



Metaloproteasas - Desintegrinas en el campo de la ofidiología

Francisco Alexis Rodríguez Acosta ¹.

Juan Carlos López Johnston ².

¹Médico-Cirujano rodriguf@ucv.ve

²Biólogo lopezjjc@cantv.net

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

La presente revisión busca reunir varios de los aspectos básicos y más resaltantes de la familia de proteínas conocida como las metaloproteasas/desintegrinas, ADAM'S (A Disintegrin And Metalloprotease). Por la gran extensión del tema, en relación con la multiplicidad de funciones que desempeñan dentro de los organismos biológicos y los tipos de receptores descritos, se haría extremadamente extenso hacer una recopilación completa de todos los aspectos en dónde esta familia de proteínas se encuentra involucrada. Sin embargo, haremos énfasis en las metaloproteasas/desintegrinas que forman parte de las toxinas naturales, especialmente de los venenos ofídicos.

PALABRAS CLAVE: integrinas, desintegrinas, metaloproteasas, veneno de serpientes

METALLOPROTEASES-DISINTEGRINS IN THE OPHIDISM FIELD

SUMMARY

This review resumes different basic aspects of the protein family called Metalloproteases-Disintegrins (ADAM'S: A Metalloprotease and Disintegrins). Because the high extension of the

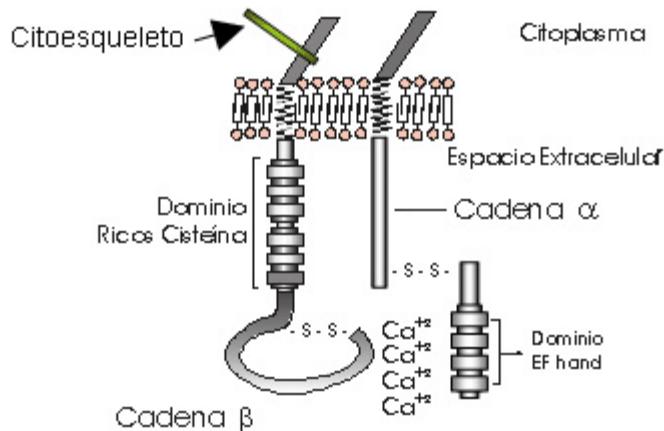
topic, in relationship with the multiple functions that they develop in biological organisms, it could be so extents to make a total recompilation of all aspects from this protein family where it is involved. However, it will emphasize the snake venoms metalloproteases-disintegrins complex.

KEY WORDS: integrins, disintegrins, metalloproteases, snake venom

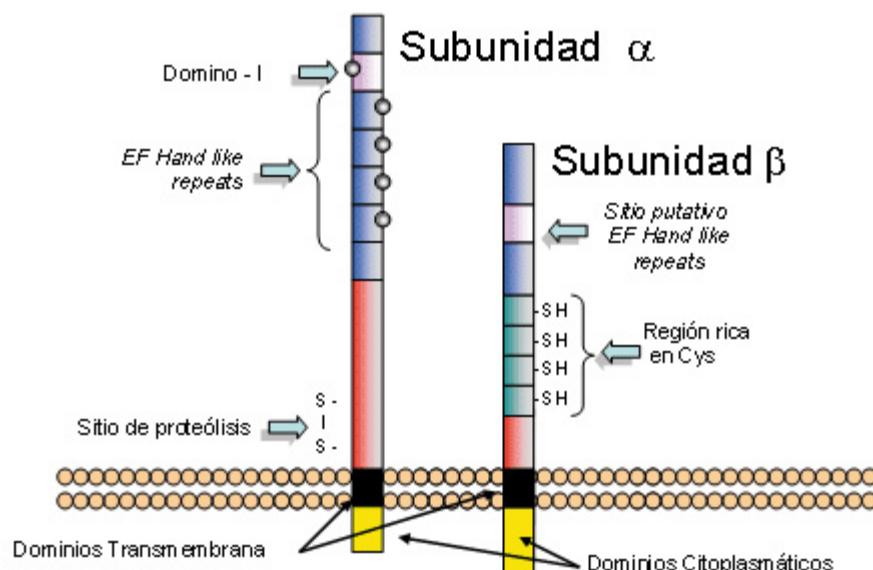
LAS INTEGRINAS

Se define como integrina a la superfamilia de glicoproteínas de membrana que median la adhesión de células con la matriz extracelular y células entre si mismas, siendo consideradas como el mayor y más importante grupo de receptores para proteínas de la matriz extracelular. El término fue introducido para denotar que los receptores estaban compuestos por glicoproteínas integrales de membranas envueltas en la asociación de la matriz con el citoesqueleto. Son, entonces, responsables de proveer el nexo funcional entre el ambiente extracelular y el citoesqueleto, factor que resulta fundamental para los mecanismos de adhesión y migración celular y la propagación de varios tipos de sistemas de señalización (Dzamba, 2001).

Todas las integrinas se encuentran estructuradas como heterodímeros asociados de forma no covalente. Basándose en la similitud de secuencia, el sistema de nomenclatura propuesto para la designación de las integrinas, categoriza las subunidades individuales de cada heterodímero como α y β , ambas del tipo transmembrana, cuyas combinaciones definen la propiedad adhesiva y de señalización. La mayor parte de la proteína se encuentra expuesta hacia el medio extracelular, mientras que el citoesqueleto de actina y la maquinaria de señalización se encuentran asociados al pequeño dominio citoplasmático. Ambas subunidades son diferentes con baja homología en sus secuencias (Dzamba, 2001). Dzamba, (2001) también reporta, dentro del grupo de los mamíferos, la existencia de al menos 18 subunidades α y alrededor de 8 subunidades β . Las subunidades β contienen entre 760 y 790 residuos aminoacídicos mientras que las subunidades α presentan tamaños de entre 1000 y 1200 residuos. Los dominios extracelulares de las subunidades β presentan 56 residuos de cisteína, la mayoría de los cuales se localizan dentro de un rango de 260 aminoácidos, separados de la membrana plasmática por aproximadamente 50 residuos. Por su parte, las subunidades α contienen siete secuencias repetitivas de aproximadamente 60 aminoácidos cada una, que incluyen motivos EF HAND, con una secuencia consenso del tipo DxDxDGxxD, capaces de atrapar cationes divalentes. Estos motivos son importantes para mantener la capacidad de adhesión de la integrina y los cambios conformatacionales que afectan al receptor por el ligando (Dzamba, 2001). También se reporta que la mitad de las subunidades α encontradas en las integrinas de mamíferos carecen del sitio de proteólisis extracelular, pero contienen un dominio de inserción (I-Domain "Inserted Domain") cerca de la región N-terminal. Cada Dominio I está constituido por una hoja beta rodeada por siete alfa hélices (Dzamba, 2001). Las figuras 1 y 2 proponen dos esquemas diferentes para descripción de la estructura de las integrinas.



Fuente: Gompertz y cols., 2002



Fuente: Dzamba y cols., 2002

Figura 1 y 2
Estructura de las integrinas

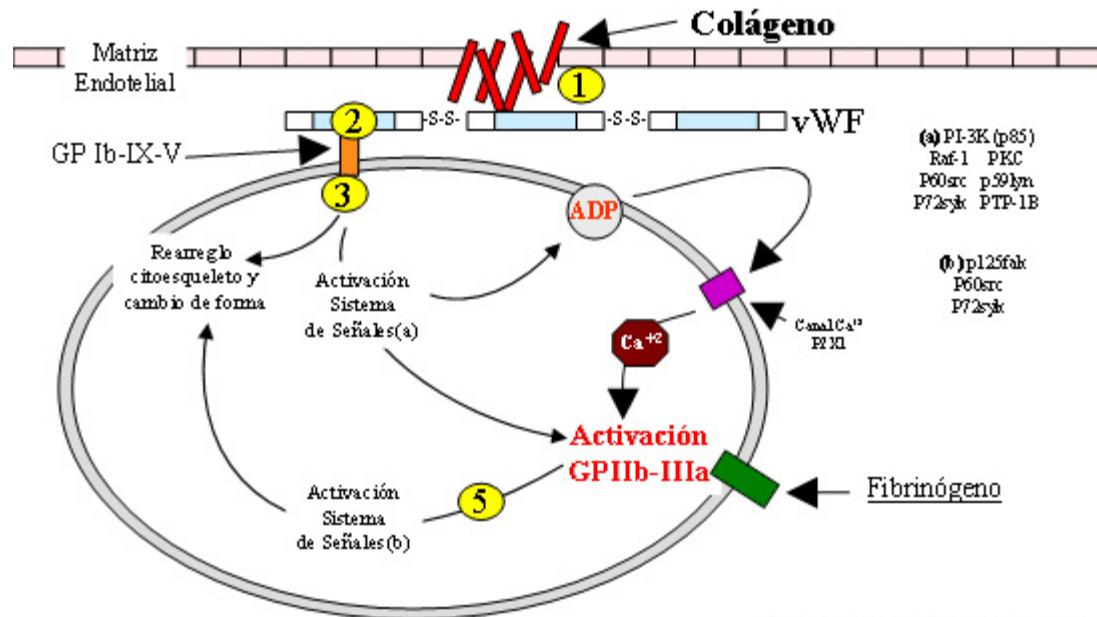
El principal determinante de la especificidad de la interacción entre los ligandos es la composición de las subunidades α y β de cada tipo de molécula. Muchas de las integrinas poseen la capacidad para reconocer la secuencia RGD presente en varios tipos de proteína, pero esto no garantiza que dos proteínas que posean esta secuencia puedan ser reconocidas por un mismo receptor. Esto ha llevado a considerar la probabilidad de que sean la secuencias flanqueantes a la RGD y las diferentes conformaciones tanto de los sitios adhesivos como de los bolsillos de unión los que definen esta situación (Dzamba, 2001).

