

Universidad de Costa Rica
Facultad de Microbiología

**Estudio del efecto trombocitopénico inducido por el
veneno de *Bothrops asper***

Trabajo final de graduación para optar por el grado de licenciatura
en Microbiología y Química Clínica.

Mónica Soto Morera.

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

San José , Costa Rica

2002

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a mis padres por ser los pilares de mi vida.

De manera muy especial a la Dra. Alexandra Rucavado Romero; quien me ofreció toda su confianza para seguir adelante, su sabiduría para realizar la investigación y su valiosa amistad.

Al Dr. José María Gutiérrez y a la Dra. Teresa Escalante por la guía académica brindada y sus consejos oportunos.


A todo el personal del Instituto Clodomiro Picado, que de una u otra forma me ofrecieron todo el apoyo y las facilidades para llevar a cabo este trabajo.

A mi familia por su paciencia incondicional.

A mis amigos por la amistad incondicional que me ofrecen todos los días.

Informe Final de Práctica Dirigida de Graduación presentado a la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el Título de Licenciada en Microbiología y Química Clínica y grado profesional de Doctora en Microbiología y Química Clínica.

El Tribunal Examinador estuvo integrado por los siguientes miembros:


Dra. Elizabeth Abrahams Sandi
Presidenta


Dra. Alexandra Rucavado Romero


Dr. José María Gutiérrez Gutiérrez


Dra. Teresa Escalante Muñoz


Dra. Lilliana Reyes Izano

ÍNDICE.

	Página
Portada	i
Agradecimientos	ii
Tribunal examinador del informe final	iii
Índice	iv
Resumen	vi
CAPÍTULO I	INTRODUCCIÓN
	1
CAPÍTULO II	ANTECEDENTES
	4
2.1	Metaloproteinasas hemorrágicas
	4
2.2	Lectinas tipo-C
	6
CAPÍTULO III	MATERIALES Y MÉTODOS
	8
3.1	Venenos e inhibidor
	8
3.2	Aislamiento de la aspercetina y BaP1
	9
3.3	Producción de anticuerpos anti-aspercetina
	9
3.4	Determinación de la dosis trombocitopénica 50% del veneno de <i>Bothrops asper</i> Pacífico (P)
	11
3.5	Estudio del papel de la aspercetina y las metaloproteinasas en el efecto trombocitopénico inducido por <i>B. asper</i> (P)
	12
3.6	Estudio del posible papel de la aspercetina elemento potenciador del efecto hemorrágico producido por BaP1
	14
3.7	Detección de la presencia de moléculas antigénicamente similares a la aspercetina en otros venenos de la familia Viperidae
	14
3.8	Análisis estadístico
	16
CAPÍTULO IV	RESULTADOS
	17
4.1	Producción de anticuerpos anti-aspercetina
	17
4.2	Determinación de la dosis trombocitopénica

	50% (DT 50%) del veneno de <i>B. asper</i> (P)	19
4.3	Estudio del papel de la aspercetina y de las metaloproteinasas en el efecto trombocitopénico inducido por el veneno de <i>B. asper</i> (P)	19
4.3.1	Inhibición por medio del batimastat de la actividad trombocitopénica inducida por las metaloproteinasas del veneno de <i>B. asper</i> (P)	19
4.3.2	Neutralización utilizando anticuerpos anti-aspercetina de la actividad trombocitopénica inducida por la aspercetina del veneno de <i>B. asper</i> (P)	20
4.3.3	Inhibición conjunta del batimastat y anticuerpos anti-aspercetina del efecto trombocitopénico inducido por las metaloproteinasas y la aspercetina del veneno de <i>B. asper</i> (P)	20
4.4	Estudio del posible papel de la aspercetina como elemento potenciador del efecto hemorrágico inducido por BaP1	24
4.5	Detección de la presencia de moléculas antigénicamente similares a la aspercetina en otros venenos de serpientes de la familia Viperidae	24
CAPÍTULO V	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	28
	REFERENCIAS	32

RESUMEN

En esta investigación se determinó la capacidad de la aspercetina y de las metaloproteinasas, dos toxinas aisladas del veneno de *Bothrops asper*, de inducir un efecto trombocitopénico. Para esto se utilizaron mezclas complejas, las cuales fueron inyectadas por vía intravenosa en diferentes grupos de ratones de la cepa CD1 con un peso de 18-22 gramos. Una hora después de la inyección los animales se sangraron del plexo retroorbital y se realizó el recuento de plaquetas circulantes/ μL en sangre por medio del método de Rees-Ecker. Como primer paso se determinó la inhibición de la actividad trombocitopenica de la aspercetina utilizando anticuerpos anti-aspercetina, lográndose una inhibición de un 14%. Posteriormente, se evaluó el papel de las metaloproteinasas en el efecto trombocitopénico, para esto se utilizó el batimastat, un inhibidor sintético de las metaloproteinasas, obteniéndose de esta forma una inhibición de la actividad trombocitopénica de un 38%. Luego se estudió la acción conjunta de ambas toxinas, utilizando al mismo tiempo batimastat y anticuerpos anti-aspercetina, se observó una inhibición del efecto de un 33%. No obstante el grado de inhibición de la actividad trombocitopenica esperado era mayor al que se obtuvo, esto se puede deber a: a) la variabilidad fisiológica del número de las plaquetas entre los animales de experimentación, que se refleja en el error del método, b) que el batimastat inhibiendo a las moléculas tipo aspercetina. Se observó que la acción trombocitopenica inducida por el veneno de *B. asper* no se inhibe completamente con los anticuerpos anti-aspercetina y con el batimastat, lo que indica que existen otras toxinas que inducen un efecto trombocitopénico. Se determinó la acción potenciadora de la aspercetina en el efecto hemorrágico inducido por la BaP1, una metaloproteinasa aislada del veneno de

B. asper, utilizando un grupo de ratones de la cepa CD1 de 18-22 gramos, a los cuales se les inyectó por vía intravenosa una solución de aspercetina y dos horas después por vía intradérmica una dosis de la BaP1, los animales se sacrificaron y se determinó el efecto hemorrágico siguiendo la metodología descrita por Kondo *et al.*, (1960) modificado por Gutiérrez *et al.*, (1985), obteniéndose que la aspercetina es capaz de potenciar la acción hemorrágica producida por las metaloproteinasas. Por último, se determinó la presencia de moléculas antigénicamente similares a la aspercetina en diferentes venenos de serpientes de la familia Viperidae que se encuentran en nuestro país utilizando Western blotting, observándose múltiples bandas de reacción en la mayoría de ellos, esto apoya la observación clínica frecuente de cuadros trombocitopénicos que se presenta en los pacientes que sufren un accidente ofídico.

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN

Según la OMS cada año ocurren 300.000 mordeduras de serpientes, y de estas, entre 30.000 y 40.000 personas fallecen (Chippaux, 1998). Este alto número de muertes hace del accidente ofídico un importante problema de salud pública.

La inmensa mayoría de las mordeduras producidas en Costa Rica son ocasionadas por serpientes de la familia Viperidae, donde más del 50% de los casos pueden ser atribuidos a *Bothrops asper*, observándose que la trombocitopenia es uno de los hallazgos de laboratorio que se presenta con alta frecuencia (Gutiérrez, 1995).

Los venenos de las serpientes de la familia Viperidae son sustancias muy complejas, contienen una gran variedad de componentes proteicos y peptídicos con actividad biológica muy diversa; un gran número de esas proteínas afectan la hemostasia (Markland, 1997). Algunas de estas proteínas que afectan la hemostasia son enzimas como las metaloproteinasas, otras en cambio no tienen función enzimática como las que pertenecen al grupo de las lectinas tipo-C (Braud *et al.*, 2000).

Entre los mecanismos más estudiados por medio de los cuales las metaloproteinasas interfieren con la hemostasia están: (A) la inducción de la hemorragia (Bjarnason & Fox, 1994), (B) la hidrólisis del fibrinógeno, el cual es un cofactor importante de la agregación plaquetaria y de los mecanismos de coagulación sanguínea (Hawiger *et al.*, 1982), y (C) la inhibición de la agregación plaquetaria (Kamiguti *et al.*, 1996).

El batimastat es un peptidomimético que inhibe la acción de las metaloproteinasas debido a que mimetiza el sitio de corte de la colagenasa, además posee un ácido hidroxámico el cual se une al zinc muy efectivamente (Brown & Whittaker, 1998). En esta investigación el batimastat fue utilizado como herramienta para estudiar el papel de las metaloproteinasas del veneno de *B. asper* en la trombocitopenia producida por este.

