

COMUNICACIONES

Citotoxicidad inducida por veneno de serpientes peruanas sobre fibroblastos de ratón

María Goñi¹; Abraham Vaisberg^{1,3} y Alfonso Zavaleta*^{2,3,4}.

- ¹ Laboratorio de Biología Celular y Virología, Depto. Académico de Microbiología, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.
² Laboratorio de Farmacología, Depto. Académico de Ciencias Fisiológicas, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.
³ Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt", Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.
⁴ Laboratorio Afiliado, Centro de Investigaciones en Salud "Hugo Lumbrales Cruz", Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú.
* Correspondencia: A.P. 5045, Lima 100, Perú.

(Rec. 12-II-1991. Acep. 11-X-1991)

Abstract: The cytotoxic effect of venoms from six crotalinae Peruvian snakes (*Bothrops atrox*; *B. brazili*; *B. pictus*; *B. barnetti*; *Lachesis m. muta* y *Crotalus durissus terrificus*) was studied in an in vitro system of BALB/c 3T3 fibroblasts grown in Dulbecco modified minimal essential medium at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ - 95% air. The viability of the cells was evaluated 24 hours after the treatment with the different venoms, using the method of exclusion of trypan blue. The six venoms produced cytotoxic effects at 24 hours on the 3T3 fibroblasts. The venom from *B. atrox* was the most potent (DE50=162 ng/ml) and that from *B. barnetti* the least (DE50=7182 ng/ml).

Key words: cytotoxicity, snake venom, *Bothrops*, *Lachesis*, *Crotalus*.

Los venenos de serpientes contienen una amplia gama de toxinas que desencadenan múltiples trastornos fisiopatológicos (edema, hemorragia, destrucción muscular, etc.), y alteran la fisiología de órganos y sistemas (cardiovascular, neuromuscular, hemostático y otros) (De la Vega *et al.* 1989, Tu 1977). Algunas de las acciones biológicas de los venenos de serpientes se han asociado con ciertas toxinas de los venenos, varias de las cuales tienen efectos tóxicos selectivos sobre tejidos animales. Por ejemplo, algunas toxinas de los venenos de *Naja* (Elapidae) y *Crotalus* (Viperidae) afectan preferentemente a las células sanguíneas y a ciertas células tumorales *in vitro* (Tu 1977, Karlsson 1979). Otras toxinas como las obtenidas del veneno de *Bothrops asper* (Viperidae), afectan principalmente a células linfocíticas (Lewis *et al.* 1990). En este trabajo evaluamos comparativamente la capacidad citotóxica de seis venenos de serpientes peruanas, sobre fibroblastos de ratón en un sistema *in vitro* de cultivo celular.

Se utilizó veneno desecado cristalizado obtenido en el serpentario del Instituto Nacional de Salud en Lima, Perú, a partir de ejemplares adultos de *Bothrops atrox* (Iquitos); *B. brazili* (Iquitos); *B. pictus* (Lima); *B. barnetti* (Lambayeque); *Lachesis m. muta* (Alto Marañón, Amazonas) y *Crotalus durissus terrificus* (Sandia, Puno). Para cada ensayo se prepararon soluciones individuales de 1 mg/ml en agua tridestilada. Las soluciones de veneno se esterilizaron por separado mediante filtración a presión positiva a través de filtros descartables Millex-GS (Millipore, USA) de 0.22 µm de diámetro de poro, y luego se almacenaron congelados a -70°C hasta su utilización. El día del ensayo, los venenos se diluyeron en medio de crecimiento estéril constituido por medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM) con 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (Sigma) y glutamina 2 mM (Gibco, USA); y suplementado con 0.5 ml de una solución 100X de vitaminas (MEM, Gibco, USA), (stock 100X 0.5 ml %) y 10% (V:V) Suero

Fetal Bovino (Flow, USA) previamente inactivado a 56°C durante 20 minutos (Freshney 1987).

