

METALOPROTEINASAS DEPENDIENTES DE ZINC: PROTAGONISTAS CENTRALES EN LA FISIOPATOLOGÍA DE ENVENAMIENTOS POR SERPIENTES DE LA FAMILIA VIPERIDAE

José María Gutiérrez*, Teresa Escalante, Alexandra Rucavado

Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología,
Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica
e-mail: jose.gutierrez@ucr.ac.cr

RESUMEN

Se presenta y discute el papel que juegan las metaloproteinasas de los venenos de serpientes (SVMPs) de la familia Viperidae en la fisiopatología de los envenenamientos inducidos por mordeduras de estos reptiles. Se hace especial énfasis en los mecanismos mediante los cuales estas enzimas inducen hemorragia. Así mismo, se discuten otros efectos que resultan de la acción de estas enzimas, tales como la necrosis muscular, la formación de ampollas y flictenas, y la coagulopatía. Finalmente, se analiza el rol que juegan las SVMPs en la deficiente regeneración de tejido muscular que caracteriza estos envenenamientos.

PALABRAS CLAVE: serpientes; venenos; metaloproteinasas; hemorragia, daño tisular.

ABSTRACT

The role played by snake venom metalloproteinases (SVMPs) in the pathophysiology of envenomings induced by snakes of the family Viperidae is discussed. The mechanisms involved in the ability of these enzymes to generate hemorrhage are presented, together with an analysis of other pathological effects induced by SVMPs, such as myonecrosis, blistering and coagulopathy. Finally, the role played by these enzymes in the poor skeletal muscle regeneration characteristic of viperid snakebite envenomings is analyzed.

KEY WORDS: Snakes; venoms; metalloproteinases; hemorrhage; tissue damage.

INTRODUCCIÓN

Los venenos de serpientes constituyen secreciones de enorme complejidad bioquímica, con una alta concentración de proteínas, muchas de las cuales presentan efectos tóxicos que les permiten a las serpientes inmovilizar a sus presas y, en algunos casos, efectuar una predigestión de las mismas. Los estudios proteómicos de venenos de serpientes han revelado la existencia de una gran cantidad de proteínas, las cuales sin embargo se pueden clasificar en un número limitado de familias (Calvete, 2011). Los venenos de serpientes de la familia Viperidae presentan, en general, una alta concentración de metalloproteinases dependientes de zinc (en inglés 'snake venom metalloproteinases', SVMPS). Estas SVMPS pertenecen a la familia M12 de las metalloproteinases, junto con las ADAMs ('a disintegrin and metalloproteinase'), con las cuales forman la subfamilia de las 'reprolisinas' (Fox y Serrano, 2005), las cuales a su vez forman parte de las 'metzincinas', junto con las astacinas, seralisinas y metalloproteinases de matriz. Las metzincinas se caracterizan por presentar una secuencia consenso en el sitio catalítico (HExxHxxGxxH) y luego una región conteniendo un residuo de metionina ('Mettur').

Las SVMPS juegan un papel central en las dos funciones principales de los venenos, esto es, en la inmovilización y muerte de las presas y en la predigestión (Gutiérrez et al., 2010). Además de su actividad digestiva, las SVMPS ejercen una serie de efectos tóxicos relevantes, entre los que destacan su actividad hemorrágica, su capacidad para generar necrosis como consecuencia de la isquemia, su actividad procoagulante, la inhibición de la agregación plaquetaria y la degradación de la matriz extracelular, entre otros efectos (Gutiérrez et al., 2010). Dada la relevancia de estas enzimas en los venenos de vipéridos, diversos grupos han avanzado en la caracterización molecular de estas proteinases y en la comprensión de los mecanismos mediante los cuales provocan alteraciones fisiopatológicas y patológicas. El presente trabajo resume algunos de estos hallazgos.

ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DE LAS SVMPs

Las SVMPs difieren notoriamente en sus masas moleculares, las cuales van desde 22 kDa hasta más de 70 kDa (Fox y Serrano, 2005). Esta heterogeneidad se debe a las variaciones en la composición de dominios de estas enzimas. Todas las SVMPs presentan, en su proteína madura, un dominio metaloproteinasa, el cual contiene la secuencia de unión a zinc y el bucle donde se encuentra la metionina. Las SVMPs que presentan únicamente este dominio se clasifican en la clase PI. Algunas SVMPs presentan, además del dominio metaloproteinasa, un dominio disintegrina, constituyendo la clase PII. En muchos casos este dominio disintegrina es liberado como consecuencia de la acción proteolítica, aunque unas pocas SVMPs presentan los dos dominios en la proteína madura (Fox y Serrano, 2005). Las SVMPs clasificadas en la clase PIII contienen, además del dominio metaloproteinasa, un dominio tipo-disintegrina y un dominio rico en cisteína. Dentro de esta clase PIII hay algunas enzimas que presenten una subunidad adicional, una proteína tipo lectina tipo C, unida a la cadena con tres dominios mediante puentes disulfuro. Dentro de las clases PII y PIII existen varias subclases dependiendo de si se trata de proteínas diméricas o con base en otras características (Fox y Serrano, 2005). Se conoce la estructura 3D de una serie de SVMP de la clase PI y de algunas SVMPs de la clase PIII, las cuales se disponen en forma de C, con el dominio rico en cisteína ubicado cerca del dominio catalítico (Escalante et al., 2011b). Se ha propuesto que la evolución molecular de las SVMPs se basa en el 'reclutamiento' ancestral de un gen que codifica para una ADAM, seguido de un proceso evolutivo molecular basado en pérdida de dominios, evolución acelerada y neofuncionalización de los dominios remanentes (Casewell et al., 2011). SVMPs de la clase PIII han sido aisladas de venenos de serpientes de las familias Viperidae, Elapidae, Atractaspididae y Colubridae (sensu lato), en tanto SVMPs de las clases PII y PI solamente se han descrito en venenos de la familia Viperidae (Gutiérrez et al., 2010).

ACTIVIDADES TÓXICAS DE LAS SVMPS

La actividad tóxica más estudiada de las SVMPs es su capacidad para inducir hemorragia, tanto a nivel local como sistémico. Este efecto acarrea consecuencias fisiopatológicas variadas y complejas, ya que contribuye a la patología local del envenenamiento, asociada con la destrucción de tejido, que lleva frecuentemente a secuelas permanentes, y con alteraciones hemodinámicas severas que pueden culminar en un choque cardiovascular (Gutiérrez et al., 2005). Pero además, las SVMPs son capaces de inducir necrosis muscular, probablemente como consecuencia de la isquemia resultante de la destrucción microvascular (Gutiérrez et al., 1995). Además, inducen formación de flictenas (Jiménez et al., 2008) y contribuyen con las coagulopatías características de envenenamientos por vipéridos, ya que hay SVMPs que activan el factor X de la coagulación y la protrombina, generando la formación de microtrombos, con la consecuente desfibrinogenación y alteración de las pruebas de coagulación (Gutiérrez et al., 2010). Algunas SVMPs de la clase PIII son capaces de inhibir la agregación plaquetaria inducida por el colágeno y otros agonistas (Kamiguti, 2005). Por otra parte, las SVMPs contribuyen con la inflamación característica de la acción de estos venenos (Teixeira et al., 2005).

