

EFECTO DEL VENENO TOTAL *Bothrops colombiensis* SOBRE LA AGREGACIÓN DE PLAQUETAS

Bothrops colombiensis Venom Effect on Platelet Aggregation

Melvis Arteaga-Vizcaino ^{1*}, Mario León-Gutiérrez ¹, Jesús Quintero ¹, Enrique Torres-Guerra ¹,
Gilberto Vizcaino-Salazar ¹, María Díez de Edwald ¹, Juan Montilla-Farías ², Saulo Urdaneta-Vargas ²
y María Álvarez-García ²

¹Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette", Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

²Unidad de Investigaciones Ofidológicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia.

* Teléfono-Fax: 02617597247. E-mail: melvisarteaga@gmail.com

RESUMEN

Se estudió el efecto del veneno total de *Bothrops colombiensis* (VBC) sobre la agregación plaquetaria en humanos. Ciento veinte muestras de sangre de donantes voluntarios fueron recogidas en citrato de sodio al 3,8%. La agregación plaquetaria fue realizada en plasma rico en plaquetas (PRP), plaquetas lavadas con buffer tyrode pH 7,35 (PLBT) y en plaquetas incubadas con inhibidores de la agregación plaquetaria (PIAP): Acido acetil salicílico (ASA), Ticlopidina y Clopidogrel; la concentración final de plaquetas fue 250 x 10⁹/L. Los agentes inductores de la agregación empleados fueron Epinefrina: 1 x 10⁻⁵ M (concentración final: 11 µg/mL), Adenosin 5 Difosfato (ADP): 7,5 x 10⁻⁶ M (concentración final: 2,14 µg/mL), Colágeno: 1,2 x 10⁻² M (concentración final: 3 µg/mL) y Ristocetina: 5,5 x 10⁻⁴ M (concentración final: 1,2µg/mL). El VBC total (concentración final de 2,2 x 10⁻⁴ µg/mL) se incubó con PRP, PLB, PIAP para observar la agregación plaquetaria. Se analizó además el efecto del VBC total sobre PRP incubado con inhibidores enzimáticos como Fenil metilsulfonil fluoruro (PMSF) (10,20 µg/mL), 2-Mercaptoetanol (4,57 µg/mL) y acido etilendiamino-tetracético (EDTA) (64,00 µg/mL) sobre la agregación plaquetaria. El VBC total produjo agregación plaquetaria superior al 80% en PRP y PLBT (P<0,0001 y P<0,01, respectivamente) y revirtió el efecto inhibidor observado en PIAP (ASA y Clopidogrel P<0,05; ticlopidina P<0,01) e inhibió de manera significativa la agregación de las plaquetas incubadas con PSMF (P<0,0001). Se concluye que el VBC total ejerce un potente efecto inductor sobre la agregación plaquetaria, cuya acción es diferente a las dependientes de ciclooxigenasa o ADP.

Se requieren estudios más detallados con el fin de identificar el (los) componente (s) responsable (s) del efecto agregante plaquetario y su mecanismo de acción.

Palabras clave: Veneno, *Bothrops colombiensis*, agregación, plaquetas.

ABSTRACT

The venom total of *Bothrops colombiensis* (VBC) on platelet aggregation in humans was studied. One hundred twenty blood samples from volunteer donors were collected in sodium citrate 3.8%. Platelet aggregation was made in platelet-rich plasma (PRP), platelets washed with buffer tyrode pH 7.35 (PLBT) and in platelet incubated with inhibitors of platelet aggregation (PIAP): acetyl salicylic acid (ASA), ticlopidine and clopidogrel; the final concentration of platelet was 250 x 10⁹/L. Inducing agents used to aggregation were Epinephrine: 1x10⁻⁵M (final concentration: 11 µg/mL), Adenosin 5 Difosphate (ADP): 7.5x10⁻⁶M (final concentration: 2.14 µg/mL), Collagen: 1.2x10⁻² M (final concentration: 3 µg/mL), Ristocetin: 5.5x10⁻⁴M (final concentration: 1.2 µg/mL). Final concentration of VBC (2.2xs 10⁻⁴) was incubated with PRP, PL, PIAP to observe the platelet aggregation. Furthermore, it was also examined the effect of PRP on VBC incubated with enzymatic inhibitors such as phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) (10.20 µg/mL) and 2-Mercaptoethanol (4.57 µg/mL). As well, etilendiaminotetracetic acid (EDTA) (64.00µg/mL) was used on platelet aggregation. The total VBC produced platelet aggregation more than 80% in PRP and PLBT (P<0.0001 and P<0.01, respectively), and reverted the inhibitor effect observed in PIAP (ASA and Clopidogrel P<0.05; ticlopidine P<0.01) and it inhibited the platelet aggregation significantly on incubated platelets

with PSMF ($P < 0.0001$). It is concluded that total VBC is a potent inducer of platelet aggregation whose action is different from the ADP-dependant cyclooxygenase. Studies are required more detailed in order to identify the component (s) responsible of the platelet effect and its mechanism of action.

Key words: Venom, *Bothrops colombiensis*, aggregation, platelet.

INTRODUCCIÓN

Diferentes especies del género *Bothrops* son responsables de la mayoría de los envenenamientos por mordeduras de serpientes en Latinoamérica [2, 13]; su veneno posee propiedades inflamatorias [12, 18, 25, 53, 58], procoagulantes y fibrinolíticas [8, 9, 26]. En Venezuela, cerca del 80% de los casos por envenenamiento ofídico es ocasionado por *Bothrops colombiensis* (Mapanare) [11, 39, 43].

