

**Identificación, aislamiento y caracterización
parcial de componentes del veneno de
Bothrops asper (terciopelo) que inhiben la
agregación plaquetaria**

POR

Adrián Pinto Tomás

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

Presentado como co-requisito del curso MQ-2601
para optar por el grado de
Licenciado en Microbiología y Química Clínica.

Facultad de Microbiología

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

2000

I. TITULO DEL PROYECTO

Identificación, aislamiento y caracterización parcial de componentes del veneno de *Bothrops asper* (terciopelo) que inhiben la agregación plaquetaria

II. TUTOR:

M.Sc. Yamileth Angulo Ugalde

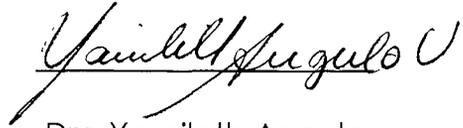
Instituto Clodomiro Picado

Facultad de Microbiología

Universidad de Costa Rica

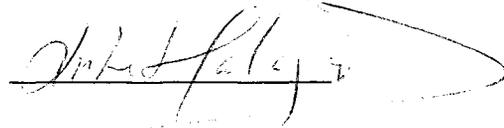
"Ciudad Universitaria Rodrigo Facio"

Aprobado por:



Dra Yamileth Angulo

Tutora



Dra Lisbeth Salazar

Revisor

Dra María del Mar Gamboa

Directora del Departamento de Microbiología

Agradecimientos

A Dios, Rey del universo, por permitirme vivir en este precioso mundo que su infinito amor creó para los seres humanos, y por darme la oportunidad de intentar comprender una ínfima parte de su maravillosa creación material.

A la Dra. Yamileth Angulo, por su guía, orientación y excelentes consejos, y especialmente por su enorme disponibilidad para ayudarme a resolver las continuas vicisitudes que se presentaron durante la realización de esta investigación; sin su atenta colaboración este trabajo no sería una realidad.

Al Dr. Rafael Jiménez, a la Dra. Berta Valverde y al señor Jorge Monge, del Laboratorio de Investigación del Hospital Nacional de Niños, por su valiosa colaboración en la realización de las pruebas de agregación plaquetaria.

A todo el personal del Instituto Clodomiro Picado, por ser excelentes compañeros de trabajo, por estar siempre dispuestos a brindarme su ayuda y por enseñarme que la investigación, más que una profesión, es un estilo de vida. Un agradecimiento particular al Dr. José María Gutiérrez y al Dr. Bruno Lomonte, por ser para mí un modelo del científico en el que anhelo convertirme en el futuro.

A la Dra. Lisbeth Salazar, por la atención que prestó a este trabajo y por sus valiosas correcciones.

A mis compañeros Teresa Escalante y David Loría, por el incondicional apoyo brindado cuando los resultados no eran los esperados y la frustración amenazaba con desanimarme.

A todos muchas gracias.

Dedicatoria

Dedico este trabajo, así como todos mis logros presentes y futuros, a mi mamá, Sandra Tomás, pues todo lo que soy se lo debo a Dios y a ella.

También dedico este trabajo a las restantes 11 personas que conforman mi familia, pues son los seres más importantes en mi vida. A mis tres hermanas, Sandra, Martha y Maricelle, las mejores hermanas del mundo, y a sus esposos; a mis sobrinos mayores, Larissa, Arianna y Alejandro, mis compañeros de juegos de infancia, y a mis sobrinitos menores, Anne, Marielle y Fabián, las nuevas estrellas de la familia.

Los amo a todos, esto es para ustedes.

INDICE

	Páginas
Portada	
Contraportada	i
Hoja de aprobación	ii
Agradecimientos	iii
Dedicatoria	v
Indice general	vi
Introducción	1
Marco teórico	4
Materiales y métodos	23
1. Aislamiento de una disintegrina (botrasperina) del veneno de <i>Bothrops asper</i>	23
2. Prueba de agregación plaquetaria	24
3. Homogeneidad de las proteínas purificadas	25
4. Aislamiento de una fosfolipasa ácida con actividad antiagregante del veneno de <i>B. asper</i>	25
5. Actividad fosfolipasa	26
6. Secuencia N-terminal	26
7. Elaboración de un péptido sintético RGD	27
8. Determinación del valor IC 50 para la disintegrina, la fosfolipasa ácida y el péptido sintético RGD	27
Resultados	29
A. Aislamiento y caracterización parcial de una disintegrina (botrasperina) del veneno de <i>Bothrops asper</i> (terciopelo)	29

B.	Aislamiento y caracterización parcial de una fosfolipasa ácida con acción antiagregante sobre plaquetas del veneno de <i>B. asper</i> ...	vii	32
C.	Determinación de la acción antiagregante sobre plaquetas y del IC 50 para un péptido sintético RGD		35
	Discusión y conclusiones		37
	Referencias		43
	Figuras		

INTRODUCCION

El accidente ofídico representa, sin duda alguna, un importante problema de salud pública para la humanidad. En todo el mundo ocurren alrededor de 2.7 millones de accidentes por mordedura de serpiente, de los cuales aproximadamente 125 000 tienen un desenlace fatal (Chippaux, 1998). Las regiones con mayor incidencia en este tipo de eventos son las zonas tropicales de Asia, Africa y América Latina.

Nuestro entorno no escapa a esta situación. En América Central, la cifra de accidentes puede ascender a unos 5000 casos anuales, con una tasa de letalidad estimada en un 4% (Rojas, 2000). En Costa Rica ocurren alrededor de 600 mordeduras de serpiente por año, con una tasa de letalidad inferior al 1%, siendo los trabajadores agrícolas la población más comúnmente afectada (Gutiérrez, 1995).

La magnitud del problema justifica ampliamente la inversión de recursos económicos, científicos y tecnológicos para su solución. En nuestro país, al igual que en toda la región centroamericana, los accidentes ofídicos son provocados en su mayoría por ejemplares de la familia Viperidae, dentro de las cuales la especie *Bothrops asper* (terciopelo o barba amarilla) es la responsable de aproximadamente la mitad de los casos (Gutiérrez, 1995). Por esta razón el veneno de *B. asper* es uno de los más estudiados en el ámbito regional, y ha sido objeto del mayor número de investigaciones por científicos costarricenses dentro del campo de la toxicología.

Los signos y síntomas ocasionados en el envenenamiento por vipéridos ² incluyen tanto alteraciones locales como sistémicas. Característicamente se produce un extenso daño del tejido local que abarca dolor, edema, hemorragia y necrosis del tejido muscular. Así mismo, pueden presentarse manifestaciones sistémicas como alteraciones de la coagulación, hemorragias, choque cardiovascular e insuficiencia renal aguda (Rosenfeld, 1971; Gutiérrez y Lomonte, 1989; Otero *et al*, 1992).

Los venenos de serpientes están compuestos por una compleja mezcla de proteínas y péptidos con una amplia gama de actividades biológicas, las cuales desembocan en las manifestaciones locales y sistémicas propias del accidente ofídico. La caracterización de estos componentes y de sus efectos específicos permite mejorar nuestra comprensión acerca de la patogénesis del envenenamiento, y de este modo permite implementar mejores estrategias de tratamiento.

En este sentido, adquiere singular importancia el estudio de la relación entre los venenos de serpiente y la coagulación sanguínea, debido al vínculo existente entre la magnitud de las alteraciones en la hemostasia y la severidad del envenenamiento (Otero, 2000). Muchos de los componentes del veneno interactúan con el sistema hemostático, ya sea activando o inhibiendo el proceso de coagulación (Meier y Stocker, 1991). Esta interacción resulta en muchos casos tan específica, que se ha propuesto el empleo de estos componentes en el laboratorio clínico como herramientas de diagnóstico y monitoreo de problemas de coagulación (Marsh, 1998), a la vez que se les ha

señalado como posibles agentes terapéuticos en patologías que implican 3
ciertos trastornos hemostáticos (Verstraete, 1995).

Dentro de este grupo de sustancias destacan aquellas capaces de inhibir específicamente la agregación plaquetaria, ya que esta constituye uno de los pasos iniciales en el proceso de coagulación y es indispensable para que este sea efectivo. Se han descrito al menos cuatro grupos de inhibidores de la agregación plaquetaria en los venenos de serpientes, los cuales se denominan de acuerdo a su mecanismo de acción como α -fibrinogenasas, fosfolipasas A_2 , 5'-nucleotidasas y disintegrinas (Markland, 1998).

En los venenos de serpientes de Costa Rica aún no se ha valorado la presencia de componentes capaces de inhibir específicamente la agregación plaquetaria. La presente investigación pretende determinar la presencia de este tipo de sustancias en el veneno de la serpiente más importante en nuestro medio, la terciopelo (*B. asper*). Este hallazgo podría resultar en el inicio de una nueva línea de investigación en nuestro país, debido a la importancia de estos componentes en la patogénesis del envenenamiento y a las diferentes aplicaciones terapéuticas posibles para este grupo de moléculas.

Sistema hemostático: importancia de la agregación plaquetaria

La hemostasia es un sistema fisiológico que detiene la salida de sangre, al sellar provisionalmente el sitio del daño vascular e iniciar posteriormente los mecanismos de reparación (Martínez y Quintana, 1996). Puede dividirse en un conjunto de cuatro procesos fisiológicos que tienen la misma finalidad, iniciándose simultáneamente, pero finalizando de manera secuencial. Ellos son: la vasoconstricción, la formación del agregado plaquetario, la activación del mecanismo bioquímico de la coagulación sanguínea (cascada de la coagulación) y, finalmente, la fibrinólisis o disolución progresiva del coágulo hemostático (Atmetlla, 1995).

Agregación plaquetaria

Las plaquetas son pequeños fragmentos celulares anucleados de la sangre periférica, las cuales circulan en forma de disco y miden en promedio de 2 a 4 μm de diámetro y 0.6 a 1.3 μm de grosor. Su función consiste en contribuir rápidamente a la reparación de cualquier daño en el endotelio vascular, mediante la formación de acúmulos plaquetarios capaces de obturar estas lesiones (Martínez y Quintana, 1996). Proviene de la fragmentación del citoplasma de los megacariocitos y tienen una vida media de entre 9 y 12 días.

Bajo condiciones fisiológicas normales, las plaquetas son esencialmente inertes; su adhesión a la matriz subendotelial es prevenida por una pared vascular intacta. Sin embargo, en respuesta a una lesión en la vasculatura, se desencadenan una serie de eventos en la función plaquetaria, los cuales culminan en el agregado plaquetario, formándose un tapón hemostático que cierra la lesión y previene una mayor pérdida de sangre a partir del sitio implicado (Colman, 1994).

La formación del agregado plaquetario consume de 3 a 5 minutos, y puede subdividirse en 3 etapas (Frishman, 1995), que son:

1. Adhesión de las plaquetas al endotelio. La lesión en la vasculatura causa la exposición de la matriz proteica subendotelial hacia las plaquetas, permitiendo que estas se adhieran a determinadas estructuras en el endotelio dañado, como el colágeno y las microfibrillas. La glicoproteína Ib es el principal receptor de la superficie plaquetaria implicado en el proceso de adhesión (Bennett, 1992). Este es el único proceso hemostático que se produce sin necesidad de una activación previa de las plaquetas.
2. Activación plaquetaria. Una vez formada la monocapa sobre la superficie endotelial, agonistas específicos inducen la secreción del contenido de las vesículas plaquetarias. Los agonistas fisiológicamente más importantes incluyen trombina, difosfato de adenosina (ADP), colágeno y tromboxano A₂(proveniente del ácido araquidónico) (Frishman, 1995) Todos estos agonistas probablemente actúan mediante una vía común que conlleva al

6
aumento en la concentración de calcio intraplaquetar, ya sea a través de la entrada directa de iones o por medio de la liberación del calcio almacenado (Detwiler, 1978). Seguidamente, se desencadenan dos importantes mecanismos dependientes de calcio, a saber la fosforilación de las cadenas livianas de miosina y la activación de fosfolipasas A₂ (Colman, 1994). El primer proceso (unido a la polimerización de actina) es responsable del cambio morfológico que sufre la plaqueta activada, el cual implica la adquisición de una forma redondeada, la proyección de pseudópodos y la centralización y liberación del contenido de los gránulos de almacenamiento. Por su parte, la activación de fosfolipasas A₂ provoca la liberación de ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de membrana, el cual es convertido por ciclooxigenasas en tromboxano A₂. Este potente agonista provoca que las plaquetas liberen parte del contenido de sus gránulos densos alfa y lisosómicos, secretándose en el medio circulante ADP, adrenalina, serotonina, Factor Agregante Plaquetar (FAP) e iones calcio (Atmella, 1995). El ADP liberado puede a su vez estimular la vía del ácido araquidónico y aumentar la liberación del tromboxano A₂ (Coller, 1987). De este modo la plaqueta es capaz de incrementar su propia activación.

3. Agregación plaquetaria. Todos los mecanismos que conducen a la activación de las plaquetas desembocan en un punto común: la activación de un receptor de membrana específico, responsable de la agregación plaquetaria (Dennis, 1987). Este receptor se conoce como glicoproteína (GP) IIb/IIIa, y es un miembro de la superfamilia de integrinas que median la adhesión de células a componentes de la matriz

extracelular (Hynes, 1987). La GP IIb/IIIa se encuentra exclusivamente en 7 plaquetas y permanece en forma inactiva hasta que la plaqueta es estimulada. Este receptor tiene una alta afinidad por la secuencia de tres aminoácidos: arginina – glicina - aspartato (RGD), la cual se encuentra presente en fibrinógeno, factor de von Willebrand, fibronectina y vitronectina (Hirsh, 1994). El fibrinógeno, principalmente debido a su alta concentración en el plasma, es el principal polipéptido involucrado en la agregación plaquetaria. Debido a que el fibrinógeno es un dímero divalente, es capaz de enlazar a plaquetas adyacentes para formar finalmente el agregado plaquetario. Por último, la trombina convertirá el fibrinógeno en fibrina, dando lugar a la irreversibilidad del agregado plaquetario.

El correcto funcionamiento de este proceso fisiológico puede valorarse en el laboratorio mediante la prueba de agregación plaquetaria. El principio de la prueba de agregación in vitro se basa en el cambio de densidad óptica que se sucede en un plasma rico en plaquetas cuando se forma el agregado plaquetario. El instrumento empleado para este tipo de determinaciones se denomina agregómetro. Este es un espectrofotómetro modificado en el que se coloca plasma rico en plaquetas en una cubeta a través de la cual se dirige una fuente de luz constante. Con la temperatura a 37 °C y con una agitación regulada de las plaquetas, la agregación permitirá un aumento en el paso de luz a través del plasma, cuya intensidad puede demostrarse gráficamente (Barrantes, 1995).