En los ensayos de citotoxicidad se empleó la línea celular 3T3 de fibroblastos de ratón BALB/c desarrolladas en medio de crecimiento. Las células fueron cultivadas en frascos plásticos descartables de 150 cm² de superficie (Corning, USA), y en una incubadora a 37°C en atmósfera húmeda de 5% CO₂ y 95% aire. Previo al ensayo de citotoxicidad, las células se tripsinizaron y resuspendieron en medio de crecimiento y se contaron en una cámara de Neubauer, ajustándose la densidad celular del resuspendido a 150,000 células/ml de medio. Inmediatamente después se sembró alícuotas de 0.5 ml del resuspendido, en placas de plástico para cultivo de células (Corning, USA) de 35 mm de diámetro con 0.5 ml de medio de crecimiento. Las diluciones de veneno y NaCl 0.85% estéril (testigo) se ensayaron 24 horas después, en placas duplicadas incubadas en las condiciones antes descritas. Luego de 24 horas de tratamiento, las células se resuspendieron mediante tripsinización, y se procedió al conteo de las células vivas y muertas en cámara de Neubauer, según el método de exclusión del azul de Trypan que diferencia las células vivas de las muertas por la incorporación inmediata del azul de Trypan en las muertas (Kruse & Patterson 1973). El porcentaje de células vivas después del tratamiento con veneno, fue comparado con los conteos realizados en las placas control. El porcentaje de células muertas se obtuvo por diferencia. La Dosis Efectiva 50% (DE50) y las curvas teóricas de dosis respuesta citotóxica se estimaron según el método de Probits (Finney 1971), utilizando como parámetros el porcentaje de células muertas, y el logaritmo de la concentración final del veneno en las placas expresada en ng/ml.

Las células tratadas con dosis bajas de veneno durante 24 horas, mostraron vacuolización citoplasmática y presencia de formas atípicas. Dosis elevadas provocaron un grado variable de lisis celular, observándose restos de membranas flotando en el medio de cultivo. Los seis venenos estudiados presentaron efectos citotóxicos dosis-dependientes sobre los fibroblastos de ratón, y las curvas de dosis-respuesta citotóxica siguieron un patrón sigmoideo de actividad (Figura 1). El veneno de *Bothrops atrox* resultó el de mayor actividad citotóxica

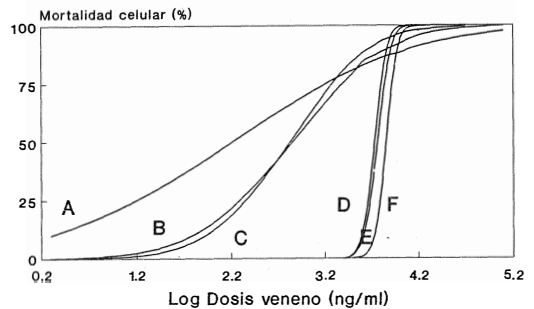


Fig. 1. Curvas sigmoideas de citotoxicidad de venenos de serpientes vipéridas sudamericanas de los géneros *Bothrops*, *Lachesis* y *Crotalus* calculadas a partir de las líneas de regresión log dosis-probit. A, *B. atrox*; B, *C. d. terrificus*; C, *L. m. muta*; D, *B. brazili*; E, *B. pictus*; F, *B. barnetti*.

(DE50=162 ng/ml), y el de *B. barnetti*, la menor (DE50=7200 ng/ml). Utilizando como criterio de clasificación los valores de las DE50 de los venenos, éstos se separaron en tres grupos: "alta actividad" (*B. atrox*), "moderada actividad" (*L. m. muta* y *C. durissus terrificus*) y "baja actividad" (*B. pictus*, *B. brazili* y *B. barnetti*) (Cuadro 1).