Otro factor es el relacionado con la existencia de diferentes estados de activación de las integrinas, siendo definido el estado de activación como el cambio en la afinidad por su ligando por un receptor individual. Al proceso regulatorio capaz de modificar la afinidad, se define como Modulación de la Afinidad, que es disparado a través de un sistema de señales del tipo "inside out", siendo entonces una forma rápida para regular las funciones adhesivas en respuesta a varios estímulos fisiológicos (Dzamba, 2001). Entre los mecanismos

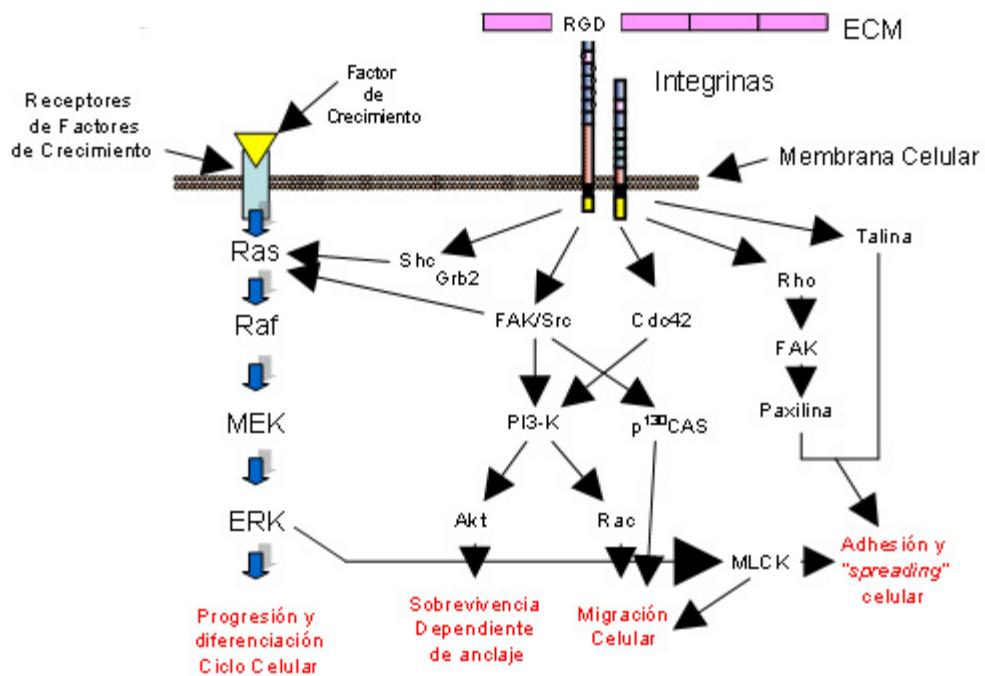
involucrados en la regulación de la interacción con el ligando se encuentra la presencia de iones metálicos , como lo sugiere la existencia de los motivos EF - Hand y MIDAS (Metal Ion Dependent Adhesión Sites), los cuales pueden modular positiva o negativamente. Por ejemplo, el Mn⁺² conlleva al aumento de la afinidad de receptor por su ligando, mientras que Ca⁺² estabiliza conformaciones de baja afinidad o estados de reposo. Adicionalmente, se consideran los fenómenos de "clustering" o agrupamiento de receptores como otra forma de aumentar la afinidad por su ligando, el cual es independiente del estado de activación del receptor mediado por cambios conformacionales. En este modelo, la presencia de ligandos multivalentes o la asociación de receptores con el citoesqueleto pueden limitar la difusión de la moléculas por la membrana incrementando de esta manera la fuerza adhesiva de la interacción (Dzamba, 2001).

Las funciones de las integrinas como mediadoras de adhesión y fusión celular (célula - célula y célula - matriz), por la activación e inhibición de señales, se lleva a cabo a través de dos tipos de sistemas de señalización, uno cuyo origen es la propia célula portadora de la integrina hacia el exterior y otro que proviene del medio externo hacia la célula y que modula su función. El primero se conoce como "inside - out signaling" mientras que el segundo se conoce como "outside - in signaling". En el "inside - out signaling", el aumento de afinidad de los receptores, por cambios conformacionales, es mediada por la activación previa de sistemas de señales intracelulares propios. Un ejemplo es el sistema de activación de la integrina GPIIb/IIIa, receptor del fibrinógeno (Figura 3), en cual se encuentra en todo momento expuesto, pero es a través de señales mediadas por la interacción de la plaqueta con ligandos como el colágeno, el ADP y la trombina que la GPIIb/IIIa sufre el cambio conformacional necesario para elevar su nivel de afinidad y desencadenar la agregación plaquetaria (Dzamba, 2001). El segundo sistema de señales "outside - in signaling", se dispara al ocurrir la interacción de la célula con alguno de sus ligandos para mediar la adhesión la matriz extracelular influenciando de esta manera eventos como el ciclo de división celular, cambios en la expresión génica, migración celular y rearreglo del citoesqueleto (Figura 4) (Dzamba, 2001).

Se ve entonces la importancia de las integrinas como moléculas responsables de numerosos procesos fisiológicos en donde resulta vital el contacto directo entre las células interviniéntes, sirviendo no solo como molécula puente para interacción intercelular, sino también como molécula puente entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de la célula, a través de la cual se intercambian señales celulares.



Fuente: Andrews, R. 1997 - 1999



Fuente: Damba y Cols., 2001

Figura 3 y 4
Esquema de señalización fibrinógeno

METALOPROTEASA - DESINTEGRINAS

Metaloproteasa - Desintegrinas (A Disintegrin And Metalloprotease -ADAM's)

Los fenómenos de adhesión célula - célula, de adhesión célula - matriz y la proteólisis de la

matriz extracelular son vitales para el desenvolvimiento normal de procesos como la morfogénesis tisular, la cicatrización de heridas, y en procesos patológicos como la invasión de células tumorales y la metástasis (Gould y cols, 1990; Wolfsberg y cols, 1995). Estos fenómenos se encuentran mediados por proteínas de adhesión de superficie celular, tales como las cadherinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas, las selectinas, las integrinas y sindecans. Los receptores citoadhesivos conocidos como integrinas, conforman una superfamilia de moléculas heterodiméricas del tipo transmembrana, entre las que se encuentran, el receptor de fibrinógeno en la plaqueta llamado glicoproteína GPIIb/IIIa y los receptores de vitronectina y fibronectina, en la célula endotelial (Gould y cols, 1990). Otro grupo de proteínas involucradas son moléculas ancladas a la superficie de la membrana, las cuales se encuentran representadas por las metaloproteasas de matriz de membrana. Entre las proteasas acopladas a la matriz de la membrana, se encuentran aquellas que contienen un dominio metaloproteasa y un dominio desintegrina, codificadas por la familia de genes conocidos como ADAM's (A Disintegrin And Metalloprotease) (Wolfsberg y cols, 1995). Esta familia de moléculas está formada por un significativo número de proteínas, que desempeñan diversos tipos de funciones en gran variedad de células. Su característica principal es la presencia de la secuencia tripeptídica conservada RGD (arginina-glicina-aspárico), que forma el sitio común de reconocimiento de las integrinas. Entre las moléculas con este tipo de dominio de reconocimiento, se encuentra un representativo número de ligandos proteicos de alto peso molecular como laminina, colágeno, el factor von Willebrand, la trombospondina, el fibrinógeno y la molécula C3bi del complemento (Gould y cols, 1990). Además de estas moléculas de alto peso molecular, también se han identificado otras proteínas, estas de bajo peso molecular, pero provenientes de algunos veneno de serpiente como *A. agkistrodon halys* y *A. rhodostoma*, *Trimeresurus gramineus* y *Echis carinatus* (Gould y cols, 1990). Blobel, (1992) refiere que los primeros miembros de la familia de proteínas solubles pertenecientes a las desintegrinas, moléculas capaces de interrumpir la interacción célula - matriz, fueron descritos en los venenos de serpientes, específicamente la tigramina, aislada a partir del veneno de la serpiente *Trimeresurus gramineus*. La primera proteína integral de membrana descrita que contiene un dominio desintegrina fue la HP-30, presente en esperma de cerdo de guinea, con una importante función en el proceso de fusión entre el óvulo y el espermatozoide. Es una glicoproteína de naturaleza heterodimérica (subunidades α y β), cuyas subunidades se encuentran evolutivamente relacionadas. HP-30 α posee un sitio potencial de fusión de péptido, mientras que HP-30 β contiene el dominio desintegrina, siendo esta, entonces la primera proteína integral de membrana en la cual se describe la presencia de la secuencia RGD (Blobel y cols, 1992).