La agregación plaquetaria puede ser inducida por varios agonistas, 8 cada uno de los cuales posee un mecanismo de acción específico y bien caracterizado. El uso de diferentes agonistas durante una prueba de agregación permite definir el origen del defecto causante de la patología en estudio, siendo de valor incalculable para establecer el diagnóstico de la trombocitopatía. Por ejemplo, el ADP valora la funcionalidad de la GP IIb/IIIa, mientras que el colágeno interactúa con la GP Ib y la trombina con la GP V (Domínguez & Rosenfeld, 1996).

Venenos de serpientes y coagulación sanguínea

Las serpientes (*Ophidia, Serpentes*) forman un suborden dentro de los organismos vertebrados de la clase *Reptilia*. Un pequeño número de especies dentro de este grupo ha adoptado a lo largo de la evolución una estrategia de supervivencia basada en su habilidad de producir un veneno muy tóxico para sus presas naturales. Esto les ha permitido superar sus desventajas físicas para obtener alimento, como la carencia de extremidades y en algunos casos su pequeño tamaño.

Los venenos de serpientes son únicos en la naturaleza en cuanto a sus propiedades bioquímicas y farmacológicas. Son el producto de millones de años de evolución, y la amplitud, eficiencia y efectividad de su acción resulta fascinante. Enzimas y polipéptidos no enzimáticos forman más del 90% del peso seco del veneno, el cual varía del 18 a más del 50% del peso total, por lo que los venenos de serpientes son probablemente los productos de secreción más concentrados presentes en organismos vertebrados (Stocker, 1990).

En los venenos de serpientes han sido caracterizadas diferentes 9 actividades enzimáticas, incluyendo fosfolipasas A₂, fosfodiesterasas, fosfomonoesterasas, L-amino ácido oxidasas, acetilcolinesterasas, enzimas proteolíticas tipo metaloproteinasas y serin proteinasas, arginina esterasas, 5'-nucleotidasas, hialuronidasas y nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) nucleosidasas (Markland, 1997). Entre los péptidos presentes en los venenos encontramos neurotoxinas presinápticas y postsinápticas, neurotoxinas que se unen a canales de potasio, citotoxinas, miotoxinas, cardiotoxinas e inhibidores de la agregación plaquetaria (disintegrinas) (Markland, 1997).

Las especies de la familia *Elapidae* poseen un veneno en el que predominan neurotoxinas polipeptídicas, por lo que sus presas generalmente mueren por parálisis respiratoria (Meier & Stocker, 1991). En cambio, los venenos de la familia *Viperidae* producen choque, coagulación intravascular, hemorragia local y sistémica, edema y necrosis (Teng & Huang, 1991a). Por tanto, el choque circulatorio con hemorragia interna es la causa más común de muerte en los envenenamientos por mordeduras de vipéridos (Russell, 1980).

Dentro de este contexto, los componentes del veneno de vipéridos que interfieren con el sistema hemostático de la víctima juegan un papel esencial en su letalidad. Dichos componentes poseen una gran variedad de efectos, algunos de ellos desencadenan el proceso de coagulación mientras otros más bien lo inhiben (Marsh, 1998). Esta aparente contradicción culmina en un efecto común: un estado de anticoagulación sanguínea, ya que las sustancias procoagulantes llevan al consumo de los factores de coagulación, en tanto las anticoagulantes evitan que dicho proceso fisiológico sea efectivo.

El estudio de la hemostasia y la trombosis despierta gran interés en el campo de la medicina. Por esta razón, los venenos de serpientes que afectan el sistema hemostático humano han sido extensamente investigados, y se han aislado y caracterizado un gran número de componentes del veneno capaces de interferir con la hemostasia normal. Muchas de estas sustancias son utilizadas como herramientas experimentales en investigación básica, mientras otras tienen aplicaciones prácticas en el campo del diagnóstico clínico e incluso podrían emplearse como agentes terapéuticos. Según su acción específica, los componentes del veneno que interactúan con el sistema hemostático pueden agruparse en varias categorías (Markland, 1998); dicha información se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Componentes del veneno de serpientes que interactúan con el sistema hemostático.

Actividad funcional general	Actividad biológica específica
Procoagulante	Activación del factor V Activación del factor X Activación del factor IX Activación de protrombina Coagulación directa del fibrinógeno
Anticoagulante	Activación de proteína C Proteínas de unión a factor IX/factor X Inhibición de trombina Fosfolipasas A
Fibrinolítica	Degradación de fibrinógeno Activación de plasminógeno
Interacción con la pared vascular	Hemorragia
Acción sobre plaquetas	Inducción de agregación plaquetaria Inhibición de la agregación plaquetaria
Inactivación de proteínas plasmáticas	Inhibición de SERPINS (SERPINS: inhibidores de serin proteinasas)

Ref: Markland (1998).

Componentes del veneno con acción sobre plaquetas

Dentro de la amplia gama de efectos biológicos que poseen los venenos de serpientes sobre el sistema hemostático, aquellos componentes que interactúan directamente con las plaquetas son de especial importancia. Como se ha mencionado previamente, las plaquetas poseen un papel central y primordial en el proceso de coagulación, por lo que las sustancias que afecten directamente su funcionalidad afectarán también dicho proceso en su propio inicio.

En los venenos se han descrito una serie de componentes con acción sobre plaquetas, los cuales son capaces tanto de provocar la agregación plaquetaria como de inhibirla (Kini & Evans, 1990). Dichos componentes y su actividad específica se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Componentes del veneno de serpientes con acción sobre plaquetas

Actividad funcional	Acción biológica específica o requerimiento
<i>Inductores de agregación plaquetaria</i>	
Acción enzimática directa	Serín proteinasas Fosfolipasas A ₂
Acción directa no enzimática	Lectinas Proteínas que se unen a la GP Ib
Requieren co-factor	Factor de von Willebrand
<i>Inhibidores de la agregación plaquetaria</i>	
	α -fibrinogenasas Fosfolipasas A ₂ 5'-nucleotidasas Disintegrinas.

Ref: Markland, (1998)

Inhibidores de la agregación plaquetaria

Los componentes del veneno de serpientes que inhiben la agregación plaquetaria constituyen el enfoque principal de este trabajo. Al impedir la formación del agregado plaquetario, estas sustancias son capaces de bloquear prácticamente por completo el proceso de coagulación. Además, su especificidad y efectividad las ha convertido en excelentes herramientas para la investigación y el tratamiento de problemas trombóticos (Coller, 1996). Los inhibidores de la agregación plaquetaria se han subdividido tradicionalmente en 4 grupos de acuerdo a su mecanismo de acción (Teng y Huang, 1991), sin embargo, recientemente se ha propuesto la creación de un grupo adicional (Markland, 1998).

α -fibrinogenasas.

Son enzimas capaces de degradar la cadena $A\alpha$ del fibrinógeno. De este modo, impiden que dicha molécula se una adecuadamente al receptor plaquetario GP IIb/IIIa, evitando así el desarrollo de la agregación plaquetaria (Ouyang, 1985).

Fosfolipasas A_2 .

En los venenos de serpientes se han aislado más de 100 enzimas con actividad de fosfolipasa A_2 , las cuales poseen una amplia variedad de efectos farmacológicos que incluyen alteraciones en la hemostasia, neurotransmisión y

función muscular (Tsai, 1997). En este grupo de enzimas se encuentran tanto ¹³ inductores como inhibidores de la agregación plaquetaria, e incluso algunas de ellas presentan ambos efectos, usualmente de una manera bifásica (Kini y Evans, 1990). Estas fosfolipasas A₂ con acción bifásica ejercen un efecto agregatorio luego de incubaciones cortas o en bajas concentraciones de enzima, mientras que son capaces de inhibir la agregación luego de incubaciones prolongadas o en altas concentraciones. (Markland, 1998). El efecto inhibitorio en la agregación plaquetaria puede deberse a que estas enzimas son capaces de degradar metabolitos derivados del ciclo del ácido araquidónico. Estas enzimas por lo general tienen un peso molecular de aproximadamente 15 kDA y son capaces de inhibir la agregación inducida por varios agonistas (Yuan *et al*, 1993; Huang *et al*, 1997; Laing *et al*, 1995). Existen también fosfolipasas A₂ capaces de provocar cambios en la morfología plaquetaria incluyendo una alteración drástica en el citoesqueleto, lo cual podría representar un mecanismo adicional por el que estas enzimas inhiben la agregación plaquetaria (Laing *et al*, 1995).

5`-nucleotidasas.

Son enzimas capaces de degradar ADP, un inductor de la agregación plaquetaria liberado de los gránulos densos plaquetarios por varios agonistas (Markland, 1998). La eliminación del ADP liberado por las plaquetas impide que el proceso de agregación se desarrolle de una manera efectiva, ya que esta sustancia es indispensable para una adecuada activación y un buen funcionamiento plaquetario.

Este es el grupo de inhibidores de la agregación plaquetaria descrito más recientemente. Incluye proteínas capaces de bloquear directamente al receptor plaquetario para el colágeno, GP Ib, como la jararhagina aislada del veneno de *Bothrops jararaca* (Kamiguti *et al*, 1996), así como también sustancias capaces de unirse al colágeno, evitando así su unión a la superficie plaquetaria (Zhou *et al*, 1996b).

Disintegrinas.

Las disintegrinas son sin duda el grupo más interesante entre los inhibidores de la agregación plaquetaria presentes en venenos de serpientes, principalmente por su gran potencial como modelos de agentes terapéuticos. Por esta razón, este grupo de péptidos constituye el enfoque principal de este trabajo.

Las disintegrinas constituyen una familia de péptidos de bajo peso molecular (49 a 84 aminoácidos), ricos en cisteínas y enlaces disulfuro, capaces de unirse a integrinas en superficies celulares a través de la secuencia RGD (aminoácidos arginina-glicina-aspartato) (Gould *et al*, 1990). La presencia de esta secuencia las convierte en inhibidores específicos de integrinas RGD-dependientes, como lo son las integrinas de las subfamilias β_1 y β_3 , incluyendo el receptor plaquetario para el fibrinógeno GP IIb/IIIa (integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$), el receptor de vitronectina ($\alpha_v\beta_3$) y el receptor de fibronectina ($\alpha_5\beta_1$) (Markland, 1998).

Las disintegrinas se sintetizan en las glándulas de veneno como parte de una proteína multimérica que contiene dominios tipo metaloproteinasa, disintegrina y rico en cisteína. Este precursor sufre una serie de procesos proteolíticos y modificaciones post-translacionales, hasta generar las disintegrinas "maduras" (Kini y Evans, 1992). Por esta razón, las disintegrinas están íntimamente relacionadas con las hemorraginas presentes en el veneno, ya que provienen de un mismo precursor común.

Desde el descubrimiento de la primera disintegrina, denominada trigramina (Huang et al, 1987), se han descrito cerca de cincuenta disintegrinas en diferentes venenos de serpientes. Tradicionalmente ellas se nombran de acuerdo al nombre científico de la serpiente de cuyo veneno han sido aisladas. Ejemplo de esto son equistatina (*Echis carinatus*), trigramina (*Trimeresurus gramineus*), laquesina (*Lachesis mutus*), cerastina (*Crotalus cerastes*) y jararacina (*Bothrops jararaca*), entre muchas otras.

Características estructurales. Tradicionalmente las disintegrinas se han clasificado en tres subgrupos de acuerdo a su tamaño, clasificándose así en cortas, medianas y largas (Niewiarowski et al, 1994). Las cortas poseen 4 enlaces disulfuro y una cadena polipeptídica de 49 a 51 aminoácidos, las medianas presentan 6 enlaces disulfuro y están conformadas por 68 a 73 aminoácidos, mientras las disintegrinas largas poseen 7 enlaces disulfuro y una cadena polipeptídica de 83 aminoácidos. Sin embargo, esta clasificación no incluye disintegrinas diméricas que se han descrito recientemente. (McLane et al, 1998)

Casi todas las disintegrinas poseen la secuencia de aminoácidos arginina – glicina – aspartato (RGD) en la porción carboxilo terminal de la molécula, la cual es esencial para su habilidad de bloquear la interacción de integrinas con sus ligandos fisiológicos (Dennis *et al*, 1989). Constituyen excepciones a esta regla la disintegrina barbourina, aislada de la serpiente *Sistrurus m. barbouri* cuya secuencia es lisina – glicina – aspartato (KGD) (Scarborough *et al*, 1991) y la disintegrina atrolisina E, aislada del veneno de *Crotalus atrox*, que posee la secuencia metionina – valina – aspartato (MDV) (Shimokawa *et al*, 1998). A pesar de esta diferencia ambas disintegrinas son capaces de inhibir la agregación plaquetaria. Este hecho confirma, junto a experimentos en que se han modificado cada uno de los residuos de la secuencia RGD (Denis, 1993), que el residuo de aspartato es el más importante para definir la capacidad de las disintegrinas de inhibir la agregación plaquetaria.

Las disintegrinas presentan una estructura secundaria irregular (Adler, 1991). Se caracterizan por varios giros irregulares y lazos para formar una estructura central rígida estabilizada por puentes de hidrógeno y mantenida unida por enlaces disulfuro (Markland, 1998). Aunque pueden tener diferencias en cuanto a tamaño, todas las disintegrinas presentan homología en la ubicación de sus residuos de cisteína, a excepción de una cisteína extra que poseen las disintegrinas cortas cerca de la secuencia RGD (Niewiarowski *et al*, 1994). Este hecho refleja la importancia de mantener un adecuado patrón de enlaces disulfuro, pues se ha comprobado que la reducción y alquilación de

los enlaces disulfuro de las disintegrinas elimina completamente su actividad biológica (Lazarus y McDowell, 1993). 17

La secuencia RGD está en la misma localización en todas las disintegrinas con estructura tridimensional conocida. Esto es, en el extremo de un lazo (loop) flexible de 13 aminoácidos, estabilizado por dos enlaces disulfuro en su base (Niewiarowski *et al*, 1994). La secuencia RGD posee una alta movilidad, y el lazo que la contiene se proyecta a partir de la estructura central, optimizándose de esta manera su capacidad de interacción con integrinas.