Entre los efectos que ocasiona el veneno bothrópico sobre los componentes del sistema de coagulación se reportan la degradación del fibrinógeno [50, 53], la alteración de la fibrinólisis [5, 24] y de la función plaquetaria [14, 20, 36, 42, 45, 46].

Se ha descrito alteración de la estructura plaquetaria con el veneno de *Bothrops asper* [6], *B. jararaca* [41] y *B. moojeni* [52], además del efecto inhibitorio sobre la función plaquetaria [4, 14, 19, 20, 31, 38, 42, 45]. Sin embargo, algunos autores señalan acción activadora para el veneno de *Bothrops alternatus*, *B. jararacá*, *B. cotiara*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedii*, entre otros [19, 46, 49, 55].

Para el veneno de *B. colombiensis* (VBC) se mencionan efectos sobre la coagulación sanguínea, caracterizados por alteración en los tiempos de la coagulación [26, 40], repercusión sobre el endotelio vascular [12, 43], hipofibrinogenemia [26, 30, 46], alteración de otros factores de la coagulación y del sistema fibrinolítico [24], además del efecto antiagregante a través de desintegrinas [47]. Sin embargo, no se dispone de datos que informen sobre la acción del veneno de este vipérido (VBC) sobre las plaquetas con efecto activador de la agregación, por lo cual, el presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto del VBC sobre la agregación plaquetaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del veneno

Se obtuvo un pool de 3,3 mL de veneno crudo extraído manualmente previa anoxia con CO_2 , de un lote de 4 serpientes *B. colombiensis* adultas, recolectadas en el estado Carabobo, Venezuela, y mantenidas en condiciones de bioterio (temperatura promedio de 26-30°C) en la Unidad de Investigaciones Ofidológicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia-Venezuela. El veneno extraído fue congelado -70°C en ultracongelador vertical (EC-Mo-

del 8359 S/N 81837-2630, Forma Cientific Division of Mallinckrodt, INC, EUA); posteriormente liofilizado (Lab CONCO Lyph Lock 4,5) y finalmente pesado en la balanza analítica (Mettler Instrument AG CH-8606 Greifensee-Zurich, Suiza) rindiendo 0,868 gramos en peso seco, el cual ulteriormente fue guardado a -70°C hasta su utilización en los experimentos de agregación plaquetaria.

Se procedió a preparar una solución madre de 10 mg de veneno en 2 mL de agua destilada; almacenada en alícuotas de 0,5 ml a -70°C. Para conocer el contenido proteico del veneno crudo se utilizó el método de Lowry [35], obteniéndose un valor de 2,713 mg de proteína/mg de veneno total.

Obtención del Plasma Rico en Plaquetas (PRP)

Se seleccionaron 120 donantes voluntarios de sangre que asistieron al Banco de Sangre del Hospital Universitario de Maracaibo-Venezuela. Los donantes llenaron los requisitos solicitados por las Unidades de Bancos de Sangre del país, en cuanto a la edad y estado de salud [21], los individuos participantes negaron el consumo de fármacos antiagregantes plaquetarios, al menos quince días antes de la donación.

Previo consentimiento informado de cada uno de los donantes se extrajo 4,5 mL de sangre venosa mediante punción antecubital, la sangre se dispuso en tubos plásticos que contenían 0,5 ml de citrato de sodio al 3,8% para una relación de 9:1.

La muestra sanguínea de cada donante fue centrifugada a 800 rpm (180 g) (IEC CENTRA- MP4R-Internatinal Equipment Company, EUA) a 800 rpm (180 g) durante 5 minutos a temperatura ambiente para obtener PRP, luego el remanente de cada muestra fue centrifugado a 3600 rpm (2.200 g) durante 20 minutos, a 4°C para obtener plasma pobre en plaquetas (PPP). La concentración de plaquetas en el PRP se ajustó a $250 \times 10^9/\text{L}$ con el PPP.

Pruebas de agregación plaquetaria

Para la prueba de agregación plaquetaria se utilizó 0,45 mL del PRP: Epinefrina: 1×10^{-5} M (concentración final: 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ADP: $7,5 \times 10^{-6}$ M (concentración final: 2,14 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Colágeno: $1,2 \times 10^{-2}$ M (concentración final: 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Ristocetina: $5,5 \times 10^{-4}$ M (concentración final: 1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La agregación se realizó según el método turbidimétrico de Born y Cross [7], empleando un agregómetro Chrono-log (Corp. Haverton, PA, EUA). El número de donantes utilizado para este estudio varió de acuerdo a la cantidad de PRP obtenido por donante y de las repeticiones de las pruebas de agregación que se requirieron.

Plaquetas lavadas

Las plaquetas de una parte del PRP fueron lavadas tres oportunidades con tampón Tyrode modificado (NaCl 137 mM, KCl 2,8 mM, MgCl_2 1 mM, Na_2HPO_4 0,4 mM, NaHCO_3 12 mM, HEPES 10 mM, Glucosa 5,5 mM, Albúmina 0,35%) posteriormente resuspendidas en el mismo tampón (V/V), con una con-

centración de $250 \times 10^9/L$ [33]. Las plaquetas utilizadas correspondieron con aquellas que mostraron una respuesta normal a los agonistas plaquetarios utilizados.