La aspercetina, una proteína aislada del veneno de *B. asper*, es un heterodímero que pertenece a la familia de las lectinas tipo C, la cual induce agregación plaquetaria mediada por la interacción con el factor de von Willebrand, seguida por la unión de este factor plasmático al receptor de plaquetas GPIIb (Rucavado *et al.*, 2001). Esta inducción de la agregación plaquetaria produce trombocitopenia marcada cuando la proteína es inyectada por vía intravenosa en ratones (Rucavado *et al.*, 2001).

En este estudio se definieron cuatro objetivos específicos:

- 1) Investigar el papel de la aspercetina en el efecto trombocitopénico inducido por el veneno de *B. asper*.
- 2) Evaluar el papel de las metaloproteinasas hemorrágicas y no hemorrágicas del veneno de *B. asper*, en el efecto trombocitopénico inducido por dicho veneno.
- 3) Estudiar el posible papel potenciador de la aspercetina, una toxina inductora de trombocitopenia sobre la hemorragia inducida por BaP1 una metaloproteinasas aislada del veneno de *B. asper*.
- 4) Determinar la presencia de moléculas antigénicamente similares a la aspercetina en diferentes venenos de serpientes de la familia Viperidae.

Hasta el momento existen muy pocos estudios sobre los mecanismos que producen el efecto trombocitopénico observado en los accidentes ofídicos producidos por *B. asper*, de ahí la importancia de realizar este estudio, ya que permite identificar el papel de los algunos de los diferentes componentes del veneno, implicados en dicho efecto.

CAPÍTULO II.

ANTECEDENTES

Los venenos de serpientes son mezclas complejas de proteínas y péptidos que contienen diferentes actividades biológicas, participando muchas de estas en la alteración de la hemostasia, afectando principalmente las vías de coagulación, las células endoteliales y las plaquetas (Markland, 1997)

2.1 Metaloproteinasas hemorrágicas.

La producción de hemorragia, tanto a nivel local como sistémico, es una de las manifestaciones más importantes vistas en el accidente ofídico por los venenos de las serpientes de la familia Viperidae (Bolaños, 1982)

Esta alteración se debe principalmente a la presencia de toxinas hemorrágicas y proteolíticas, las cuales tienen la capacidad de destruir los vasos sanguíneos de pequeño calibre y se encuentran incluidas dentro del grupo de las metaloproteinasas. La mayoría de estas enzimas son dependientes de zinc (Hati *et al.*, 1999) y son glicoproteínas ácidas o ligeramente básicas, cuyos pesos moleculares son muy variados, van desde 22 kDa hasta 100 kDa (Bjarnason & Fox, 1994).

Las metaloproteinasas se clasifican en cuatro clases, según su secuencia de aminoácidos (Bjarnason & Fox, 1994). La clase P-I son metaloproteinasas que a nivel de la secuencia de aminoácidos presentan un dominio zimógeno y un dominio metaloproteinasas,

poseen pesos moleculares entre 20 y 30 kDa. La clase P-II son toxinas que tienen un dominio zimógeno, un dominio metaloproteinasa y una secuencia tipo disintegrina, poseen pesos moleculares intermedios, entre 30 y 50 kDa. La clase P-III son aquellas que tienen un dominio zimógeno, una secuencia metaloproteinasa, una secuencia tipo disintegrina y una secuencia rica en cisteínas, sus pesos moleculares oscilan entre 50 y 80 kDa, son las metaloproteinasas que presentan la mayor actividad hemorrágica. Por último, se propone que existe una clase adicional P-IV con pesos moleculares entre 60 y 90 kDa cuya secuencia de aminoácidos contiene un dominio zimógeno, una secuencia metaloproteinasa, una secuencia tipo disintegrina, una secuencia rica en cisteínas y un dominio tipo lectina.

Hasta este momento, han sido aisladas y caracterizadas del veneno de *B. asper* varias toxinas con actividad hemorrágica: BaH1, BH2, BH3 (Borkow *et al.*, 1993), BaP1 (Gutiérrez *et al.*, 1995) y BaH4 (Franceschi *et al.*, 2000)

BaP1 es una metaloproteinasa que posee una débil actividad hemorrágica pero degrada potentemente componentes de matriz extracelular como laminina, colágeno tipo IV y fibronectina. Estos hallazgos sugieren que esta toxina afecta de manera indirecta la integridad de la microvasculatura, causando la desorganización de la lámina basal. Además, contribuye al desarrollo de la hemorragia ya que posee actividades farmacológicas que afectan los mecanismos de la coagulación sanguínea, y la inyección intravenosa en animales de experimentación induce a una disminución del número de plaquetas circulantes en sangre y un aumento en los tiempos de coagulación (Rucavado *et al.*, 1995)

La actividad hemorrágica de estas toxinas dependen de su actividad metaloproteasa, por lo tanto la inhibición de esta actividad es fundamental para neutralizar la hemorragia.

Se han desarrollado compuestos sintéticos que inhiben esta actividad ligando la molécula de zinc del sitio activo, lo que impide la unión al sustrato y, por consiguiente, su proteólisis. La mayoría son estructuras peptídicas que interactúan específicamente con las enzimas, poseen un grupo que liga el zinc catalítico, como clorometil, piroglutamato e hidroxamato (Bjarnason & Fox, 1994)

El batimastat o BB-94 ([4-(N-hidroxiamonio-2R-Isobutil-3S(Tieniltiometil)-succinil]-L-fenilalanina-N-Metilamina) es un hidroximato pseudopéptidico que mimetiza la secuencia al lado derecho del sitio de corte de la colagenasa, contiene un ácido hidroxámico el cual ha mostrado ser un grupo de unión muy efectivo del zinc (Brown & Whittaker, 1998). Se ha demostrado que este compuesto tiene la capacidad de inhibir la actividad proteolítica y los efectos tóxicos locales inducidos por BaP1, una metaloproteínasa hemorrágica aislada del veneno de la serpiente *B. asper* (Escalante *et al.*, 2000)

2.2 Lectinas tipo-C

Las moléculas tipo-C lectinas de los venenos de serpientes son un grupo grande de proteínas, compuestas por dos cadenas (α y β) unidas por un enlace disulfuro, entre las cuales existe un dominio activo (Clemetson *et al.*, 1998). Algunas de estas lectinas son calcio dependiente (Ozeki *et al.*, 1994), otras tienen acción anticoagulante ya que se unen a los factores IX y X de la coagulación (Atoda *et al.*, 1989) y otras interactúan específicamente con los receptores de las plaquetas, induciendo la activación o inhibición de las mismas (Clemetson *et al.*, 1998).

La alteración en la función o la disminución en el número de plaquetas, constituye una de las manifestaciones patológicas más frecuentes en los envenenamientos por serpientes de la familia Viperidae, dando probablemente como resultado la exacerbación de la hemorragia local y sistémica producida por la acción primaria de las metaloproteinasas hemorrágicas (Bjarnason *et al.*, 1994).

El desarrollo de una trombocitopenia es observado en muchos de los pacientes que sufren una mordedura por *B. asper* (Gutiérrez, 1995). Recientemente, Rucavado *et al.* (2001) describieron en el veneno de *B. asper* la presencia de una proteína llamada aspercetina, la cual induce la agregación plaquetaria en presencia de plasma o del factor de von Willebrand (vWF).

La aspercetina es un heterodímero con un peso molecular de 29,759 Da y un pI 5,0. posee una secuencia N-terminal que presenta homología con las lectinas tipo-C de los venenos. Si se inyecta por vía intravenosa en ratones induce trombocitopenia de manera dosis dependiente, lo que sugiere que cumple un rol importante en las alteraciones de la hemostasia en los envenenamientos producidos por *B. asper* (Rucavado *et al.*, 2001)

Del mismo modo que la aspercetina, proteínas como la Botrocetina de *Bothrops jararaca* (Read *et al.*, 1978) y la Bitiscetina de *Bitis arietans* (Hamako *et al.*, 1996), se unen al vWF, provocando a su vez la interacción de este factor con el receptor GPIb en las plaquetas induciendo agregación plaquetaria (Read *et al.*, 1978).

