de NaOH 0.05 M. Se añadieron diferentes cantidades de enzima a la mezcla de incubación, manteniéndose a 25°C, - en agitación constante y bajo atmósfera de nitrógeno.

Una unidad de actividad enzimática se define como: la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de ácido/minuto, a pH 8 y 25°C, en 3 ml de una solución al 10% (p/p) de yema de huevo, en NaCl 0.1 M.

C.8: ACTIVIDAD ESTEROLITICA MEDIDA CON BAEE COMO SUSTRATO.

Esta actividad se midió espectrofotométricamente con un aparato Gilford-250. Los ensayos se hicieron a 25°C, añadiendo la solución de enzima a una celda de cuarzo. conteniendo 1 ml de α -N-benzoil-L-arginina etil éster (BAEE) 1 mM, en amortiguador de Tris-HCl 0.1 M, pH 7.95, y midiendo el cambio en absorbancia a 255 nm por 5 minutos. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de proteína que se requiere para hidrolizar 1 μ mol de sustrato/minuto, bajo las condiciones descritas previamente.

C.9: ACTIVIDAD PROTEOLITICA MEDIDA CON HEMOGLOBINA COMO SUSTRATO.

Esta actividad se determinó midiendo la cantidad de tirosina soluble, liberada después de la digestión de hemoglobina por una proteasa (Rick, W., 1965). Se incubaron diferentes cantidades de enzima con 0.5 ml de una solución de hemoglobina (5 mg), en amortiguador de Tris-HCl 0.1 M, pH 7.95, conteniendo CaCl_2 10 mM, durante 10 minutos y en agitación constante. Después, se añadió 1 ml de ácido tricloroacético al 5%, incubándose la mezcla 30 minutos a 25°C. Se tomaron alícuotas - (1.5 ml) de cada tubo, que se centrifugaron 10 minutos en una microfuja Beckman. El precipitado se descartó, y se añadieron al sobrenadante (0.5 ml) 10 ml de NaOH 0.5 N y 300 μ l de reactivo de fenol. Esto se in cubió 10 minutos a 25°C, y fue centrifugado 5 minutos. La absorbancia a 750 nm del sobrenadante fue determinada. Para cuantificar la actividad, se construyó una curva estándar con tirosina-HCl, incubada como se ha descrito con NaOH 0.5 y reactivo de fenol. Como proteasa control se -- empleó tripsina.

C.10: PURIFICACION DE FBRINOGENO SIN PLASMINOGENO.

El fibrinógeno bovino fue precipitado con sulfato de amonio (Laki, K., 1951), y vuelto a precipitar dos veces con etanol en presencia de lisina, - para remover el plasminógeno contaminante (Mosessonm N.W., 1962). Brevemente: 2 g de fibrinógeno comercial (coagulante en 88%) o fibrinógeno O, se di solvieron en 100 ml de amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.4, llevándose el volúmen al doble con agua bidestilada; la solución se dejó reposar a 4°C durante la noche. El precipitado que se formó fue removido por -- filtración. Al filtrado (fibrinógeno I), se le añadió 1/3 de volúmen de una solución saturada de sulfato de amonio. El fibrinógeno precipitado se recuperó por centrifugación, y fue resuspendido en 50 ml de NaCl 0.3 M; ésto se dializó contra la misma solución (3 cambios de 1 hora cada uno; fibrinógeno II). A la solución se le añadieron 250 ml de L-lisina 0.12 M, en amortiguador de fosfatos 5 mM, pH 7.0, y se dejó enfriar en hielo por 30 minutos. Se añadieron, lentamente y bajo agitación constante, 22 ml de etanol absoluto - frío. Después de 10 minutos, el fibrinógeno precipitado fue recuperado por centrifugación, y resuspendido en 33 ml de NaCl 0.3 M (fibrinógeno III), re pitiéndose la precipitación etanólitica en presencia de lisina. El fibrinógeno precipitado se resuspendió en 30 ml de amortiguador de fosfatos 15 mM, pH 7.2 conteniendo NaCl 0.15 M (PBS), dializándose exhaustivamente contra - esta misma solución amortiguadora (fibrinógeno IV, sin plasminógeno).

La concentración final del fibrinógeno empleado en los experimentos de fibrinolisis fue 4.3 mg/ml para el fibrinógeno I, y 1.0 mg/ml para fibrinógeno IV ($E_{280}^{1 \text{ mg/ml}} = 1.59$).

C.11: PURIFICACION DE PLASMINOGENO DE PLASMA HUMANO.

Para purificar plasminógeno, se empleó cromatografía de afinidad, según el método de Deutsch, D.G., y Mertz, E.T. (1970). Esta resina se preparó en el laboratorio, acoplando 7 g de L-lisina-HCl con 50 g de Sefarosa CL-4B -- 200, activada con bromuro de cianógeno (Cuatrecasas, P. et.al., 1968).

El plasma humano (250 ml) se diluyó con el mismo volumen de amortiguador de fosfatos 0.1 m, pH 7.4, y se centrifugó a 7 000 rpm (centrífuga Sorvall; rotor GSA) durante 10 minutos, para remover la proteína precipitada.- El sobrenadante se aplicó a una columna (12 x 2 cm) de L-lisina-Sefarosa -- CL-4B. Los contaminantes fueron lavados con 0.1 M del mismo amortiguador, - conteniendo 0.2 M NaCl y 3 mM EDTA, hasta obtener una lectura $A_{280}=0.01$. El

plasminógeno fue eluido con el mismo amortiguador, conteniendo 0.2 M -- ácido ξ -aminocaprótico. Finalmente, el plasminógeno se separó de este último por una cromatografía en Sefadex G-75 (54 x 2.5 cm), eluida con -- amortiguador de fosfatos 5 mM, pH 7.2. El rendimiento final fue de aproximadamente 40 mg de plasminógeno.

C.12: GELES DE AGAROSA CON FIBRINA PARA LA DETECCION DE LA ACTIVIDAD FIBRINOLITICA.

Se siguió el método de Granelli-Piperno, A. et.al., (1978), con algunas modificaciones. Se prepararon las siguientes soluciones: a) agarosa al 1% en amortiguador de Tris-HCl 25 mM, pH 7.2. La agarosa se disolvió en baño María, manteniendose a 42°C; b) fibrinógeno I (4.3 mg/ml) ó IV (1.0 mg/ml) en PBS, calentado y mantenido a 42°C. Se mezclaron rápidamente 3 ml de cada una de esas soluciones, añadiendo a la mezcla 0.5 -- unidades NIH de trombina humana, en 50 μ l de NaCl 0.5 M y amortiguador -- de citrato de sodio 50 mM, pH 7.2. Con esta actividad enzimática, el fibrinógeno es convertido en fibrina en aproximadamente 5 minutos. En algunos casos, los geles fueron suplementados con plasminógeno purificado -- (10 μ g/ml de solución). La mezcla fue distribuida homogéneamente sobre -- dos tiras de acetato de celulosa (7 x 5.5 cm, cada una), evitando la formación de burbujas. Después de la gelificación, las tiras se colocaron -- dentro de cajas de Petri conteniendo papel absorbente, para evitar su desecación.

La actividad fibrinolítica se detectó siguiendo la difusión radial de la actividad (lisis de fibrina) después de aplicar, por duplicado, -- las muestras de enzima en pocillos (3 mm de diámetro) hechos en el gel de agarosa; éstas se incubaron por 18 horas a temperatura ambiente. Para visualizar mejor este efecto, las placas se lavaron con NaCl 0.15 M, y -- se tiñeron durante 5 minutos con Negro de Amido al 0.1% en metanol al 70% y ácido acético 10%.

Para la cuantificación de la actividad, se compararon las áreas de -- lisis producidas en el gel, con las generadas por un estándar de AP-t en sayado bajo estas mismas condiciones.

C.13. GELES DE AGAROSA CON CASEINA PARA DETECTAR ACTIVIDAD CASEINOLITICA.