Drogas antiagregantes plaquetarias

Las drogas antiagregantes plaquetarias utilizadas fueron: Acido Acetil Salicílico (ASA) (500 mg), Clopidogrel (75 mg) y Ticlopidina (40 mg). Cada una de ellas se diluyó por separado en 10 mL de agua destilada, resultando 50 mg/mL, 7,5 mg/mL y 4 mg/mL, respectivamente. Seguidamente, 200 mL del PRP de los donantes se combinaron con 200 mL de cada mezcla (V/V), durante 30 minutos, a temperatura ambiente realizando agregación plaquetaria con cada uno de los agentes inductores antes señalados.

Inhibidores enzimáticos

Los siguientes agentes inhibidores fueron empleados: Fenil Metil Sulfonil Fluoruro (PMSF): 2,4 mM; 2-Mercaptoetanol (2-ME): 12mM y ácido Etilen Diaminotetracético (EDTA): 3mM, empleándose 10 μ L, 20 μ L y 30 μ L, respectivamente, para una concentración final de PMSF: 10,20 μ g/mL, 2-ME: 4,57 μ g/mL y EDTA: 64,00 μ g/mL. Para ello se procedió a incubar el PRP con cada uno de los inhibidores, en proporción 1:1 (200 μ L) (V/V), durante 30 minutos, a temperatura ambiente y se evaluó la respuesta de la agregación plaquetaria como ya fue descrita. Las plaquetas utilizadas correspondieron con aquellas que mostraron respuesta normal ante los agonistas plaquetarios utilizados.

Determinación del efecto del veneno sobre la agregación de las plaquetas

Para conocer la concentración óptima del VBC total que se utilizó para evaluar su efecto sobre la agregación de las plaquetas se procedió a preparar diferentes concentraciones a partir de la dilución inicial del VBC (200 μ g/mL), a saber: $2,5 \times 10^{-2}$ μ g/mL, 5×10^{-2} μ g/mL, 1×10^{-1} μ g/mL y $2,5 \times 10^{-1}$ μ g/mL, que se dispensaron en tubos de Ependorf. Se tomó 100 μ L de

cada una de estas concentraciones y se diluyó en 400 μ L de agua destilada, resultando la más adecuada 5×10^{-2} μ g/mL (concentración final $2,2 \times 10^{-4}$ μ g/mL). De ésta se utilizó 10 μ L que se dispensaron en 0,45mL de PRP de los donantes, tanto en aquellos que habían respondido ante los agonistas plaquetarios utilizados y señalados con anterioridad, como en aquellos que mostraron una respuesta disminuida, en plaquetas lavadas, en el PRP incubado con drogas antiagregantes plaquetarios y con los inhibidores enzimáticos.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valores absolutos, porcentajes, medias y desviaciones estándar; el análisis estadístico que se empleó correspondió a t de Student y ANOVA para la comparación de grupos, con una significancia de $P < 0,05$ [59].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontró que 27/120 donantes (22,5%) presentaron déficit en la agregación con uno o más agonistas. Seguidamente se colocó VBC total sobre el PRP de los donantes, tanto en aquellos que mostraron una agregación normal como disminuida y se evidenció que el VBC total a una concentración final de $2,2 \times 10^{-4}$ μ g/mL, produce un efecto activador importante de la agregación plaquetaria, independientemente de la respuesta que mostraron previamente ante los agonistas empleados como Epinefrina, ADP, Colágeno y Ristocetina. El promedio de la agregación plaquetaria inducida por el veneno fue mayor al 80%, tanto en el PRP con respuesta normal ($93,82 \pm 9,08$) como anormal ($86,00 \pm 1,98\%$), para esta última el incremento fue significativo ($P < 0,0001$) en comparación con la agregación anormal con los diferentes agonistas plaquetarios empleados (TABLA I).

En la última década se han reportado resultados contradictorios sobre el efecto que el veneno de serpientes del géne-

TABLA I
AGREGACIÓN PLAQUETARIA DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP) DE LOS DONANTES ANTE DIFERENTES AGONISTAS UTILIZADOS Y EL VENENO DE *Bothrops colombiensis* (VBC)

Agonista Plaquetarios	PRP (%)		P
	(valores promedio \pm desviación estándar)		
	Agregación Plaquetaria		
	Anormal (27) 22,5%	Normal (93) 77,5%	
ADP	30 \pm 20,61 (27)	87,46 \pm 11,41 (92)	< 0,0001
Epinefrina	13,9 \pm 20,68 (20)	85,69 \pm 12,17 (84)	< 0,0001
Colágeno	12,6 \pm 8,82 (15)	91,01 \pm 12,88 (72)	< 0,0001
Ristocetina	17,84 \pm 12,68 (12)	87,02 \pm 13,12 (58)	< 0,0001
VBC	86,00 \pm 1,98 (11) *	93,82 \pm 9,08 (46)	NS

ADP: Adenosina 5 Fosfato. NS: No Significativo. * $P < 0,0001$ con respecto a la agregación anormal con los otros agentes agregantes. Las cifras entre paréntesis representan número de casos.

ro *Bothrops* de diferentes especies produce sobre las plaquetas; unos autores afirman que la presencia de compuestos derivados del mismo tiene un efecto inhibitor sobre la función de las plaquetas [4, 14, 19, 20, 38, 42, 45], mientras que otros reportan lo contrario [19, 46, 49, 55].

Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los descritos por varios autores, pero para otras especies de *Bothrops* [55]. De igual forma, Fujimura y col. [20] para el veneno de *B. Jararaca* demostraron efecto agregante plaquetario producido a través de una proteína que se une a la GP Ib; mientras que Rucavado y col. [46] describen en el veneno de *B. asper*, la Aspercetina, la cual produce agregación plaquetaria y trombocitopenia en ratones (*Swiss Webster*), pero solo en presencia de plasma o FvW purificado.

Para *B. colombiensis* (Mapanare), Sánchez y col. [47] reportan que una desintegrina purificada del veneno *B colombiensis*, que denominaron Colombistatin, inhibe la agregación plaquetaria; en la presente investigación, el efecto del VBC total a una concentración final $2,2 \times 10^{-4}$ µg/mL indujo agregación plaquetaria. Es necesario realizar más estudios sobre este veneno para identificar el componente o los componentes que producen este efecto agregante sobre la plaqueta.

Al emplearse una mezcla de PRP de los donantes con las drogas antiagregantes como ASA, Clopidogrel y Ticlopidina y agregarse VBC para identificar su mecanismo de acción se encontró un incremento de la agregación plaquetaria, tal como se muestra en la TABLA II.

Es conocido el efecto de fármacos como aspirina (ASA) Ticlopidina y Clopidogrel sobre la agregación plaquetaria; al respecto, la ASA produce inhibición irreversible de la actividad

de la ciclooxigenasa por acetilación del grupo hidroxilo-serina [1, 44], de esta forma se interrumpe la transformación del ácido araquidónico en sus derivados ciclooxigenados, reduciéndose la producción de tromboxano A2. En el presente estudio se observó que el VBC agregado a plaquetas incubadas con ASA, revierte el efecto inhibitor de la misma.

En cuanto al efecto que el Clopidogrel produce sobre las plaquetas se conoce que, inhibe selectiva e irreversiblemente la agregación plaquetaria inducida por el ADP, impidiendo la unión de la adenosina difosfato al receptor plaquetario; de esta manera, la activación del complejo glicoproteico GIIb/IIIa resulta alterada, su inactivación impide la unión del fibrinógeno a las plaquetas, lo que finalmente inhibe la agregación plaquetaria [51]. En el presente estudio, cuando se empleó VBC total se produjo un aumento significativo de la agregación de las plaquetas incubadas con Clopidogrel ($P < 0,001$).

Una respuesta similar a la que se evidenció con el Clopidogrel se observó cuando se utilizó el VBC total como inductor de la agregación plaquetaria en el PRP incubado con Ticlopidina. El mecanismo de acción de la Ticlopidina se asocia principalmente al bloqueo del receptor plaquetario del ADP y a la interferencia de la unión del fibrinógeno a la glicoproteína IIb/IIIa de la membrana plaquetaria [15, 17], no interfiere en el metabolismo del ácido araquidónico y por lo tanto no modifica la síntesis de prostaglandinas plaquetarias o vasculares.

El comportamiento que mostraron las plaquetas de los donantes incubadas con las drogas antiagregantes antes descritas, cuando se agregó el VBC total sugiere que, este veneno pudiera contener algún compuesto que utiliza un mecanismo de activación distinto a los utilizados por las drogas antiagregantes empleadas (ASA, Ticlopidina y Clopidogrel); al respecto, Calve-

TABLA II
AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP) DE DONANTES DE SANGRE INCUBADO CON DROGAS ANTIAGREGANTES: ACIDO ACETILSALICÍLICO (ASA), TICLOPIDINA (TIC) Y CLOPIDOGREL (CLO) CON Y SIN VENENO DE *Bothrops colombiensis* (VBC)

Agonistas Plaquetarios	Agregación Plaquetaria (%) (valores promedio ± desviación estándar)			
	ADP	Epinefrina	Colágeno	Ristocetina
PRP+ASA	25 ± 10,6 (n=52)	18 ± 2,0 (n=50)	43,5 ± 18 (n=15)	30 ± 16 (n=12)
PRP+ASA+VBC	80,5 ± 11,5 (n= 50) *	82,1 ± 12 (n=50) *	85,6 ± 16,7 (n=15) *	90,3 ± 9,8 (n=12) *
PRP+TI	19,4 ± 5,4 (n= 53)	23 ± 6,2 (n=58)	28,4 ± 9,1 (n=15)	30 ± 20 (n=12)
PRP+TI+VBC	89,5 ± 4,4 (n= 50) *	90 ± 7,8 (n=58) *	83,9 ± 5,8 (n=14) *	63,9 ± 12 (n=12) *
PRP+CLO	28 ± 7,81 (n=58)	15 ± 4,2 (n=62)	46 ± 3,2 (n=15)	26 ± 9,2 (n=12)
PRP+CLO+VBC	82,5 ± 6,4 (n= 58) *	88,3 ± 7,9 (n=60) *	93 ± 8,1 (n=15) *	85 ± 2,3 (n=12) *

* P < 0,0001 con respecto a la droga antiagregante respectiva sin VBC. n= número de casos.

te y col. [10] identifican ocho tipos de familias proteínas en la *Bothrops colombiensis* de Venezuela, alguna de ellas pudiera ser la responsable de la actividad agregante sobre las plaquetas que se encontró en la presente investigación. Este mecanismo de agregación pudiera corresponder probablemente a los receptores de la membrana plaquetaria, tal como se ha descrito para serpientes de otros géneros [3, 32] y para otras especies de *Bothrops* en las cuales se indica un efecto similar a la trombina [3, 20, 46, 54] pero no para la *B. colombiensis*, en el presente estudio este mecanismo no fue investigado.