CAPÍTULO III.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Venenos e inhibidor

El veneno de *Bothrops asper* que se utilizó en la mayoría de los experimentos a continuación descritos, fue obtenido de ejemplares adultos de la región del Pacífico de Costa Rica, del mismo modo los venenos de *Bothrops asper* región del Atlántico, *Cerrophidium godmani*, *Bothriechis schlegelii*, *Bothriechis lateralis*, *Atropoides nummifer*, *Atropoides picadoi*, *Porthidium ophryomegas*, *Porthidium nasutum*, *Agkistrodon bilineatus*, *Lachesis muta*, *Crotalus durissus durissus* fueron obtenidos de ejemplares mantenidos en cautiverio en el serpentario del Instituto Clodomiro Picado. El veneno de *Bothrops jararaca* una especie brasileña se obtuvo, como donación del Instituto Butantán (Sao Paulo, Brasil).

El batimastat, un inhibidor peptidomimético de metaloproteinasas, utilizado en algunas de las pruebas fue proporcionado por la British Biotech Pharmaceuticals Ltd, Cowley, Oxford, Reino Unido. Las diluciones utilizadas de batimastat se prepararon por medio de una sonicación en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS: 150 mM NaCl, 1,5 mM NaH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄) pH 7,2 conteniendo 0,01% de Tween 80.

3.2 Aislamiento de la aspercetina y BaP1

El aislamiento de la aspercetina se llevó a cabo según lo describe Rucavado *et al.*, (2001) utilizando cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sepharose y cromatografía de afinidad en Affi-Gel Blue. Su pureza se demostró por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12 % bajo condiciones reductoras con 2-mercaptoetanol (Laemmli, 1970).

La metaloproteinasa BaP1 se obtuvo siguiendo la metodología descrita por Gutiérrez *et al.*, (1995) en el cual se realiza una cromatografía en CM-Sepharose C-50, seguida de filtración en gel en Sephacryl S-200 y por último una cromatografía de afinidad en Affi-Gel Blue. Su homogeneidad se demostró de la misma forma que para la aspercetina.

3.3 Producción de anticuerpos anti-aspercetina

Se utilizó un conejo de aproximadamente 700 gr al cual se le aplicó el siguiente esquema de inmunización:

Día	Dosis de aspercetina (mg)	Adyuvante	Vía de administración
1	0,1	Freund Completo	intramuscular (i.m.)
15	0,1	Freund Incompleto	subcutánea (s.c)
30	0,1	alginato de sodio	s.c.
45	0,1	alginato de sodio	s.c.
60	0,2	alginato de sodio	s.c.

75	0,2	alginato de sodio	s.c
90	0,5	Freund Incompleto	i.m.
105	0,5	Freund Incompleto	i.m.
120	0,5	alginato de sodio	s.c.
135	0,5	Freund Incompleto	i.m.
150	0,5	Freund Incompleto	i.m.

Una semana después de finalizado el período de inmunización, se procedió a sangrar al conejo, a separar el suero y a evaluar el título de anticuerpos. El título de anticuerpos se evaluó por medio de una doble inmunodifusión en gel (Ouchterlony *et al.*, 1986), en la cual se utilizó un gel de agarosa al 1% en PBS pH 7,2. El gel se perforó con pozos de 3 mm utilizando un patrón hexagonal y una perforación central. En los pozos periféricos se colocaron 30 μ L del antisuero sin diluir o diluciones dobles del mismo, y en el pozo central se colocaron 30 μ L de una solución de aspercetina 1,4 mg/mL. La placa se dejó en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 24 horas, sobre una superficie nivelada. Para evidenciar la formación de bandas se procedió a lavar el gel con PBS pH 7,2, teñirlo con negro almidón y luego decolorarlo con ácido acético al 5%.

La fracción de IgG del suero, se purificó posteriormente, por medio de una precipitación con ácido caprílico (Tijssen, 1985). Esta consistió en diluir el suero 1:2 con acetato de sodio 0,06 M pH 4,0. Luego se agregó gradualmente y con agitación fuerte, 6,8 g de ácido caprílico. Se dejaron 30 minutos más en agitación y pasado este tiempo se centrifugó y se recogió el sobrenadante, ajustando luego el pH a 7,2 con NaOH 1 M. Por último, se realizó una diálisis contra PBS pH 7,2 eliminándose de este modo las sales de

precipitación final. La concentración final de anticuerpos se calculó midiendo la absorbancia de la solución obtenida a 280 nm en una cubeta de 1cm de profundidad y tomando en cuenta el coeficiente extinción de 1,30 para una solución de IgG de conejo de 1mg/mL.

Para verificar la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti-aspercetina de conejo se utilizó una dosis de aspercetina de 40 μ g capaz de inducir trombocitopenia en ratones (Rucavado *et al.*, 2001), la cual se preincubó a 37 °C por 30 minutos con los anticuerpos anti-aspercetina (12 mg/mL). Posteriormente, la mezcla fue inyectada por vía intravenosa (i.v.) en de la vena caudal a un grupo de tres ratones de la cepa CD1 (18-22 g). Como controles se utilizaron ratones inyectados i.v. con (a) 40 μ g de aspercetina en 100 μ L de PBS, para obtener el número de plaquetas que quedan libres en la circulación, (b) otros únicamente con 100 μ L de PBS, para obtener el recuento normal de plaquetas circulantes/ μ L en sangre. Una hora después de la inyección los animales se anestesiaron por inhalación de éter y luego se sangraron del plexo retrorbital, utilizando citrato de sodio al 3,8 % como anticoagulante en una proporción de 1:9. El recuento de las plaquetas circulantes se llevó a cabo siguiendo el método de Rees-Ecker (Sáenz *et al.*, 1987).

3.4 Determinación de la dosis trombocitopénica 50% (DT50%) del veneno de *B. asper* Pacífico (P)

Para la determinación de la DT50%, definida como la cantidad de veneno que induce una disminución del 50% del número de plaquetas circulantes/ μ L en sangre de

ratones, se prepararon soluciones del veneno de *B. asper* (P) de 1,8 µg, 7,5 µg y 30 µg disueltas en 100 µL de PBS. Estas cantidades nos aseguran la inducción de una trombocitopenia en los animales sin que se produzca su letalidad. Cada mezcla se inyectó en un grupo de cuatro ratones de la cepa CD1 (18-22 g) por vía i.v. en la vena caudal. Como controles se utilizaron ratones inyectados con 100 µL de PBS, obteniéndose el valor normal del número de plaquetas circulantes/µL en sangre. Una hora después de la inyección del veneno los animales se anestesiaron con éter y se sangraron del plexo retroorbital, utilizando como anticoagulante citrato de sodio al 3,8% en proporción de 1:9. Posteriormente se realizó el recuento de plaquetas circulantes utilizando la metodología de Rees Ecker descrita por Sáenz *et al.*(1987)

3.5 Estudio del papel de la aspercetina y de las metaloproteinasas en el efecto trombocitopénico inducido por el veneno de *B. asper* (P)

El estudio del papel que desempeñan la aspercetina y las metaloproteinasas en el efecto trombocitopénico, se llevó a cabo *in vivo* utilizando grupos de cuatro ratones de la cepa CD1 de 18 a 22 gramos de peso. Se realizaron tres tipos de experimentos:

(a) Se prepararon suspensiones de batimastat, un inhibidor sintético de las metaloproteinasas, de 5 µM, 20 µM y 40 µM, los cuales fueron incubadas a 37°C por 30 minutos, con una concentración de 20 µg/µL del veneno de *B. asper*. Posteriormente 100 µL de cada una de las mezclas fueron inyectadas por vía i.v. en la vena caudal al grupo de

cuatro ratones. Este experimento se realizó para estudiar el papel de las metaloproteinasas en el efecto trombocitopénico del veneno de *B. asper*.

(b) Se preparó una mezcla que contuviera una concentración de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del veneno de *B. asper* (P) con la preparación de IgG de conejo anti-aspercetina (12 mg/mL), la cual neutraliza completamente la actividad trombocitopénica de 40 μg de aspercetina. Se preincubaron a 37°C por 30 minutos, al cabo de este tiempo se inyectaron por vía i.v. en la vena caudal a los animales. Este experimento se realizó para estudiar el papel de la aspercetina en el efecto trombocitopénico del veneno de *B. asper*.