Se siguió el procedimiento de Graneli-Piperno, A. et.al.(1978), con algunas modificaciones. Los geles se prepararon con las siguientes soluciones: a) agarosa 1.5% en amortiguador de Tris-HCl 25 mM, pH 7.2; la agarosa se disolvió en baño María, manteniéndose a 42°C; b) solución de caseína, preparada a partir de una mezcla de leche evaporada al 8% (p/p), disuelta en agua bidestilada; la mezcla se calentó durante 30 minutos en baño María, y fue centrifugada a 8 000 rpm (centrífuga Sorvall, rotor SS-34; rmax=10.8 cm) durante 10 minutos. Al sobrenadante se le añadió azida de sodio 0.02% (c.f), y se mantuvo a 4°C hasta el momento de su uso. Antes de mezclarlo con la agarosa, se calentó y mantuvo a 42°C. Para preparar los geles, se mezclaron 3 ml de la solución de agarosa y 1.9 ml de la solución de caseína. La preparación de las placas, su tinción y la detección de la actividad, fueron similares que para los geles con fibrina-agarosa. En algunos experimentos, las muestras con la enzima se preincubaron con plasminógeno antes de ser aplicadas en el gel.

RESULTADOS

A: FRACCIONAMIENTO DEL VENENO SOLUBLE.

A.1. Cromatografía en PC-Aminohexil-Sefarosa 4B.

El veneno soluble se hizo pasar primero a través de una columna de afinidad para fosfolipasa A; la resina (PC-Aminohexil-Sefarosa 4B) tiene como ligando un análogo de fosfolípido [1-(11-carboxi)undecil-rac-2-hexadecil-3 glicerofosforilcolina o PC], acoplado a Aminohexil-Sefarosa 4B.

El veneno liofilizado fue disuelto en amortiguador inicial de Tris-HCl 25 mM, pH 7.95, conteniendo CaCl_2 25 mM, EDTA 1 mM y Tritón X-100 0.5%, centrifugándose a 8 000 rpm (centrífuga Sorvall; rotor SS-34; $r_{\text{max}}=10.8$ cm) por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante o veneno soluble, fue aplicado a una columna (9x1.1 cm) de PC-Aminohexil-Sefarosa 4B, la que fue eluída sucesivamente con: amortiguador inicial, el mismo conteniendo NaCl 0.5 M, amortiguador de Tris-HCl 25 mM, pH 7.95 conteniendo EDTA 50 mM, y ácido acético 0.1 M. Los tubos que recibieron el eluído con ácido acético contenían 500 μl de Tris-HCl 1M, pH 7.95, para neutralizarlo inmediatamente (Figura 1).

La fracción que no se pegó a la resina (F.1) contuvo, además de la mayoría de los componentes del veneno soluble (con excepción de la fosfolipasa), aproximadamente 69% de la actividad de BAEE-esterasa original. Esta misma fue concentrada y dializada (con recuperación del 45.3% de la actividad), y se aplicó a una columna de Benzamidina-Sefarosa (7.5x1.8 cm) que fue eluída con: amortiguador de fosfato de sodio 20 mM, pH 6.8, el mismo amortiguador conteniendo NaCl 0.8 M, y una solución de ácido acético 0.1 M, neutralizada con 500 μl de Tris-HCl 1 M, pH 7.95 en cada tubo (Figura 2). Se colectaron tres fracciones con proteína; la última (F.1.3), contenía aproximadamente 85% de la actividad de BAEE-esterasa aplicada a la columna. Finalmente, la fracción concentrada y dializada se cromatografió en una columna (26x1.1 cm) de intercambio iónico, DE-32 celulosa, que fue eluída con un gradiente salino lineal (Figura 3). Se colectó la fracción

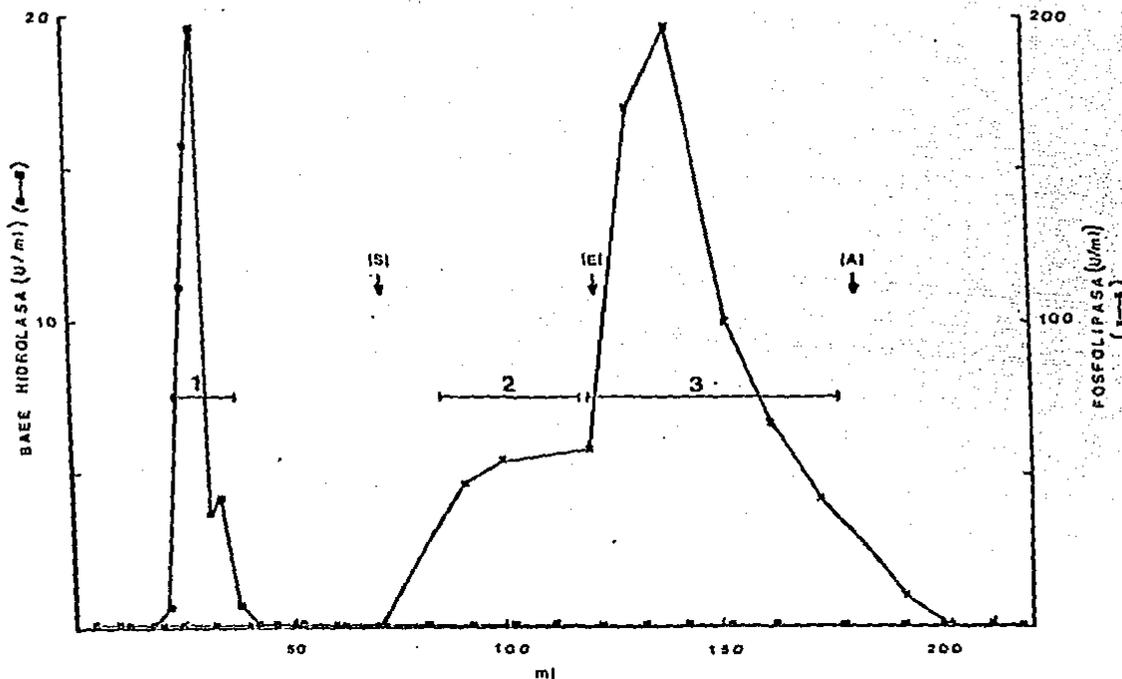


FIGURA 1. Fraccionamiento del Veneno Soluble en una columna de afinidad para Fosfolipasas A. El veneno soluble (4.7 ml; 59.4 unidades A280) en amortiguador inicial de Tris-HCl 25 mM, pH 7.95, conteniendo CaCl_2 25 mM, EDTA 1 mM y Tritón X-100 0.5%, se aplicó a una columna de PC-Aminohexil-Sefarosa 4B (9.0x1.1 cm), la que se eluyó sucesivamente con: amortiguador inicial, (S) el mismo conteniendo NaCl 0.5 M, (E) amortiguador de Tris-HCl 25 mM, pH 7.95 conteniendo EDTA 50 mM, y (A) ácido acético 0.1 M. Las fracciones (2 ml/tubo) se colectaron y juntaron como se indica (barras horizontales; 1-3). La fracción 1 (con actividad de BAEE-esterasa) se dializó contra el amortiguador inicial de la Figura 2, y fue concentrada por ultrafiltración. Sólo se muestran las actividades enzimáticas.