Nuestros resultados utilizando fibroblastos demuestran la presencia de toxinas citolíticas en los venenos de serpientes peruanas de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. La observación de cambios en la morfología celular es concordante con las observaciones de Thelestam (1979) quien planteó que la citólisis inducida por toxinas del veneno de serpientes ocurre debido a una interacción específica entre las toxinas y la membrana plasmática de las células sensibles. Esta requiere de tres etapas consecutivas: 1) la interacción de la citolisina con los receptores de la membrana celular; 2) el proceso lítico dado por la desorganización de la membrana; y 3) los procesos contrarios o de respuesta como la actividad de reparación en la membrana. Estas alteraciones conducirían a la formación de orificios funcionales en la membrana celular, lo cual podría producir efectos intracelulares secundarios, causando la muerte celular (Condrea 1979). Aún cuando en este estudio no se ha evaluado las posibles interacciones entre la tripsina aplicada 24 horas antes ó después del tratamiento con veneno de los fibroblastos, las diferencias dependientes de la tripsinización previa de las células pueden ser disminuidas con el empleo de los controles

CUADRO 1

Citotoxicidad de venenos de serpientes crotálicas peruanas sobre fibroblastos 3T3 de raton BALB/c.

Veneno	DE50* (ng/ml)	Límites fiduciales (ng/ml)
<i>Bothrops atrox</i>	162	114 - 230
<i>Lachesis muta muta</i>	672	556 - 811
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	702	563- 875
<i>Bothrops pictus</i>	5376	5218 - 5540
<i>Bothrops brazili</i>	5768	5582 - 5960
<i>Bothrops barnetti</i>	7182	6974 - 7396

* Dosis Efectiva 50% calculada según el método de probits.

salinos. No es posible descartar una probable interacción de la tripsina sobre las membranas celulares previamente dañadas por la acción del veneno, aún cuando las concentraciones de tripsina empleadas en este estudio son las convencionales para el tratamiento de células en cultivo (Freshney 1987).

AGRADECIMIENTOS

A María Salas por su colaboración. Esta investigación fue financiada parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) del Perú, y se realizó bajo convenio entre el Instituto Nacional de Salud del Perú y la Universidad Peruana Cayetano Heredia. A. Zavaleta es beneficiario del Programa de Apoyo al Investigador que patrocina el CONCYTEC del Perú.

REFERENCIAS

- Condrea E. 1979. Hemolytic effects of snake venoms, p. 448-479. *In* Lee, Chen-Yuan. (ed). Handbook of Exper. Pharmacology, 49: Snake venom. Springer Verlag, Nueva York. 1150 p.
- De La Vega, E., A. Zavaleta, N. Carrillo & L. Trelles. 1989. Accidentes producidos por animales ponzoñosos: serpientes venenosas del Perú, p. 169-188. *In*: Programa Nacional de Control de Zoonosis (ed.). Anales del Seminario Nacional de Zoonosis y Enfermedades de transmisión alimentaria. Ministerio de Salud; Lima, Perú.
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis. 3o Ed. Cambridge University, Londres. 333 p.
- Freshney, R.I. 1987. Culture of animal cells. A manual of basic technique. A. R. Liss, Nueva York. 127 p.
- Kruse, P.F. & M.K. Patterson. 1973. Tissue culture: Methods and application. Academic Press, Nueva York. 350 p.
- Karlsson E. 1979. Chemistry of protein toxins in snake venoms, p. 159-212. *In* Lee, Chen-Yuan. (ed.). Handbook of Exper. Pharmacology, 49: Snake venom. Springer Verlag, Nueva York. 1150 p.
- Lewis G.M., S.A. Minton & J.H. Slack. 1990. BALB/cAn B cells and T have distinct susceptibilities to cytotoxic effects of snake venom. *Toxicon* 28: 351-358.
- Thelestam, M. 1979. Mechanism of action of cytolytic toxins on human fibroblasts. *Toxicon* 17 (supl 1) : 127.
- Tu, A.T. 1977. Snake venoms: Chemistry and Molecular Biology. Wiley, Nueva York. 545 p.