(c) Se preparó una mezcla de 100 μL que contuviera: 40 μM de batimastat, dosis que presentó mayor inhibición del efecto trombocitopénico inducido por el veneno de la *B. asper* (P), más la concentración de anticuerpos (12 mg/mL) anti-aspercetina que neutralizó completamente la actividad trombocitopénica de 40 μg de aspercetina, y una concentración del veneno de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. La mezcla se incubó por 30 minutos a 37°C. Este experimento se realizó para estudiar el papel conjunto de la aspercetina y las metaloproteinasas en el efecto trombocitopénico producido por el veneno de *B. asper*.

Una hora después de la inyección i.v. de cada una de las mezclas anteriores se procedió a anestesiarse los animales con éter y a sangrarlos del plexo retroorbital utilizando como anticoagulante citrato de sodio al 3,8% en una proporción de 1:9. Seguidamente se llevaron a cabo los recuentos de plaquetas circulantes utilizando el método mencionado de Rees Ecker descrito por Sáenz *et al.* (1987)

En todos los experimentos se utilizaron como controles: (a) un grupo de ratones que se inyectaron solamente con una concentración de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del veneno, para obtener el número de plaquetas que quedan libres en la circulación, (b) y otros únicamente con 100 μL de PBS, para obtener el recuento normal de plaquetas circulantes/ μL en sangre de ratón.

3.6 Estudio del posible papel de la aspercetina como elemento potenciador del efecto hemorrágico inducido por BaP1.

Para evaluar si la aspercetina es capaz de potenciar la acción hemorrágica de la BaP1, una metaloproteinasa aislada del veneno de *B. asper*, se utilizaron grupos de cinco ratones de la cepa CD1 (18-22 g), los cuales recibieron por vía i.v. en la vena caudal una dosis de aspercetina de 140 μg disueltos en 100 μL de PBS. Dos horas después se les administró por vía intradérmica (i.d.) en la región ventral abdominal, una dosis de 50 μg de BaP1 disueltos en 50 μL de PBS pH 7,2, cantidad capaz de producir una hemorragia leve (Gutiérrez *et al.*, 1995)

Como controles se utilizaron (a) un grupo de ratones que recibieron la inyección i.v. de 100 μL de PBS pH 7,2 y dos horas después la inyección i.d. de 50 μg de BaP1, y (b) un grupo que recibió la dosis i.v. de aspercetina y a las dos horas 50 μL de PBS por vía i.d. Dos horas después de la inyección de BaP1, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se determinó el efecto hemorrágico siguiendo la metodología descrita por Kondo *et al.*, (1960) modificada por Gutiérrez *et al.*, (1985) donde la piel es removida para medir el área de hemorragia en el lado interno de la piel.

3.7 Detección de la presencia de moléculas antigénicamente similares a la aspercetina en otros venenos de serpientes de la familia Viperidae.

Para detectar la posible presencia de moléculas antigénicamente relacionadas con la aspercetina en otras especies de la familia Viperidae, se llevó a cabo un Western blotting, utilizando los venenos *Bothrops asper* región del Atlántico, *Cerrophidium godmani*, *Bothriechis schlegelii*, *Bothriechis lateralis*, *Atropoides nummifer*, *Atropoides picadoi*, *Porthidium ophryomegas*, *Porthidium nasutum*, *Agkistrodon bilineatus*, *Lachesis muta*, *Crotalus durissus durissus*. Como controles se utilizaron una solución del veneno de *B. asper* (P) y una solución de aspercetina, todos se utilizaron en una concentración de 1mg/mL.

Los componentes de los diferentes venenos se separaron electroforéticamente por SDS-PAGE (Laemmli, 1970), utilizando geles homogéneos de poliacrilamida al 15% y en condiciones reductoras con 2-mercaptoetanol corridos a 180 V. La inmunodetección (Towbin *et al.*, 1979) se realizó transfiriendo a membranas de nitrocelulosa las proteínas separadas, utilizando una cámara de transferencia a 50 V y durante 24 horas. Posteriormente, se realizó una tinción con Ponceau S a la membrana de nitrocelulosa para evaluar la eficacia de la transferencia y marcar los estándares de pesos moleculares. Se bloquearon los sitios libres con albúmina sérica al 2% en PBS por 30 minutos. Luego, se le agregaron los anticuerpos producidos en conejo específicos contra la aspercetina en una dilución 1: 600 en la solución de lavados, la cual consiste en albúmina al 0,1% en PBS. Se incubó durante 24 horas y al cabo de este tiempo, se procedió a detectar la presencia de

anticuerpos unidos con un conjugado IgG-peroxidasa diluida 1:1000 en solución de lavados, que se incubó por una hora. Por último, se reveló la presencia de bandas de reacción utilizando como sustrato 4-cloro-1-naftol. La reacción se detuvo descartando la solución de sustrato y lavando la hoja con abundante agua destilada.

3.8. Análisis estadístico.

En aquellos casos en que fue necesario comparar resultados entre grupos de estudio se usó como prueba estadística la t student considerando como significativas las diferencias entre dos grupos cuando $p < 0,05$. Para este análisis se utilizó el programa estadístico Instat.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Producción de anticuerpos anti-aspercetina en conejo.

Con el fin de evaluar el papel de las moléculas tipo aspercetina en el efecto trombocitopénico inducido por el veneno de la *B. asper* (P), se produjeron anticuerpos anti-aspercetina en un conejo.

La capacidad neutralizante de estos anticuerpos se evaluó tal y como se describe en materiales y métodos. Los valores correspondientes a los recuentos de plaquetas circulantes en sangre de animales inyectados por vía i.v. con una mezcla de aspercetina más anticuerpos anti-aspercetina se muestran en la figura 1.

En lo que respecta a los valores de los recuentos de plaquetas en los animales control se tiene que, los inyectados solamente con 40 μg de aspercetina en 100 μL de PBS mostraron un valor de $196 \times 10^3 /\mu\text{L} \pm 17 \times 10^3$ una hora después de la inyección, y los que recibieron únicamente 100 μL de PBS mostraron un valor basal de $1332 \times 10^3 /\mu\text{L} \pm 50 \times 10^3$. Los animales inyectados por vía intravenosa con una mezcla de 40 μg de aspercetina en 100 μL de PBS pH 7,2 y anticuerpos anti-aspercetina 12 mg/mL, mostraron un recuento de plaquetas circulantes significativamente mayores ($p < 0,05$) con respecto al valor de los controles de aspercetina.