El lavado de plaquetas proporciona una célula en la cual se han retirado todos los compuestos adheridos sobre su superficie, donde se encuentran ubicados los receptores que median la unión de las plaquetas y generan señales de activación, tal como ocurre para el fibrinógeno, requisito indispensable para la agregación plaquetaria [34, 37].

Cuando se analizó la respuesta que las plaquetas lavadas tratadas con buffer Tyrode tenían ante el VBC total se produjo una agregación plaquetaria que fue significativamente menor ($P < 0,01$) que la observada en las plaquetas no tratadas con este tampón (TABLA III). Esta respuesta podría significar que, existe un compuesto en el plasma que es importante para algún (os) componente (s) presente (s) en el veneno pero no para otro (s) componente (s), lo que permite observar el efecto proagregante a pesar de la disminución de la agregación encontrada en las plaquetas lavadas. En ese sentido se describe que, otras especies de *Bothrops* necesitan de un elemento en el plasma para ejercer una actividad directa sobre las plaquetas [20, 46].

Los compuestos como el PSMF, 2 Mercaptoetanol y EDTA son utilizados para el estudio de una variedad de enzi-

mas; el PSMF es el más usado y se emplea para el análisis de esterases y proteasas de serinas, tales como la subtilisina, quimotripsina, tripsina, trombina y plasmina. El 2 Mercaptoetanol induce cambios en la conformación de los compuestos enzimáticos impidiéndoles ejercer su actividad [16, 22, 23, 28, 29, 48, 56, 57], mientras que el EDTA, agente quelante de calcio, disminuye la concentración de este ión en el medio extracelular; en la plaqueta produce una menor apertura de los poros de su membrana y en consecuencia un menor efecto de la activación y la agregación. También se señala que este compuesto tiene efecto inhibitor sobre enzimas como las metaloproteasas, encontradas en los diferentes venenos de serpientes incluidas las *Bothrops*, las cuales son dependientes de calcio [19].

En la TABLA IV se presentan los valores obtenidos al agregar el VBC total sobre el PRP incubado con los diferentes inhibidores enzimáticos empleados en el presente estudio (PMSF, 2-Mercaptoetanol, EDTA); se notó que la agregación plaquetaria fue inhibida de manera significativa en el PRP con PMSF ($P < 0,01$). Los resultados muestran que, aunque se produjo disminución de la agregación plaquetaria con todos estos compuestos, ésta solo fue significativa para el PMSF ($P < 0,0001$), posiblemente por la acción que ejerce sobre un compuesto similar a la trombina que pudiera estar presente en el veneno, tal como se ha descrito para otros venenos de *Bothrops* como *cotiara*, *alternatus*, *atrox*, *moojeni*, *neuwiedi*, *jararacussu* y *jararaca* [19, 27, 53].

Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran que el veneno total de *B. colombiensis* a una concentración de $2,2 \times 10^{-4}$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, actúa como un potente inductor de la agregación plaquetaria, cuya acción es diferente a las dependientes de ciclooxigenasa o ADP.

TABLA III
EFECTO DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* (VBC) SOBRE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA DE PLAQUETAS LAVADAS CON BUFFER TYRODE (PLBT) Y PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP)

Mezclas	Número de Casos	Agregación Plaquetaria (%) Valores promedios \pm desviación estándar	P
PRP + VBC	46	93,82 \pm 9,08	<
PLBT + VBC	29	76,06 \pm 8,59	0,01

TABLA IV
EFECTO DEL VENENO DE *Bothrops colombiensis* (VBC) SOBRE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA EN EL PLASMA RICO EN PLAQUETA DE LOS DONANTES (PRP) INCUBADAS CON LOS INHIBIDORES ENZIMÁTICOS: PMSF, 2 MERCAPTOETANOL (2-ME) Y EDTA

Agonista Plaquetarios	Número de Casos	Agregación Plaquetaria (%) Valores promedios \pm desviación estándar
PRP + VBC	46	93,82 \pm 9,08
PRP + MSPF + VBC	42	9,5 \pm 6,4 *
PRP + 2ME + VBC	42	85 \pm 8,82
PRP + EDTA + VBC	42	86,33 \pm 8,6

* $P < 0,0001$ con respecto al resto de los grupos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El presente estudio evidencia que el veneno total de *B. colombiensis* produce un potente efecto inductor de la agregación plaquetaria pero, hasta el presente, su mecanismo de acción es desconocido. Se requiere un mayor número de estudios en los cuales se consiga caracterizar este veneno e identificar sus fracciones y cual de estas ejerce agregación sobre las plaquetas. Los resultados que se obtengan podrían servir para el diseño de futuras investigaciones donde se evalúe su utilidad como herramienta diagnóstica y/o terapéutica.