Además de la secuencia RGD, existen otras secuencias importantes en las disintegrinas que contribuyen a modular su actividad biológica. En un estudio realizado con 11 disintegrinas aisladas de serpientes americanas, Scarborough *et al* (1993a) demostraron que las secuencias de aminoácidos inmediatamente adyacentes al sitio RGD pueden crear un locus RGD expandido, el cual acoplado con la presentación conformacional de la secuencia RGD puede estar involucrado en la definición de la selectividad y afinidad por las diferentes integrinas. Los investigadores llegaron a esta conclusión basándose en el hecho de que las disintegrinas con la secuencia RGDNP (N=asparragina y P=prolina) inhiben más intensamente la unión de fibronectina y vitronectina a las integrinas $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_v\beta_3$, respectivamente, mientras que aquellas que poseen la secuencia RGDW (W=triptofano) inhiben más fuertemente la unión del fibrinógeno a la GP IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$).

Acción de disintegrinas sobre plaquetas. Las disintegrinas se unen al ¹⁸

receptor plaquetario de fibrinógeno, GP IIb/IIIa, a través de su secuencia RGD. De este modo, bloquean al receptor e impiden que este se una adecuadamente al fibrinógeno. Debido a que este es el paso final común de las diferentes vías que generan la agregación plaquetaria, las disintegrinas son capaces de inhibir la agregación inducida por diferentes agonistas como ADP, trombina, colágeno y ácido araquidónico (Dennis, 1989).

La efectividad de las diferentes disintegrinas como agentes antiagregantes se mide mediante el valor denominado IC_{50} . Este valor corresponde a la concentración de disintegrina necesaria para inhibir en un 50% la agregación de plaquetas humanas inducida por ADP, y varía de 30 nmol/L a 300 nmol/L (Niewiarowski *et al*, 1994), lo cual evidencia la potencia de estos agentes como inhibidores de la agregación plaquetaria. El efecto inhibitorio de las disintegrinas sobre la agregación plaquetaria es más de 1000 veces mayor que el que poseen péptidos sintéticos lineales que contienen la secuencia RGD, lo cual se le atribuye a la ubicación conformacional que presenta la secuencia RGD en las disintegrinas (Scarborough *et al*, 1993b).

Las disintegrinas no ejercen ningún efecto en la morfología ni en el metabolismo plaquetario, incluyendo la liberación de ADP y la movilización de calcio (Huang *et al*, 1991). Por tanto, no interfieren en el mecanismo de activación de las plaquetas. Este factor confirma que todo su poder antiagregante se debe al bloqueo del receptor plaquetario para el fibrinógeno.

Está bien establecido que las disintegrinas son capaces de unirse tanto a plaquetas activas como inactivas, y que la activación de las plaquetas no aumenta significativamente el número de sitios de unión a disintegrinas (McLane *et al*, 1994). Sin embargo, se ha propuesto que estas sustancias deben dividirse en dos grupos de acuerdo a su afinidad de unión a plaquetas: el primer grupo está compuesto por disintegrinas que se unen con la misma afinidad a plaquetas inactivas y activas, mientras que las del segundo grupo se unen con mayor afinidad a plaquetas activas (Teng y Huang, 1991).

Acción de disintegrinas sobre otros tipos de células. Las disintegrinas son capaces de interferir con la función de integrinas RGD dependientes, es decir, aquellas que reconocen la secuencia RGD en sus ligandos fisiológicos. Estas incluyen el receptor de vitronectina (integrina $\alpha_v\beta_3$) y el receptor de fibronectina (integrina $\alpha_5\beta_1$). Vitronectina y fibronectina son proteínas de matriz extracelular (MEC), por lo que el bloqueo de sus correspondientes receptores impide la adhesión de la célula a la MEC. Las integrinas mencionadas están presentes en leucocitos, células endoteliales, osteoclastos e incluso en células malignas, entre otras. Por tanto, las disintegrinas pueden afectar la capacidad de adhesión de estas células a la MEC, factor del cual se derivan una serie de aplicaciones para estas moléculas que serán discutidas seguidamente.

Aplicaciones potenciales de las disintegrinas: utilidades clínicas, terapéuticas y diagnósticas. Desde el descubrimiento de las disintegrinas y su mecanismo de acción, se han realizado muchas investigaciones para dilucidar las posibles aplicaciones terapéuticas de estas moléculas en diferentes áreas de la medicina. A continuación se mencionan algunas conclusiones obtenidas

a partir de diferentes experimentos en que se emplearon disintegrinas, y que son un reflejo del alto potencial terapéutico de este grupo de sustancias.

- Las disintegrinas poseen actividad antitrombótica efectiva y previenen la re-oclusión arterial en modelos animales de trombosis (Markland *et al*, 1995; Shebuski *et al*, 1990).
- Conservan el número y la funcionalidad de las plaquetas durante circulación extracorpórea (Bernabei *et al*, 1995; Musial *et al*, 1990).
- Inhiben la adhesión de espermatozoides a oocitos (Bronson *et al*, 1995).
- Inhiben la reabsorción del hueso por parte de los osteoclastos, por lo que las disintegrinas podrían tener un uso potencial en el tratamiento de osteoporosis y otros trastornos que involucran pérdidas óseas. (Fisher *et al*, 1993; King *et al*, 1994).
- Previenen la metástasis de células tumorales de diferentes tipos. Las disintegrinas se unen a través de su secuencia RGD a integrinas en la superficie de células tumorales e inhiben la adhesión celular y la metástasis (Morris *et al*, 1995; Sheu *et al*, 1996; Zhou *et al*, 1996a; Staiano *et al*, 1997; Lang *et al*, 1997; Danen *et al*, 1998).
- Las disintegrinas inhiben la angiogénesis, un proceso indispensable para la progresión de masas tumorales, mediante el bloqueo de la integrina $\alpha\beta_3$ y la inducción de apoptosis en células endoteliales (Yeh *et al*, 1998)

Inicialmente se pensó que las disintegrinas podrían ser buenos agentes 21 terapéuticos, ya que su vida media en la circulación es del orden de minutos, en tanto su actividad biológica permanece por varias horas y tienen baja toxicidad (Markland, 1998). Pero estas moléculas presentan el inconveniente de su inmunogenicidad, su alto costo de producción y su susceptibilidad a ser degradadas por proteólisis en el organismo, por lo que las compañías farmacéuticas han centrado sus esfuerzos en la obtención de análogos sintéticos para estas moléculas (Frishman *et al*, 1995).

Las disintegrinas también constituyen útiles herramientas para valorar la funcionalidad plaquetaria (Liu *et al*, 1996) y para el diagnóstico de patologías relacionadas con plaquetas, como la trombostenia de Glanzmann, en la cual las disintegrinas pueden emplearse para evidenciar la carencia del receptor plaquetario GP IIb/IIIa (Liu *et al*, 1994). Además, se ha sugerido que las disintegrinas, en conjunto con anticuerpos monoclonales pueden contribuir a la identificación de los epitopos activos en las integrinas (McLane *et al*, 1998).

Moléculas relacionadas con disintegrinas. Actualmente se sabe que existen proteínas tipo disintegrina ampliamente distribuidas en todo el reino animal. Aparentemente, existe toda una superfamilia de proteínas celulares que contienen un dominio disintegrina, las cuales funcionan como ligandos de integrinas en importantes interacciones de adhesión entre células y entre células y matriz extracelular (Weskamp y Blobel, 1994).

Se han aislado inhibidores de la agregación plaquetaria que poseen una secuencia RGD en otras especies de animales, incluyendo sanguijuelas y

garrapatas (Niewiarowski *et al*, 1994). Un caso interesante es el del péptido 22 denominado mambina, aislado del veneno de la serpiente *Dendroaspis jamesonii* (familia *Elapidae*), ya que su estructura corresponde a una neurotoxina y es un inhibidor de la agregación plaquetaria a través de su secuencia RGD (McDowell *et al*, 1992). Se propone que esta molécula tiene importantes implicaciones para la biología evolutiva, pues representa un híbrido genético entre proteínas neurotóxicas y hemotóxicas que se encuentran en los venenos de serpientes.

En numerosos trabajos científicos se han logrado aislar de venenos de serpientes de distintas especies componentes específicos capaces de inhibir la agregación plaquetaria. Por ejemplo, Scarborough y colaboradores (1993a) demostraron la presencia de disintegrinas en 11 especies de vipéridos americanos. Sin embargo, hasta la fecha se desconocía si el veneno de la serpiente más importante de nuestro medio, la terciopelo (*Bothrops asper*), posee proteínas o péptidos con la mencionada actividad. La presente investigación pretende dilucidar dicha incógnita.

MATERIALES Y METODOS

1. Aislamiento de una disintegrina (Botrasperina) del veneno de *Bothrops asper*

El veneno de *B.asper* utilizado fue una mezcla obtenida de más de 15 a 20 especies colectadas en la vertiente Atlántica de Costa Rica. Después de centrifugado, el veneno fue liofilizado y almacenado a -20°C . Muestras de 250 mg de veneno fueron disueltas en amortiguador de ácido acético 0.5 M, pH 1.8 y aplicadas a una columna de 1.8 centímetros de diámetro por 93.5 centímetros de largo de Sephadex G50 (Farmacia), equilibrada con la misma solución amortiguadora. Las fracciones se colectaron a una tasa de flujo de 0.3 ml/min. Los picos 2 y 3 fueron seleccionados con base en su peso molecular para valorar su actividad antiagregante, por lo que fueron liofilizados para su posterior análisis.

Posteriormente 2 mg de la fracción liofilizada se disolvieron en 2ml de una solución amortiguadora de acetato de amonio 0.05M, pH 7.5 (solución amortiguadora A). Dicha preparación se centrifugó y se aplicó a una columna mono Q en un sistema FPLC (Cromatografía líquida de alta velocidad) (Farmacia Biotech). Las fracciones unidas se eluyeron con un gradiente de acetato de amonio que va de 5% a 20% de solución amortiguadora B (acetato de amonio 1M, pH 7.5) en un tiempo de 30 minutos, lo cual equivale aproximadamente a un gradiente de 0.10M a 0.24M de acetato de amonio.

Las fracciones así obtenidas se concentraron al vacío en un aparato Speed²⁴ Vac (Savant). Luego se disolvieron en 100 μL y se determinó cuales fracciones poseían actividad procoagulante (mezclando 5 μL de cada una con 250 μL de plasma humano), las cuales se descartaron. Las restantes fracciones se probaron para definir si poseían actividad antiagregante, mediante una prueba de agregación plaquetaria (ver punto 2). Una vez identificada la fracción con actividad tipo disintegrina, se procedió a optimizar el gradiente para su separación en el sistema FPLC, estableciéndose un gradiente de 5% a 13% de solución amortiguadora B en 20 minutos, lo cual equivale aproximadamente a un gradiente de 0.1M a 0.17M de acetato de amonio. Utilizando esta metodología se aisló la disintegrina en múltiples corridas cromatográficas.

2. Prueba de agregación plaquetaria

Las pruebas de agregación plaquetaria se realizaron en un agregómetro de Chrono-Log Corporation, modelo 530-VS, perteneciente al Laboratorio de Investigación del Hospital Nacional de Niños. La actividad antiagregante se estableció incubando 450 μL de plasma rico en plaquetas (PRP) con una alícuota de cada una de las fracciones por 5 minutos a 37 °C en agitación constante. La agregación fue inducida agregando 50 μL de ADP (Sigma #885). Se utilizó como blanco 450 μL de plasma pobre en plaquetas (PPP). Tanto el PRP como el PPP se obtuvieron a partir de plasmas de donadores sanos que acudieron al Banco de Sangre del Hospital Nacional de Niños.

3. Homogeneidad de las proteínas purificadas

La homogeneidad de las proteínas purificadas fue probada por electroforesis en gel de poliacrilamida para péptidos y proteínas de bajo peso molecular. Este es un sistema trifásico con un gel separador (16.5%), un gel espaciador (10%) y un gel en la superficie (4%). La corrida electroforética se llevó a cabo a 150 voltios y las proteínas fueron teñidas con azul coomasie. (Manual de técnicas para los sistemas de separación de péptidos, Promega).

4. Aislamiento de una fosfolipasa ácida con actividad antiagregante del veneno de *B. asper*

La fracción de la cromatografía de filtración en gel Sephadex G-50 en la cual se demostró la actividad antiagregante fue recromatografiada bajo las mismas condiciones. Se seleccionó la fracción que correspondía a componentes de peso molecular intermedio y se liofilizó. Se disolvieron 2 mg de la fracción liofilizada en 2ml de una solución amortiguadora de acetato de amonio 0.05M, pH 7.5 (solución amortiguadora A). Dicha preparación se centrifugó y se aplicó a una columna mono Q en un sistema FPLC (Pharmacia Biotech). Se aplicó el mismo gradiente empleado para el aislamiento de la disintegrina, esto es, de 5% a 13% de solución amortiguadora B (acetato de amonio 1M, pH 7.5) en 20 minutos. Se probó la actividad antiagregante (según se describió en el punto 2) con la fracción que tenía un patrón cromatográfico

similar a la disintegrina. Se comprobó que dicha fracción tenía actividad antiagregante. 26

5. Actividad fosfolipasa

La actividad de la fosfolipasa ácida del veneno de *B. asper* fue determinada mediante el método de hemólisis radial (Gutiérrez *et al*, 1988). Un volumen de 0.3 ml de eritrocitos de carnero lavados tres veces con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2, 0.3 ml de yema de huevo diluída 1:4 con la solución amortiguadora de fosfatos y 0.25 ml de solución de CaCl₂ 0.01 M fueron añadidos a 25 ml de 0.8% de agarosa disuelta en la solución de fosfatos (PBS). La mezcla fue aplicada a placas plásticas de 135 X 80 mm en donde gelifica. Posteriormente se abren hoyos de 3 mm de diámetro en donde se aplicaron 5 ul de la fracción obtenida. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 20 horas y posteriormente se midieron los diámetros de hemólisis. Como control negativo se utilizó un volumen igual de solución amortiguadora de fosfatos sola y como control positivo la miotoxina III de *B. asper* a una concentración de 2ug/ul.

6. Secuencia N-terminal

Para determinar la secuencia N-terminal de la disintegrina y de la fosfolipasa ácida de *B. asper* se utilizó el procedimiento de degradación de Edman en un secuenciador Beckman LF-3000. Ambas secuenciaciones fueron realizadas en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (UNAM), en Cuernavaca, México.

7. Elaboración de un péptido sintético tipo RGD.

El péptido sintético con la secuencia RGDW fue sintetizado por Chiron Technologies (Australia), con un 90 % de pureza probado en un sistema de RP-HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) en una columna C18.