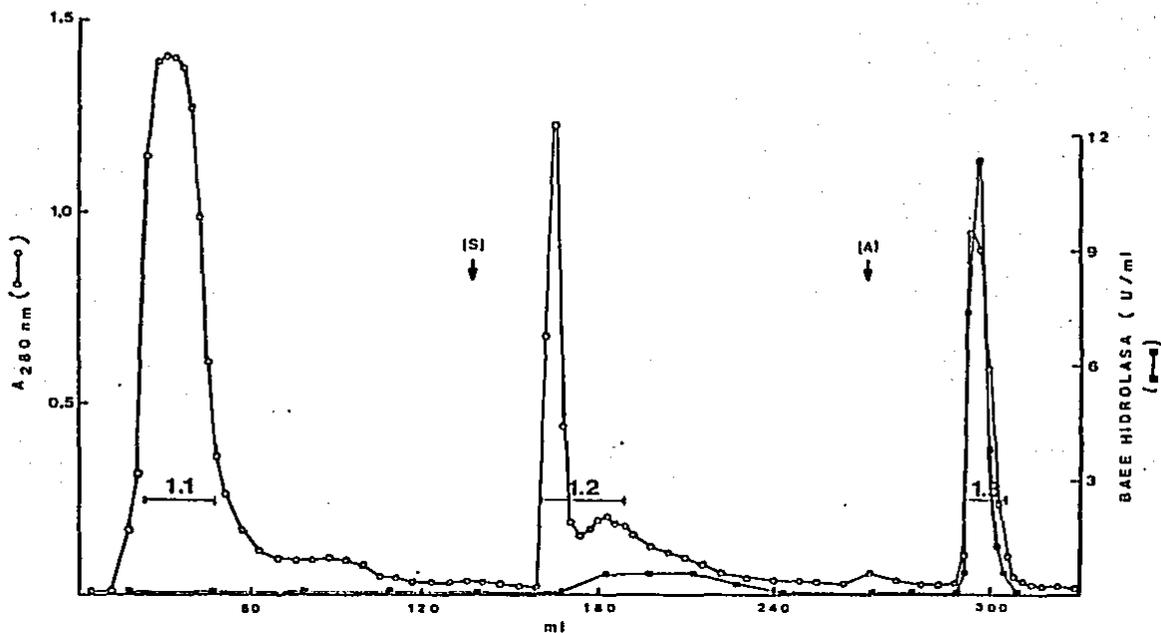


FIGURA 2. Cromatografía de afinidad de la fracción 1, en una columna (7.5x1.8 cm) de Benzamidina-Sefarosa. Se aplicaron 75.0 unidades de BAEE esterasa de la fracción 1 a esta columna, la cual fue eluida sucesivamente con: amortiguador inicial de fosfato de sodio 20 mM, pH 6.8, (S) el mismo amortiguador conteniendo NaCl 0.8 M, y (A) ácido acético 0.1 M. Se colectaron tres fracciones (3 ml/tubo), las que se juntaron como se indica (1.1-1.3). La fracción eluida con ácido acético (1.3), conteniendo actividad de BAEE-esterasa, fue concentrada y dializada contra amortiguador de fosfato de sodio 20 mM, pH 6.8.

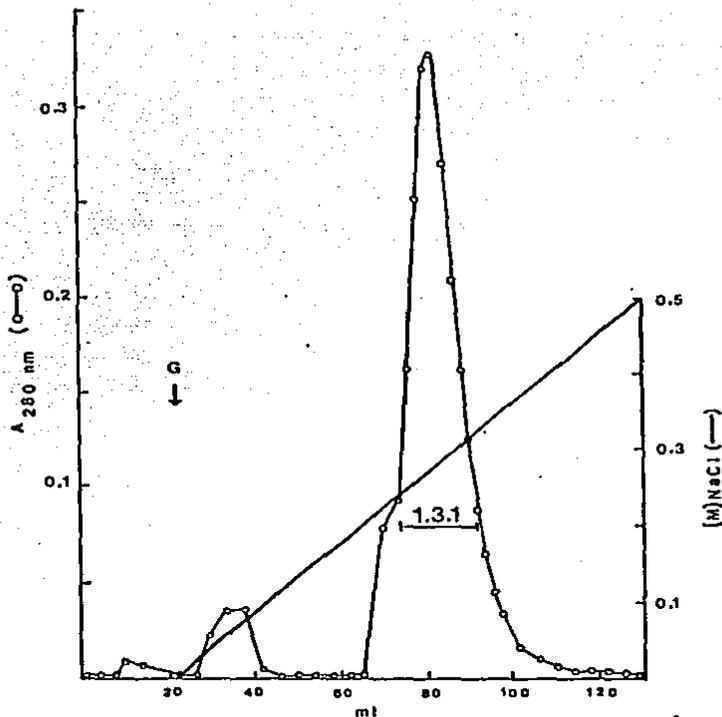


FIGURA 3. Cromatografía de Intercambio Iónico de la Fracción 1.3, en una columna (26.0x1.1 cm) de DE-32 celulosa. Se aplicaron 5.4 unidades A280 de la fracción 1.3 a esta columna, la que fue eluida con un gradiente salino lineal (0-0.5 M NaCl), en amortiguador de fosfato de sodio 20 mM, pH 6.8 (2 ml/tubo). Se colectó la fracción con actividad de BAEE-esterasa (1.3.1), la que fue concentrada y dializada contra amortiguador de acetato de amonio 5 mM, pH 8.3.

con actividad BAEE-esterasa (F.1.3.1), que fue concentrada, dializada - contra amortiguador de acetato de amonio 5 mM, pH 8.3 y mantenida a -22°C hasta el momento de su uso.

La electroforesis de la fracción F.1.3.1. en dos sistemas de geles (SDS y amortiguador de Tris), mostró dos bandas conspicuas de proteína, prácticamente puras. El PM de las mismas, determinado por comparación con estándares de peso molecular conocido, fue de aproximadamente 27 000 y 25 000 daltones, respectivamente (Figura 4).

Cuando esta fracción se ensayó para fibrinólisis se observó actividad únicamente en los geles con fibrina I y con fibrina IV suplementada con plasminógeno; esto también sucede cuando se ensaya el veneno soluble, y corrobora las observaciones de González (1983), sobre la presencia de actividad fibrinolítica indirecta o de activador de plasminógeno en este veneno, debida a estas dos enzimas.

En la Tabla I se resumen los distintos pasos cromatográficos del veneno de H.h.horridum, empleados para purificar la fracción con actividad fibrinolítica indirecta, así como la recuperación de proteína y actividad enzimática en cada uno de ellos. Se ha decidido llamar a estas isoenzimas proteolíticas Helodermatidas, aludiendo a la familia a la que pertenecen los Heloderma (Helodermatidae). Los nombres Helodermi- -na y Helospectinas designan a los péptido secretagogos (Hoshino, et.al., 1985; Parker, et.al., 1984) y Helodermatina a la calicreína (Alagón, et. al., 1986) presentes en el veneno de estos saurios.

A.2: Electroelución de las Helodermatidas 1 y 2.

La electroelución se llevó a cabo empleando dos sistemas de geles, con el objeto de separar las dos isoenzimas de la fracción F.1.3.1, y - hacer un análisis comparativo de las mismas. La fracción F.1.3.1 (360 - µg) liofilizada, se resuspendió en 200 µl de amortiguador de Tris-HCl - 20 mM, pH 7.95; se añadieron 200 µl más de amortiguador de electrofore- -sis, y la muestra (400µl) se aplicó a lo largo de un gel en placa (2 mm de espesor) de acrilamida (7.5%) en amortiguador de Tris (Jovin, T. et. al., 1964). La electroforesis se corrió a 150 V (voltaje constante), -- hasta que la distancia entre el borde inferior del gel y el colorante fue de

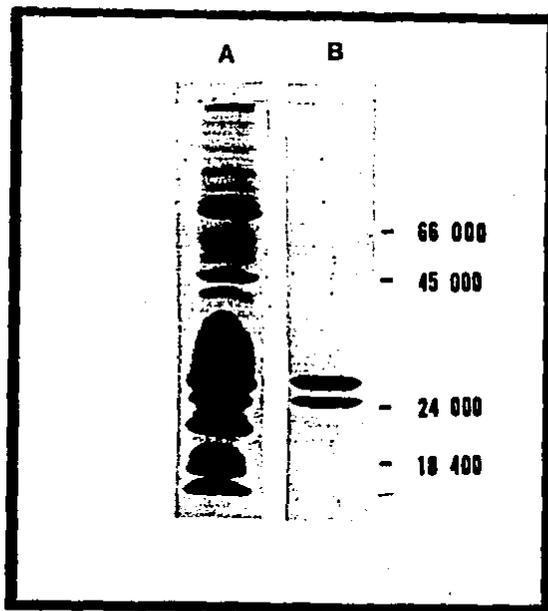


FIGURA 4. Electroforesis en gel (12.5%) en placa de poliacrilamida en presencia de SDS (Laemmli, U.K., 1970), empleando β -mercaptoetanol para reducir los puentes disulfuro. A: Veneno soluble de H.h.horridum (126 μ g). B: fracción F.1.3.1 (10.5 μ g), mostrando las dos bandas de proteína purificadas a partir de este veneno. El gel fue teñido con azul brillante de coomassie R-250. La posición de los estándares de peso molecular conocido se encuentra indicada a la derecha de la figura.

