

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL VENENO DE *Bothrops asper*
(SERPENTES: VIPERIDAE) EN LINFOCITOS HUMANOS Y CÉLULAS
MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA *IN VITRO*, MEDIANTE LOS
ENSAYOS DE ÍNDICE MITÓTICO, VIABILIDAD CELULAR Y APOPTOSIS**

ANDREA CORONEL TOVAR

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGÉNICA
POPAYÁN
2008**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL VENENO DE *Bothrops asper*
(SERPENTES: VIPERIDAE) EN LINFOCITOS HUMANOS Y CÉLULAS
MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA *IN VITRO*, MEDIANTE LOS
ENSAYOS DE ÍNDICE MITÓTICO, VIABILIDAD CELULAR Y APOPTOSIS**

ANDREA CORONEL TOVAR

Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de Biólogo

Mg. SILVIO MARINO CARVAJAL
Director

Bióloga ADRIANA MUÑOZ
Asesora

M.D. SANTIAGO AYERBE GONZÁLEZ
Asesor

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGÉNICA
POPAYÁN
2008

Nota de aceptación

Director Magíster Silvio M. Carvajal

Jurado Magíster Patricia Eugenia Vélez

Jurado Magíster Nilza Velasco Palomino

A mis padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

A Dios por hacerse presente a través de mis padres, las únicas personas de las que recibo sincero, incondicional, desinteresado y constante amor y apoyo. Les agradezco no sólo por darme la vida, sino también por ser un excelente ejemplo de la misma.

A mis hermanos por su compañía. A carito, una de las pocas personas que admiro por su inteligencia y a quien agradezco por ser mi modelo “cercano” a seguir, y por su calor. A Iván por esforzarse por mí, por su importante participación en la realización del estudio y por su constante colaboración.

A la profesora Patricia Vélez por permitirme acercarme a ella, por su valiosa amistad, por sus consejos, por su guía y por enseñarme no sólo biología, sino también a ser persona.

Al profesor Silvio Carvajal por aceptar ser mi director de trabajo de grado y a la profesora Nilza Velasco por su tiempo.

Al doctor Santiago Ayerbe, a don José Arnulfo, al GIHT y al CIBUC, por su importante contribución y colaboración en la ejecución del proyecto.

A Adriana Muñoz por su asistencia, tiempo, correcciones y sugerencias, y a Luis por acompañarla.

A mis dos grandes amigas: Diana Marcela Echeverry por su positivismo y ánimo, y a María Fernanda González por ponerme en sus agradecimientos. A las dos por su valiosa amistad.

A John Carlos, el laboratorista, por guiarme en los laboratorios durante toda la carrera, y a todas aquellas personas que de alguna u otra forma participaron e hicieron posible la realización de éste, mi trabajo de grado.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
2. ANTECEDENTES	17
3. MARCO TEÓRICO	20
3.1 VENENOS OFÍDICOS Y SUS COMPONENTES	20
3.2 ACTIVIDAD DE LOS VENENOS OFÍDICOS	20
3.3 CARACTERÍSTICAS Y GENERALIDADES DE <i>Bothrops asper</i>	21
3.3.1 Veneno de <i>Bothrops asper</i>	22
3.4 CICLO DE DIVISIÓN CELULAR	23
3.5 APOPTOSIS	23
3.5.1 Apoptosis y necrosis	24
3.5.2 Fases de la apoptosis	25
3.5.3 Significancia biológica de la apoptosis	26
3.5.4 Pruebas para la detección de apoptosis	26

3.6 ACERCA DEL ESTUDIO <i>IN VITRO</i>	27
3.7 LINFOCITOS Y CÉLULAS MONONUCLEARES COMO MODELOS PARA EVALUAR LA CITOTOXICIDAD DEL VENENO	28
3.8 ENSAYOS ESCOGIDOS PARA DETERMINAR LA CITOTOXICIDAD DEL VENENO	28
4. OBJETIVOS	30
4.1 OBJETIVO GENERAL	30
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5. HIPÓTESIS	31
6. METODOLOGÍA	32
6.1 TIPO DE ESTUDIO	32
6.2 VARIABLES	32
6.3 EXTRACCIÓN DE VENENO	32
6.4 CUANTIFICACIÓN PROTEICA, ESTERILIZACIÓN Y DILUCIÓN DEL VENENO	33
6.5 TRATAMIENTOS	34
6.6 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE	34
6.7 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	34
6.7.1 Ensayo de índice mitótico (IM)	35
6.7.2 Selección de la concentración óptima de H ₂ O ₂ a emplear como control positivo	36