AGRADECIMIENTO

Esta investigación contó con el apoyo económico del CONSEJO DE DESARROLLO CIENTÍFICO Y HUMANÍSTICO (CONDES) de la Universidad del Zulia, Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ACKERMAN, R.H.; NEWMAN, K.L. Incomplete end-point effects in patients on aspirin compounds. **Ann. Neurol.** 28: 224. 1990.
- [2] ALVES-ARAUJO, F.A.; SANTALUCÍA, M.; FERNÁNDEZ-CABRAL, R. Epidemiología dos accidentes por animais peconhentos. In: Costa Cardoso, J.L.; de Siqueira Franca, F.O.; Wen, F.H.; Sant'Ana Málaque, C.M.; Haadad, Jr. V. (Eds.). **Animais Peconhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes.** Sarvier, FAPESP, Sao Paulo, Brasil. Pp 6-12. 2003.
- [3] ANDREWS, R.K.; GARDINER, E.E.; SHEN, Y.; BERNDT, M.C. Structure-activity relationships of snake toxins targeting platelet receptors, glycoprotein Ib-IX-V and glycoprotein VI. **Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents.** 1 (2): 143-9. 2003.
- [4] ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.; FULY, A.L.; CORRÊA, F.M.; ROSA, J.C.; GREENE, L.J.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A (2) from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochem. Pharmacol.** 64 (4): 723-32. 2002.
- [5] BELLO, C.A.; HERMOGENES, A.L.; MAGALHAES, A.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, L.H.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie.** 88 (2): 189-200. 2006.
- [6] BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; OVADIA, M. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicol.** 31: 1137-1150. 1993.
- [7] BORN, G.V.R.; CROSS, M.J. The aggregation of the blood platelets. **J. Physiol.** 168: 178-83. 1963.
- [8] BUCARETCHI, F.; HERRERA, S.R.; HYSLOP, S.; BARACAT, E.; VIEIRA, R.J. Snakebites by *Bothrops spp* in children in campinas, São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 43 (6): 329-33. 2001.
- [9] BUCARETCHI, F.; HYSLOP, S.; MELLO, S.M.; VIEIRA, R.J. *Bothrops* snakebite on the head: case report and review of the literature. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 101 (8):733-43. 2007.
- [10] CALVETE, J.J.; BORGES, A.; SEGURA, A.; FLORES-DÍAZ, M.; ALAPE-GIRÓN, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; DIEZ, N.; DE SOUSA, L.; KIRIAKOS, D.; SÁNCHEZ, E.; FAKS, J.G.; ESCOLANO, J.; SANZ, L. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. **J. Proteomics.** 72(2):227-40. 2009.
- [11] COLIMODIO, H.; AGUILAR, M. Envenenamiento ofídico en Venezuela. **Med. Crít. Venez.** 8 (1): 23-38, 55. 1993.
- [12] COMINETTI, M.R.; TERRUGGI, C.; RAMOS, O.H.; FOX, J.W.; MARIANO- OLIVEIRA, A.; DE FREITAS, M.S.; FIGUEIREDO, C.C.; MORANDI, V.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. **J. Biol. Chem.** 279 (18), 18247-55. 2004.
- [13] COSTA-CARDOSO, J.L.; FAN, H.W. Snakebites in South America. In J. Meier & J. White (Eds). **Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons.** CRC, Boca Raton, Florida, EEUU. Pp 261-329 1995.
- [14] DE ALBUQUERQUE-MODESTO, J.C.; SPENCER, P.J.; FRITZEN, M.; VALENÇA, R.C.; OLIVA, M.L.; DA SILVA, M.B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; GUARNIERI, M.C. BE-I-PLA2, a novel acidic phospholipase A2 from *Bothrops erythromelas* venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I2 release by endothelial cells. **Biochem Pharmacol.** 72 (3): 377-84. 2006.
- [15] DEFREYN, G.; BERNAT, A.; DELEBASSE, A.; MAFFRAND, J.P. Pharmacology of ticlopidine. A review. **Semin. Thromb. Hemost.** 15: 159-166. 1989.
- [16] DWIGHT, L.; RAULSTON, S.; GEORGE, J.; SCHROEPFER, J. Effect of Phenylmethylsulfonyl Fluoride on Sterol Biosynthesis in 10,000 X g Supernatant Fraction of Rat Liver Homogenates. **J. Biol. Chem.** 256 (14): 7173-7176. 1981.
- [17] FÉLISTE, R.; DELEBASSÉE, D.; SIMON, M.F.; CHAP, H.; DEFREYN, G.; VALLÉE, E.; DOUSTE-BLAZY, L.; MAFFRAND, J.P. Broad spectrum anti-platelet activity of