MECANISMO DE ACCIÓN DE SVMPS HEMORRÁGICAS

Los estudios ultraestructurales han demostrado que las SVMPs hemorrágicas provocan lesiones drásticas en los vasos capilares muy rápidamente después de la inyección en animales de laboratorio (Gutiérrez et al., 2005). Los capilares afectados presentan evidentes alteraciones tanto en las células endoteliales como en la membrana basal (MB). En el caso de las células endoteliales, estas disminuyen el número de vesículas pinocitóticas, se distienden y adelgazan y, eventualmente, se rompen (Gutiérrez et al., 2005, 2006). La estructura de la MB se altera, con pérdida de su integridad y de su continuidad. Cuando se analiza este efecto mediante inmunohistoquímica, con anticuerpos contra los componentes de la MB, se observa una clara pérdida de tinción para

laminina, nidogen y colágeno tipo IV (Escalante et al., 2006). No obstante el conspicuo efecto patológico observado en las células endoteliales de los vasos capilares in vivo, cuando líneas de endotelio son expuestas in vitro a SVMPs hemorrágicas, no ocurre efecto citotóxico agudo equivalente a lo que se observa in vivo. Lo que se observa es un despegue de las células de su sustrato, seguido, varias horas después, por muerte celular apoptótica (Díaz et al., 2005).

La discrepancia descrita entre las observaciones in vivo e in vitro se pueden explicar mediante una hipótesis que plantea que la hemorragia inducida por las SVMPs ocurre en dos pasos: inicialmente las enzimas actúan sobre sustratos ubicados en la MB, resultando en un debilitamiento de la estabilidad mecánica que dicha MB provee a la estructura de los vasos capilares. Como consecuencia de dicho debilitamiento, in vivo, se desencadena el segundo paso del proceso: las fuerzas biofísicas que normalmente operan en la vasculatura (presión hidrostática y fuerzas de cizalla o shear stress) provocan una distensión en el capilar debilitado, lo cual lleva eventualmente a la ruptura de la célula endotelial y la consecuente extravasación (Gutiérrez et al., 2005, 2006, 2010). Al no operar estas fuerzas biofísicas in vitro, esto explica la ausencia de patología directa sobre el endotelio en cultivo celular.

En el contexto de esta hipótesis, es interesante preguntarse por qué algunas SVMPs son hemorrágicas y otras no, tomando en cuenta que todas son generalmente capaces de hidrolizar proteínas de la MB. Una posible respuesta a esta incógnita fue presentada por Escalante et al. (2011a y 2011b). Cuando se estudiaron los patrones de degradación in vitro e in vivo sobre proteínas de la MB como consecuencia de la acción de una SVMP hemorrágica y una no hemorrágica se observó que, aunque ambas hidrolizaban de manera similar la laminina y el nidogen, la SVMP hemorrágica fue mucho más efectiva en la hidrólisis del colágeno tipo IV y del proteoglicano perlecan (Escalante et al., 2011a). Estas observaciones se relacionan con el hecho de que precisamente el colágeno tipo IV y el perlecan juegan un papel central en la estabili-

dad mecánica de los vasos capilares. Por ende, una hidrólisis de estos componentes redundaría en un debilitamiento mecánico de la MB en particular y de la pared vascular en general, lo cual encaja muy bien con la hipótesis de los dos pasos para explicar el mecanismo de acción de las SVMs hemorrágicas.

La base estructural de la diferente capacidad de SVMs de la clase PI para inducir hemorragia no se conoce a cabalidad. No obstante, Wallnoefer et al. (2010), al comparar mediante simulaciones dinámicas SVMs hemorrágicas y no hemorrágicas, observaron que existen diferencias en la dinámica molecular de un bucle localizado en la vecindad del sitio activo de estas enzimas. Las SVMs hemorrágicas presentan más flexibilidad en una parte de ese bucle, en tanto las no hemorrágicas la presentan en otra región.

¿POR QUÉ LAS SVMs DE LA CLASE PIII SON MÁS HEMORRÁGICAS QUE LAS DE LA CLASE PI?