TABLA I

RESUMEN DE LA PURIFICACION DE HELODERMATIDINA.

FRACCION*	mg	U TOTALES	U/mg	RENDI- MIENTO	PURIFI- CACION
Veneno	100.0	165.6	2.8	100.0	1.0
F.1	**	75.0	**	45.3	**
F.1.3	9.1	63.9	7.0	38.6	2.5
F.1.3.1	2.7	71.3	26.4	43.0	9.4

* Los valores, con excepción del veneno, se refieren a la muestra respectiva dializada y concentrada.

** No fue cuantificada la proteína, debido a la presencia de Tritón X-100.

aproximadamente 5 mm. Se hizo una tinción rápida del mismo con azul brillante de coomassie G-250, siguiendo el método de Resnier, A.H., et.al. (1975); las bandas de proteína se cortaron y, por separado, se lavaron en un tubo con 3 ml de amortiguador del gel concentrador, haciendo 4 cambios de este cada 10 minutos.

Para electroeluir las proteínas, se prepararon dos geles de poliacrilamida (7.5%) con el mismo amortiguador de Tris, en tubos de vidrio (7.0 x 0.7 cm); el volumen del gel concentrador fue de 200 μ l, y el del separador, 1 ml. En la parte inferior de cada tubo se ató una membrana de diálisis, formando una bolsa de aproximadamente 500 μ l de volumen, para retener las proteínas eluidas. Sobre el gel concentrador se colocaron los pedazos del gel (1x1x1 mm) con la proteína correspondiente, bañados con 200 μ l del amortiguador de muestra. La electroforesis se corrió a 1.5 mA/gel (gel concentrador), y 3 mA/gel (gel separador), a corriente constante. Después de que el colorante (azul de bromofenol) salió del gel, se contaron 15 minutos, revirtiéndose la polaridad 15 segundos.

Las muestras se dializaron exhaustivamente durante 5 horas (7 cambios/45 minutos cada uno), contra amortiguador de acetato de amonio 5 mM, pH 8.3. Por cada 360 μ g (cuantificados por absorbancia) separados por electroforesis preparativa, se obtuvieron 67 y 50 μ g (cuantificados por análisis de aminoácidos) de Helodermatidina 1 y 2, respectivamente.

La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, mostró una banda de proteína prácticamente pura con la enzima de mayor PM aparente (Helodermatidina 1), mientras que la que migra más rápidamente (Helodermatidina 2) presentó un contaminante de alrededor del 10% de la otra forma (Figura 5).

B: CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LAS HELODERMATIDINAS.

B.1. Determinación de Carbohidratos.

El análisis del contenido de hexosas y pentosas en la fracción F.1.3.1 (Helodermatidinas juntas), fue de 59 μ g/mg de proteína; es decir, aproximadamente 5.9% del peso total.

B.2. Análisis de Aminoácidos.

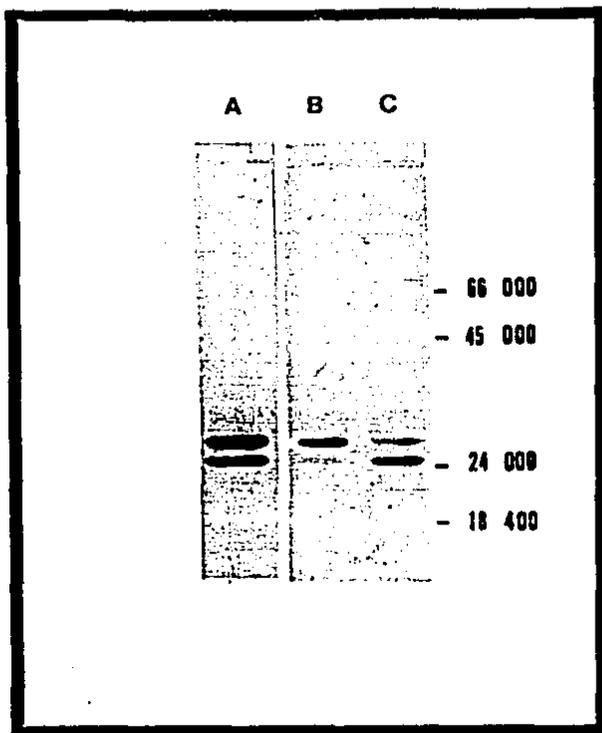


FIGURA . 5. Electroforesis en gel (12.5%) en placa de poliacrilamida, en presencia de SDS, preparado y teñido según las condiciones descritas para la Figura 4. A: Fracción F.1.3.1 (7.8 μ g), con las dos Helodermatidinas presentes. B: Helodermatidina 1 (5 μ g), electroeluida como se ha descrito en la sección de Métodos. Se observa una banda de proteína -- prácticamente pura cuyo peso molecular se calculó en este sistema en -- aproximadamente 27 000 daltones. C: Helodermatidina 2 (5 μ g) electro- -- eluida, con un peso molecular aproximado a 25 000 daltones; en ésta se observa un pequeño contaminante (menos del 10%) de la otra isoenzima.

La composición de aminoácidos de las Helodermatidinas 1 y 2, se muestra en la Tabla II. La comparación de las mismas muestra que se trata de proteínas muy similares. El PM calculado a partir de este análisis fue de: 25 990 y 23 575 daltones, respectivamente, y es cercano al determinado por la electroforesis en gel en presencia de SDS (27 000 y 25 000).

B.3: Mapas Peptídicos de las Helodermatidinas 1 y 2.

Se hizo una digestión proteolítica parcial de las Helodermatidinas 1 y 2 con el objeto de comparar el patrón electroforético de los péptidos generados. Se hicieron digestiones con tres proteasas: tripsina, quimotripsina y pepsina, bajo las condiciones descritas previamente. Los productos de digestión se analizaron en un gel en placa de poliacrilamida (20%), en presencia de SDS. Únicamente se observó proteólisis de las Helodermatidinas con quimotripsina. Sin embargo, bajo idénticas condiciones caseína fue digerida completamente. En la Figura 6 se muestran los resultados del experimento en el que 15 µg de cada una de las Helodermatidinas fueron incubadas a 37°C -- con 0.3 µg de quimotripsina, bajo las condiciones descritas en la sección de Métodos. El patrón cualitativo de los productos de digestión fue casi -- idéntico para ambas proteínas, siendo la única diferencia un péptido adicional de alto peso molecular en la Helodermatidina 1. Sin embargo, la abundancia relativa de los péptidos fue diferente entre ambas.

C: CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LA FRACCION F.1.3.1.

Los resultados del análisis de aminoácidos y la comparación de los productos de digestión quimotriptica, junto con la demostración inicial de que las dos proteínas en la fracción F.1.3.1 comparten un mismo tipo de actividad enzimática (fibrinolítica indirecta), nos permiten postular que éstas -- representan formas alternativas de una misma enzima. Por esta razón, y dado que su separación por electroforesis preparativa es laboriosa, se procedió a hacer el análisis algunas de sus propiedades enzimáticas, empleando la -- fracción con las dos Helodermatidinas.

C.1: Actividad esterásica y proteolítica de la fracción F.1.3.1.