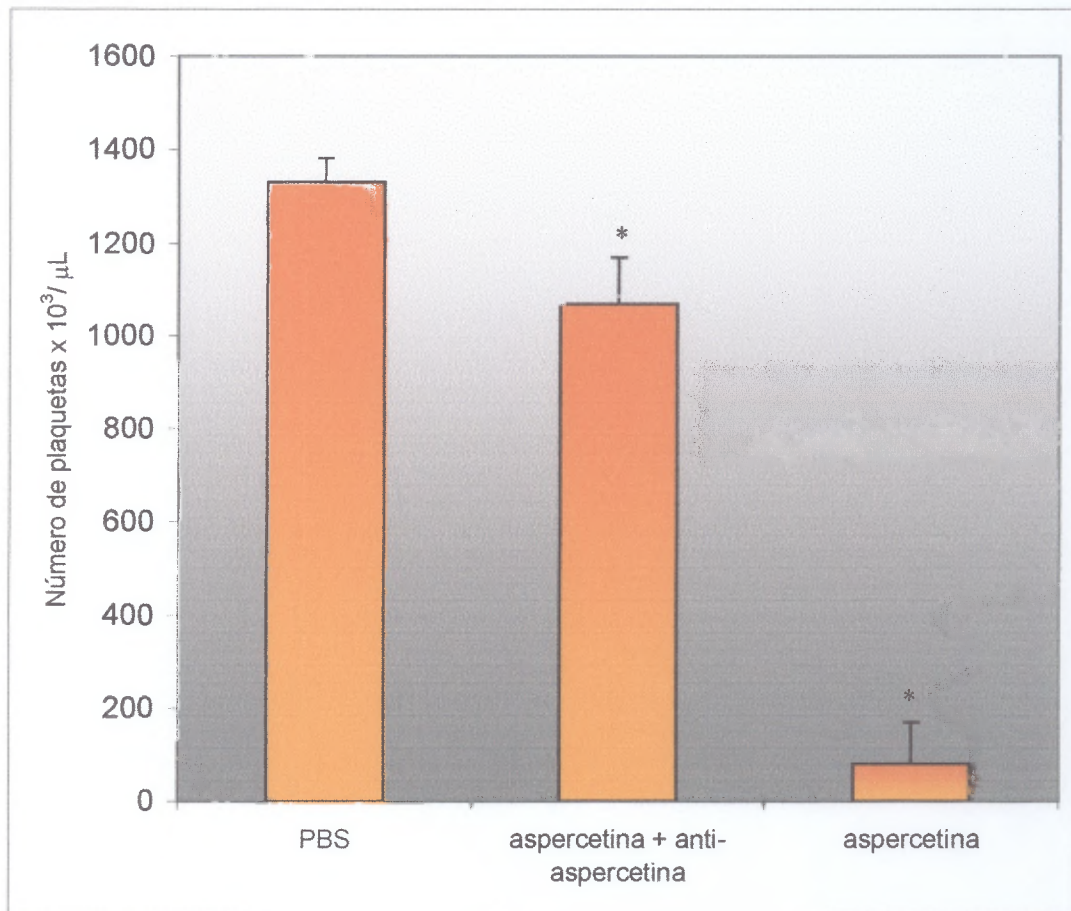


Figura 1. Neutralización de la actividad trombocitopénica de aspercetina 40 μg con anti-aspercetina 12 mg/ml. Cada barra representa el promedio \pm desviación estándar del recuento de plaquetas circulantes/ μL de sangre de tres ratones de la cepa CD1, determinados por el método de Rees-Ecker. (*) Los valores del grupo de la mezcla de aspercetina y de anticuerpos anti-aspercetina purificados son significativamente diferentes con respecto al control de aspercetina ($p < 0,05$)

4.2 Determinación de la dosis trombocitopénica 50% (DT 50%) del veneno de *B. asper* Pacífico (P)

La dosis de veneno de *B. asper* que induce una disminución del número de plaquetas circulantes/ μL de sangre en un 50% (DT 50%) corresponde a 6,0 μg . Este valor se calculó con base a los recuentos de plaquetas/ μL de sangre obtenidos de animales inyectados con diferentes dosis de veneno (1,8 μg , 7,5 μg , 30 μg) comparándolos con un grupo de ratones inyectados con PBS pH 7,2. Los ratones control en promedio tuvieron recuentos de $833 \times 10^3 / \mu\text{L} \pm 139 \times 10^3$.

4.3 Estudio del papel de la aspercetina y de las metaloproteinasas en el efecto trombocitopénico inducido por el veneno de *B. asper* (P)

El batimastat, un inhibidor peptidomimético de las metaloproteinasas y los anticuerpos específicos contra la aspercetina, fueron utilizados para determinar el efecto trombocitopénico que producen las metaloproteinasas y la aspercetina dentro del inducido por el veneno de *B. asper* (P).

4.3.1 Inhibición por medio del batimastat de la actividad trombocitopénica inducida por las metaloproteinasas del veneno de *B. asper* (P)

Al inyectar mezclas conteniendo 20,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del veneno completo de *B. asper* con diferentes dosis de batimastat, se logró inhibir la acción trombocitopénica del veneno de manera parcial. Como se puede observar en la figura 2, esta inhibición es dosis

dependiente. La concentración de 5 μM no disminuye la acción trombocitopénica del veneno de manera significativa, pero las concentraciones más altas 20 y 40 μM inhibieron en forma significativa esta actividad trombocitopénica ($p < 0,05$).

4.3.2 Neutralización utilizando anticuerpos anti-aspercetina de la actividad trombocitopénica inducida por la aspercetina del veneno de *B. asper* (P)

El promedio del recuento de plaquetas circulantes/ μL en sangre de ratones ($n=3$) inyectados con la mezcla de anticuerpos anti-aspercetina (12 mg/mL) y 20,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del veneno, mostraron una moderada pero significativa inhibición de la acción trombocitopénica ($p < 0,05$) después de una hora de inyectada la solución por vía intravenosa al compararse con los animales control inyectados únicamente con una concentración 20,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del veneno de *B. asper* (Figura 3).

4.3.3 Inhibición conjunta del batimastat y anticuerpos anti-aspercetina del efecto trombocitopénico inducido por las metaloproteinasas y la aspercetina del veneno de *B. asper* (P)

La aplicación por vía intravenosa de una mezcla de anticuerpos anti-aspercetina (12 mg/mL), 20,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del veneno de *B. asper* y batimastat 40 μM a un grupo de tres ratones, mostró un promedio del recuento de plaquetas circulantes/ μL de sangre de $824 \times 10^3/\mu\text{L} \pm 96 \times 10^3$, después de una hora de inyectada la mezcla. Esta solución induce a una moderada pero significativa inhibición del efecto trombocitopénico ($p < 0,05$), si se compara con el control de los animales inyectados solamente con veneno, como se observa en la Figura 4.

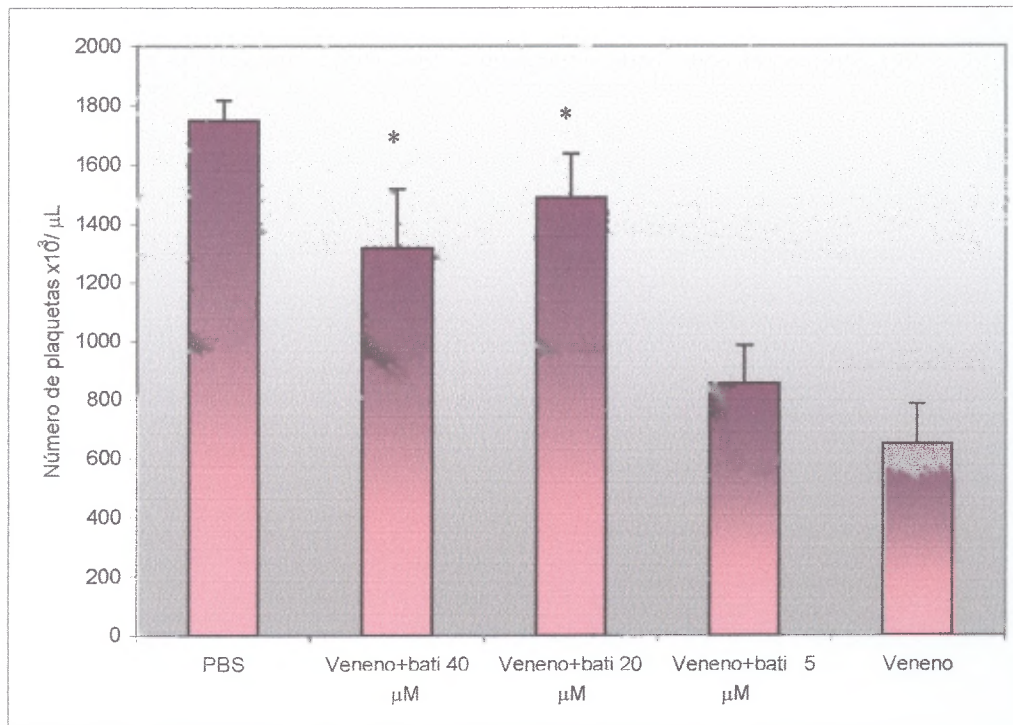


Figura 2. Inhibición de la actividad trombocitopénica del veneno de *B. asper* con batimastat. Mezclas de 20,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del veneno *B. asper* y diferentes concentraciones de batimastat fueron inyectadas por vía i.v. a grupos de tres ratones de la cepa CD1, una hora después se realizó el recuento de plaquetas circulantes/ μL de sangre determinados por el método de Rees-Ecker. Cada barra representa el promedio \pm desviación estándar. Los (*) muestran aquellos valores que son significativamente diferentes al del veneno ($p < 0,05$).