Consistentemente se ha observado que las SVMs hemorrágicas de la clase PIII son mucho más activas en su capacidad de inducir hemorragia que las de la clase PI. Dado que las primeras tienen una estructura multidominio, se ha planteado que los dominios adicionales (tipo disintegrina y rico en cisteína) son responsables de dicho fenómeno. Estos dominios poseen exositos que les permiten a las SVMs PIII ligarse a blancos celulares y de la matrix extracelular que las ubican en sitios estratégicos para lesionar la microvasculatura, en la vecindad de la MB o de las células endoteliales. Al carecer de esos exositos, por tener únicamente un dominio metaloproteínasa, las SVMs de la clase PI tienen una acción más promiscua y menos dirigida a blancos estratégicos para generar lesión microvascular (Gutiérrez et al., 2005). Por otra parte las SVMs PIII son resistentes a la acción inhibitoria de la α 2-macroglobulina, una proteína plasmática de alta masa molecular que inhibe diversos tipos de proteinasas; por el contrario, las SVMs de la clase PI son inhibidas por la α 2-macroglobulina (Baramova et al., 1990; Gutiérrez et al., 2005). La razón por la cual las SVMs PIII resisten la in-

hibición por esta proteína plasmática no se conoce a cabalidad; se ha planteado que la misma se basa en un impedimento estructural generado por los dominios adicionales tipo disintegrina y rico en cisteína. La ausencia de inhibición por la $\alpha 2$ -macroglobulina explicaría por qué las SVMPs PIII son capaces de inducir hemorragia sistémica, en tanto las PI generan fundamentalmente hemorragia local, ya que al ingresar a la circulación son inhibidas por esta proteína plasmática. Finalmente, podría ser que la mayor actividad hemorrágica de las SVMPs PIII se relacione con su capacidad para inhibir la agregación plaquetaria, contribuyendo así al sangrado generado por la hidrólisis de las proteínas de la MB (Gutiérrez et al., 2005; Kamiguti, 2005).

LA ACCIÓN DE LAS SVMPs EN LA PIEL

Uno de los efectos patológicos que se observa con frecuencia en pacientes envenenados por serpientes de la familia Viperidae es la formación de ampollas o flictenas en la región donde es inyectado el veneno. Los estudios experimentales han mostrado que este efecto es reproducido en ratones mediante inyección con SVMPs purificadas (Jiménez et al., 2008). Se ha postulado que esta lesión es consecuencia de la degradación proteolítica de componentes de la MB que forma la interfase entre la epidermis y la dermis, lo cual ha sido evidenciado mediante inmunohistoquímica (Jiménez et al., 2008; Escalante et al., 2009). El análisis del exudado colectado a nivel subcutáneo en ratones inyectados con una SVMP mostró la presencia de diversas proteínas de la matriz extracelular, así como de queratinas (Escalante et al., 2009, 2011a).

LAS SVMPs Y EL PROBLEMA DE LA DEFICIENTE REGENERACIÓN DEL TEJIDO MUSCULAR

Los envenenamientos por mordeduras de serpientes de la familia Viperidae se caracterizan por una severa necrosis muscular local. En muchos pacientes, esta necrosis no es seguida por un proceso adecuado de regeneración muscular, por lo que se generan secuelas permanentes asociadas a pérdida de masa y función muscular, con un alto impacto en la calidad de vida de

estas personas. Las razones por las cuales está afectado el proceso de regeneración muscular se ha investigado a nivel experimental. Se ha observado que, cuando se inyectan toxinas que inducen mionecrosis, pero que no afectan la microvasculatura, la regeneración se desarrolla de manera exitosa (Hernández et al., 2011). Sin embargo, cuando los ratones son inyectados con una mezcla de miotoxinas y SVMPs hemorrágicas, o cuando se inyecta veneno total, la regeneración es deficiente (Hernández et al., 2011). Dado que el proceso de regeneración muscular depende de una adecuada perfusión sanguínea al tejido en regeneración, se ha postulado que la destrucción de la microvasculatura por las SVMPs hemorrágicas afecta drásticamente la regeneración (Hernández et al., 2011). Además, es probable que las SVMPs también afecten las fibras nerviosas de los nervios periféricos que llegan al músculo, contribuyendo de esta manera en la inadecuada regeneración (Hernández et al., 2011).