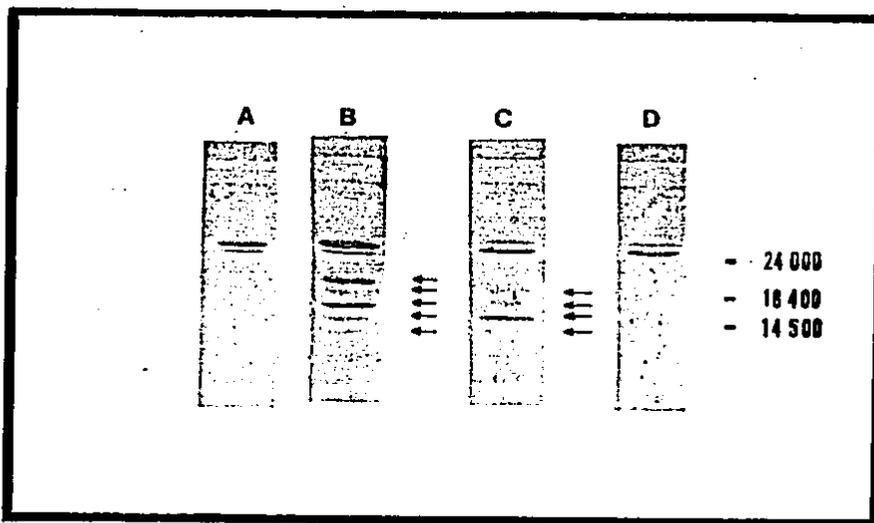


FIGURA 6. Mapas Peptídicos de las Helodermatidinas 1 y 2. Para su comparación se empleó la electroforesis en gel (20 %) en placa de poliacrilamida, en presencia de SDS y con β -mercaptoetanol. A y D: Helodermatidinas 1 y 2, respectivamente (3 μ g de cada una), sin digerir. B y C: Helodermatidinas 1 y 2 (15 μ g de cada una), digeridas con quimotripsina bajo las condiciones descritas. Las flechas indican la posición de los péptidos generados por la digestión proteolítica. Asimismo, se indica la migración de los marcadores de peso molecular empleados.

TABLA II

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LAS HELODERMATIDINAS 1 y 2.

<u>AMINOACIDO</u>	<u>HELODERMATIDINA 2</u>	<u>HELODERMATIDINA 1</u>
Asx	26	27
Tre	14	14
Ser	26	28
Glx	22	25
Pro	12	12
Gli	33	39
Ala	15	19
1/2 Cis	n.c.	n.c.
Val	7	7
Met	6	6
Ile	9	10
Leu	11	13
Tir	4	5
Fen	3	3
His	7	8
Lis	6	7
Arg	4	3
Trp	n.c.	n.c.
PM	23 575	25 990

La actividad específica de esterasa (empleando BAEE como sustrato) de la fracción PC.1.3.1 se cuantificó, siendo la misma de 26.4 U/mg. Asimismo, se cuantificó su actividad fibrinolítica en geles de agarosa con fibrina I en relación a un estándar de AP-t, dando una actividad específica del orden de 30 IU.

Para delimitar aún más la especificidad de la actividad proteolítica de las Helodermatidinas, se emplearon también otros sustratos protéicos.

Para el ensayo con caseína como sustrato, 10.5 μ g (27.8x10 exp-2 U BAEE esterasa) de la fracción F.1.3.1 fueron preincubados durante 24 horas a 25°C, en amortiguador de Tris-HCl 20 mM, pH 7.95, con o sin 15 μ g de plasminógeno. Después de ello, las muestras se aplicaron a un gel de caseína-agarosa, el cual se incubó 18 horas, a 25°C. Como controles se ensayaron: la fracción F.1.3.1 y tripsina (0.2 μ g) sin preincubar, y plasminógeno (15 μ g) preincubado en las mismas condiciones. Se observaron halos de proteólisis únicamente cuando la muestra de Helodermatidina fue preincubada con plasminógeno; esto indica que la actividad caseinolítica se debió a la plasmina generada durante dicha preincubación. Con plasminógeno solo, la actividad caseinolítica endógena fue prácticamente nula, y el control con tripsina fue positivo como se esperaba.

Cuando el sustrato ensayado fue hemoglobina, no se observó digestión del mismo hasta con 1.3 U BAEE esterasa (50 μ g) de la fracción de Helodermatidinas. Una actividad esterásica equivalente de tripsina dió una liberación correspondiente a 0.32 μ moles de tirosina, bajo las mismas condiciones.

Los resultados anteriores con caseína y hemoglobina sugieren que la especificidad de la actividad proteolítica de las enzimas de esta fracción es muy restringida.

C.2. ANALISIS DE LA CONVERSION DE PLASMINOGENO EN PLASMINA.

Para analizar el patrón electroforético de los productos de digestión generados al activar plasminógeno con la fracción F.1.3.1, se empleó electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) con SDS. Estos

patrones se compararon con los producidos por la activación de plasminógeno por urocinasa.

Se prepararon las siguientes mezclas de reacción: 12.9 µg (40.6x10 exp-2 U de BAEE esterasa) de fracción F.1.3.1, o 0.5 µg de urocinasa humana, - disueltos en amortiguador de Tris-HCl 20 mM, pH 7.95 (30 µl v.f.) conteniendo L-lisina (10 mM c.f.), en tubos con 30 µg de plasminógeno liofilizado. - En algunos casos se añadió BPT1, 10 µM, c.f., para inhibir la actividad de la plasmina generada. Los tubos se incubaron 48 horas, a 25°C y bajo agitación constante. La reacción fue terminada por la adición de amortiguador de muestra con SDS, conteniendo β-mercaptoetanol 1% (c.f.). Las muestras se calentaron 5 minutos a 90°C, antes de ser aplicadas en el gel.

Bajo estas condiciones, parte del plasminógeno fue convertido en plasmina, cuyas cadenas se separaron por la electroforesis en condiciones reductoras (Figura 7). Tanto para urocinasa como para las Helodermatidinas del veneno de H.h.horridum, el resultado fue el mismo: la cadena pesada de plasmina aparece mayoritariamente como una especie con un PM aparente de 62 500 - daltones. Cuando a la mezcla se le añadió BPT1, el PM de la misma aumentó a aproximadamente 67 500 daltones; bajo estas dos condiciones, no se alteró - el PM aparente de la cadena ligera de la molécula de plasmina (aproximadamente 25 000 daltones).

Los resultados de este experimento, sugieren que el mecanismo de activación del plasminógeno por los AP del veneno de H.h.horridum, es semejante - al producido por su activación con urocinasa.