La estructura básica de las ADAM's está filogenéticamente bien conservada y los cambios estructurales son el producto de las funciones propias de cada proteína (Yamamoto y cols, 1999). Así por ejemplo, las ADAM designadas desde uno (1) hasta siete (7) se expresan, de manera principal, en órganos reproductores, jugando su papel durante la espermatogénesis y la fusión esperma - óvulo (Wolfsberg y cols, 1995; Yamamoto y cols, 1999), y donde cada una es expresada durante distintas etapas del proceso espermatogénico. ADAM 9, por su parte, también llamada MDC9 (Metalloprotease-like, Disintegrin-like Cysteine rich), ha sido descrita en varios tipos de órganos, entre los cuales se encuentran los pulmones y glándulas mamarias, pudiendo tener relación con el desencadenamiento de señales de transducción. Otra proteína

referida es la ADAM 11, que se encuentra en células de órganos reproductores y no reproductores, mientras que ADAM 12 y 19, llamadas Meltrinas α y β respectivamente, se localizan en musculatura embrionaria y de estados neonatales y tejido óseo de embriones y adultos (Yamamoto y cols, 1999). Por otra parte, Yamamoto (1999) refiere que ADAM 17, conocida como TACE (Tumour necrosis factor Alfa Converting Enzyme) y ADAM 10, conocida como MADAM (bovine Mammalian A Metalloprotease-And Disintegrin), cumplen funciones importantes en la procesamiento de la forma acoplada a la superficie celular del precursor del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) para liberar la forma madura de la citoquina.

Aún cuando las ADAM's poseen secuencias diferentes a otras proteasas o moléculas de adhesión ancladas a membrana, se encuentran relacionadas con los dominios presentes en una familia de proteínas solubles de venenos de serpiente conocidas como Metaloproteasas de venenos de serpiente (SVMP's: Snake Venom MetalloProteases) (Wolfsberg y cols, 1995; Yamamoto y cols, 1999).

Todas las proteínas pertenecientes a la familia de las ADAM contienen un dominio del tipo metaloproteasa, el cual es similar al encontrado en las SVMP's dependientes de Zn⁺², pero, a través de análisis de secuencia realizados a ambos tipos de proteínas se ha encontrado que a diferencia de las SVMP's, solo algunos de estos dominios en las ADAM's son proteolíticamente activos (Wolfsberg y cols, 1995). Estos autores también refieren que los dominios metaloproteasa de las SVMP's poseen una secuencia consenso en su sitio activo HEXGHNLGXXHD, en donde, los tres residuos de His forman el sitio de unión para Zn⁺², el residuo de Gly permite la formación de un giro, y finalmente el residuo de ácido glutámico (E) conforma el sitio catalítico. Por otra parte, los dominios tipo metaloproteasa de las ADAM's 1, 8, 9 y 10 presentan residuos de sitios activos tipo SVMP's, manteniendo también su propiedad catalítica, mientras que ADAM's 2-7 y 11, contienen secuencias diferentes en su sitio activo. Así, a pesar de que sus dominios metaloproteasa son del tipo similar al encontrado en las SVMP's, estos son catalíticamente inactivos (Wolfsberg y cols, 1995).

En relación con los dominios tipo desintegrina encontrados en las ADAM's, todos son ligandos potenciales tanto para las integrinas como para otros receptores. A pesar de que todas las ADAM's comparten ciertos residuos en el lazo desintegrina, muchos de los residuos no están conservados, sobre todo los del tipo Cys. Aproximadamente la mitad de las ADAM's y todas las desintegrinas del tipo SVMP's poseen un residuo de ácido aspártico (carga negativa) en el motivo RGD, el cual refiere ser crítico en su función como ligando de las integrinas. Adicionalmente, no todas las ADAM's poseen el mismo número de residuos conformando su lazo desintegrina, tal diferencia en secuencias puede ser explicada a través de tres postulados: el primero, propone que la diferencia se basa en la diversidad de ligandos (integrinas y/o receptores) con los que las diferentes ADAM's interactúan. El segundo, postula que diferentes ADAM's son capaces de interactuar con los mismos receptores o receptores altamente relacionados, por lo cual, tales dominios tipo desintegrinas adoptarán estructuras similares. El último postulado propone que sólo un grupo de estas ADAM's son moléculas funcionalmente adhesivas (Wolfsberg y cols, 1995).



Bothrops colombiensis

Fuente: Juan C. López
Laboratorio de Investigaciones - Facultad de Farmacia
Universidad Central de Venezuela

Los dominios desintegrinas presentes en todas las ADAM's y las SVMP's del grupo P-III poseen un residuo extra de cisteína, en comparación con las SVMP's del grupo II. Este residuo produce un número impar de residuos de cisteína en el dominio desintegrina y puede permanecer libre o formando un puente disulfuro con alguna cisteína del dominio rico en cisteína, el cual posee un número impar de residuos (Wolfsberg y cols, 1995). El mismo autor refiere que existen evidencias que sustentan que la presencia de este residuo "extra" de cisteína, en el dominio desintegrina, es típico de moléculas funcionalmente adhesivas. Así por ejemplo, las SVMP's del grupo P-III inhiben la agregación plaquetaria. Sin embargo debe hacerse notar que en el dominio desintegrina de las hemorraginas de serpiente y las ADAM's la secuencia RGD puede estar usualmente sustituida por TDE (Thr-Asp-Glu), EDE (Glu-Asp-Glu), RDE (Arg-Asp-Glu) o por otras secuencias (McLane y cols, (1998).

Wolfsberg y cols, (1995) también hace referencia a la existencia de un dominio de fusión potencial localizado en el dominio rico en cisteína, el cual de la misma manera a como ocurre en los péptidos de fusión viral, son capaces de promover la fusión de las membranas celulares, habiendo sido identificados por su total hidrofobicidad. En relación con la cola citoplasmática de las ADAM's, son ricas en residuos de serina, prolina, ácido glutámico y/o lisina. Ninguna de las diferentes colas muestra similitud obvia en sus secuencias con respecto a las colas de otras proteínas, pudiendo estar, sin embargo, relacionadas con procesos de oligomerización o señalización (Wolfsberg y cols, 1995).

Los procesos regulatorios que modulan la actividad de estas proteínas son considerados como complejos. A nivel de su estructura primaria, sólo algunas ADAM's son capaces de presentar dominios metaloproteasa o de fusión catalíticamente activos. La transcripción de los mensajeros primarios está regulada posicional y temporalmente, ya que si bien es cierto que ciertos mensajeros se transcriben de forma específica en ciertos tejidos, existen otros mensajeros cuya transcripción ocurre en una variedad de tejidos. Además de esta característica, otra forma en que los mensajeros son regulados es a través del "Splicing alternativo" a consecuencia de la presencia de múltiples exones de pequeño tamaño

(Wolfsberg y cols, 1995). Estas proteínas también pueden ser objeto de regulación funcional a nivel de su estructura cuaternaria, debido a que de acuerdo con el tipo de dímero u oligómero formado, presentarán distintas funciones a nivel celular (Wolfsberg y cols, 1995). Otra manera de regular, referida por el autor, es a través de la modificación de su estructura terciaria por medio del procesamiento proteolítico en regiones que se localizan entre los dominios, como ocurre en ciertas SVMP's, las cuales pueden contener grupos de dos o cuatro residuos básicos entre los dominios que pueden ser reconocidos por proteasas tipo subtilisina (Wolfsberg y cols, 1995). Por analogía con las SVMP's, la regulación de la actividad metaloproteasa de las ADAM's puede ocurrir a través de un mecanismo mediado por residuos de cisteína, en el que un pro dominio de cisteína se une al sitio activo de unión a Zn⁺² manteniéndola en estado inactivo. Las ADAM's que contienen los residuos del sitio activo del dominio metaloproteasa poseen un residuo de cisteína en su pro dominio, el cual se encuentra ausente en las ADAM's que carecen de los residuos de histidina sitio para la unión del Zn⁺² (Wolfsberg y cols, 1995).