CONCLUSIONES

Las SVMPs juegan un papel clave en la fisiopatología de los envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae, al contribuir de manera directa con la patología local y sistémica de dichos envenenamientos. Pese a que se ha avanzado de manera significativa en la comprensión de la estructura y mecanismo de acción de las SVMPs, aún permanecen muchas incógnitas relacionadas con los determinantes estructurales de la toxicidad y con los mecanismos mediante los cuales estas enzimas generan lesión tisular e inflamación. Así mismo, desde la perspectiva terapéutica, es muy importante descubrir y desarrollar inhibidores de estas enzimas, los cuales puedan ser utilizados como complemento a los antivenenos en el tratamiento de los envenenamientos por mordeduras de serpientes.

AGRADECIMIENTOS

Algunos de los estudios discutidos en este trabajo han sido financiados por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, por la red NeTropica y por el Wellcome Trust.

BIBLIOGRAFÍA

- Baramova, E.N., Shannon, J.D., Bjarnason, J.B., Gonias, S.L., Fox, J.W., 1990. Interaction of hemorrhagic metalloproteinases with human α 2-macroglobulin. *Biochemistry* 29, 1069-1074.
- Calvete, J.J., 2011. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert Rev. Proteomics* 8, 739-758.
- Casewell, N.R., Wagstaff, S.C., Harrison, R.A., Renjifo, C., Wüster, W., 2011. Domain loss facilitates accelerated evolution and neofunctionalization of duplicate snake venom metalloproteinase toxin genes. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2637-2649.
- Díaz, C., Valverde, L., Brenes, O., Rucavado, A., Gutiérrez, J.M., 2005. Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells. *J. Cell. Biochem.* 94, 520-528.
- Escalante, T., Ortiz, N., Rucavado, A., Sanchez, E.F., Richardson M., Fox, J.W., Gutiérrez, J.M., 2011a. Role of collagen and perlecan in microvascular stability: Exploring the mechanism of capillary vessel damage by snake venom metalloproteinases. *PLoS ONE* 6, e28017.
- Escalante, T., Rucavado, A., Fox, J.W., Gutiérrez, J.M., 2011b. Key events in microvascular damage induced by snake venom metalloproteinases. *J. Proteomics* 74, 1781-1794.
- Escalante, T., Rucavado, A., Pinto, A.F.M., Terra, R.M.S., Gutiérrez, J.M., Fox, J.W., 2009. Wound exudate as a proteomic window to reveal different mechanisms of tissue damage by snake venom toxins. *J. Proteome Res.* 8, 5120-5131.
- Escalante, T., Shannon, J.D., Moura-da-Silva, A.M., Gutiérrez, J.M., Fox, J.W., 2006. Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: A biochemical and immunohistochemical study. *Arch. Biochem. Biophys.* 455, 144-153.
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicol* 45, 969-985.

- Gutiérrez, J.M., Núñez, J., Escalante, T., Rucavado, A., 2006. Blood flow is required for rapid endothelial cell damage by a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. *Microvasc. Res.* 71, 55-63.
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., 2010. Snake venom metalloproteinases. Biological roles and participation in the pathophysiology of envenomation. In: Mackessy, S.P. (Ed.), *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. CRC Press, Boca Raton, pp. 115-138.
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Díaz, C., 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45, 997-1011.
- Jiménez, N., Escalante, T., Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., 2008. Skin pathology induced by snake venom metalloproteinase: Acute damage, revascularization and re-epithelization in a mouse ear model. *J. Invest. Dermatol.* 128, 2421-2428.
- Kamiguti, A.S., 2005. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 45, 1041-1049.
- Teixeira, C.F.P., Fernandes, C.M., Zuliani, J.P., Zamuner, S.F., 2005. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Memorias Inst. Oswaldo Cruz* 100 (Suppl. 1), 181-184.
- Wallnoefer, H.G., Lingott, T., Gutiérrez, J.M., Merfort, I., Liedl, K.R., 2010. Backbone flexibility controls the activity and specificity of a protein-protein interface: Specificity in snake venom metalloproteases. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 10330-10337.