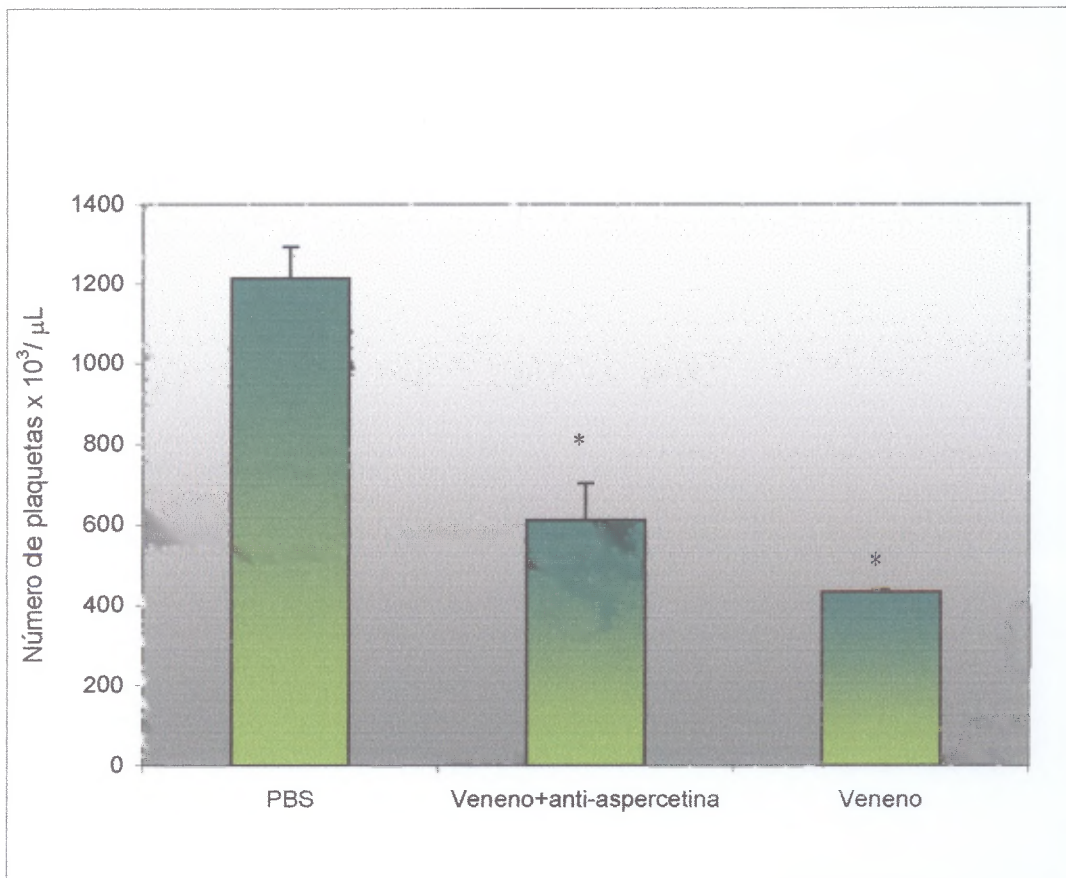


Figura 3. Inhibición de la actividad trombocitopénica del veneno de *B.asper* con anticuerpos anti-aspercetina. Una mezcla conteniendo 20,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del veneno y 12 mg/mL de anticuerpos anti-aspercetina fue inyectada i.v. a grupos de tres ratones de la cepa CD1. Una hora después se realizó el recuento de plaquetas circulantes/ μL de sangre determinados por el método de Rees-Ecker. Cada barra representa el promedio \pm desviación estándar. (*) Los recuentos en animales inyectados con la mezcla de anticuerpos y veneno son significativamente más altos con respecto a los del grupo control de veneno ($p < 0,05$).

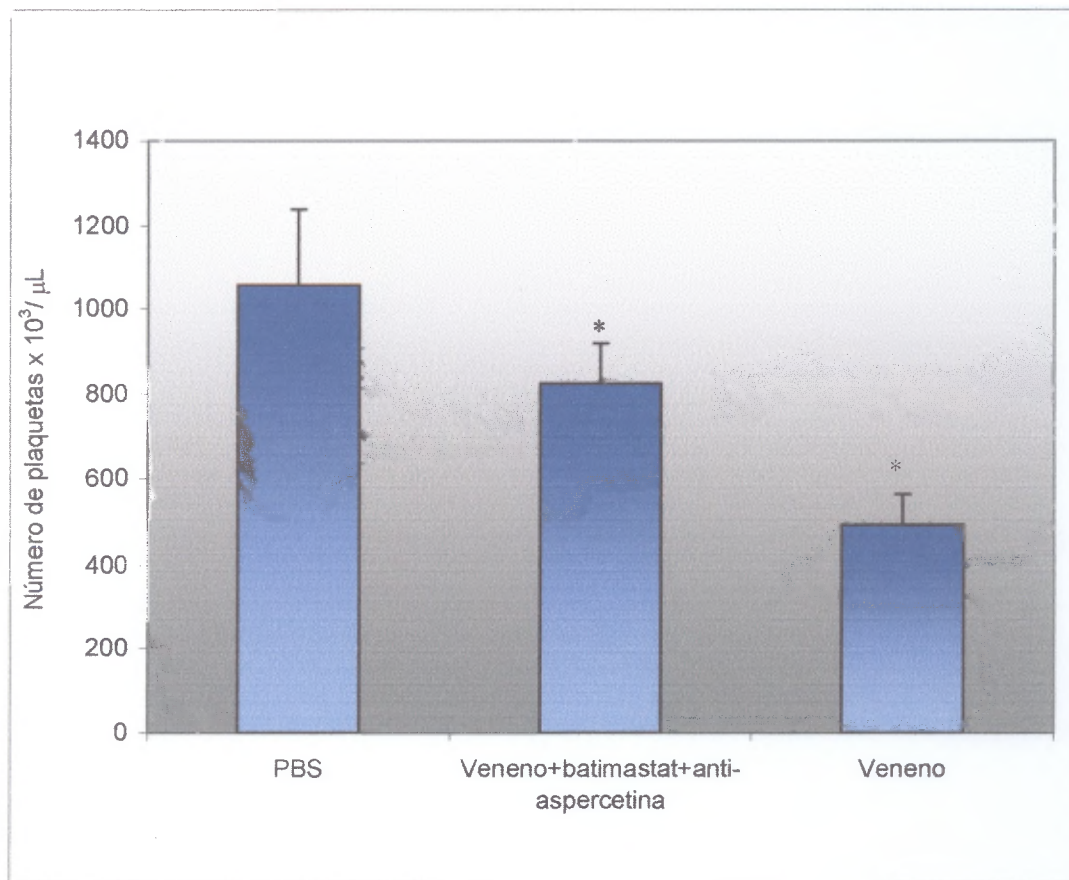


Figura 4. Neutralización de la actividad trombocitopénica del veneno de *B. asper* con anticuerpos anti-aspercetina y batimastat: El veneno (20,0 μg/μL), mezclado con anticuerpos anti-aspercetina (12 mg/mL) y batimastat (40 μM) fue inyectado i.v. a grupos de tres ratones de la cepa CD1. Una hora después se realizó el recuento de plaquetas circulantes/μL de sangre determinados por el método de Rees-Ecker. Cada barra representa el promedio ± desviación estándar. (*) El recuento de plaquetas en los animales inyectados con la mezcla de anticuerpos anti-aspercetina, el batimastat y el veneno es significativamente mayor que el grupo control inyectados solo con veneno ($p < 0,05$).

4.4 Estudio del posible papel de la aspercetina como elemento potenciador del efecto hemorrágico inducido por BaP1.

Se observó que la aspercetina es capaz de potenciar la hemorragia en la piel inducida por la BaP1. En el grupo de ratones control inyectados por vía intradérmica con 50 μg de BaP1 se logró observar un área hemorrágica en piel de $13,18 \pm 1,28$ (Figura 5). Cuando se inyectó 140 μg aspercetina por vía i.v., y a las dos horas la inyección con 50 μg de BaP1 por vía i.d., el diámetro de la hemorragia aumento significativamente ($p < 0,05$). El grupo control que recibió la dosis i.v. de aspercetina y 50 μL de PBS por vía i.d. no presentó ninguna lesión hemorrágica.

4.5 Detección de la presencia de moléculas antigénicamente similares a la aspercetina en otros venenos de serpientes de la familia Viperidae.

Con el fin de detectar la presencia de moléculas relacionadas antigénicamente con la aspercetina en diferentes venenos, se realizó Western blotting. Cuando los venenos de *Bothrops asper* de la región del Pacífico, *Bothriechis lateralis*, *Atropoides nummifer* se probaron con anticuerpos anti-aspercetina se observó una única banda de reacción bien definida con un peso molecular de 14 kDa (Figura 6A).

Los venenos de *Bothrops asper* Atlántico, *Bothrops jararaca*, *Bothriechis schegelii*, *Porthidium ophryomegas*, *Porthidium nasutum* mostraron varias bandas de reacción con

pesos moleculares entre 64 y 14 kDa. En los venenos *Atropoides picadoi*, *Lachesis muta* y *Crotalus durissus* se observó una única banda de reacción, con pesos moleculares de 34, 13 y 11 kDa, respectivamente. Por último, en los venenos de *Cerrophidium godmani* y *Agkistrodon bilineatus*, no se obtuvieron bandas al hacerlos reaccionar con el suero anti-aspercetina (Figura 6A, 6B).