Tang, B. (1999), reporta la existencia de proteínas con el dominio metaloproteasa - desintegrina, relacionadas con las ADAM's, con una nueva característica ausente en las demás proteínas de este grupo, la presencia de un motivo trombospondina de tipo 1 (TSP1), localizado entre los dominios desintegrina y rico en cisteína. Otra diferencia entre estas proteínas y el resto de las ADAM's es que carecen de dominio transmembrana, por lo cual son secretadas en la matriz extracelular (Tang, B. 2001). Los motivos de trombospondina de tipo 1 son secuencias repetitivas encontradas en las trombospondinas 1 y 2, proteínas multifuncionales de matriz extracelular involucradas en motilidad, crecimiento y adhesión, que forman la mayor parte del contenido de los gránulos α de las plaquetas. Tang, B (1999) también refiere que, además de su presencia en los gránulos plaquetarios, la expresión de trombospondina ha sido reportada en una gran variedad de células epiteliales y mesenquimales y sus niveles dependen del grado de desarrollo embrionario y de la respuesta a daño epitelial en los adultos. También indica que, a través de estudios de ARNm, se ha determinado que son susceptibles a inducción en estados de inflamación aguda, habiendo evidencias experimentales de que la función de este motivo está relacionada con la unión de la proteína a matriz extracelular. Aún cuando estas proteínas presentan homología en las secuencias clave para ser caracterizadas como una nueva familia, muestran divergencias suficientes en sus secuencias fuera de sus dominios metaloproteasa y trombospondina como para sugerir diferencias en sus funciones fisiológicas (Tang, B. 1999).

LOS VENENOS DE SERPIENTE

Las serpientes son la más prodigiosa fuente de toxinas que pueden llegar a ser útiles a la humanidad. Sus venenos están compuestos por complejas mezclas de polipéptidos y proteínas que inducen una variada gama de efectos farmacológicos, los cuales proveen una útil herramienta para la comprensión de muchos eventos moleculares dentro de procesos fisiológicos normales. Los efectos patológicos de los venenos de las serpientes se han conocido a través de la historia. Para las civilizaciones antiguas, como la egipcia y la griega, las serpientes representaban el "Espíritu de la Tierra", eran Dios y la fuente de toda la cosmogonía.

Encarnaban la vida, la muerte, la eternidad, el conocimiento, la fecundidad, el aire y todo cuanto rodeaba a cada una de las culturas que las veneraban según sus creencias. En el siglo XVI, Van Helmont propuso en su publicación llamada "Orthus Medicinae", publicada después de su muerte en 1648, que los venenos de las serpientes eran "espíritus irritados", muy fríos, que la bestia expulsaba cuando mordía y que coagulaban la sangre en las venas y detenían la circulación. No fue hasta 1664 cuando Redi, en su publicación "Observatione Intorno Alle Vipera", el cual no prestaba atención a las teorías de momento y se basaba en las observaciones y en los hechos, determinó positivamente que el jugo extraído de las glándulas venenosas de una serpiente, viva o muerta, causaba un daño letal. Debió pasar un siglo antes de que Fontana, en su libro publicado en 1781, confirmara con resultados experimentales las observaciones de Redi, poniendo de esta forma fin a la "Teoría de los Espíritus" (Boquet, 1991). A finales del siglo XVIII, Lavoisier, convirtió a la química en una ciencia experimental y un siglo después bajo la influencia de Claude Bernard, ocurrió el desarrollo de la fisiología y comenzó el relacionar el entendimiento de las estructuras y las funciones en un sistema que definía las condiciones esenciales para el mantenimiento de la vida (Boquet, 1991). Los químicos fueron los primeros en considerar los venenos como objetos de interés, esforzándose por definir su composición. Sometieron a los venenos a reacciones con diferentes tipos de reactivos e intentaron separar sus componentes. Observaron que algunos tipos de reactivos los destruían, mientras que otros los precipitaban. En 1878, ocurrió un nuevo hallazgo en la investigación de los venenos de las serpientes, cuando Pelder, propuso que los venenos eran sustancias "tipo proteínas" y luego utilizando el veneno de *Crotalus adamanteus*, determinó que su naturaleza no era homogénea (referido por Boquet, 1991).

Los exámenes realizados a las víctimas motivaron a los fisiólogos a reproducir experimentalmente en animales, los fenómenos observados en el hombre, con la finalidad de estudiarlos más detalladamente. Debido a que estos fenómenos eran el resultado de las alteraciones en una o más funciones, los fisiólogos trataron de disociar cada síntoma del envenenamiento y relacionarlo con la función más afectada. De esta manera fueron aumentando la comprensión de los fenómenos observados mediante experimentos *in vitro* en sistemas biológicos seleccionados. En las observaciones realizadas a animales de laboratorio, mordidos por serpientes venenosas, llegaron a la conclusión de que esos venenos habían tenido un efecto sobre la sangre circulante. Bajo algunas condiciones, el envenenamiento inhibía la coagulación y bajo otras condiciones, al realizar la autopsia del animal abriendo los vasos sanguíneos, se encontraba que la sangre estaba totalmente coagulada (Boquet, 1991).



Crotalus durissus cumanensis

Fuente: Juan C. López
Laboratorio de Investigaciones - Facultad de Farmacia
Universidad Central de Venezuela

Es bien conocido que las serpientes de la familia Viperidae (Crotalinae) presentan como una de sus manifestaciones más agresivas a través de diversos efectos farmacológicos, las alteraciones sobre la agregación plaquetaria (Scarborough, 1993; Fujimura, 1995; Fuly, 1997; Clissa, 2001.). En Venezuela, los géneros Bothrops y Crotalus, pertenecientes a la familia Viperidae, ocupan los dos primeros lugares en las estadísticas nacionales de accidentes, sin embargo existen otros géneros también pertenecientes a esta familia tales como Lachesis, Porthidium, Bothriechis y Bothriopsis que no entran en las estadísticas debido a que su localización geográfica y tipos de hábitat y hábitos hacen que los encuentros con seres humanos sean muy escasos y como consecuencia la incidencia de estos accidentes sea baja. Las manifestaciones clínicas en el envenenamiento producido por las serpientes de la familia Viperidae pueden ser de los tipos locales, sistémicos o ambos. Los efectos locales incluyen con frecuencia dolor, edema, equimosis y hemorragia local, los cuales se presentan minutos después de la inyección del veneno. Tales signos son seguidos, en muchos casos por necrosis del área que rodea al sitio de la mordedura. Entre los efectos de tipo sistémico se incluyen alteraciones en la coagulación sanguínea y varios tipos de sangrado en sitios distantes al sitio de inyección del veneno como gingivorragia, macrohematuria, epistaxis, sangrado uterino y hemoptisis. Esto se debe a que estos venenos contienen una rica variedad de compuestos enzimáticos y no enzimáticos con profundos efectos en el mecanismo hemostático. Sin duda alguna, su presencia lleva a espectaculares cambios en la hemostasia, observándose con frecuencia marcados cuadros de hemorragia como consecuencia del envenenamiento posterior a una mordedura (Marsh, 1994)

Como ha sido referido, varias de estas proteínas provenientes de los venenos de serpientes interfieren con la coagulación sanguínea y la agregación plaquetaria, impidiendo el normal funcionamiento de las plaquetas ya sea iniciando, potenciando o inhibiendo la agregación. Están constituidas también por un grupo molecular heterogéneo con diversas propiedades físicas y bioquímicas, encontrándose tanto proteínas como glicoproteínas con pesos moleculares que oscilan entre 5.000 y más de 10.000 de peso molecular, con presencia o

ausencia de actividades enzimáticas (Kini, 1990).

Las fracciones de los venenos de serpiente que alteran el mecanismo de la hemostasia han sido clasificados en cinco grupos diferentes, dependiendo de su efecto general: a) fracciones del tipo coagulante que incluyen las enzimas similares a la trombina o trombino similares y las activadoras de la protrombina; b) fracciones anticoagulantes como las activadoras de la proteína C; c) fracciones que inhiben la función plaquetaria como la familia de las proteínas RGD (Arg-Gly-Asp), las desintegrinas; d) fracciones activadoras de la fibrinolisis y finalmente, e) las hemorraginas (Marsh, 1994; Huang, 1998).