8. Determinación del valor IC₅₀ para la disintegrina, la fosfolipasa ácida y el péptido sintético RGD.

Se determinó la concentración de la disintegrina y de la fosfolipasa ácida mediante el micrométodo de Bradford. Para los tres agentes antiagregantes se efectuaron varias diluciones. La concentración molar de la solución madre de disintegrina, fosfolipasa y péptido RGD se calculó con base a su peso molecular aproximado. En el caso de la disintegrina, se realizaron varias diluciones a partir de la solución madre, y la concentración final de cada dilución en la prueba de agregación se calculó multiplicando por el factor de dilución 1/50, ya que se probaron 10 µL de cada dilución con 490 µL de PRP. Para la fosfolipasa y el péptido RGD, se probaron diferentes alícuotas de una misma solución madre, por lo que la concentración final de cada dilución se calculó multiplicando por el factor de dilución específico para cada prueba.

Para el cálculo del IC₅₀ de la disintegrina se emplearon diluciones de 360nM, 90nM, 45nM, 36nM, 18nM y 6 nM. Con la fosfolipasa se probaron diluciones de 511nM y 261nM, mientras que para el cálculo del IC₅₀ del péptido

RGD se utilizaron diluciones de 103 μ M, 40 μ M y 10 μ M. Se determinó el ²⁸ porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria para cada dilución, mediante la comparación gráfica de la agregación plaquetaria del control de PRP (100% de agregación) con la agregación obtenida con cada dilución en particular. Con base a estos resultados se calculó el IC₅₀ para cada uno de estos componentes.

RESULTADOS

A. Aislamiento y caracterización parcial de una disintegrina (botrasperina) del veneno de *Bothrops asper* (terciopelo)

1. Separación cromatográfica del veneno por filtración en gel Sephadex G-50

El veneno completo fue separado mediante una cromatografía de filtración en gel Sephadex G-50, obteniéndose cuatro fracciones (figura 1).

Se intentó determinar cuales de estas fracciones poseían actividad antiagregante, pero fue imposible, ya que todas ellas causaban la coagulación del plasma rico en plaquetas durante el periodo de incubación.

2. Separación por cromatografía tipo FPLC en columna mono-Q de las fracciones obtenidas por filtración en gel.

Para efectuar la separación mediante cromatografía tipo FPLC se seleccionaron las fracciones 2 y 3 obtenidas por filtración en gel. La fracción 1 se descartó debido a que representaba componentes de muy alto peso molecular, en tanto la fracción 4 se desechó porque tenía una baja concentración proteica.

El sistema FPLC permitió separar la fracción 2 en 10 subfracciones, mientras que la fracción 3 fue separada en 11 subfracciones (figura 2).

Se determinó cuales subfracciones presentaban actividad procoagulante. 9 de las 10 subfracciones de la fracción 2 y 4 de las 11 subfracciones de la fracción 3 manifestaban dicha actividad. Estas subfracciones fueron descartadas.

3. Identificación de la actividad disintegrina

Se probó la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria de cada una de las subfracciones restantes de la cromatografía tipo FPLC, empleando 20 μ L de cada una de ellas. Se empleó como control plasma rico en plaquetas sin ningún aditivo, el cual arrojó el patrón característico de la agregación plaquetaria (figura 3). La subfracción 3 de la fracción 3 fue la única capaz de inhibir completamente la agregación plaquetaria (figura 4). Se establece por lo tanto que esta subfracción posee una actividad antiagregante compatible con la de una disintegrina.

4. Reproducción del aislamiento de la disintegrina.

Una vez identificada la subfracción con actividad disintegrina, se procedió a optimizar el gradiente para su aislamiento en el sistema FPLC. Con este nuevo gradiente se recuperó dicha fracción en repetidas ocasiones

(figura 5). Se logró demostrar la actividad antiagregante para 12 subfracciones ³¹ aisladas de este modo (figura 6).

5. Caracterización electroforética.

La electroforesis realizada en gel de poliacrilamida (figura 7) permitió establecer que la disintegrina presente en el veneno de *Bothrops asper* es un monómero con un peso molecular de aproximadamente 8000 gramos/mol.

6. Secuencia N-terminal

Se lograron determinar los primeros 11 aminoácidos de la secuencia N-terminal de la disintegrina. La siguiente fue la secuencia obtenida:

NH₂– EAGEECDGTE

Esta secuencia es prácticamente idéntica a la de otras disintegrinas aisladas de venenos de serpientes (figura 8).

7. Determinación del IC 50

Para calcular el IC 50, se determinó el porcentaje en que inhibían la agregación plaquetaria diferentes concentraciones de botrasperina. Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Con base en estos resultados, se confeccionó una curva de mejor ajuste (figura 9). Según la ecuación de la recta, $y = 0.7047x + 14.515$, se determinó que el IC 50 de la botrasperina es de aproximadamente 50 nanomolar.

Tabla 3. Inhibición de la agregación plaquetaria producida por diferentes concentraciones nanomolares de botrasperina

Concentración (nM)	Porcentaje de inhibición
360	100%
90	81%
45	41%
36	37%
18	30%
6	21%

B. Aislamiento y caracterización parcial de una fosfolipasa ácida con acción antiagregante sobre plaquetas del veneno de *B. asper* (terciopelo)

1. Separación cromatográfica del veneno por filtración en gel Sephadex G-50.

El veneno completo fue separado mediante una cromatografía de filtración en gel Sephadex G-50, obteniéndose cuatro fracciones (figura 1). Se decidió recromatografiar bajo las mismas condiciones la fracción 3, en la cual

previamente se había hallado la actividad antiagregante, con el fin de separar sus componentes de acuerdo a su peso molecular. La fracción 3 se separó en tres nuevas fracciones (figura 10). Se seleccionó la fracción 2 producto de esta recromatografía, debido a que correspondía a los componentes de peso molecular intermedio.

2. Separación por cromatografía tipo FPLC en columna mono-Q de la fracción obtenida por filtración en gel.

La fracción 2 obtenida mediante la recromatografía de la fracción 3 original fue separada en el sistema FPLC empleando el mismo gradiente optimizado para el aislamiento de la botrasperina. Se obtuvo una subfracción con un patrón cromatográfico similar al de la botrasperina (figura 11).

3. Identificación de la actividad antiagregante.

Mediante una prueba de agregación plaquetaria se determinó que la subfracción con un patrón cromatográfico similar a la botrasperina es capaz de inhibir la agregación plaquetaria, aunque con una potencia menor que la de la botrasperina (figura 12).

4. Determinación de la actividad fosfolipasa

Mediante el método de hemólisis radial se determinó que la subfracción con un patrón cromatográfico similar a la botrasperina posee actividad fosfolipasa. El halo de hemólisis para esta subfracción fue en promedio de 25

mm, mientras que el control positivo (miotoxina II de *B. asper*) presentó un halo de hemólisis de 14 mm. Este resultado permite establecer que dicha subfracción corresponde a una fosfolipasa ácida con acción antiagregante sobre plaquetas.

5. Caracterización electroforética.

La electroforesis realizada en gel de poliacrilamida (figura 13) permitió establecer que la fosfolipasa ácida con acción antiagregante sobre plaquetas presente en el veneno de *Bothrops asper* es un monómero con un peso molecular de aproximadamente 14500 gramos/mol.

6. Secuencia N-terminal

Se lograron determinar los primeros 25 aminoácidos de la secuencia N-terminal de la fosfolipasa ácida. La siguiente fue la secuencia obtenida:

NH₂ – ELFELXCDILQETNXCCAXDYGWYGC

Esta secuencia presenta una gran homología con otras fosfolipasas aisladas de venenos de serpientes.

7. Determinación del IC 50

Para calcular el IC 50, se determinó en que porcentaje inhibían la agregación plaquetaria diferentes concentraciones de fosfolipasa ácida. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Inhibición de la agregación plaquetaria producida por diferentes concentraciones nanomolares de fosfolipasa ácida

Concentración (nM)	Porcentaje de inhibición
511	51%
261	23%

Con base en estos resultados, se confeccionó una curva de mejor ajuste (figura 14). Según la ecuación de la recta, $y = 0.112x - 6.232$, se determinó que el IC 50 de la fosfolipasa ácida es de aproximadamente 502 nanomolar.

C. Determinación de la acción antiagregante sobre plaquetas y del IC 50 para un péptido sintético RGD.

Para calcular el IC 50, se determinó en que porcentaje inhibían la agregación plaquetaria diferentes concentraciones del péptido sintético RGD. Los resultados se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Inhibición de la agregación plaquetaria producida por diferentes concentraciones micromolares del péptido RGD

Concentración (μM)	Porcentaje de inhibición
103	71%
52	60%
40	46%
10	27%

Con base en estos resultados, se confeccionó una curva de mejor ajuste (figura 15). Según la ecuación de la recta, $y = 0.4614x + 24.469$, se determinó que el IC 50 del péptido RGD es de aproximadamente 55 micromolar.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los venenos de serpientes están conformados por una compleja mezcla de proteínas y péptidos con una amplia gama de actividades biológicas. Muchos de estos componentes interactúan con el sistema hemostático, ya sea activando o inhibiendo el proceso de coagulación (Meier y Stocker, 1991). En los venenos de un sinnúmero de especies se han caracterizado componentes capaces de inhibir específicamente el proceso de agregación plaquetaria (Markland, 1997). En esta investigación se logró demostrar la presencia en el veneno de *Bothrops asper* (terciopelo) de dos componentes distintos capaces de inhibir la agregación plaquetaria: una disintegrina y una fosfolipasa ácida.

En el aislamiento de estos componentes inicialmente se realizó una separación del veneno total por filtración en gel Sephadex G-50. Se intentó determinar cual de las fracciones obtenidas presentaba actividad antiagregante, con el fin de facilitar la purificación de los componentes específicos responsables de dicha actividad. Sin embargo, las fracciones obtenidas, con excepción de la fracción 4, provocaban la coagulación del plasma rico en plaquetas durante el periodo de incubación de la prueba de agregación. Por este motivo, para obtener las proteínas o péptidos con actividad antiagregante fue necesario separar dichas fracciones en sus diferentes constituyentes mediante el sistema de cromatografía FPLC. En esta cromatografía FPLC se demostró como en el veneno de *Bothrops asper* los componentes que inhiben y activan el proceso de coagulación se encuentran

entremezclados, ya que en la fracción 3 se encontraron 2 subfracciones capaces de inhibir la agregación plaquetaria (la disintegrina y la fosfolipasasa) y 4 subfracciones con actividad pro-coagulante.

Al comparar la actividad antiagregante de la disintegrina y la fosfolipasa empleando las subfracciones obtenidas mediante la cromatografía FPLC, se puede determinar que a la concentración analizada únicamente la disintegrina fue capaz de inhibir la agregación plaquetaria por completo (figuras 4 y 12), lo cual refleja su enorme potencia como agente antiagregante.

En este trabajo se logró diseñar un protocolo efectivo para lograr la identificación y el aislamiento de una disintegrina del veneno de *B. asper*. Dicho protocolo es relativamente sencillo, y mostró ser reproducible en repetidas ocasiones. Además, permitió obtener la disintegrina en un grado de pureza suficiente para realizar su caracterización parcial y para definir su actividad biológica, según los objetivos de esta investigación. Sin embargo, para lograr la purificación absoluta de la disintegrina es necesario emplear técnicas cromatográficas de mayor resolución, como cromatografía de fase reversa tipo FPLC o HPLC, lo cual escapa a las posibilidades económicas y de instrumentación bajo las que se efectuó este trabajo.

Tradicionalmente las disintegrinas se han nombrado de acuerdo al nombre científico de la especie de cuyo veneno se realizó el aislamiento. Por este motivo, se decidió nombrar a la disintegrina aislada del veneno de *Bothrops asper* como botrasperina.

En este trabajo se logró determinar la característica acídica de la disintegrina y la fosfolipasa aisladas, ya que ambos componentes fueron obtenidos mediante una columna de intercambio catiónico Mono Q. Este es un dato especialmente importante en el caso de fosfolipasa, debido a que es la primera fosfolipasa de carácter ácido identificada en el veneno de *Bothrops asper*.

La secuencia N-terminal determinada para la botrasperina es prácticamente idéntica a la de otras disintegrinas secuenciadas (figura 8). La mayor variabilidad entre las secuencias de disintegrinas de diferentes especies se encuentra en los aminoácidos cercanos a la secuencia RGD, esto es, en la región carboxilo-terminal, mientras que la secuencia amino-terminal es muy conservada y es característica de este tipo de moléculas (Scarborough *et al*, 1993a). Por esta razón, el resultado obtenido en la secuenciación de la botrasperina es suficiente para concluir que se trata de una disintegrina.

Las disintegrinas tradicionalmente se han dividido en tres grupos de acuerdo a su tamaño (McLane *et al*, 1998). De acuerdo al peso molecular obtenido para la botrasperina (aproximadamente 8000 dalton), y a la alineación de su secuencia con la de otras disintegrinas caracterizadas, se puede concluir que ella pertenece al grupo de las disintegrinas medianas, las cuales poseen 6 enlaces disulfuro y una cadena polipeptídica de 68 a 73 aminoácidos.

La concentración de disintegrina capaz de inhibir el 50% de la agregación plaquetaria (IC 50) está en un intervalo de 30 y 300 nanomolar

(Niewiarowski, 1994). En el caso de la botrasperina, este parámetro se calculó ⁴⁰ en aproximadamente 50 nanomolar. Por tanto, podemos concluir que la disintegrina botrasperina aislada del veneno de *B. asper* es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria.

En las corridas electroforéticas que se realizaron a la botrasperina, se observó la presencia de una banda difusa con un peso molecular aproximado de 14500 daltons (figura 7). Ya que el aislamiento de la botrasperina se realizó con base en su punto isoeléctrico (pI), dicha banda debía corresponder a una sustancia con un pI muy similar. Para caracterizar esta banda se decidió recromatografiar mediante filtración en gel Sephadex G-50 la fracción de la cual se había aislado la botrasperina, con el fin de separar sus componentes de acuerdo a su peso molecular. De esta nueva cromatografía se decidió seleccionar la fracción con un peso molecular intermedio (fracción 2, figura 10). Esta fracción se separó en el sistema FPLC empleando el mismo protocolo optimizado para el aislamiento de la disintegrina. De esta manera se obtuvo una subfracción con mayor peso molecular que la botrasperina pero con un pI muy similar. La caracterización de dicha subfracción permitió establecer que se trataba de una fosfolipasa ácida con actividad antiagregante sobre plaquetas. Por tanto es posible concluir que la banda difusa que se observa en las electroforesis de la botrasperina corresponde a la fosfolipasa ácida, ya que ambos agentes antiagregantes poseen un pI semejante. El hecho de que dos sustancias distintas con una actividad biológica semejante tengan un pI similar nos hace pensar que dicha característica es importante para lograr inhibir la agregación plaquetaria.