- ticlopidine and PCR 4099 involves the suppression of the effects of released ADP. **Thromb. Res.** 48 (4): 403-15. 1987.
- [18] FERREIRA, M.L.; MOURA DA SILVA, A.M.; MOTA, I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. **Toxicon.** 30: 1591-1602. 1992.
- [19] FRANCISCHETTI, I.M.; CASTRO, H.C.; ZINGALI, R.B.; CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A. *Bothrops sp.* snake venoms: comparison of some biochemical and physico-chemical properties and interference in platelet functions. **Comp. Biochem Physiol C. Pharmacol Toxicol Endocrinol.** 119 (1): 21-9. 1998.
- [20] FUJIMURA, Y.; IKEDA, Y.; MIURA, S.; YOSHIDA, E.; SHIMA, H.; NISHIDA, S.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; TANIUCHI, Y.; KAWASAKI, T. Isolation and characterization of *Jararaca* GPIIb-BP, a snake venom antagonist specific to platelet glycoprotein Ib. **Thromb. Haemost.** 74 (2): 743-50. 1995.
- [21] MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL DE VENEZUELA. Ley de Transfusión y Bancos de Sangre. Gaceta oficial N° 31.356 de fecha 08 de noviembre de 1977. En línea: <http://legal.com.ve/leyes/C175.pdf>. 31-05-2011.
- [22] GLADNER, J.A.; FOLK, J.E. Carboxypeptidase BII. Mode of action on protein substrates and its application to carboxyl terminal group analysis. **J. Biol. Chem.** 231(1):393-401. 1958.
- [23] GLADNER, J.A.; LAKI, K.; STOHLMAN, F. Labeled DIP-thrombin Labeled DIP-thrombin. **Biochim Biophys Acta.** 27 (1): 218. 1958.
- [24] GIRÓN, M.E.; SALAZAR, A.M.; AGUILAR, I.; PÉREZ, J.C.; SÁNCHEZ, E.E.; AROCHA-PIÑANGO, C.L.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; GUERRERO, B. Hemorrhagic, coagulant and fibrinolytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** 147 (1): 113-21. 2008.
- [25] GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. **Rev. Biol. Trop.** 54 (3): 889-901. 2006.
- [26] GUTIÉRREZ, J.M.; ROMERO, M.; DÍAZ, C.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon.** 33 (1): 19-29. 1995.
- [27] IZIDORO, L.F.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES, R.S.; FERRO, E.V.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J.R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). **Biochimie.** 85 (7): 669-75. 2003.
- [28] JANSEN, E.F.; NUTTING, F.; BALLS, A.K. Inhibition of the proteinase and esterase activities of trypsin and chymotrypsin by diisopropyl fluorophosphate; crystallization of inhibited chymotrypsin. **J. Biol. Chem.** 179 (1): 189-99. 1949.
- [29] JANSEN, E.F.; NUTTING, F.; BALLS, A.K. Mode of inhibition of chymotrypsin by diisopropyl fluorophosphate; introduction of phosphorus. **J. Biol. Chem.** 179 (1): 201-204. 1949.
- [30] JUAN, F.C.; THOMAZINI, I.; CARVALHO, I.; CARREIRA, D.; CASSINELLI, V.J.; PEREIRA, P.C.; BARRAVIERA, B. Evaluation of platelet number and function and fibrinogen level in patients bitten by snake of the *bothrops* genus. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 28 (1): 19-24. 1995.
- [31] KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha 2 beta 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochem. J.** 320 (Pt 2): 635-41. 1996.
- [32] KAWASAKI, T.; TANIUCHI, Y.; HISAMICHI, N.; FUJIMURA, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; SAKAI, Y.; KAKU, S.; SATOH, N.; TAKENAKA, T.; MAKOTO, H.; SAWAI, Y. Tokaracetin, a new platelet antagonist that binds to platelet glycoprotein Ib and inhibits von Willebrand factor-dependent shear-induced platelet aggregation. **Biochem. J.** 308 (Pt 3):947-53. 1995.
- [33] KITCHEN, S.; McCRAW, A. Diagnóstico de la Hemofilia y otros trastornos de la coagulación. Federación Mundial de Hemofilia. Manual de laboratorio. 55 pp. 2000.
- [34] KUNICKI, T.J.; NEWMAN, P.J. The molecular immunology of human platelet proteins. **Blood.** 80 (6): 1386-1404. 1992.
- [35] LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275. 1951.
- [36] MARCUSSI, S.; BERNARDES, C.P.; SANTOS-FILHO, N.A.; MAZZI, M.V.; OLIVEIRA, C.Z.; IZIDORO, L.F.; FUL, Y.; ALMAGRO, A.J.; BRAZ, A.S.; FONTES, M.R.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M. Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops jararacussu* snake venom with anti-platelet activity. **Peptides.** 28 (12): 2328-39. 2007.
- [37] Mc EVER, R.P. The Clinical Significance of platelet membrane Glycoproteins. **Hemato-Oncol. Clin. Nort. Am.** 4: 87-105. 1990.