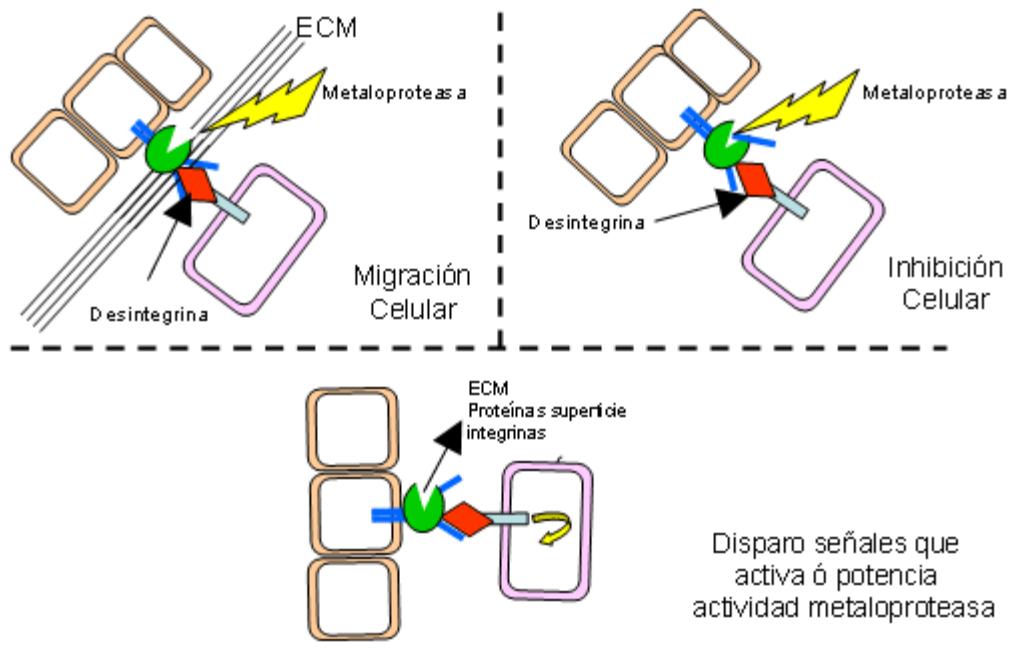
En relación con los venenos producidos por las serpientes pertenecientes al grupo de las víboras, estas contienen tres clases diferentes de proteínas capaces de interferir con la hemostasia, a saber, las proteínas capaces de unirse con la glicoproteína GPIb-IX-V, las cuales inhiben la unión del Factor de von Willebrand (vWF) a la plaqueta, alterando la agregación plaquetaria; las hemorraginas, representadas por las metaloproteinasas de venenos de serpientes (SVMP's Snake Venoms MetalloProteinases) y las desintegrinas (McLane y cols, 1998).

En el caso de las hemorraginas, estas se encuentran relacionadas con la familia de proteínas encontrada en los tejidos de los mamíferos, las ADAM o MDC (Metalloprotease-like, Disintegrin-like and Cys rich) (Huang, 1998). Son de carácter altamente tóxico, produciendo sangrado severo evitando la formación del tapón hemostático, hidrolizando la membrana basal y los componentes de la matriz extracelular tales como colágeno tipo IV, fibronectina y laminina (McLane y cols, 1998). De forma contraria como ocurre con las desintegrinas y las hemorraginas (SVMP's), las ADAM's se caracterizan por encontrarse ancladas a la membrana celular (McLane y cols, 1998).

LAS METALOPROTEASAS - DESINTEGRINAS EN LOS VENENOS DE LAS SERPIENTES

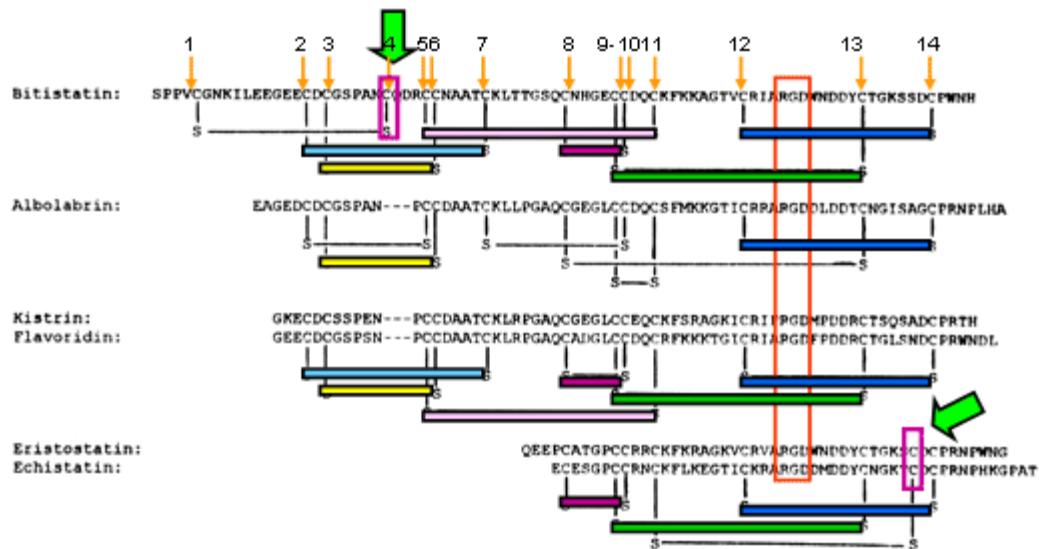
Las Metaloproteasas - Desintegrinas, definen a una familia de proteínas de los venenos de las serpientes que se caracterizan por su gran afinidad de unión (K_d 10-7 ≈ 10-8 M) con las integrinas, activas como inactivas, alterando la función plaquetaria (Huang, 1998). Las metaloproteasas de venenos de serpientes (SVMP's) forman junto con las ADAM's, la subfamilia de las "Reprolisinas" debido a que comparten la misma organización estructural de dominios, aún cuando las ADAM's posean otros dominios ausentes en las SVMP's. A su vez, las reprodilisinas forman parte de la familia de las "Metzincinas", que se caracterizan por ser metaloproteasas dependientes de Zn⁺², junto con las metaloproteasas de matriz, las astacinas y las serralisinas, las cuales presentan dominios de unión de Zn⁺² similares con secuencias consenso idénticas HEXXHXXGXXH y un residuo de "vuelta de metionina" (Gutiérrez, 2000). Se organizan en forma de dominios estructurales según el siguiente orden: a) un dominio propeptido N-terminal, b) un dominio metaloproteasa, el cual digiere colágeno tipo IV, c) un dominio desintegrina con las secuencias Arg-Gly-Asp (RGD) o Lys-Arg-Asp (KGD) y d) un dominio C-terminal rico en cisteína (Wolfsberg y cols, 1995; Huang, 1998; Andrews, 2000). Tales metaloproteasas encontradas en los venenos de serpientes poseen una longitud aproximada de 200 residuos aminoacídicos y un sitio activo de unión a Zn⁺² con dominio

HEXXH (Blobel y cols, 1992, Gutiérrez, 2000). Desde el punto de vista genético, se ha encontrado que las SVMP's se encuentran codificadas por tres clases de cDNA: clase N-I, que codifica para dominios pro y metaloproteasa, clase N-II que codifica para dominios pro y metaloproteasa y tipo desintegrina y, clase N-III, que codifica para dominios pro y metaloproteasa, tipo desintegrina y rico en cisterna localizado adyacentemente al extremo carboxi terminal del dominio tipo desintegrina y la última de clase IV, que presenta un dominio tipo lectina en el extremo carboxi terminal (Wolfsberg y cols, 1995; McLane y cols, 1998; Yamamoto y cols, 1999). Resulta importante acotar que McLane, (1998) y Gutiérrez (2000) se refieren a la clasificación de las diferentes SVMP como de clases P-I, P-II, P-III y P-IV. McLane y cols, (1998), refiere que el dominio desintegrina de las SVMP's, le confiere a estas moléculas la capacidad para unirse al receptor (integrina) de la superficie celular, potenciando de esta manera su capacidad proteolítica. Todos los residuos de cisteína presentes en las SVMP's se encuentran enlazados formando puentes disulfuro (McLane y cols, 1998).



Influencia del Dominio desintegrina sobre la actividad metaloproteasa

Fuente: MacLane y Cols, 1998



Fuente: White y Cols, 2001

Figura 5 y 6: Desintegrinas - Metaloproteasa

Gutiérrez (2000) refiere que las metaloproteasas son producidas como zimógenos, en los cuales el mecanismo de "cysteine-switch" inhibe su actividad enzimática. Los zimógenos serán procesados proteolíticamente para ser activados. Su dominio de unión a Zn²⁺ es tetraédrico, con la secuencia amino acídica referida anteriormente que contiene los tres residuos de histidina y una molécula de agua. Adicionalmente, posee un ión de calcio localizado sobre la superficie de la molécula, del lado opuesto a la ranura del sitio activo, el cual parece ser importante en su conformación estructural. La actividad hemorrágica se encuentra asociada a

su capacidad proteolítica. (Gutiérrez, 2000) también refiere la existencia de metaloproteasas que carecen de actividad hemorrágica y que son aquellas que presentan ambos dominios, desintegrina y metaloproteasa, las que manifiestan mayor actividad hemorrágica que aquellas que solo expresan el dominio metaloproteasa.