La actividad enzimática de la fosfolipasa fue muy grande, incluso mayor⁴¹ que la del control positivo empleado en la prueba (miotoxina III de *B. asper*). Esto puede explicarse debido a que característicamente las fosfolipasas ácidas poseen una actividad mayor que la de sus contrapartes básicas.

La fosfolipasa ácida no fue capaz de inhibir por completo la agregación plaquetaria con las concentraciones empleadas en las distintas pruebas de agregación. Sin embargo, en repetidas ocasiones esta proteína fue capaz de disminuir el porcentaje de agregación de las plaquetas humanas inducida por ADP. El cálculo del IC 50 arrojó un valor en el orden de centenas de nanomolar, el cual es lo suficientemente bajo para afirmar que esta fosfolipasa posee una potente acción antiagregante sobre plaquetas.

La secuencia N-terminal de la fosfolipasa ácida presenta una gran similitud con la secuencia de otras fosfolipasas aisladas de venenos de serpientes, especialmente con la miotoxina II de *Bothrops asper*. Este resultado, junto a su gran actividad enzimática y su IC 50, es suficiente para afirmar que se logró identificar la presencia de una fosfolipasa ácida capaz de inhibir la agregación plaquetaria en el veneno de *Bothrops asper*. Además, los valores calculados de IC 50 y peso molecular son muy similares a los de otras fosfolipasas con actividad antiagregante aisladas de venenos de serpientes (Prasad *et al*, 1996; Huang *et al*, 1997).

El péptido sintético RGD se empleó para comparar su actividad antiagregante con la de la botrasperina. El IC 50 del péptido RGD fue de aproximadamente 55 micromolar, en tanto el de la botrasperina fue de 50

nanomolar. Este hecho demuestra que la botrasperina es un inhibidor de la agregación plaquetaria más de mil veces más potente que un péptido lineal con la secuencia RGD. Esto se debe a la estructura tridimensional de las disintegrinas y a los aminoácidos adyacentes a la secuencia RGD, todo lo cual contribuye a optimizar el acceso de la secuencia RGD a sus moléculas blanco.

Este trabajo de investigación demuestra contundentemente que el veneno de *Bothrops asper* (terciopelo) posee una disintegrina, ya que sus características de peso molecular, punto isoeléctrico, patrón electroforético, secuencia N-terminal e IC 50 son compatibles con las de otras disintegrinas aisladas de venenos de serpientes. Este es el aporte principal de este trabajo, ya que hasta la fecha no se había logrado identificar la presencia de disintegrinas en los venenos de las serpientes centroamericanas, de las cuales la terciopelo es la de mayor importancia. Debido a las muchas aplicaciones terapéuticas y diagnósticas de las disintegrinas, y a la importancia de la secuencia RGD en un sinnúmero de procesos fisiológicos que involucran la interacción de células entre sí y con la matriz extracelular, este descubrimiento representa la apertura de toda una nueva línea de investigación en venenos de serpientes en nuestro país. Una vez determinada la presencia de disintegrinas en el veneno de terciopelo, queda pendiente determinar la contribución de este tipo de moléculas en la patogénesis del envenenamiento, lo cual constituye aún un campo de investigación inexplorado en Costa Rica.

REFERENCIAS

Adler, M. A. *et al.* 1991. Solution structure of kistrin a potent platelet aggregation inhibitor and GP IIb-IIIa antagonist. *Science* **253**: 445-448.

Atmella, F. 1995. Bioquímica de la coagulación sanguínea. En; Sáenz, G. ed. *Hematología Analítica*. EDNASSS, San José, pp 251-269.

Barrantes, A. 1995. Desórdenes plaquetarios. En; Sáenz, G. ed. *Hematología Analítica*. EDNASSS, San José, pp 357-366.

Bennet, J. S. 1992. Mechanisms of platelet adhesion and aggregation: an update. *Hospital Practice* **27**: 124-138.

Bernabei, A. *et al.* 1995. Iloprost and echistatin protects platelets during simulated extracorporeal circulation. *Ann. Thorac. Surg.* **59**: 149-153.

Bronson, R. A. *et al.* Echistatin, a disintegrin, inhibits sperm-oolemmal adhesion but not oocyte penetration. *Fertil. Steril.* **64**: 414-420.

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

Colman, R. W. *et al.* 1994. Overview of hemostasis. En: Colman R. W. *et al* eds. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. Philadelphia: JB Lippincott, pp 3-18.

Danen, E. H. J. *et al.* 1998. The disintegrin eritostatin interferes with integrin $\alpha 4\beta 1$ function and with experimental metastasis of human melanoma cells. *Exp. Cell. Res.* **238**: 188-196.

Dennis, M. S. *et al.* 1989. Platelet glycoprotein IIb/IIIa protein antagonist from snake venom: Evidence for a family of platelet aggregation inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **87**: 2471-2475.

Dennis, M. S., Carter, P., Lazarus, R. A. 1993. Binding interactions of kistrin with platelet glycoprotein IIb/IIIa. Analysis by site directed mutagenesis. *Proteins* **15**: 312-321.

Detwiler, T. C. *et al.* 1978. Evidence that calcium regulates platelet function. *Thromb. Haemost.* **40**: 207-211.

Domínguez, V., Rosenfeld, F. 1996. Estudios de laboratorio en hemostasia. Principios y control de calidad. En Martínez C. y Quintana, S. eds. *Manual de hemostasia y trombosis. Bases fisiopatológicas y clínicas de las enfermedades hemorrágicas y trombóticas*. Editorial Prado, México, pp 190-210.

Frishman, W.H et al. 1995. Novel antiplatelet therapies for treatment of patients with ischemic heart disease: Inhibitors of the platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin receptor. *Am. Heart. J.* **130**: 877-92.

Gould, R. J. et al. 1990. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **195**: 168-171.

Gutiérrez, J.M. et al (1988) an alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon* **26**:411-413.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B. 1989. Local tissue damage induced by Bothrops asper snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan.* **51**: 211-233.

Gutiérrez, J. M. 1995. Clinical toxicology of snake bites in Central America. En: Meier, J. y White, J., eds. *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*. CRC Press, Boca Raton, pp 645-665.

Hirsh, J. et al. 1994. Overview of the thrombotic process and its therapy. En: Colman R. W. et al eds. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. Philadelphia: JB Lippincott, pp 1151-1163.

Huang, T.F et al (1987). Trigramin: a low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet expressed on glycoprotein IIb/IIIa complex. *J. Biol. Chem.* **262**: 16157-16163.

Huang, T. F. *et al.* 1991. Mechanism of action of the antiplatelet peptide, arietin, from *Bitis arietans* venom. *Biochim. Biophys. Acta.* **1074**: 144-150.

Huang, M. Z., Gopalakrishnakone, P. y Kini, R. M. 1997. Inhibition of human platelet aggregation by a phospholipase A₂ platelet inhibitor from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom. *Toxicon* **35**, 492.

Hynes, R. O. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* **48**, 549-554.

Kamiguti, A. S., Hay, C. R. y Zuzel, M. 1996. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha 2 beta 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Biochem. J.* **320**, 635-641.

King, K. L. *et al.* 1994. Effects of kistrin on bone resorption *in vitro* and serum calcium *in vivo*. *J. Bone Min, Res.* **9**: 381-387.

Kini, R. M. y Evans, H. J. 1990. Effects of snake venom proteins on blood platelets. *Toxicon* **28**, 1387-1422.

Kini, R. M., Evans, H. J. 1992. Structural domains in venom proteins: Evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. *Toxicon.* **30**: 265-293.

Laing, G. D., Kamiguti A. S., Wilkinson, M. C., Lowe, G. M. y Theakston, R. D. 1995. Characterization of a purified phospholipase A₂ from the venom of the Papuan black snake (*Pseudechis papuanus*) *Biochim. Biophys. Acta* **1250**: 137-143

Lang, S. H. *et al.* 1997. Primary prostatic epithelial cell binding to human bone marrow stroma and the role of alpha2beta1 integrin. *Clin. Exp. metastasis*. **15**: 218-227.

Liu, C. Z. *et al.* 1994. Analysis of human platelet glycoprotein IIb-IIIa by fluorescein isothiocyanate-conjugated disintegrins with flow cytometry. *Thromb. Haemost.* **72**: 919-925.

Liu, C. Z. *et al.* 1996. Measurement of glycoprotein IIb-IIIa by flow cytometry with fluorescein isothiocyanate-conjugated crotavirin, a member of disintegrins. *Thromb. Haemost.* **76**: 585-591.

Markland, F.S. *et al.* 1995. Contortrostatin, a disintegrin with potent antiplatelet activity, prevents reocclusion following thrombolysis in a canine carotid artery thrombosis model. *Thromb. Haemost.* **73**: 1314.

Markland, F.S. 1997. Snake venoms. *Drugs*. **54**(suppl 3): 1-10.

Markland, F.S. 1998. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* **36**(12):1749-1800.

Marsh, N.A (1998) Use of snake venom fractions in the coagulation laboratory. ⁴⁸

Blood coagulation and fibrinolysis **9**:395-404.

Martínez, C., Quintana, S. 1996. Fisiología de la hemostasia primaria. En Martínez C. y Quintana, S. eds. *Manual de hemostasia y trombosis. Bases fisiopatológicas y clínicas de las enfermedades hemorrágicas y trombóticas*. Editorial Prado, México, pp 5-22.

McDowell, R. S. *et al.* 1992. Mambin, a potent glycoprotein IIb/IIIa antagonist and platelet aggregation inhibitor structurally related to the short neurotoxins. *Biochemistry* **31**: 4766-4772.

McLane M. A. *et al.* 1994. Interaction of disintegrins with the α IIb/ β 3 receptor on resting and activated human platelets. *Biochem. J.* **301**: 429-436.

McLane, M.A. *et al* (1998) Viper venom disintegrins and related molecules. *P.S.E.B.M.* **219**: 109-119.

Meier, J. y Stocker, K. (1991) Effects of snake venoms on hemostasis. *Critical Reviews in Toxinology* **21**(3):171-182.

Morris, V. L. *et al.* 1995. Effects of the disintegrin eritostatatin on individual steps of hematogenous metastasis. *Exp. Cell Res.* **219**: 571-578.

Musial, J. *et al* (1990). Inhibition of platelet adhesion to surfaces of extracorporeal circuits by disintegrins. *Circulation* **82**:261-273.

Otero, R. 2000. Epidemiología y aspectos clínicos del accidente ofídico en Colombia: Envenenamiento bothrópico grave. En: *Resúmenes del Simposio Internacional "El envenenamiento ofídico: un problema de salud pública en Latinoamérica"*. Instituto Clodomiro Picado, San José, Costa Rica.

Otero, R. *et al.* 1992. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos (marzo de 1989-febrero de 1990). *Acta Méd. Colombiana*. **17**: 229-34.

Ouyang, C., Hwang, L. J. y Huang, T. F. 1985. Inhibition of rabbit platelet aggregation by alpha-fibrinogenase purified from *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper). *J. Formosan Med. Assoc.* **84**: 1197-1206.

Prasad, B. N. *et al.* 1996. A platelet aggregation inhibitor phospholipase A₂ from Russell's viper (*Vipera russelli*) venom: isolation and characterization. *Toxicon*. **34**: 1173-1185.

Rojas, G. El Instituto Clodomiro Picado: ciencia y tecnología endógenas en la solución de un problema de salud pública. En: *Resúmenes del Simposio Internacional "El envenenamiento ofídico: un problema de salud pública en Latinoamérica"*. Instituto Clodomiro Picado, San José, Costa Rica.

Rosenfeld, G. 1971. Symptomatology, pathology and treatment of snakes bites in South America. Bucherl, W., Buckely, E., eds. *Venomous animals and their venoms*, Vol II, *Venomous vertebrates*. Academic Press, New York, pp 345-384.

Scarborough, R.M. *et al* (1993a) Characterization of the integrin specificities of disintegrin isolated from american pit viper venoms. *J. Biol. Chem.* **268**(2):1058-1065).

Scarborough, R.M. *et al.* (1993b). Design of potent and specific integrin antagonists. *J. Biol. Chem.* **268**: 1066-1073.

Shebuski, R. J. *et al.* 1990. Acceleration of recombinant tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis and prevention of reocclusion by the combination of heparin and the Arg-Gly-Asp containing peptide bitistatin in a canine model of coronary thrombosis. *Circulation* **82**: 169-177.

Sheu, J. R. *et al.* 1994. Triflavin, an Arg-Gly-Asp containing peptide, inhibits human cervical carcinoma (HeLa) cell-substratum adhesion through an RGD-dependent mechanism. *Peptides*. **15**: 1391-1398.

Sheu, J. R. *et al.* 1996. Triflavin, an Arg-Gly-Asp containing peptide, inhibits the adhesion of tumor cells to matrix protein via binding to multiple integrin receptors expressed on human hepatoma cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **213**: 71-79.

Shimokawa, K. *et al.* 1998. Isolation, sequence analysis, and biological activity of atrolisin E/D, the non-RGD disintegrin domain from *Crotalus atrox* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* **354**: 239-246.

Staiano N. *et al.* 1997. Echistatin induces decrease of pp125FAK phosphorylation, disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions, and detachment of fibronectin-adherent melanoma cells. *Eur. J. Cell. Biol.* **73**: 298-305.

Stocker, K. 1990. Composition of snake venoms. En: Stocker K.F., ed. *Medical use of snake venoms proteins*. CRC Press, Boca Raton, pp 33-56.

Teng, C. M. y Huang, T. F. 1991b. Inventory of exogenous inhibitors of platelet aggregation. *Thromb. Haemost.* **65**, 624-626.

Teng, C. M., huang, T. F. 1991a. Snake venom constituents that affect platelet function. *Platelets* **2**: 1-11.

Trikha, M. Et al (1994) Contortrostatin, a snake venom disintegrin, inhibits $\beta 1$ integrin – mediated human metastatic melanoma cell adhesion and blocks experimental metastasis. *Cancer Research* **54**:4993-4998.

Verstraete, E., Zoldhelyi, N. 1995. Novel antithrombotic drugs in development. *Drugs* **49**: 856-884.

Weskamp, G. y Blobel C.P. (1994) A family of cellular proteins related to snake venom disintegrins. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 2748-2751.

52
Yeh, C.H.(1998) Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo by acting as integrin $\alpha V\beta 3$ antagonist and inducing apoptosis. *Blood* **92**(9):3268-3276.