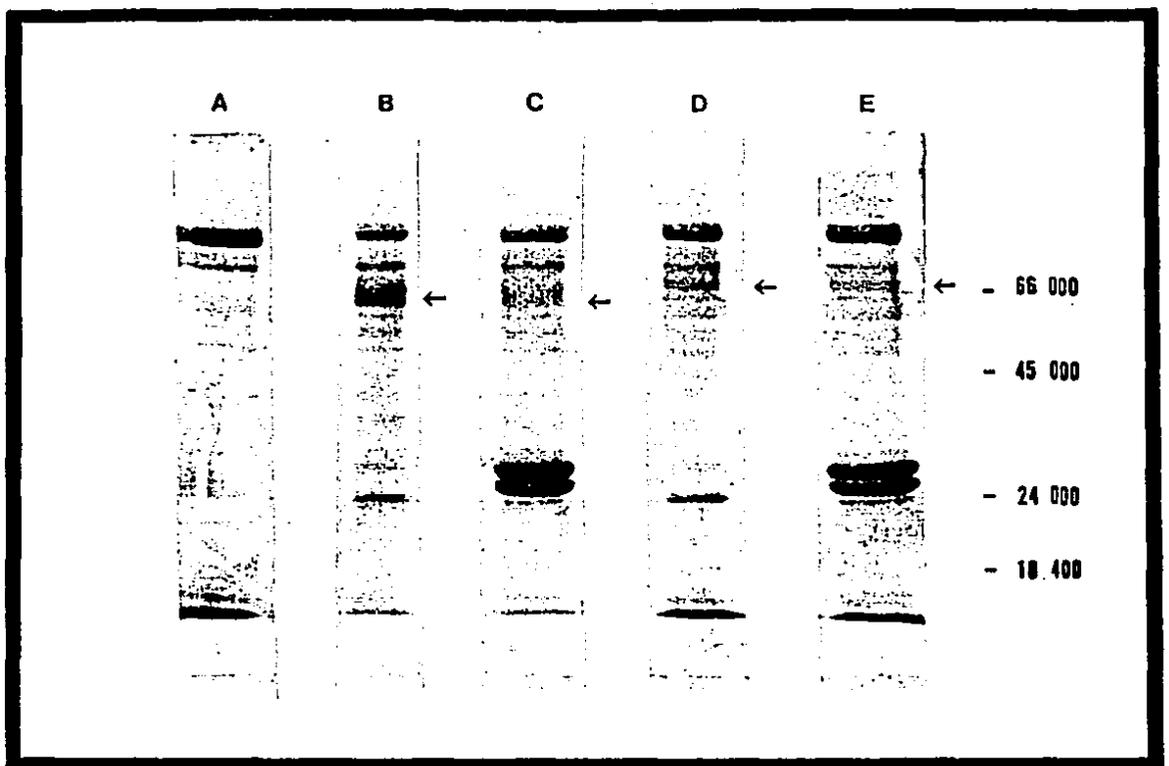


FIGURA 7. Comparación de los productos de digestión producidos al activar plasminógeno humano. Se incubaron 30 μg de plasminógeno humano con urocinasa (0.5 μg) o fracción F.1.3.1 (12.9 μg), bajo las condiciones descritas. Las cadenas de la plasmina generada se separaron en un gel (10%) en placa de poliacrilamida, en presencia de SDS y con β -mercaptoetanol como agente reductor. A: Plasminógeno humano sin digerir, mostrando una especie mayoritaria con un peso molecular cercano a 82 000 daltones. B y C: plasminógeno incubado con urocinasa y fracción F.1.3.1, respectivamente. D y E: plasminógeno incubado con urocinasa y fracción F.1.3.1, respectivamente, en presencia de BPTI 10 μM . Las flechas (+) indican las posiciones de las cadenas de plasmina generadas en cada una de estas reacciones. La posición de los marcadores de peso molecular se encuentra indicada.

DISCUSION

Los resultados del trabajo de tesis de González, J.C. (1983) sobre la caracterización de las actividades coagulantes y anticoagulantes del veneno de H.h.horridum, reportan que la primera se debía a una enzima con un PM aproximado a 65 000 daltones. La actividad anticoagulante por fibrinólisis se producía únicamente en presencia de plasminógeno, y era debida a dos enzimas en el veneno, cuyo PM aproximado se calculó en alrededor de - 25 000 daltones. Esto suponía que posiblemente el papel fisiológico de -- las mismas era a través de la activación de plasminógeno.

En dicho trabajo, se describe un método cromatográfico para la obtención de una fracción de proteína conteniendo a estas dos enzimas en forma bastante pura. En el mismo se reporta como paso cromatográfico inicial, - el uso de una columna de Fenil-Sefarosa, ya que se deseaba separar a la - enzima fosfolipasa con el objeto de purificarla y caracterizarla como par te de otro proyecto. La fracción de proteína que no se pegaba a esta resi na, contenía la actividad esterásica medida con BAEE como sustrato, y se cromatografió en una columna de afinidad de Benzamidina-Sefarosa; la frac ción que se pegó más fuertemente a la resina fue eluída con ácido acético 0.1 M, y contenía, además del 80% de la actividad esterásica inicial, a - las dos proteínas con actividad fibrinolítica indirecta.

En este trabajo intentamos una primera estrategia de purificación que consistió en cromatografiar directamente el veneno a través de una colum na de Sefarosa 4B con p-aminobenzamidina. Sin embargo, la fosfolipasa A2 del veneno también interaccionó con la resina y eluyó bajo las mismas con diciones que las Helodermatidinas (ácido acético 0.1 M). No se exploró es te resultado inesperado; lo único que puede decirse es que la actividad - fosfolipásica, medida titulométricamente, no es inhibida aún con 25 mM de p-aminobenzamidina libre. La inclusión de una cromatografía en Fenil-Sefa rosa, tampoco sirvió para remover a la enzima fosfolipasa de la fracción con las Helodermatidinas.

Por lo anterior, decidimos primero separar la fosfolipasa empleando una resina de afinidad para fosfolipasas A (PC-Aminohexil-Sefarosa);- así, esta última actividad se removió efectivamente del resto de los

componentes del veneno y está siendo caracterizada como parte de otro proyecto. El uso de dos cromatografías adicionales (Benzamidina-Sefarosa y DE-32 celulosa), llevó a la obtención de una fracción con las dos proteínas con actividad de AP, prácticamente puras.

El análisis de la composición de aminoácidos de cada una de las Helodermatidinas indica que se trata de dos enzimas muy similares: prácticamente son idénticas, teniendo la de mayor peso molecular cuando menos, 21 residuos de aminoácido adicionales (cisteína y triptofano no fueron cuantificados); siete de los mismos son hidrofóbicos. La diferencia en el peso molecular de ambas proteínas, cuantificada a partir de este análisis, fue de 2 415 daltones; por electroforesis en presencia de SDS, la misma es de aproximadamente 2 000 daltones, y podría verse alterada debido a la presencia de carbohidratos en la(s) molécula(s). Como el contenido de éstos se cuantificó empleando la fracción F.1.3.1 con las dos proteínas, no es posible saber cuál es su contribución en la diferencia en el PM total.

Una alternativa para explicar el origen de las dos isoenzimas, es que la de menor peso molecular sea un derivado proteolítico de la mayor, lo que es consistente con el hecho de que el único péptido quimotriptico diferente apareció en la especie de mayor peso molecular. La secuencia de las Helodermatidinas esclarecerá esta pregunta.

La capacidad de estas enzimas para convertir al plasminógeno en plasmina se ensayó en dos sistemas diferentes: en geles de fibrina-agarosa y de caseína-agarosa. El primer sistema se emplea comúnmente para asignar actividades fibrinolíticas directas o indirectas, debido a la facilidad de obtener formas de fibrinógeno libres o contaminadas con plasminógeno. Sin embargo, la identificación de la especificidad de dichas actividades puede verse alterada, debido a la presencia de otros contaminantes provenientes del suero. Para corroborar que la actividad fibrinolítica indirecta se debe a la plasmina generada por activación del plasminógeno, se empleó un segundo sistema, cuyos componentes son más definidos. En estos geles, el sustrato de caseína es digerido por la plasmina generada cuando las muestras se han incubado previamente con plasminógeno. Una de las ventajas del empleo de ambos sistemas en conjunción, radica en la identificación de actividades de AP estrictamente dependientes de

fibrina. Aparentemente, las Helodermatidinas del veneno de H.h.horridum no dependen de fibrina para convertir al plasminógeno en plasmina, ya que en ambos sistemas se observó digestión equivalente del sustrato.

La comprobación de que los sitios de hidrólisis en la molécula de plasminógeno por las Helodermatidinas son aparentemente los mismos que los generados por urocinasa, demuestra que son enzimas con una gran especificidad. Sin embargo, para que una enzima proteolítica califique como un verdadero AP debe, además, mostrar una actividad específica muy alta en el proceso de activación.

La actividad fibrinolítica de las enzimas, 30U/mg, es muy baja si se compara con la de otros AP's: 2 400, 29 000, 104 000 y 200 000, para AP-t de glándula salival porcina, AP de saliva de vampiro, AP-u y AP-t de células HeLa, respectivamente. Esto sugiere que quizá debiera descalificarse a las Helodermatidinas como AP's, aun siendo capaces de convertir específicamente al plasminógeno en plasmina.