Las desintegrinas componen a una familia de inhibidores de la agregación plaquetaria encontradas en los venenos de serpiente, además de poder interactuar con las integrinas presentes en otras células, como fibroblastos y osteoclastos y células de melanoma (Blobel y cols, 1992; McLane y cols, 1998). El término desintegrina fue acuñado para describir a la interrupción resultante de la interacción mediada por las integrinas con la matriz extracelular. Los nombres de las desintegrinas aisladas a partir de los venenos de serpiente son el producto de modificaciones hechas a sus respectivos géneros (Gould y cols, 1990). Inicialmente se definieron como proteínas de bajo peso molecular (49-84 amino ácidos), ricas en residuos de cisteína que contienen un lazo RGD/KGD, que mantenido en una conformación apropiada a través de puentes disulfuro, son capaces de actuar como fuertes inhibidores de la agregación plaquetaria (McLane y cols, 1998). McLane (1998) también refiere que, a través de estudios de resonancia magnética nuclear (RMN), se ha determinado que la secuencia RGD se encuentra en el ápice del lazo móvil, flanqueado por dos hojas β plegadas, el cual sobresale entre 14 y 17 \AA del núcleo proteico. Tal estructura terciaria le confiere una gran capacidad para producir cambios conformacionales que dependen de la exposición del sitio de unión dependiente de ligando en los receptores. Son péptidos cortos, no anclados a la membrana celular (solubles), con gran afinidad a la glicoproteína GPIIb-IIIa, presente en la membrana plaquetaria, capaces de inhibir la interacción entre el fibrinógeno con la superficie de la plaqueta, inhibiendo de esta manera la agregación plaquetaria (Blobel y cols, 1992). Su afinidad por el receptor en cuestión, que es mayor que la del mismo ligando natural, depende del tipo de desintegrina y el estado de activación del receptor. Así por ejemplo, la eristostatina (Eristocophis macmahoni) es capaz de unirse con la misma afinidad a plaquetas tanto activadas como en reposo, sin embargo, la bitistatina (Bitis arietans), la echistatina (Echis carinatus) y la albolabrina (Trimeresurus albolabris) muestran mucha mayor afinidad por las plaquetas activadas por trombina o ADP que por las plaquetas en reposo (McLane y cols, 1998). Gould (1990) propone como sistema de clasificación tres subfamilias de desintegrinas: un primer grupo de desintegrinas cortas, con una longitud de 48 o 49 residuos aminoacídicos, como por ejemplo la echistatina y la eristostatina; un segundo grupo de desintegrinas medias con una longitud de 70 a 73 residuos aminoacídicos, como por ejemplo la tigramina, la albolabrina, la agkistrstatina, la aplagina, la batroxostatina, y un tercer grupo de desintegrinas largas, con una longitud de 83 u 84 residuos aminoacídicos, como las bitistatinas (Gould y cols, 1990; McLane y cols, 1998).

Gould (1990) también refiere que, de manera significativa, las regiones aminoacídicas con mayor variación se encuentran cercanos al dominio RGD y los residuos de cisteína cercanos a la región C- terminal.



Bothriechis schlegelii

Fuente: Juan C. López
Laboratorio de Investigaciones - Facultad de Farmacia
Universidad Central de Venezuela

En los tres subgrupos se observa la presencia de residuos aminoacídicos bien conservados, según el cuadro siguiente:

Residuo	Posición
Cys*	43, 48, 49, 52, 61, 73 y 80
Cys**	17, 19, 25, 29, 30 y 35
Cys***	78
Arg-Gly Asp (RGD)	65 - 67
Gly	46
Phe	54
ASp	70
Pro	81
Cys-Cys (desintegrinas cortas)	4 (8 residuos)
Cys-Cys (desintegrinas medianas)	6 (12 residuos)
Cys-Cys (desintegrinas largas)	7 (14 residuos)

-(*): Posición de residuos de cisteína conservados en las tres subfamilias de desintegrinas.

-(**): Posición de residuos de cisteína conservados en subfamilias corta y media de desintegrinas.

-(***): presente sólo en subfamilia de desintegrinas cortas.

-La numeración se toma con referencia a las posiciones de cada residuo en la desintegrina de mayor longitud, la bistatina 3.

En relación con las desintegrinas cortas, se citan como ejemplos la echistatina y la eristostatina, de naturaleza monomérica, un 62 % de homología en su secuencia aminoacídica e idéntico patrón de puentes disulfuro entre sus ocho residuos de cisteína. Sin embargo, estas desintegrinas muestran diferencias funcionales significativas en sus interacciones con ciertas integrinas. La eristostatina muestra alto grado de especificidad con la integrina α IIb β 3 (GPIIb-IIIa), mientras que las echistatinas es capaz de reconocer a las integrinas α IIb β 3, α V β 3 y α 5 β 1 (McLane y cols, 1998). Tales diferencias funcionales pueden ser el resultado de las diferencias a nivel estructural en el lazo del domino RGD, las cuales se evidencian por la presencia de dos residuos hidrofóbicos de cadena larga (Val25 y Trp30) alrededor del domino RGD en la eristostatina, lo cual hace que el lazo sea de mayor anchura que en la echistatina, con residuos de Arginina y Aspártico en las mismas posiciones (McLane y cols, 1998). Por otro lado, se ha propuesto que el extremo C-terminal de la echistatina posee actividad funcional separada de la del lazo RGD. Así por ejemplo, mientras el lazo RGD determina el reconocimiento selectivo de las integrinas α IIb β 3, α V β 3 y α 5 β 1, el extremo C-terminal es capaz de unirse a integrinas no activadas, siendo esto crucial para la expresión de los epítopes de los sitios de unión dependientes de ligando (LIBS Ligand Induced Binding Sites) y los cambios conformacionales del receptor, conllevando al aumento de la afinidad de unión y efecto de la echistatina (McLane y cols, 1998). De la misma forma, este autor refiere que en el caso de las proteínas echistatina con secuencia ARGDDMP y eristostatina, con secuencia ARGDWNP, si bien son ambas capaces de unirse a la α IIb β 3 con diferentes afinidades, a través de estudio de competitividad, demostraron que lo hacen sobre diferentes sitios en la integrina.

Por su parte, las desintegrinas de tamaño medio comparten una razonable similitud de secuencia aminoacídica con las desintegrinas cortas, sin embargo, el plegamiento del esqueleto peptídico (estructura secundaria) y la estructura tridimensional (estructura terciaria) de la kistrina y la flavoridina son diferentes a las encontradas en las desintegrinas cortas. Por ejemplo, aún cuando siete de los ocho residuos de cisteína se encuentran conservados entre ambos tipos de desintegrinas, existen diferencias significativas sus los patrones de puente disulfuro (McLane y cols, 1998). De la misma manera como ocurre con las desintegrinas de cadena corta, McLane (1998) refiere que en estudios realizados con isoformas de la elegantina (*Trimeresurus elegans*), la secuencia de residuos adyacentes al domino RGD son importantes en la determinación de la selectividad de las integrinas. A través de estudios de competencia por el mismo receptor, McLane (1998) también refiere que la elegantina y la kistrina poseen diferentes sitios de unión sobre α IIb β 3, tal y como se refirió para las desintegrinas de cadena corta.

Finalmente, las desintegrinas de cadena larga, representada por la bitistatina, posee el mayor grado de homología con la secuencia del domino de tipo desintegrina algunas proteínas ADAM's. El lazo RGD de la bitistatina y la eristostatina son casi idénticos, sin embargo la bitistatina resulta ser mucho menos inhibidora de la agregación plaquetaria que la eristostatina (McLane y cols, 1998). A diferencia del resto de la desintegrinas, la bitistatina posee dos residuos de cisteína bien conservados en las posiciones 5 y 24 formando un puente disulfuro. Tal puente disulfuro crea otro lazo adicional al lazo del dominio RGD, pero en posición opuesta o casi paralela a este último. La bitistatina también es capaz de inducir la proliferación de células endoteliales de aorta de bovino, en contraste con las kistrina y la

echistatina, que inhiben tal función, interacción que tal vez ocurra a través de su extremo N-terminal (McLane y cols, 1998).



Bothriechis schlegelii

Fuente: Juan C. López

Laboratorio de Investigaciones - Facultad de Farmacia
Universidad Central de Venezuela

Cortesía Mundo de las Serpientes
Grecia-Costa Rica

Además de estos tres tipos de desintegrinas, clasificados según la longitud de su estructura primaria, también existe otro grupo de desintegrinas en venenos de serpiente: las desintegrinas diméricas, cuyo peso molecular oscila entre 13 y 15 kDa, con pesos moleculares individuales de aproximadamente 7 kDa, pudiendo ser del tipo homo o heterodiméricas (McLane y cols, 1998). Entre algunas de las desintegrinas diméricas se cita la contortrostatina aislada a partir de *Akgistrodon contortrix contortrix* la cual es capaz de inhibir la metástasis en células de melanoma por bloqueo de la integrina $\alpha 5\beta 1$, mientras que las desintegrinas monoméricas son capaces de inhibir la agregación plaquetaria y la fosforilación de residuos de Tyr, se ha demostrado que la contortrostatina es capaz de inducir la fosforilación de residuos de Tyr, aún cuando inhiben la agregación plaquetaria (McLane y cols, 1998). Otros ejemplos citados por McLane y cols, (1998) incluyen a la EMF10, heterodímero (subunidades A y B) aislado a partir del veneno de la serpiente *Eristocophis macmahoni*, con 14,576 kDa y la EC3, aislada a partir del veneno de la serpiente *Echis carinatus*, con un peso molecular de 14,761 kDa. Cuando se hacen estudios reduciendo las subunidades de EC3, estas se caracterizan por presentar un alto grado de homología en sus secuencias aminoacídicas (residuos de Cys) al compararlas con las encontradas en otras desintegrinas. McLane y cols, (1998), refiere que a diferencia de las desintegrinas que presentan el dominio RGD, la EC3 presenta, en sustitución de esta región en su subunidad A, la secuencia VGD, mientras que en la subunidad B, la sustitución se presenta como MLD. Por otro lado, en la subunidad EM10A se presenta el dominio RGD, mientras que la EM10B se encuentra sustituida por la secuencia MGD (McLane y cols, 1998).