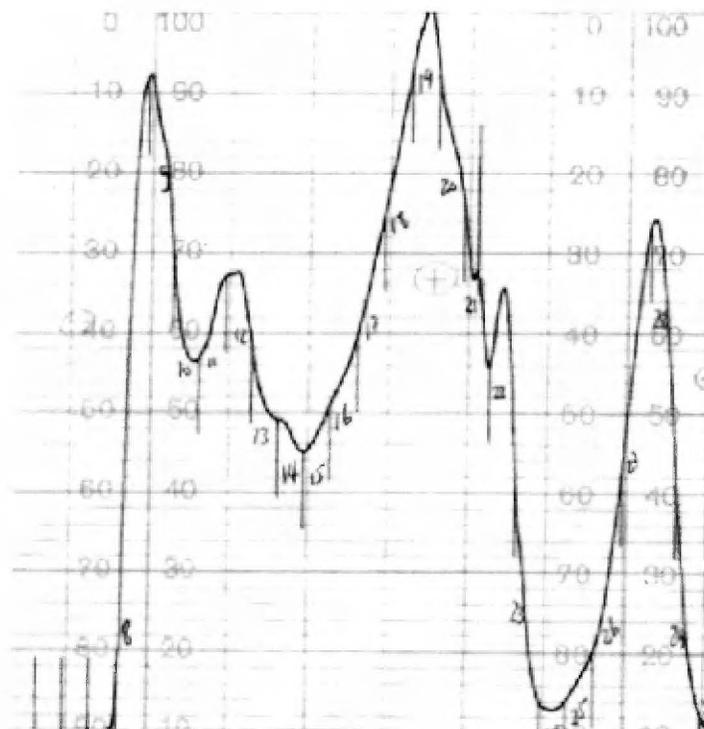
Yuan, Y., Jackson, S. P., Mitchel, C.A. y Salem, H. H. 1993 purification and characterization of a snake venom phospholipase A₂: a potent inhibitor of platelet aggregation. *Thromb. Res.* **70**, 471-481.

Zhou, Q. *et al.* 1996a. Contortrostatin, a snake venom protein, which is an inhibitor of breast cancer progression. *Molecular Biol. Cell.* **7**: 425a.

Zhou, Q. *et al.* 1996b. The hemorrhagin catrocollastatina inhibits collagen-induced platelet aggregation by binding to collagen via its disintegrin-like domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **219**: 720-726.

FIGURAS

Absorbancia 280 nm



de tubo

Figura 1: Cromatografía de filtración en gel (Sephadex G-50) de 250 mg de veneno de *B. asper* (terciopelo), usando como solución amortiguadora ácido acético 0.5M pH 1.8 y un flujo de 0.3 ml /minuto. La fracción 3 corresponde a la fracción con actividad antiagregante.

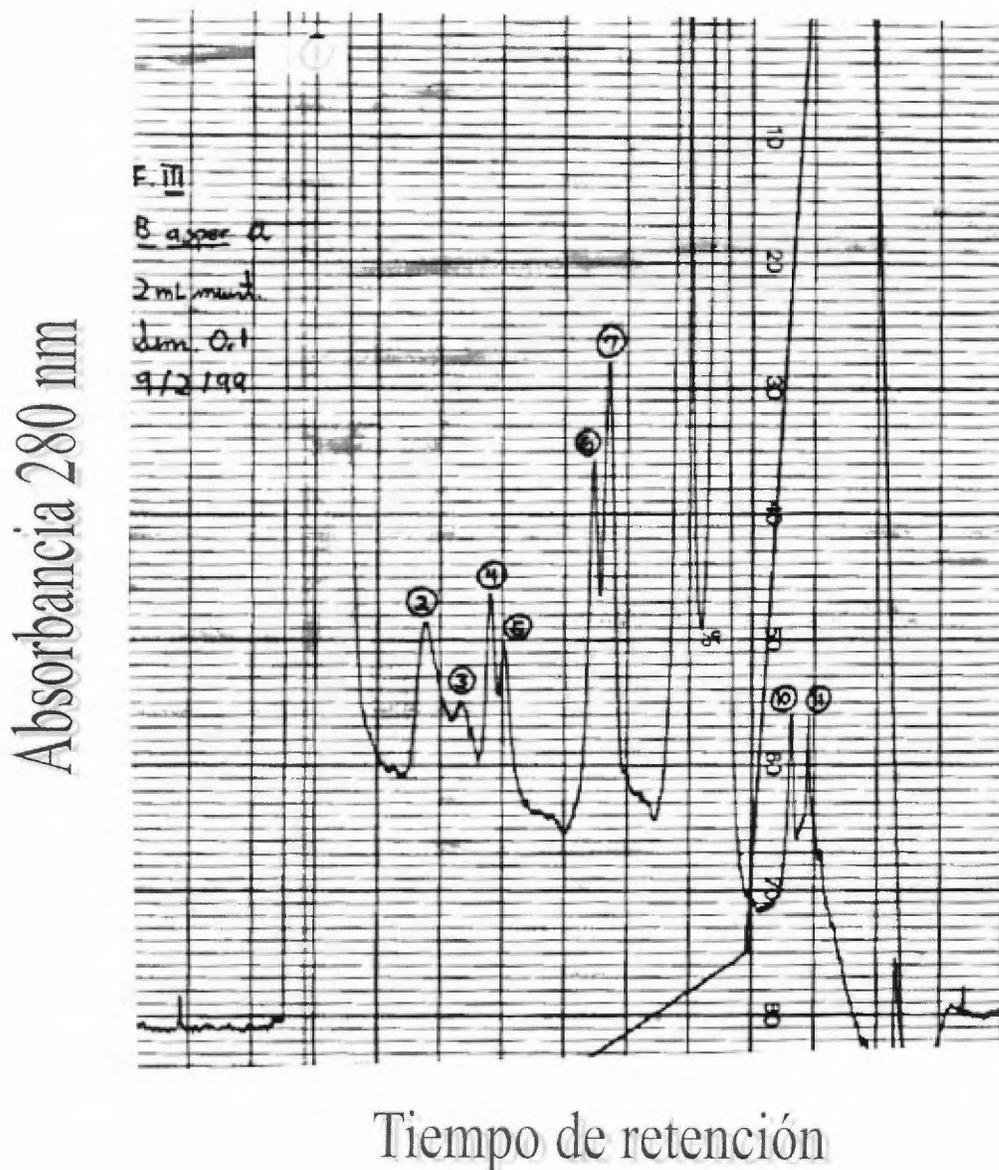


Figura 2: Cromatografía de intercambio iónico en columna mono Q y sistema FPLC, de la fracción 3 obtenida por filtración en gel Sephadex G-50. Para la elución de las fracciones se usó un gradiente de solución amortiguadora de acetato de amonio, el cual incrementaba la concentración de acetato de amonio de aproximadamente 0.10M a 0.24M en 30 minutos. La fracción 3 se separó en 11 subfracciones, la subfracción 3 corresponde a la disintegrina aislada.

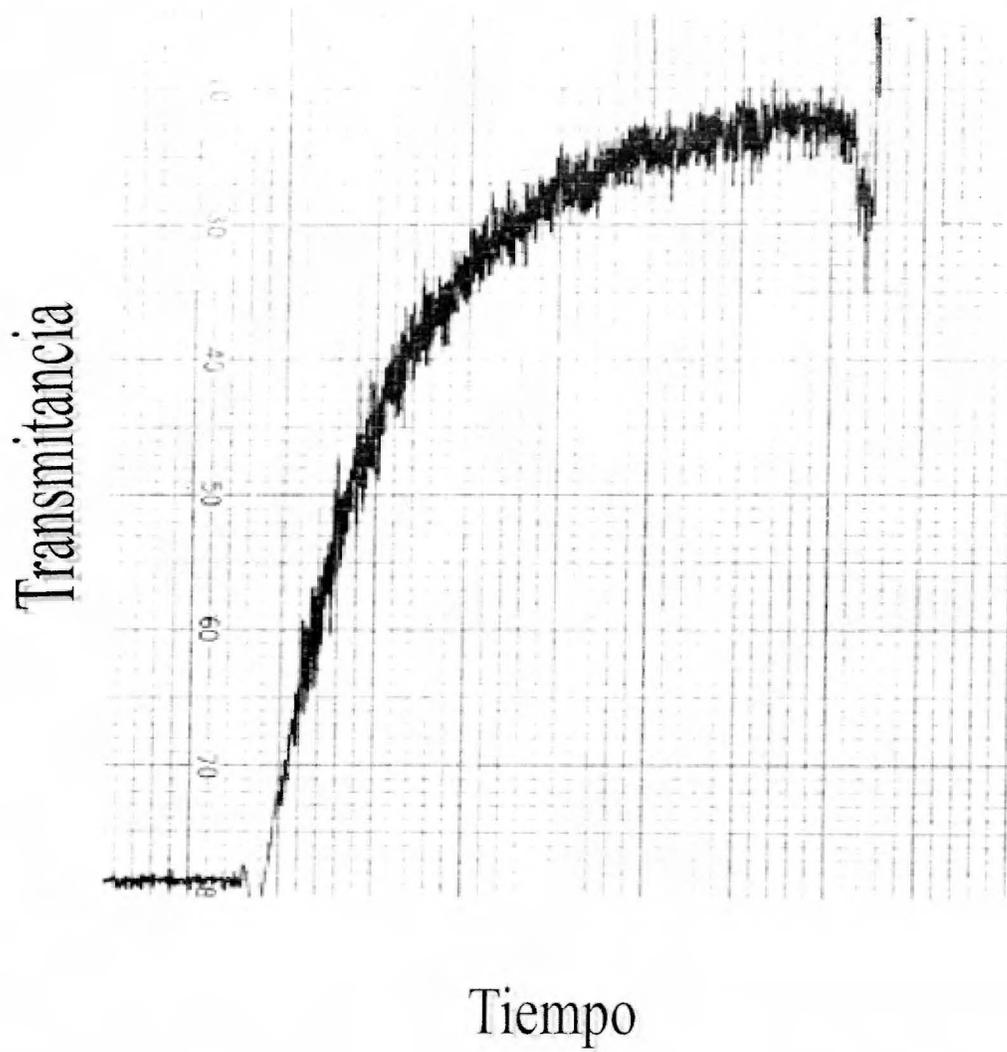
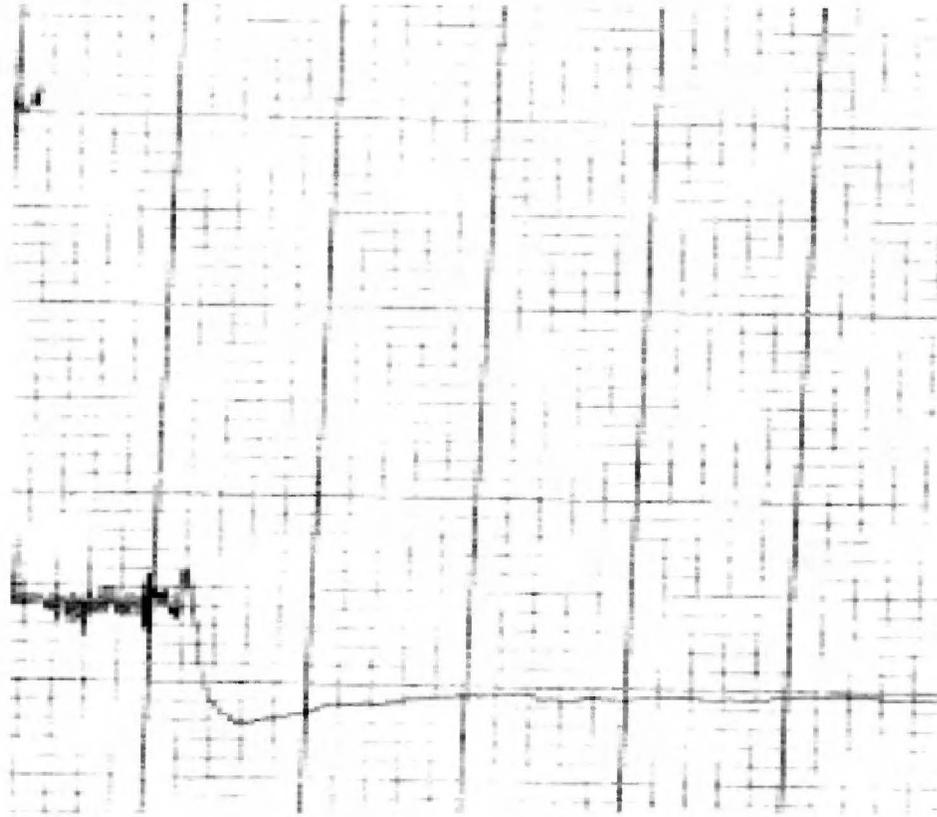


Figura 3: Actividad agregante del control de plasma rico en plaquetas usando como inductor de la agregación ADP.

Transmitancia



Tiempo

Figura 4: Inhibición de la agregación plaquetaria de un plasma rico en plaquetas por la disintegrina aislada del veneno de *Bothrops asper*, usando ADP como inductor de la agregación.