Se han descrito otras proteasas semejantes a tripsina capaces de activar al plasminógeno, con una actividad específica extremadamente baja. De acuerdo con Ichinose, A., et. al. (1986), la observación de que enzimas tan específicas como la calicreína, además de hidrolizar a sus sustratos naturales activen otros zimógenos como prourocinasa o el plasminógeno, puede tener un significado biológico si se considera que forman parte de una cadena amplificadora de eventos, que sirve para mantener y regular sistemas tan complejos como el fibrinolítico.

Es factible que el plasminógeno no sea el único sustrato protéico hidrolizado por las dos enzimas estudiadas en este trabajo; sin embargo, el hecho de que per se no digieran fibrina, caseína o hemoglobina, implica que se trata de enzimas específicas cuyos sustratos pueden ser limitados y, por lo tanto, difícilmente identificables. En 1971, Birdsey, V. et. al. observaron que el veneno total de H.h.horridum consumía grandes cantidades de los factores C1, C4 y C3-9 del sistema de complemento; si este efecto está relacionado con la actividad de estas proteasas, es algo por estudiar.

Uno de los síntomas mas notorios asociados con la mordedura de H.h.suspectum y H.h.horridum, es la producción de hemorragias masivas tanto localmente como en varios órganos de la economía. El fraccionamiento del veneno soluble de H.s.suspectum por Mebs, D. (1970),

llevó a la obtención de una fracción de proteína con actividad de BAEE-esterasa, separada de otra BAEE-esterasa con actividad de calicreína; dicha fracción producía fuertes hemorragias cuando era inyectada por vía subcutánea en ratones. En su reporte sin embargo, no menciona el grado de pureza de la fracción, ni se muestra algún gel o datos de composición de aminoácidos que permitan compararla con las enzimas purificadas en este trabajo. Por lo tanto, resulta atractivo ensayar este efecto con las Helodermatidinas purificadas del veneno de H.h.horridum, con el objeto de obtener más información acerca de otras posibles actividades biológicas relacionadas con las mismas. De hecho, se conocen varias proteasas presentes en los venenos de algunas serpientes capaces de producir hemorragias, sobre todo, de tipo local por acción directa sobre endotelios capilares y existen modelos experimentales para ensayar dicha actividad. --- (Friederich y Tu, 1971)

Algunos experimentos preliminares, realizados con muestras que contenían solamente las dos isoenzimas (Alagón, C.A.Comunicación Personal) indican que las Helodermatinas inyectadas a ratones por vía intraperitoneal a dosis de hasta 50 µg/20 g, son incapaces de matar a los animales; sin embargo, algunos desarrollaron hemorragias de los plexos suboculares, semejantes a las que ocurren en algunos ratones inyectados con dosis subletales de veneno crudo, y que fueron descritas inicialmente por Loeb -- (1913). Las Helodermatidinas tampoco tienen actividad semejante a trombina, es decir, son incapaces de coagular fibrinógeno, directamente; (Alagón, C.A., Comunicación Personal); esta actividad está ampliamente distribuida en varios venenos.

El uso de algunos substratos sintéticos específicos tampoco ha servido para definir la posible actividad de la Helodermatina. Así, su -- actividad fue extremadamente baja con los tripéptidos cromogénicos S-2160, S-2266 y S-2302, que sirven para medir actividad de trombina, de calicreína glandular y de preclaricreína, respectivamente. (Alagón C.A., Comunicación Personal). Su actividad con el substrato S-2227, específico para urocinasa, fue un poco mayor pero significativamente menor comparada con la enzima homóloga. BAPNA (benzoil-L-arginina, p-nitroanilida) fue totalmente inactivo

como sustrato de esta enzima (Alagón, C.A. Comunicación Personal).

Otras actividades biológicas que han sido atribuidas a proteasas purificadas de venenos de serpientes y que sería deseable experimentar con las helodermatidinas, aparte de la inactivación de componentes del sistema de complemento mencionado anteriormente, son la activación de los factores II (protrombina) y X (Factor de Stewart) del sistema de coagulación (Denson et al, 1972) y la actividad de colagenasa verdadera. (Simpson, et al, 1971).

Una última hipótesis que resulta muy atractiva, esta relacionada con otra de las grandes funciones que cumplen los venenos de los reptiles: la de ayudar en la digestión de sus alimentos. Se conoce que la dieta de los Heloderma comprende, principalmente, huevos de ave (Bogert, C.M. y Martín del Campo, R., 1956); asimismo, se ha reportado que la yema de estos huevos es rica en plasminógeno (Valinsky, J.E. y Reich, E., 1981). Por lo tanto, podríamos sugerir que quizás estas Helodermatidinas son en realidad activadores de plasminógeno aviar, y que ayudan a la digestión de las proteínas de los huevos que ingieren. Esta hipótesis se apoya también en el hecho de que los AP's de mamífero pueden activar muy lentamente al plasminógeno de aves, lo que igualmente sucede para los AP's que funcionan en el sistema aviar con la activación de plasminógeno de mamíferos (Cartwright, T., 1974; Alagón, A.C., resultados no publicados). La activación de plasminógeno purificado de la yema de huevo de aves, su cuantificación y comparación con los resultados obtenidos en este trabajo, comprenden algunos de los experimentos inmediatos que nos interesa realizar con las Helodermatidinas purificadas del veneno de H.h.horridum.

REFERENCIAS

- 1.-ALAGON,A.C., MALDONADO,E.A., JULIA,J.Z., SANCHEZ,C.R. y POSSANI,L.D. 1982. *Toxicon*. 20:2. 463-475.
- 2.-ALAGON,A.C. POSSANI,L.D., SMART,J. y SCHLEUNING,W.D.1986. *J.Exp.Med.* 164. 1835-1845.
- 3.-BARRET,A.J. 1977. En:"Proteinases in mammalian cells and tissues". Barret,A.J. Ed. Publ.Co.Amsterdam. 735 pp.
- 4.-BIRDESY,V., LINDORFER,J. y GEWURZ,H. 1971. *Immunology*. 21:299.
- 5.-BOGERT,C.M. y MARTIN DEL CAMPO,R. 1956. *Bull.Am.Mus.Nat.Hist.* 109:1.
- 6.-CASTELLINO,F.J. 1981. *Chemical Reviews*. 81:5. 431-446.
- 7.-CARTWRIGHT,T. 1974. *Blood*. 43:3. 317-326.
- 8.-COLLEN,D., ZAMARRON,C., LIJNEN,H.R. y HOYLAERTS,M. 1986. *J.Biol.Chem.* 261:3. 1259-1266.
- 9.-COLMAN,R.W. 1969. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 35. 273-279.
- 10.-CUATRECASAS,P., WILCHEK,T. y ANFINSEN,C. 1968. *Proc.Nac.Acad.Sci.* 61. 636-643.
- 11.-DANO,K., ANDREASEN,P.A., GRONDAHL-HANSEN,J., KRISTENSEN,B., NIELSEN,L.S. y SKRIVER,L. 1985. *Adv.Cancer Res.* 44. 146-239.
- 12.-DEUTSCH,D.G. y MERTZ,E.T. 1970. *Science*. 170. 1095-1096.
- 13.-ENGEL,A., ALEXANDER,B. y PECHET,L. 1966. *Biochemistry*. 5. 1543-1551.
- 14.-GHEYSEN,D., LIJNEN,R.H., PIERARD,L., de FORESTA,F., DEMARSIN,E., JACOBS,P., De WILDE,M., BOLLEN,A. y COLLEN,D. 1987. *J.Biol.Chem.* 262:24. 11779-11784.
- 15.-GOLDSMITH,G.H., SAITO,H. y RATNOFF,O.D. 1978. *J.Clin.Invest.* 62. 54-60.