- [38] MOURA-DA-SILVA, A.M.; RAMOS, O.H.; BALDO, C.; NILAND, S.; HANSEN, U.; VENTURA, J.S.; FURLAN, S.; BUTERA, D.; DELLA-CASA, M.S.; TANJONI, I.; CLISSA, P.B.; FERNANDES, I.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; EBLE, J.A. Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. **Biochimie**. 90 (3): 484-92. 2008.
- [39] MINISTERIO DE SALUD Y DESARROLLO SOCIAL DE LA REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA. Anuario de Epidemiología y Estadística Vital. Caracas-Venezuela. Años 1997-2002.
- [40] NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S.; BARROS, M.A. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thromb. Haemost.** 41: 314-328. 1979.
- [41] PAINE, M.J.; DESMOND, H.P.; THEAKSTON, R.D.; CRAMPTON, J.M. Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the desintegrin gene family. **J. Biol. Chem.** 267 (32): 22869-76. 1992.
- [42] PINTO, A.; ÂNGULO, Y.; JIMÉNEZ, R.; LOMONTE, B. Isolation of bothrasperin, a disintegrin with potent platelet aggregation inhibitory activity, from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Rev. Biol. Trop.** 51 (1): 253-9. 2003.
- [43] RODRÍGUEZ, A.; UZCATEGUI, W.; AZUAJE, R.; AGUILAR, L.; GIRÓN, M. Análisis clínico y epidemiológico de los accidentes por mordeduras de serpientes del género *Bothrops* en Venezuela. **Rev. Cub. Med. Trop.** 52 (2): 90-4. 2000.
- [44] ROTH, G.J.; STANFORD, N.; MAJERUS, P.W. Acetylation of prostaglandin synthetase by aspirin. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 72: 3.073-3.076. 1975.
- [45] RUCAVADO, A.; SOTO, M.; SCHROEPFER, J. GUTIÉRREZ, J.M. Thrombocytopenia and platelet hypocoaggregation induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxins involved and their contribution to metalloproteinase-induced pulmonary hemorrhage. **Thromb. Haemost.** 94 (1): 123-31. 2005.
- [46] RUCAVADO, A.; SOTO, M.; KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.; FOX, J.W.; ESCALANTE, T.; GUTIÉRREZ, J.M. Characterization of aspercetin, a platelet aggregating component from the venom of the snake *Bothrops asper* which induces thrombocytopenia and potentiates metalloproteinase-induced hemorrhage. **Thromb. Haemost.** 85 (4): 710-5. 2001.
- [47] SÁNCHEZ, E.E.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; PALOMAR, R.; LUCENA, S.E.; BASHIR, S.; SOTO, J.G.; PÉREZ, J.C. Colombistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. **Arch. Toxicol.** 83(3): 271-9. 2009.
- [48] SANGER, F.; SHAW, D.C. Amino-acid sequence about the reactive serine of a proteolytic enzyme from *Bacillus subtilis*. **Nature**. 187: 872-3. 1960.
- [49] SANO-MARTINS, I.S.; SANTORO, M.L.; CASTRO, S.C.; FAN, H.W.; CARDOSO, J.L.; THEAKSTON, R.D. Platelet aggregation in patients bitten by the Brazilian snake *Bothrops jararaca*. **Thromb. Rev.** 87 (2): 183-95. 1997.
- [50] SANT'ANA, C.D.; BERNARDES, C.P.; IZIDORO, L.F.; MAZZI, M.V.; SOARES, S.G.; FULY, A.L.; ZINGALI, R.B.; MAGRO, A.J.; BRAZ, A.S.; FONTES, M.R.; STÁBELI, R.G.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M. Molecular characterization of BjussuSP-I, a new thrombin-like enzyme with procoagulant and kallikrein-like activity isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**. 90 (3): 500-7. 2007.
- [51] SAVI, P.; HERBERT, J.M.; PFLIEGER, A.M.; DOL, F.; DELEBASSEE, D.; COMBALBERT, J.; DEFREYN, G.; MAFFRAND, J.P. Importance of hepatic metabolism in the antiaggregating activity of the thienopyridine clopidogrel. **Biochem. Pharmacol.** 44 (3): 527-32. 1992.
- [52] SERRANO, S.M.; SAMPAIO, C.A.; MANDELBAUM, F.R. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom-II. Isolation of the metalloproteinase MPB. Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSP 1 and MSP 2. **Toxicon**. 31 (4): 483-92. 1993.
- [53] SMOLKA, M.B.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J.C. Purification and partial characterization of a thrombinlike enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**. 36 (7): 1059-1063. 1998.
- [54] SOUZA, D.H.F.; LEMMA, M.R.C.; FERREIRA, L.L.; FARIA, J.P.; OLIVA, M.L.V.; ZINGALI, R.B.; NIEWIAROWSKI, S.; SELISTREDE-ARAUJO, H.S. The Disintegrin-like Domain of the Snake Venom Metalloprotease Alternagin Inhibits $\alpha 2\beta 1$ Integrin-Mediated Cell Adhesion. **Arch. Biochem. and Bioph.** 384 (2): 341-350. 2000.
- [55] STÁBELI, R.G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G.B.; PIETRO, R.C.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, E.B.; SOARES, A.M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.** 12 (11): 2881-6. 2004.
- [56] SUMMARIA, L.; HSIEH, B.; GROSKOPF, W.R.; ROBBINS, K.C. The isolation and characterization of the S-carboxymethyl beta (light) chain derivative of human plasmin. The localization of the active site on the beta (light) chain. **J. Biol. Chem.** 242 (21):5046-52. 1967.

- [57] SUMMERS, D.F.; SHAW, E.N.; STEWART, M.L.; MAIZEL, J.V. Jr. Inhibition of cleavage of large poliovirus-specific precursor proteins in infected HeLa cells by inhibitors of proteolytic enzymes. **J. Virol.** 10 (4): 880-4. 1972.
- [58] WATANABE, L.; SHANNON, J.D.; VALENTE, R.H.; RUCAVADO, A.; ALAPE-GIRÓN, A.; KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.; FOX, J.W.; GUTIÉRREZ, J.M.; ARNI, R.K. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. **Protein. Sci.** 12(10):2273-81. 2003.
- [59] WILKINSON, L. Task Force on Statistical Inference, APA Board of Scientific Affairs. Statistical methods in psychology journals: guidelines and explanations. **Am. Psychol.** 54: 594–604. 1999.