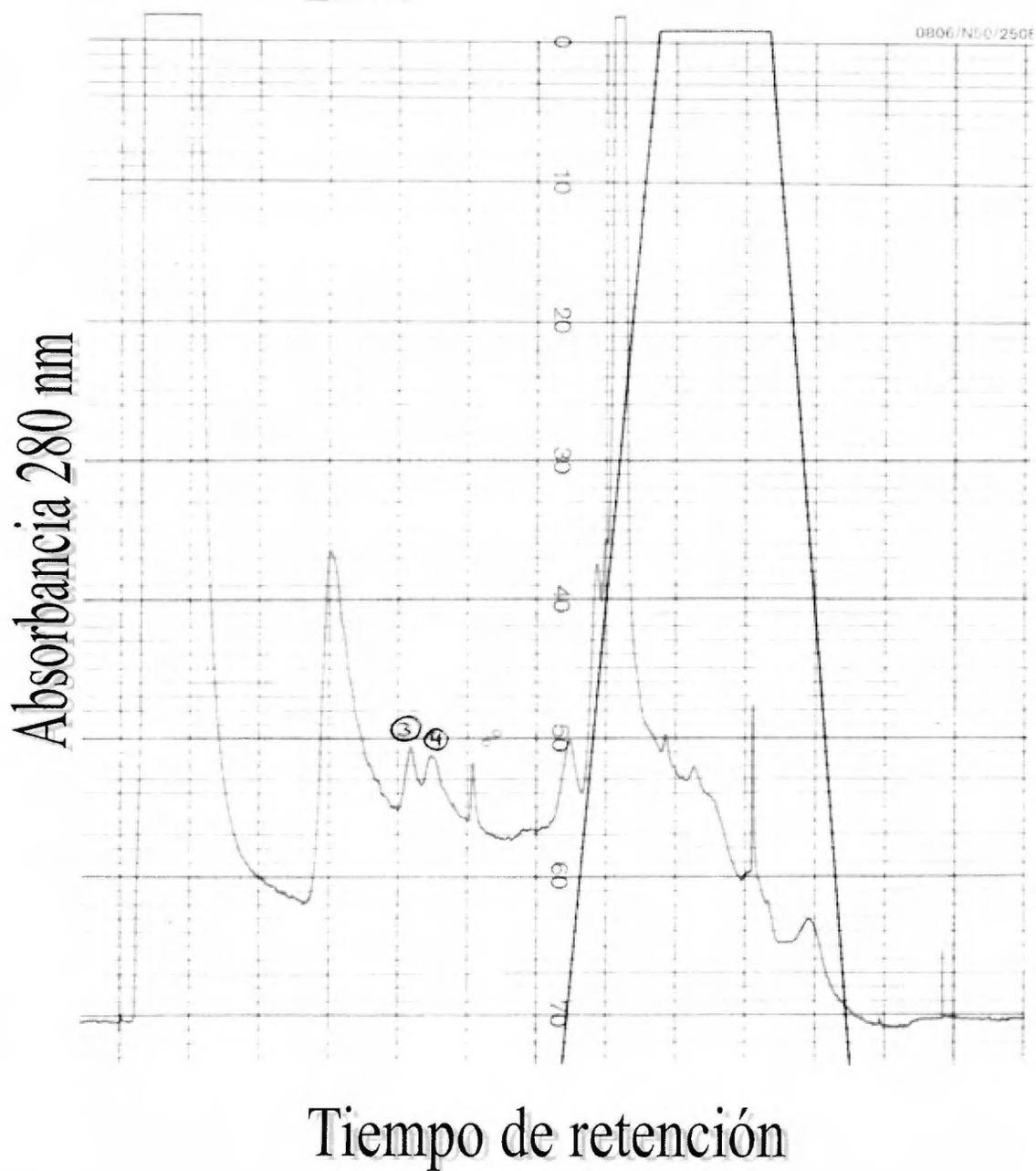


Figura 5: Cromatografía de intercambio iónico en columna mono Q y sistema FPLC de la fracción 3 obtenida por filtración en gel Sephadex G50 empleando el gradiente de acetato de amonio optimizado para el aislamiento de la disintegrina. La botrasperina corresponde a la subfracción 3.

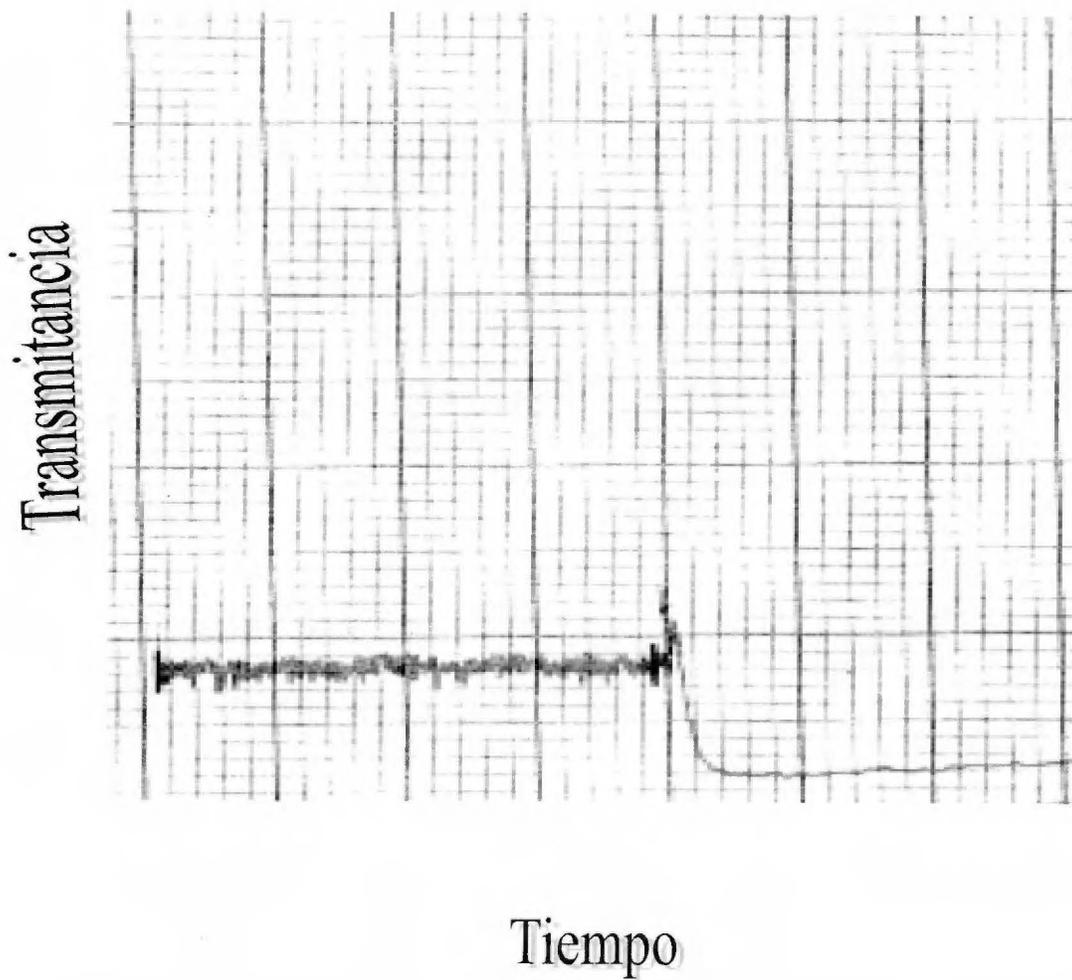


Figura 6: Inhibición de la agregación plaquetaria de un plasma rico en plaquetas por la botrasperina aislada mediante el gradiente salino optimizado, usando ADP como inductor de la agregación.

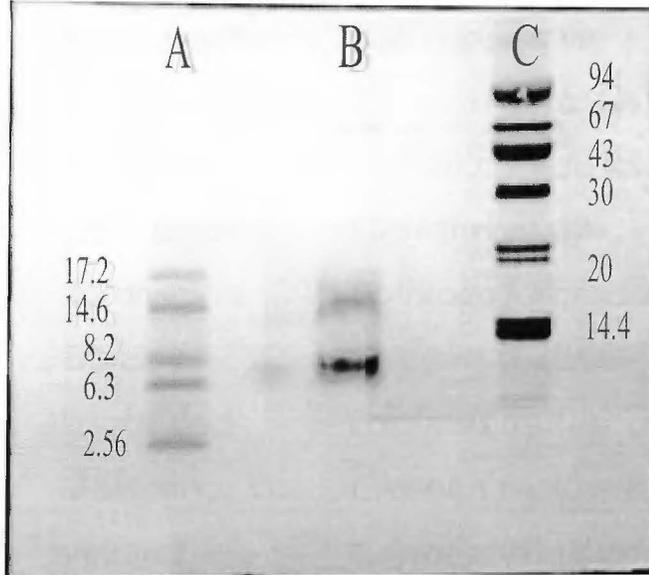


Figura 7: Electroforesis de la fracción proteica correspondiente a la disintegrina aislada del veneno de *B. asper*, (SDS) gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio para péptidos. En la línea A se encuentran marcadores de muy bajo peso molecular, en la línea B la disintegrina y en la línea C marcadores de bajo peso molecular.

5 10 		
EAGEECDCGTE	Botrasperina	<i>Bothrops asper</i>
EAGEECDCGTP	Cerastina	<i>Crotalus cerastes cerastes</i>
EAGEECDCGSP	Lutosina	<i>Crotalus viridis lutosus</i>
AGEECDCGSP	Crotatroxina	<i>Crotalus atrox</i>
EAGEECDCGTP	Jararacina	<i>Bothrops jararaca</i>
AGEECDCGSP	Durisina	<i>Crotalus durissus durissus</i>
EAGEECDCGAP	Laquesina	<i>Lachesis mutus</i>
EAGIECDCGSL	Molossina	<i>Crotalus molossus molossus</i>
AGEECDCGSP	Viridina	<i>Crotalus viridis viridis</i>
EAGEECDCGSP	Cereberina	<i>Crotalus viridis cerebelus</i>
AGEECDCGSP	Basilicina	<i>Crotalus basilicus</i>

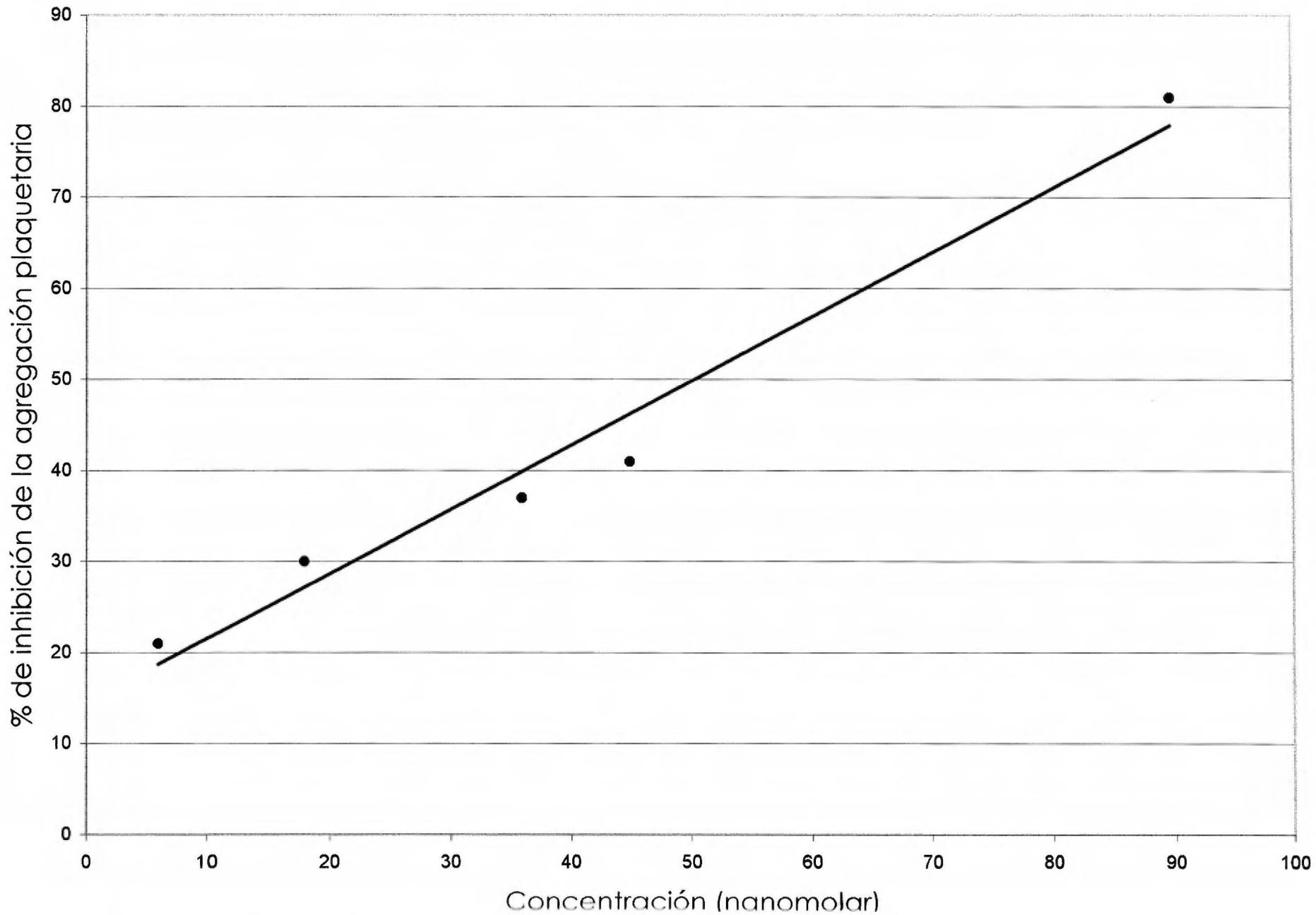
Fuente: Scarborough *et al*, 1993a

Figura 8: Secuencia amino terminal de la disintegrina botrasperina y su comparación en identidad con otras disintegrinas aisladas del veneno de serpientes americanas.