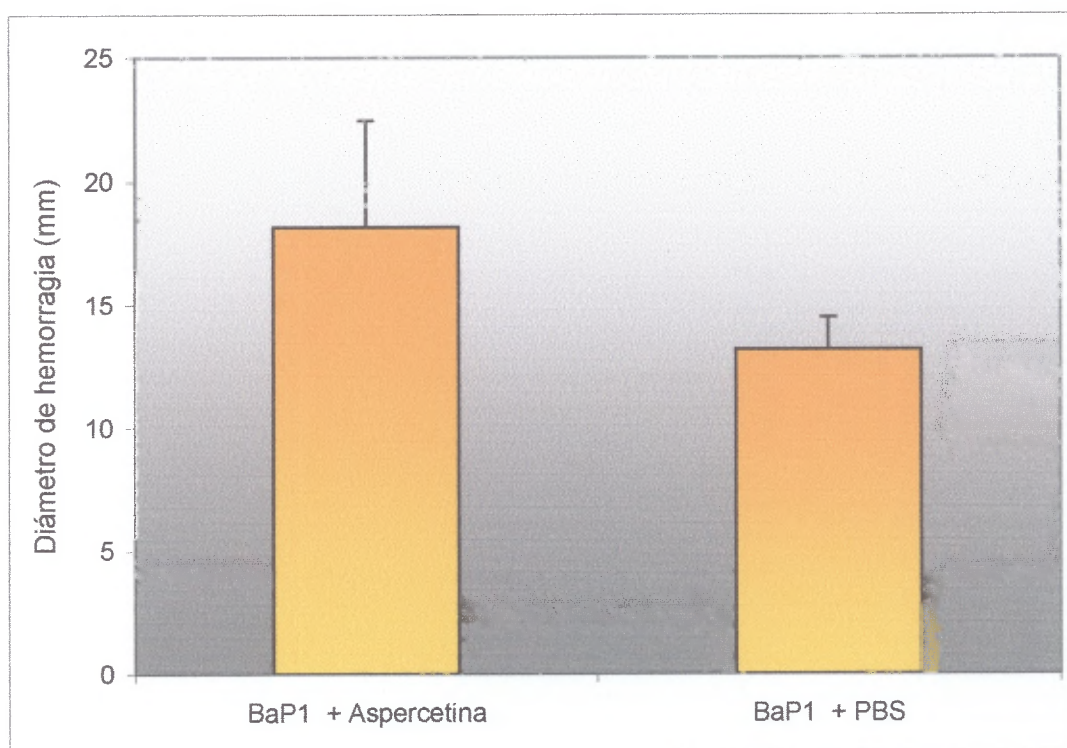


Figura 5. Papel de la aspercetina como elemento potenciador del efecto hemorrágico inducido por BaP1. Cada barra representa el promedio \pm desviación estándar del diámetro de hemorragia. Grupos de ratones ($n=5$) recibieron la inyección i.v. PBS o 140 μg de aspercetina y dos horas después la inyección i.d. de 50 μg de BaP1. La administración de aspercetina aumenta significativamente la hemorragia ($p<0,05$).

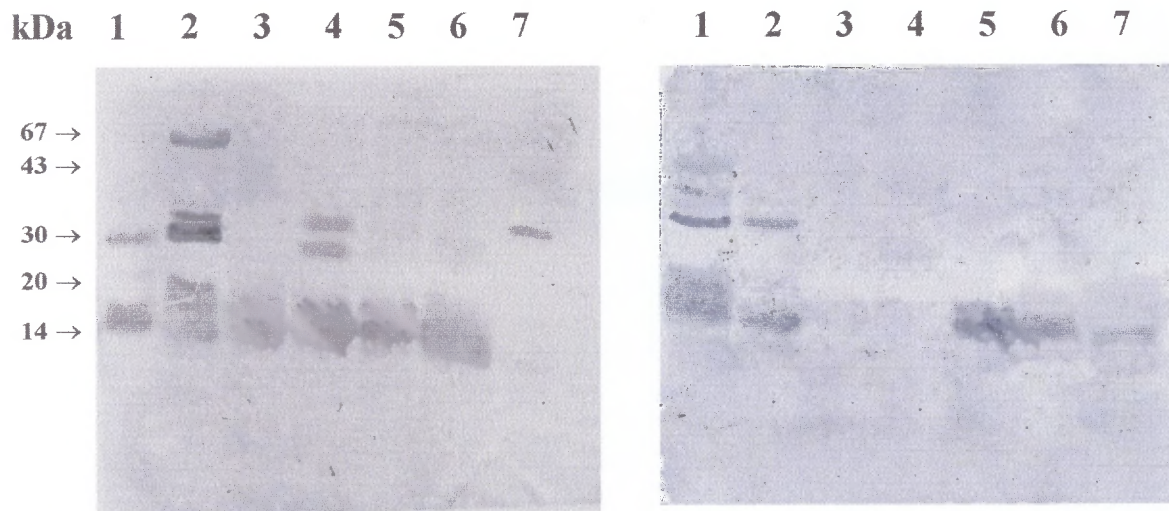


Figura 7. Western blotting para detectar moléculas antigénicamente similares a la aspercetina (suero anti-aspercetina 1:600), utilizando los venenos de (A): (1) *Bothrops jararaca* (2) *Bothrops asper* Atlántico, (3) *Bothrops asper* Pacífico, (4) *Bothriechis schegelii*, (5) *Bothriechis lateralis*, (6) *Atropoides nummifer*, (7) *Atropoides picadoi*; (B): (1) *Porthidium nasutum*, (2) *Porthidium ophryomegas*, (3) *Cerrophidium godmani*, (4) *Agkistrodon bilineatus*, (5) *Aspercetina*, (6) *Lachesis muta*, (7) *Crotalus durissus durissus*.

CAPÍTULO V.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La trombocitopenia es una de las manifestaciones patológicas más frecuentemente observadas en pacientes que han sufrido un accidente ofídico causado por *Bothrops asper* (Gutiérrez *et al.*, 1995). Aún así, son muy escasos los estudios que se han realizado hasta el momento para tratar de determinar cuáles son los componentes del veneno responsables del efecto trombocitopénico.

Se ha descrito que BaP1, una de las metaloproteinasas hemorrágicas aisladas del veneno de *B. asper* es capaz de inducir *in vivo* trombocitopenia marcada al ser inyectada por la vía i.v. en ratones. La disminución en el recuento de plaquetas circulantes inducida por esta toxina se puede detectar desde una hora después de la inyección (Rucavado *et al.*, 1996).

Los resultados de esta investigación apoyan la hipótesis de que las metaloproteinasas presentes en el veneno de *B. asper* contribuyen de manera importante en la inducción del efecto trombocitopénico. Los resultados obtenidos indican que al utilizar batimastat (40 μ M), un inhibidor peptidomimético de las metaloproteinasas, el efecto trombocitopénico del veneno se disminuye en aproximadamente un 38 % (Figura 2). Se pudo determinar además que la inhibición del efecto trombocitopénico es dosis dependiente. Estos resultados muestran que las metaloproteinasas son responsables de una buena parte del efecto trombocitopénico inducido por el veneno de *B. asper*.

La aspercetina, es una proteína heterodimérica que tiene la capacidad de producir agregación plaquetaria *in vitro* en presencia del factor de von Willebrand e *in vivo* induce trombocitopenia treinta minutos después de ser inyectada por la vía i.v. en ratones (Rucavado *et al.*, 2001). En esta investigación se logró neutralizar en un 14 % el efecto trombocitopénico del veneno al utilizar anticuerpos anti-aspercetina (Figura 3). Estos resultados indican que la aspercetina y/o moléculas relacionadas antigénicamente con esta toxina son responsables de parte del efecto trombocitopénico del veneno.

Al utilizar una mezcla de anticuerpos anti-aspercetina (12 mg/mL) y batimastat (40 μ M), se neutralizó el efecto trombocitopénico del veneno solamente en un 33% (Figura 4). Sin embargo, lo que se esperaba era un aumento en la inhibición de la actividad trombocitopénica al utilizar juntos los anticuerpos anti-aspercetina y batimastat.