Blobel (1992) refiere que en estudios realizados a proteínas aisladas de algunos venenos de serpiente, a través de resonancia magnética nuclear, se ha encontrado como característica más importante la presencia de un lazo (hairpin loop) en el cual se encuentra la secuencia RGD. Las regiones flanqueantes del lazo RGD se encuentran altamente conservadas, pudiendo llegar a ser críticas en su presentación del lazo. La alteración en esta secuencia afecta la afinidad o especificidad por el ligando, así por ejemplo, el cambio de la secuencia RGD por la secuencia KGD, en ciertas proteínas de venenos de serpiente, aumenta la afinidad por la glicoproteína GPIIb-IIIa, pero la inhabilita para unirse al receptor de vitronectina. Al menos, la mitad de los ligandos conocidos para las integrinas carecen del dominio RGD y la presencia de esta secuencia en la mayoría de las desintegrinas aisladas a partir de los venenos de serpiente puede ser el reflejo del diseño experimental utilizado para su identificación, su interacción con GPIIb-IIIa (Blobel y cols, 1992). La configuración espacial del dominio RGD puede depender de las estructuras secundarias y terciarias de la molécula, lo cual está determinado por la formación apropiada de los puentes disulfuro, como lo refiere Gould (1990) al indicar que la alquilación o eliminación de estos lleva a la pérdida total de actividad de la proteína, fenómeno que se correlaciona con la teoría de que la unión de las proteínas adhesivas con las desintegrinas depende de la conformación de la secuencia RGD. Esto lleva a concluir que tanto la configuración espacial establecida por los puentes disulfuro y los tipos de residuos presentes en la región adyacente al dominio RGD contribuyen a la gran capacidad de unión de las desintegrinas a sus ligandos en comparación con la afinidad que presentan péptidos lineales, en relación de nanomoles en contra de micromoles, respectivamente.

Otro aspecto interesante es la referencia que hace Blobel, (1992) acerca de las evidencias que sustentan la hipótesis de que las desintegrinas provienen de proteínas multifuncionales de mayor tamaño. El primer ejemplo de proteína multifuncional con el dominio desintegrina fue obtenida a partir del veneno de serpiente HBR1, aislada del veneno de *Trimeresurus flavoviridis*, la cual consta de 416 aminoácidos y además del dominio desintegrina, también presenta en su región amino terminal un dominio homólogo al de las metaloproteasas encontradas en los venenos de las serpientes y otro dominio, en este caso carboxi terminal rico en cisteína (Blobel y cols, 1992). A través de ensayos de clonación y secuenciación de los genes que codifican para los precursores de ciertas desintegrinas como la kistina (*Calloselama rhodostoma*), la tigramina (*Trimeresurus gramineus*) y la atrolisina (*Crotalus atrox*) han arrojado evidencias, con base en su estructura, de la presencia de una secuencia señal, seguida de una pequeña secuencia de función desconocida, un dominio metaloproteasa y un dominio desintegrina. En los tres ejemplos, el codón de terminación se localiza justo después del dominio desintegrina (Blobel y cols, 1992). Debido a estas evidencias sustentadas por la estructura de los dominios de las proteínas precursoras se ha propuesto que las metaloproteasas y desintegrinas cortas encontradas en los venenos de las serpientes son procesadas proteolíticamente a partir de una proteína precursora de mayor tamaño (Blobel y cols, 1992). Por lo tanto la proteína HBR1, mencionada anteriormente, puede representar un intermediario del procesamiento de la proteína precursora o una proteína que no pudo ser procesada hidrolíticamente, debido tal vez a la carencia del sitio de ruptura apropiado o la proteasa adecuada (Blobel y cols, 1992). Gould (1990) refiere que además de las fracciones anteriormente mencionadas, existen otros productos aislados a partir de los venenos de serpiente que han sido identificados como de bajo peso molecular (5400 " 9000 d), con dominios RGD y rico en residuos de cisteína y capaces de unirse con gran afinidad a las

integrinas de la superficie de las plaquetas y otras células, como por ejemplo la bitistatina 3 (Bitis arietans), la aplagina (Agkistrodon piscivorus piscivorus), la albolabrina y la elegantita, y la flavoridina (Trimeresurus flavoridis).

Con base en ensayos experimentales, Gould (1990) refiere que, sobre bases de comparación molar, las concentraciones de péptidos aislados de venenos de serpiente necesarios para lograr la IC50 de agregación plaquetaria en suspensión de células en plasma rico en plaquetas inducidas por ADP era entre 3000 y 30.000 veces más pequeñas que las requeridas por péptidos que contenían la secuencia RGD. El mismo autor refiere que, después de haber comparado las secuencias de amino ácidos de 14 péptidos aislados de venenos de serpiente, esta secuencia (RGD) es el sitio de reconocimiento de estos péptidos sobre la célula. Sin embargo, la potencia inhibitoria de estas moléculas sobre la interacción integrina ligando es una función, tanto de la conformación de la secuencia del domino RGD como de la secuencia que lo flanquea. Debido a que las secuencias que flanquean al dominio RGD, encontrado en péptidos de pequeño tamaño contribuyen a la especificidad de las integrinas, los residuos no conservados dentro de péptidos derivados de los venenos de serpiente pueden entonces contribuir a la selectividad de integrina.

Andrews (2000) también hace referencia al hecho de que a través de estudios de secuencias primarias de ADNc se ha determinado que esta familia de proteínas deriva de un precursor de mayor tamaño, localizado hacia la región N-terminal, el cual puede corresponder a la familia de las Lectinas Tipo C. De manera interesante, muchas de las proteínas que afectan la función plaquetaria pertenecen a una de las dos familias de proteínas conocidas como familia de las Lectinas Tipo C y la familia de las Metaloproteasas "Desintegrinas. Una de sus características más resaltantes es que proteínas con formas estructuralmente relacionadas pueden presentar efectos opuestos, mientras que proteínas estructuralmente diferentes pueden presentar funciones relacionadas (Andrews, 2000).

McLane (1998), hace referencia a que al detallar la secuencia amino acídica de los lazos tanto de las desintegrinas, hemorraginas y ADAM's, se observan variaciones en la composición de residuos básicos, ácidos e hidrofóbicos manteniéndose conservados los residuos de cisteína. Una desintegrina típica presenta su lazo de 11 aminoácidos flanqueados por dos residuos de cisteína, la mayoría expresa la secuencia RGD, mientras que otras como la EC3A, EC3B, EMF10B y la atrolisina expresan las secuencias KGD, VGD, MLD, MGD y MVD, respectivamente. Los lazos de desintegrina encontrados en ADAM's y en las hemorraginas presentan un residuo de cisteína insertado adyacente el extremo C-terminal de la secuencia RGD. Son estas diferencias las que hacen que las diferentes desintegrinas muestren diferentes afinidades por diferentes receptores adhesivos, lo que determina la selectividad de tales proteínas.

EFFECTOS DE LAS DESINTEGRINAS

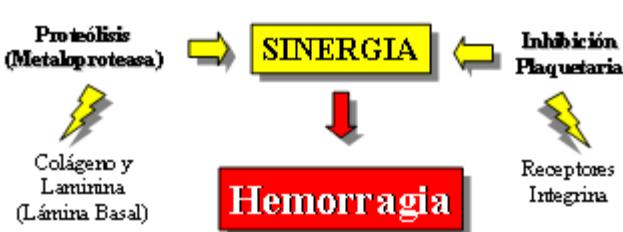
Efectos de las desintegrinas de los venenos de las serpientes sobre la agregación plaquetaria

El sangrado es una de las manifestaciones más agresivas encontradas en víctimas de un accidente por serpientes de la familia Viperidae. Este efecto hemorrágico puede estar siendo causado por la proteólisis del colágeno y la laminina, componentes de la lámina basal de la

microvasculatura. En estos pacientes, las proteínas ADAM pueden ser las responsables de promover un efecto sinergístico, ocurriendo la degradación de la membrana basal de los capilares por la región metaloproteasa y la inhibición de la función plaquetaria debida a la acción de las desintegrinas (Wolfsberg y cols, 1995, Huang, 1998).

- **SVMP's - Significado en Hemorragia:**

- Inhiben formación de tapón hemostático.
 - Hidrólisis de membrana basal y matriz extracelular.
 - Dominio desintegrina fija la proteína a receptor.
 - Dominio Metaloproteasa destruye proteínas de matriz.
 - » Inhibe adhesión de plaqueta ⇒ HEMORRAGIA.