Figura 9: Recta de mejor ajuste empleada para el cálculo del IC 50 de la disintegrina botrasperina

$$y = 0.7047x + 14.515$$

$$R^2 = 0.9728$$



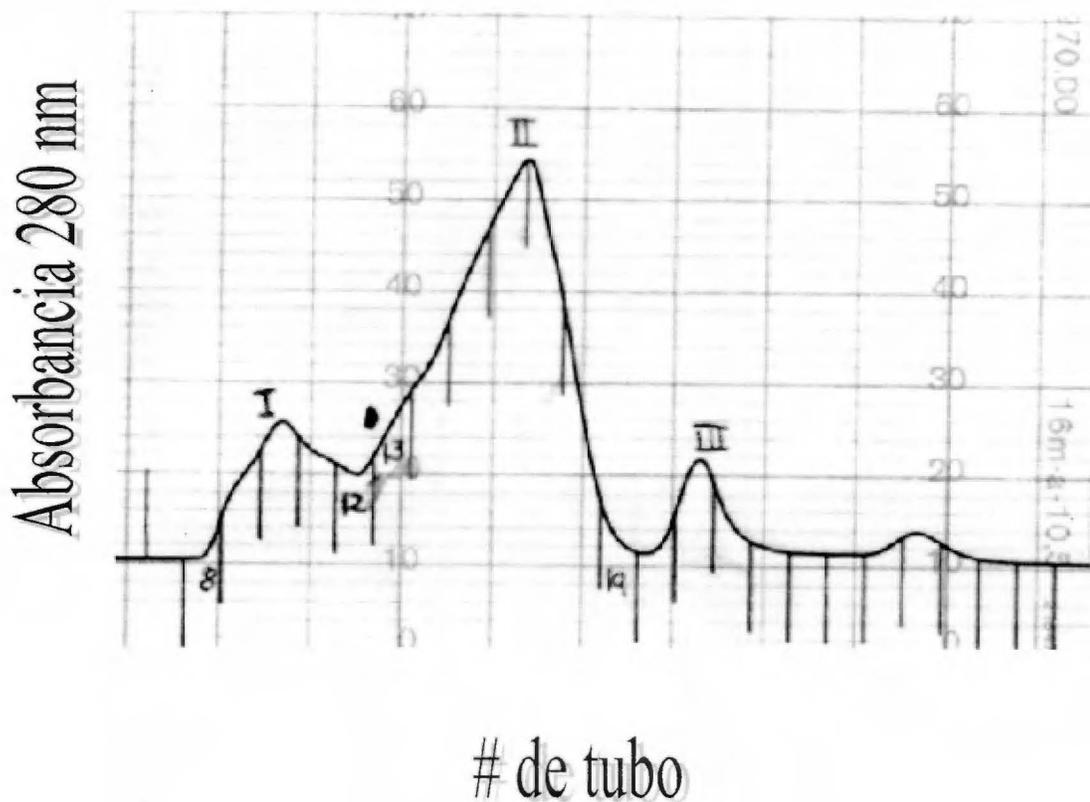
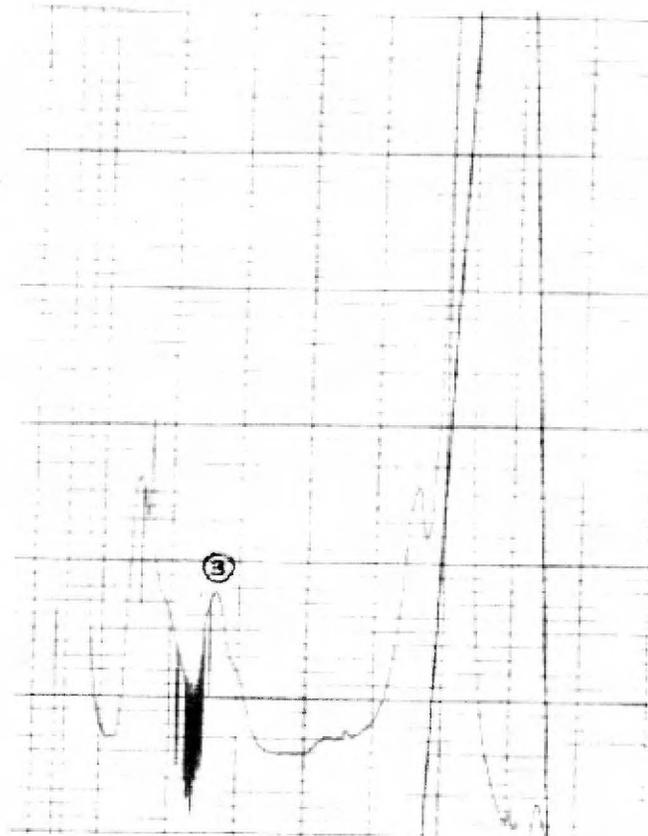


Figura 10: Recromatografía de filtración en gel (Sephadex G50) de la fracción 3, en la cual previamente se había identificado la actividad antiagregante. Se usó como solución amortiguadora de equilibrio y elución, ácido acético 0.5M pH 1.8 y un flujo de 0.3 ml/minuto. La fosfolipasa ácida fue aislada a partir de la fracción II obtenida en esta cromatografía.

Absorbancia 280 nm



Tiempo de retención

Figura 11: Cromatografía de intercambio iónico en columna mono Q y sistema FPLC, de la fracción 2 de la recromatografía de filtración en gel Sephadex G50 de la fracción con actividad antiagregante. Para la elución de las fracciones se usó un gradiente de solución amortiguadora de acetato de amonio de aproximadamente 0.1M a 0.17M en 20 minutos. La subfracción 3 corresponde a la fosfolipasa ácida aislada.

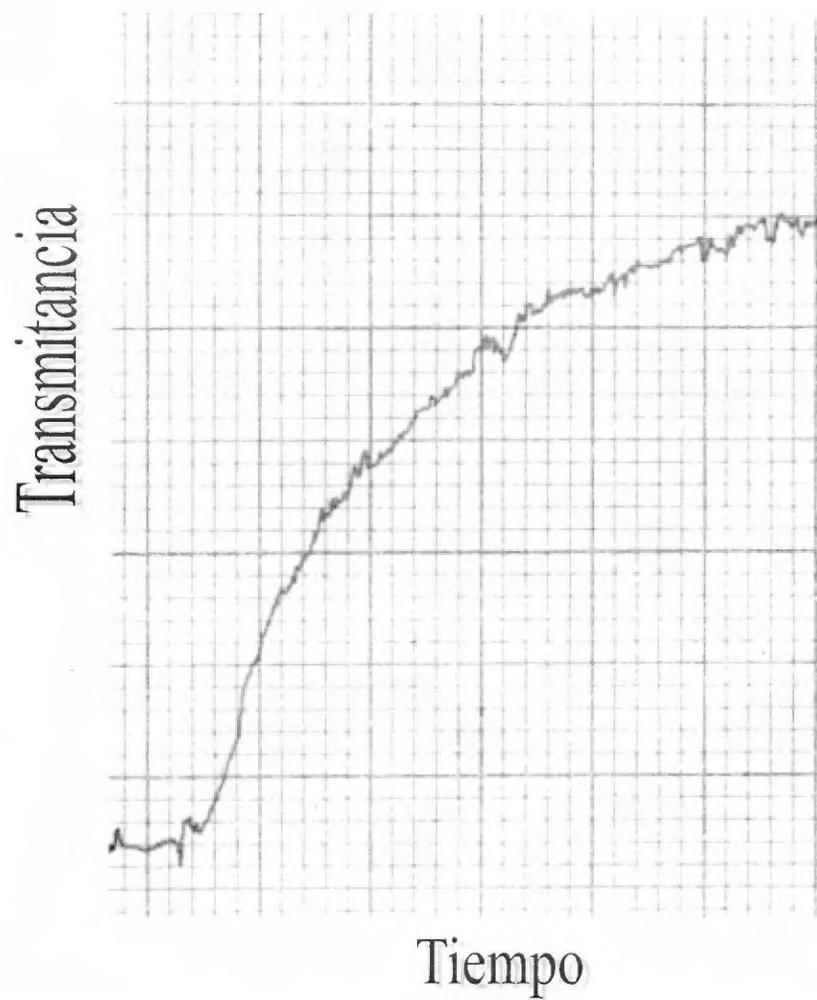


Figura 12: Inhibición de la agregación plaquetaria de un plasma rico en plaquetas por la fosfolipasa ácida aislada del veneno de *Bothrops asper*, usando ADP como inductor de la agregación.

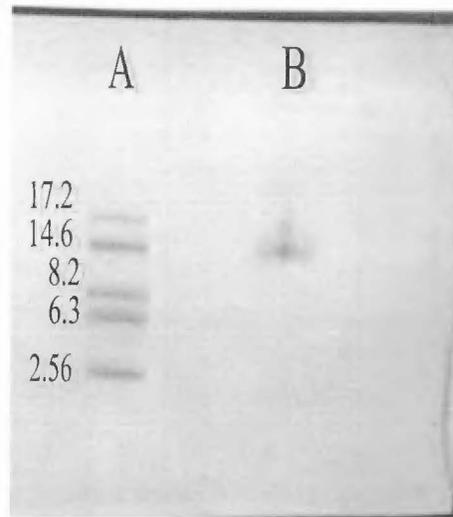
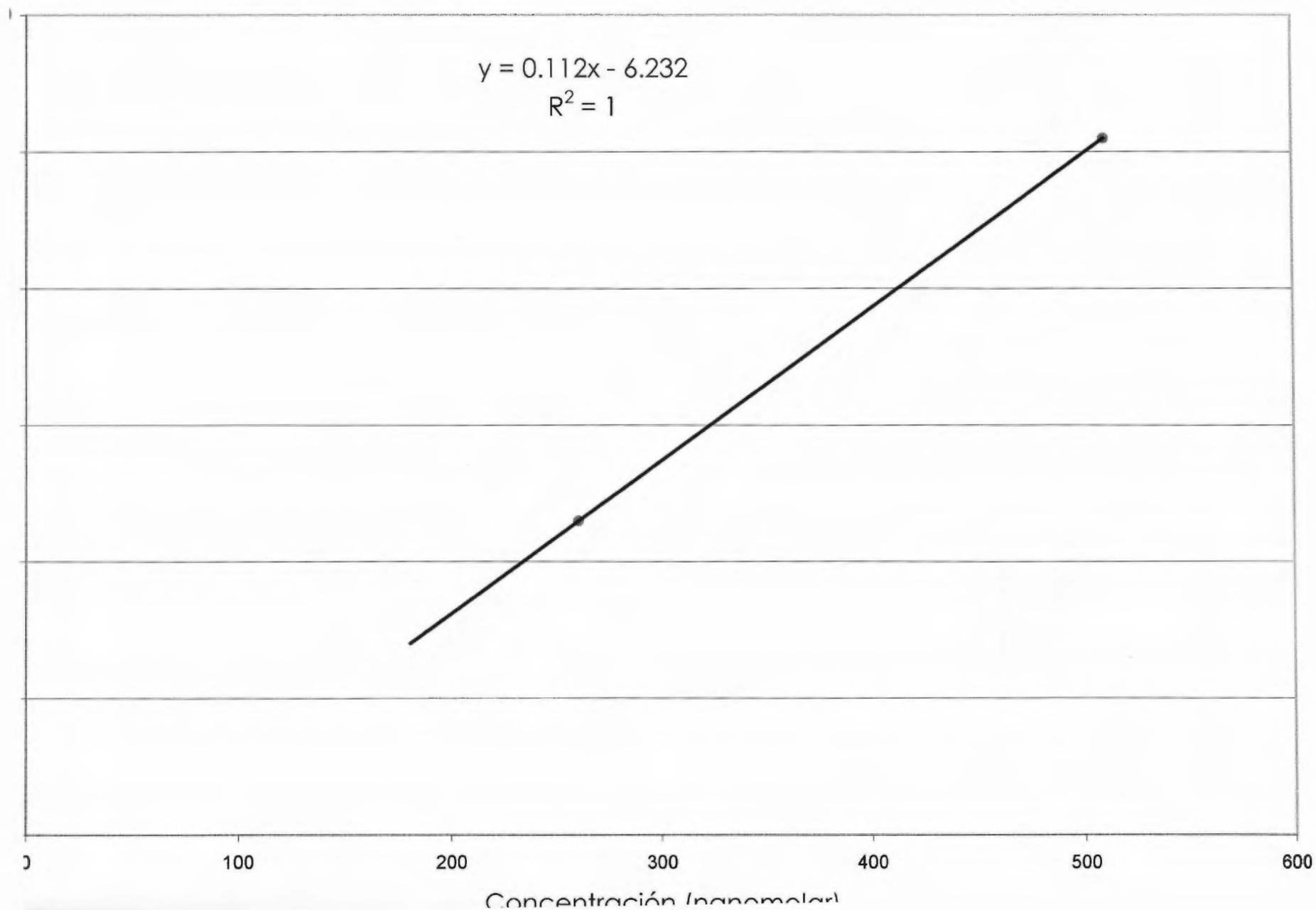


Figura 13: Electroforesis de la fracción proteica correspondiente a la fosfolipasa ácida aislada del veneno de *B. asper*, (SDS) gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio para péptidos. En línea A se encuentran marcadores de muy bajo peso molecular, en línea B la fosfolipasa purificada.

Figura 14: Recta de mejor ajuste empleada para el cálculo del IC 50 de la fosfolipasa ácida



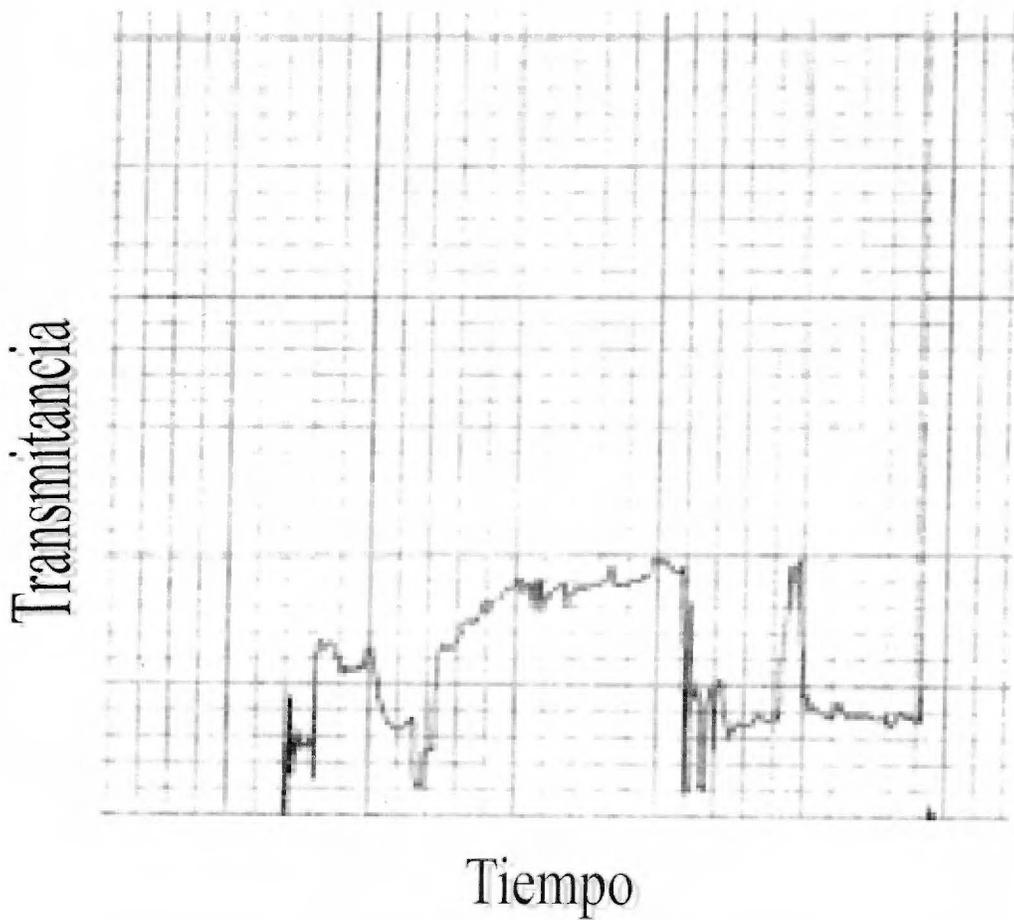


Figura 15: Inhibición de la agregación plaquetaria de un plasma rico en plaquetas por el péptido sintético RGD, usando ADP como inductor de la agregación.

Figura 16: Recta de mejor ajuste empleada para el cálculo del IC 50 del péptido sintético RGD

$$y = 0.4614x + 24.469$$

$$R^2 = 0.9848$$