Una de las razones que podría explicar este resultado es asumir que el batimastat de alguna manera se encuentre inhibiendo tanto a las metaloproteinasas del veneno como a la aspercetina. Este efecto podría ser el resultado de la acción de un grupo hidroxamato presente en el batimastat (Brown & Whittaker, 1998) el cual se uniría al Ca^{2+} que requieren las moléculas aspercetina para realizar su actividad trombocitopénica. Lo anterior, sería fácilmente demostrado si se llevara a cabo un control en el que la aspercetina se preincuba en presencia de batimastat.

La otra posibilidad que podría presentarse es la variabilidad fisiológica del número de plaquetas entre los animales de experimentación, que se refleja dentro del error del método, lo cual no permite detectar diferencias pequeñas en el recuento de las plaquetas,

por ende, los cambios de inhibición del efecto trombocitopénico inducido por el veneno de *B. asper*.

Por otra parte se puede observar con base en los resultados obtenidos que el efecto trombocitopénico del veneno de *B. asper* no se inhibe completamente al utilizar la mezcla anticuerpos anti-aspercetina y batimastat. Por la anterior, se podría concluir que parte del efecto trombocitopénico del veneno se debe a la existencia de otras toxinas cuyo efecto trombocitopénico no es inhibido ni por el batimastat ni por los anticuerpos anti-aspercetina,

Debido a que los venenos de serpientes son sustancias complejas (Markland, 1997), existe la hipótesis que la patogénesis de la hemorragia local y sistémica observada por el veneno de *B. asper* involucra no solo a las metaloproteinasas hemorrágicas sino también a otros componentes que actúan sobre las plaquetas o sobre las vías de coagulación. En esta investigación se logró determinar que la aspercetina y probablemente otras moléculas con actividades similares, las cuales se unen al vWF, provocando la interacción de este con el receptor GPIIb de las plaquetas induciendo agregación plaquetaria (Read *et al.*, 1978), son capaces de potenciar la acción hemorrágica de las metaloproteinasas hemorrágicas del veneno de *B. asper*.

Anteriormente se han descrito otras moléculas, como la Botrocetina (Read *et al.*, 1978) y la Bitiscetina (Hamako *et al.*, 1996), las cuales presentan similitudes estructurales y funcionales con la aspercetina (Rucavado *et al.*, 2001, lo que sugiere la existencia en otras especies de la familia Viperidae de moléculas similares a estas. En esta investigación demostramos en los venenos de *Bothrops asper* Atlántico, *Botriechis schlegelii*, *Botriechis lateralis*, *Atropoides nummifer*, *Porthidium ophryomegas*, *Porthidium nasutum*, *Atropoides*

picadoi, *Lachesis muta* y *Crotalus durissus durissus* que existen moléculas con pesos moleculares entre 64 y 14 kDa, que presentan similitud antigénica con la aspercetina y que podrían actuar de manera similar a esta, de forma que contribuyan a la alteración de la hemostasia. Por último, en los venenos *Cerrophidium godmani* y *Agkistrodon bilineatus*, no se obtuvieron bandas de reacción. Lo anterior, no descarta la idea de que existan moléculas que actúen sobre las plaquetas aunque con características antigénicas distintas a la aspercetina (Figura 6 A y 6 B).

Estos resultados apoyan la observación clínica frecuente de cuadros trombocitopénicos en pacientes mordidos por las serpientes de la familia Viperidae (Gutiérrez, 1995).

REFERENCIAS.

- Atoda, H. & Morita, T. (1989) A novel blood coagulation factor IX/ factor X-binding protein with anticoagulation activity from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake): isolation and characterization. *J Biochem.* **106**, 808-813.
- Bjarnason, J. B. & Fox, J. W. (1994) Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac. Ther.* **62**, 325-372.
- Bolaños, R. (1982) Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Primera parte. Aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. *Rev. Cost.Cienc. Méd.* **3**, 165-184.
- Borkow, G., Gutiérrez, J. M. & Ovadia, M (1993) Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the *Bothrops asper*. *Toxicon* **31**, 1137-1150.
- Brown, P. & Whittaker, M. (1998) Matrix metalloproteinase inhibitors. *Exp. Opin. Ther. Patents* **8**, 259-282.
- Braud, S., Bon, C. & Wisner, A. (2000) Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie* **82**, 851-859.

Chippaux, J. P. (1998) Snake bites: appraisal of the global situation. *Bull. W.H.O.* **76**, 515-524.

Clemetson, K. J., Polgár J. & Clemetson, J. M. (1998) Snake venom C-type lectins as tools in platelet research. *Platelets* **9**, 165-169.

Franceschi, A., Rucavado, A., Mora, N. & Gutiérrez, J. M. (2000) Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon* **37**, 63-77.

Escalante, T., Franceschi, A., Rucavado, A. & Gutiérrez, J. M. (2000) Effectiveness of Batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, in neutralizing local tissue damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Biochemical Pharmacology* **60**, 269-274.

Gutiérrez, J. M. (1995) Clinical toxicology of snake bites in Central America. In: *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons* (Meier, J. & White, J., Eds), pp 645-665. CRC Press, Boca Ratón, Florida 01.

Gutiérrez, J. M., Romero, M., Díaz, C., Borkow.,G. & Ovadia., M. (1995) Isolation and characterization of metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from venom of snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* **33**, 19-29.

- Gutiérrez, J. M., Gené, A., Rojas, G. & Cerdas, L. (1985) Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rica snake venom by polyvalent antivenom. *Toxicon* **23**, 887-893.
- Hati, R., Mitra, P., Sarker, S. & Battacharyya, K. (1999) Snake venoms hemorrhagins. *Toxicology* **29**, 1-19.
- Hamako, J., Matsui, T., Suzuki, M., Ito, M., Makita, K., Fujimura, Y., Ozeki, Y. & Titani, K. (1996) Purification and characterization of Bitiscetin, a novel von Willebrand factor modulator protein from *Bitis orientalis* snake venom. *Biochem Biophys Res Comm.* **226**, 273-279.
- Hawiger, J., Timmons, S., Kloczewiak, M., Strong, D. & Doolittle, R. (1982) γ and α chains of human fibrinogen possess sites reactive with human platelet receptors. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 2068-2071.
- Kamiguti, A. S., Hay, C. R. M., Theakston, R. D. G. & Zuzel, M. (1996) Insights into mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon* **34**, 627-642.
- Kondo, H., Kondo, S., Ikezama, H., Murata, R. & Osaka, A. (1960) Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. *Jnp.J.med.Sci.Biol.* **13**, 43-51.

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

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

Ouchterlony, Ö. & Nilsson, L. A. (1986) Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: *Handbook of Experimental Immunology*, Vol. 1: *Immunochemistry*, pp. 19.1-19.44 (Weir, D. M., Ed.). Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Ozeki, Y., Matsui, T., Hamako, J., Suzuki, M., Fujimura, Y., Yoshida, E., Nishida, S. & Titani, K. (1994) C-Type Galactoside-Binding Lectin from *Bothrops jararaca* venom: comparison of its structure and function with those of Botrocetin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **308**, 306-310.

Read, M. S., Shermer, R. W. & Brinkhous, K. M. (1978) Venom coagglutinin: an activator of platelet aggregation dependent on von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 4514-4518.

Rucavado, A. (1996) Efectos patológicos inducidos por BaP1 y caracterización inmunológica de BaH1 yBaP1, dos hemorraginas del veneno de *Bothrops asper*. Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica.

- Rucavado, A., Lomonte, B., Ovadia, M. & Gutiérrez J. M. (1995) Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from the *B. asper* (terciopelo) snake venom. *Exp.Mol.Pathol.* **63**, 186-199.
- Rucavado, A., Soto, M., Kamiguti, A. S., Theakston, R. D. G, Fox J. W., Escalante T. & Gutiérrez J. M. (2001) Characterization of Aspercetin, a platelet aggregation component from the venom of the snake *Bothrops asper* which induces thrombocytopenia and potentiates Metalloproteinase-induced hemorrhage. *Thromb Haemost* **85**, 710-71.
- Sáenz, G. F. (1987) Hematología analítica: teoría, técnicas, interpretaciones, pp, 101-102. San José Costa Rica: Edit. Universidad de Costa Rica.
- Tjissen, P. (1985) Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Amsterdam, Elsevier Science Publishers. P.96.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: produce and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4354.