Fuentes: MacLane y Cols, 1999

Figura 7: Desintegrinas Metaloproteasas

Dentro de los sistemas de trombosis y hemostasia, la activación de la GPIIb-IIIa (integrina ?IIb? 3) se produce a través de un sistema de señalización intracelular activado por la unión del vWF subendotelial al complejo de la GPIb-IX-V sobre la superficie plaquetaria, de forma tal que la activación de GPIIb-IIIa permite su unión al fibrinógeno o al vWF mediando de esta forma la agregación plaquetaria (Andrews, 2000). Por esta razón, las proteínas de venenos de serpiente con dominio RGD son capaces de afectar la función plaquetaria, siendo capaces de mimetizar los ligandos naturales de los receptores en la plaqueta, induciendo su activación o por el contrario sirviendo como inhibidores, evitando que estos ligandos naturales se unan a su receptor. Andrews, (2000), refiere la existencia de ciertas proteínas (Jararhagina-C de Bothrops jararaca y Atrolisina de Crotalus atrox) que a pesar de actuar como si fuesen desintegrinas (desintegrin-like) carecen de la secuencia típica RGD, inhibiendo la agregación plaquetaria dependiente de GPIIb-IIIa.

Existen venenos de serpiente pertenecientes a esta familia capaz de inducir la activación del vWF. Por ejemplo, la Botrocetina de una sola cadena aislada a partir del veneno de la serpiente Bothrops jararaca (Viperidae - Crotalinae), la cual posee un peso de aproximadamente 30 kDa reducida y no reducida, compuesta únicamente por los dominios desintegrina en su extremo N-terminal y el rico en cisteína C-terminal. Esta proteína también se caracteriza por la ausencia de la secuencia RGD en su dominio desintegrina (Andrews, 2000). Además de la Jararhagina-C de Bothrops jararaca, existen otras formas caracterizadas, una por la presencia de los dominios bcd llamada Jararhagina y la otra, la Jaracetina compuesta por dos dominios cd, [cd]2, unidas a través de un puente disulfuro entre los dominios (c). Estas proteínas activan al vWF uniéndose en su dominio de unión de integrina

A1, induciendo su unión a la GPIb-IX-V (Andrews, 2000).

Además del efecto activador sobre el vWF, existen proteínas de esta familia capaces de romper a la GPIb-IX-V y al vWF. A partir de la descripción hecha de las desintegrinas mencionadas en los ejemplos anteriores, se puede deducir que el efecto proteolítico se encuentra ausente en la jaracetina y la botrocetina de una cadena, como parte de sus mecanismos de acción, debido a la ausencia del domino (b) correspondiente a la región metaloproteasa. Este no es el caso de las fracciones correspondientes a esta familia, derivadas de los venenos de cobras (Elapidae), las cuales inhiben la función plaquetaria al evitar la unión del vWF al GPIb-IX-V, debido a la proteólisis dependiente del catión divalente de cualquiera de los elementos involucrados, el ligando o el receptor (Andrews, 2000). Así por ejemplo, el autor refiere a la Mocarhagina, aislada a partir del veneno de la serpiente Naja mocambique mocambique (Elapidae), con un peso de aproximadamente 55 kDa, la cual bloquea la agregación plaquetaria dependiente de vWF al romper a GPIb⁺, dominio de unión del factor (Andrews, 2000). Otro ejemplo de la actividad metaloproteasa de esta familia de proteínas es la Kaouthiagina, aislada del veneno de la serpiente Naja kaouthia (Elapidae), la cual también afecta la agregación dependiente del vWF, pero esta vez por manifestar su efecto proteolítico sobre el dominio A1 del vWF, del cual depende la unión con GPIb-IX-V (Andrews, 2000).

Finalmente, (Huang, 1998; Andrews, 2000), refieren otro efecto mediado por las metaloproteasa - desintegrina a través del bloqueo de la activación inducida por el colágeno y su receptor, la integrina $\alpha 2\beta 1$ (GPIa-IIa). De esta manera, tanto la Jararhagina (bcd⁺) y la Jaracetina [cd]2 inhiben la adhesión plaquetaria dependiente del colágeno mediada por la integrina $\alpha 2\beta 1$ actuando sobre el receptor, mientras que la Catrocollastatina, aislada a partir del veneno de *Crotalus atrox* (Viperidae - Crotalinae) inhibe la función plaquetaria dependiente del colágeno a través de un mecanismo que involucra la interacción de este con su dominio tipo desintegrina.

"

REFERENCIAS

1. **Andrews, R.; Berndt, M.** "Snake Venom Modulators of Platelet Adhesion Receptors and their Ligands" *Toxicon*, Vol. 38, pp.775-791, 2000.
2. **Boquet, P.** "History of Snake Venom Research", Chapter 1, pp.3-14 en Lee Chen-Yuan "Snake Venoms", *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 52, Editorial Board G.V.R Born, Cambridge A.;Farah, Rensslelear, NY H.; Herken, Berlin; A. D. Welch, Memphis, TN. 1992.
3. **Blobel, C.; White, J.** "Strucutre, Function and Evolutionary Relationship of Proteins containing a Disintegrin Domain" *Current Opinion in Cell Biology* Vol.4, pp.760-765, 1992.
4. **Clissa, P.; Laing, G.; Theakston, R.; Mota, I.; Moura-da Silva, A.** "The effect of jararhagin, a metaloproteinase from Bothrops jararaca venom, on proinflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells" *Toxicon*, Vol. 39, No.10, pp. 1567-1573, 2001.
5. **Dzamba, B.; Bolton M.; Desimone, D.** "The Integrin family of Cell Adhesion Molecules" Chapter 4, pp. 100-154 en Beckerle, M. *Frontiers in Molecular Biology, Cell Adhesion*, oxford university Press, 2001.

6. Fujimura, Y.; Ikeda, Y.; Miura, S.; Yoshida, E.; Shima, H.; Nishida, M.; Suzuki, M.; Titán, K.; Taniuchi, Y.; Kawasaki, T. "Isolation and Characterization of jararaca GPIb-BP, a snake venom Antagonist specific to platelet Glycoprotein Ib" *Trombosis and Haemostasis*, Vol. 74, No.2, pp 743-750, 1995.
7. Fuly, A.; machado, O.; Alves, E.; Carlini, C. "Mechanism od inhibitory Action on Platelet Activation of a Phospholipase A2 Isolated form Lachesis muta (Bushmaster) snake venom" *Trombosis and Haemostasis*, Vol. 78, pp.1372-1380, 1997.
8. Gould, R.; Polokoff, M.; Friedman, P.; Huang, T.; Holt, J.; Cook, J.; Niewiarowski "Disintegrins: A Family of Integrin Inhibitory Proteins form Viper Venoms" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Vol. 195, No.2, Nov., pp.168-171, 1990.
9. Gutiérrez, J., M.; Rucavado, A. "Snake Venom Metalloproteases: Their Role in the Pathogenesis of Local Tissue Damage" *Biochimie*, Vol. 82, pp.841-850, 2000.
10. Huang, T. "What Snake Venoms Taught us about Integrins" *Cell. Mol. Life. Sci.* Vol. 54, pp.527-540, 1998.
11. Kini, M., Evans, H. "Effects of snake venom proteins on Blood platelet" *Toxicon*, Vol. 28, No.12, pp.1387-1422, 1990.
12. Marsh, N. A. "Use of snake venom fractions in the coagulation laboratory" *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, Vol.9, pp. 395-404, 1998.
13. McLane, M.; Marcinkiewicz, C.; Vijay-Kumar, S.; Wierzbicka-Patynowski, I.; Niewirowski, S. "Viper Venoms Disintegrins and Related Molecules" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Vol. 219, No.2, Nov., pp.109-119, 1998.
14. Scarborough, R.; Rose, J.; Naughton, M.; Phillips, D.; Nannizzi, N.; Arften, A.; Campbell, A.; Charon, I. "Characterization of the Integrin Specificities of Desintegrinas Isolated from American Pit Viper Venoms" *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 268, No.2, Issue of January 15, pp.1058-1065, 1993.
15. Tang, B.; Hong, W. "ADAMTS: A novel family of Proteases with an ADAM Protease Domain and Thrombospondin 1 Repeats" *FEBS Letters*, Vol. 445, pp.223-225, 1999.
16. Tang, B. "ADAMTS. A novel Family of Extracellular Matrix Proteases" *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol. 33, pp.33-44, 2001.
17. Wolfsberg, T.; Primakoff, P.; Myles, D.; White, J. "ADAM, a Novel Family of Membrane Proteins Containing A Disintegrin And Metallorprotease Domain: Multipotential Functions in Cell - Cell and Cell - Matrix Interactions." *The Journal of Cell Biology*, Vol. 131, pp.275-278, 1995.
18. Yamamoto, S.; Higuchi, Y.; Yoshiyama, K.; Shimizu, E.; Kataoka, M.; Hijiya, N.; Matsuura, K. "ADAM family proteins in the immune System" *Immunology Today* Vol. 20, No.6, pp.278-284, 1999.