- 16.-GONZALEZ,J.C. 1983. Tesis de Biologo. Fac.Ciencias. UNAM. Mexico. 60 pag.
- 17.-GRANELLI-PIPERNO,A., VASALLI,J-D. y REICH,E. 1978. J.Exp.Med. 146. 1693-1670.
- 18.-HAWKEY,C.M. 1966. Nature. 211. 434-435.
- 19.-HAWKINS,R.I. y HELLEMAN,K. 1966. Br.J.Haematol. 12. 86-89.
- 20.-HOLMES,W.E., PENNICA,D., BLABER,M., REY,M.W., GUENZLER,W.A., STEFFENS,G.J. y HEYNEKER,H.L. 1985. Biotechnology. 3. 923-928.
- 21.-HOLVOET,P., LIJNEN,R.H. y COLLEN,D. 1986. Eur.J.Biochem. 158. 173-177.
- 22.-HOYLAERTS,M., RIJKEN,D.C., LIJNEN,H.R. y COLLEN,D. 1982. J.Biol.Chem. 257:6. 2912-2919.
- 23.-ICHINOSE,A., FUJIKAWA,K. y SUYAMA,T. 1986. J.Biol.Chem. 261:8. 3486-3489.
- 24.-JOVIN,T., CRAMBACH,A. y NAUGHTON,M.A. 1964. Anal.Biochem. 9. 351-356.
- 25.-KOHNO,T., HOPPER,P., LILLQUIST,J.S., SUDDITH,R.L., GREENLE,R. y MOIR,D.T. 1984. Biotechnology. 2. 628-634.
- 26.-LAEMMLI,U.K. 1970. Nature. 227. 680-685.
- 27.-LAKI,K. 1951. Arch.Biochem.Biophys. 32. 317-324.
- 28.-LESUK,A., TERMINIELLO,L y TRAVER,J.H. 1965. Science. 147. 880-882.
- 29.-LIJNEN,H.R., ZAMARRON,C., BLABER,M., WINKLER,M.E. y COLLEN,D. 1986. J.Biol.Chem. 261:3. 1253-1258.
- 30.-LOEB,L. 1913. En:"The venom of Heloderma". Loeb,L.Ed. Carnegie Institute of Washington. Wash.
- 31.-MANDLE,R.J. y KAPLAN,A.P. 1979. Blood. 54. 850-862.
- 32.-MEBS,D. 1968. Toxicon. 5. 139-226.

- 33.-MEBS.,D. 1970. En:"Toxins of Animal and Plant Origin". de Vries,A. y Kochva,E., Eds. Vol.2. Gordon and Breach Science Publ. New York. 821 pag.
- 34.-MIGNATTI,P., ROBBINS,E. y RIFKIN,D.B. 1986. Cell. 47. 487-498.
- 35.-MOORE,S. y STEIN,W.H. 1963. Methods Enzymol. 6. 819-831.
- 36.-MOSESSON,N.W. 1962. Biochem.Biophys.Acta 57. 204-213.
- 37.-OSSOWSKI,L., BIEGEL,D. y REICH,E. Cell. 16. 929-934.
- 38.-PATTERSON,R.A. 1967. Toxicol. 5. 5-10.
- 39.-PELTZ,S.W., HARDT,T.A. y MANGEL,W.F. 1982. Biochemistry. 21. 2798-2804.
- 40.-PIERARD,L., JACOBS,P., GHEYSEN,D., HOYLAERTS,M., ANDRE,B., TOPISIROVIC,L., CRAVADOR,A., de FORESTA,F., HERZOG,A., COLLEN,D., De WILDE,M. y BOLLEN,A. 1987. J.Biol.Chem. 262:24. 11771-11778.
- 41.-QUEENAN,J.T.Jr., KAO,L.-Ch., ARBOLEDA,C.E., ULLOA-AGUIRRE,A., GOLOS,Th.G., CINES,D.B. y STRAUS,J.F.III. 1987. J.Biol.Chem. 262:23. 1093-1096.
- 42.-REICH,E. 1978. En:"Molecular Basis of Biological Degradative Processes". R.D..Berlin, H.Harmann, I.H. Lepow y J.M.Tanzer, Eds. Acad.Press. New York. 155-169.
- 43.-RESNIER,A.H., NEMES,P. y BUCHOLTZ,C. 1975. Analyt.Biochem. 64. 509-514.
- 44.-RICK,W. 1965. En:"Methods of Enzymatic Analyses". H.U.Bergmeyer,Ed. Acad.Press. New York. 807-811.
- 45.-SHILOA,J., KLIBANSKY,C. y De VRIES,A. 1973. Toxicol. 11. 491-497.
- 46.-SOSA,B.P., ALAGON,A.C., MARTIN,B.M. y POSSANI,L.D. 1986. Biochemistry. 25. 2927-2933.
- 47.-STRICKLAND,S. y BEERS,W.H. 1976. J.Biol.Chem. 251. 5694-5698.
- 48.-STRICKLAND,S. y MAHDAVI,V. 1978. Cell. 15. 393-398.

- 49.-STUMP,D.C., LIJNEN,H.R. y COLLEN,D. 1986a. J.Biol.Chem. 261:3. 1274-1278.
- 50.-STUMP,D.C., LIJNEN,H.R. y COLLEN,D. 1986b. J.Biol.Chem. 261:36. 17120-17126.
- 51.-STUMP,D.C., THIENPONT,M. y COLLEN,D. 1986c. J.Biol.Chem. 261:3. 1267-1273.
- 52.-STUMP,D.C., THIENPONT,M. y COLLEN,D. 1986d. J.Biol.Chem. 261:27. 12759-12766.
- 53.-STYBLOVA,Z. y KORNALIK,F. 1967. Toxicon. 5. 139-140.
- 54.-SWANK,R.T. y MUNKRES,K.D. 1971. Anal.Biochem. 39. 42-477.
- 55.-TSUGITA,A. y AKABORI,S. 1959. J.Biochem.(Tokio) 46. 695-704.
- 56.-UNKELESS,J., DANO,K., KELLERMAN,G.M. y REICH,E. 1974. J.Biol.Chem. 249. 4295-4305.
- 57.-URANO,T., CHIBBER,B.A.K. y CASTELLINO,F.J. 1987. Proc.Nat.Acad.Sci. 84.4031-4034.
- 58.-VALINSKY,J.E. y REICH,E. 1981. J.Biol.Chem. 256: 12470-12475.
- 59.-Van ZONNEVELD,A-J., VEERMAN,H. y PANNEKOEK,H. 1986. J.Biol.Chem. 261:30. 14214-14218.
- 60.-Van ZONNEVELD,A-J., VEERMAN,H. y PANNEKOEK,H. 1986. Proc.Nat.Acad.Sci. 83. 4670-4674.
- 61.-VERHEIJEN,J.H., CASPERS,M.P.M., CHANG,G.T.G., De MUNK,G.A.W., POWELS, P.H. y ENGER-VALK,B.E. 1986. EMBO J. 5:13. 3525-3530.
- 62.-WAGNER,O.F. y BINDER,B.R. 1986. J.Biol.Chem. 261:31. 14474-14481.
- 63.-ZAMARRON,C., LIJNEN,H.R. y COLLEN,D. 1984. J.Biol.Chem. 259:4. 2080-2083.

OTRAS REFERENCIAS

- 64.- DENSON, K.W.E., RUSSELL, F.E. ALMAGRO, D. y BISHOP, R.C. (1972)
Toxicon 10. 557-561
- 65.- FRIEDERICH, C. Y TU, A (1971) Biochem Pharmacol. 20. 1549-1553.
- 66.- HOSHINO, M., YANAIIRA. C., HONG, Y-M, , KISHIDA, S., KATSUMARU, Y.,
VANDERMEERS, A., VANDERMEERS-PIRET, M.C., ROBBERECHT, P., CHRISTOPHE,
J. y YANAIHARA, N. 1985 Febs Lett. 178:2.233-239.
- 67.- PARKER, D.S., RAUFMAN, J-P., O'DONOHUE, T.L., BLEDSOE, M., YOSHIDA,
H. y PISANO, J.J. 1984. J. Biol. Chem. 259:4. 11751-11755.
- 68.- SIMPSON, J.W., TAYLOR, A.C. y LEVY, B.M. (1971) Comp. Biochem.
Physiol. 39B. 963-970.
- 69.- TU, A. (1977) En Veroms. (Hemistry and Molecular Biology pp.329-360,
John Wiley & Sons, New York.