6.7.3 Ensayo de viabilidad con azul de trypan	37
6.7.4 Ensayo de apoptosis	37
6.8 DISEÑO EXPERIMENTAL	38
6.8.1 Ensayo de IM	38
6.8.2 Selección de la concentración óptima de H ₂ O ₂ a emplear como control positivo	39
6.8.3 Ensayo de viabilidad celular con azul de trypan	39
6.8.4 Ensayo de apoptosis	40
6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
7. RESULTADOS	42
7.1 CUANTIFICACIÓN PROTEICA DEL VENENO	42
7.2 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	42
7.2.1 Ensayo de índice mitótico (IM)	42
7.2.2 Selección de la concentración óptima de H ₂ O ₂ a emplear como control positivo	43
7.2.3 Ensayo de viabilidad celular con azul de trypan	45
7.2.4 Ensayo de apoptosis	46
8. DISCUSIÓN	51
8.1 CUANTIFICACIÓN PROTEICA DEL VENENO	51

8.2 CITOTOXICIDAD DEL VENENO	51
8.2.1 Efecto citotóxico del veneno sobre el índice mitótico (IM)	52
8.2.2 Efecto citotóxico del veneno sobre la viabilidad celular	55
8.2.3 Efecto apoptótico inducido por el veneno	59
8.2.4. Efecto necrótico inducido por el veneno	64
8.2.5 Correlación entre índice mitótico, viabilidad celular y apoptosis	66
9. CONCLUSIONES	69
BIBLIOGRAFÍA	70

LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1. Promedios de IM, con sus respectivas medidas de variabilidad y n repeticiones, obtenidos para cada una de las concentraciones experimentales del veneno de *Bothrops asper* 42

Tabla 2. Porcentaje promedio de células apoptóticas y necróticas, con sus respectivas medidas de variabilidad y n repeticiones, obtenido para las concentraciones de H_2O_2 44

Tabla 3. Porcentaje promedio de células viables, con sus respectivas medidas de variabilidad y n repeticiones, para las concentraciones experimentales de veneno 45

Tabla 4. Porcentaje promedio de células viables, apoptóticas y necróticas, con sus respectivas medidas de variabilidad y n repeticiones, obtenido para las concentraciones experimentales de veneno empleando la tinción con NA/BE 47

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. <i>Bothrops asper</i> (ejemplar del CIBUC)	22
Figura 2. Dentadura solenoglifa (característica de los vipéridos)	22
Figura 3. Diferencias morfológicas entre el proceso de apoptosis y necrosis	24
Figura 4. Morfología y coloración característica de las células apoptóticas (tinción con NA/BE)	27
Figura 5. Protocolo experimental para el ensayo de IM	39
Figura 6. Protocolo experimental para la selección de la concentración óptima de H ₂ O ₂	39
Figura 7. Protocolo experimental para la prueba de viabilidad celular	40
Figura 8. Protocolo experimental para la prueba de apoptosis	40
Figura 9. Concentración de veneno Vs. Índice mitótico (IM)	43
Figura 10. Variación del porcentaje de células apoptóticas y necróticas respecto de las distintas concentraciones de H ₂ O ₂	44
Figura 11. Morfología y coloración de células viables, apoptóticas y necróticas teñidas con NA/BE	46
Figura 12. Concentración de veneno Vs. porcentaje de células apoptóticas	48
Figura 13. Concentración de veneno Vs. porcentaje de células necróticas	48
Figura 14. Concentración de veneno Vs. porcentaje de células viables (tinción con NA/BE)	49

Figura 15. Porcentaje de células viables Vs. porcentaje de células apoptóticas	50
Figura 16. Porcentaje de viabilidad celular con NA/BE Vs. porcentaje de viabilidad celular con azul de trypan	50
Figura 17. Vías hipotéticas de interacción entre las PLA ₂ y la bicapa fosfolipídica	56
Figura 18. Hidrólisis de fosfolípidos de membrana por vía directa e indirecta	57
Figura 19. Daño celular, detención del ciclo de división, apoptosis y carcinogénesis	67

INTRODUCCIÓN

Debido a sus efectos fisiopatológicos y a sus propiedades farmacológicas, los venenos ofídicos, uno de los compuestos biológicos mejor caracterizados por su acción biológica en humanos (Marshall, 2005), son sustancias ampliamente estudiadas a nivel toxicológico, médico, clínico y farmacológico. Éstos, además de ser ricos en una variedad de proteínas con y sin actividad enzimática, están constituidos por péptidos biológicamente activos que pueden actuar selectivamente sobre ciertos canales iónicos o pueden interferir con el sistema hemostático. En función de su composición, los venenos ofídicos muestran actividades diferentes sobre diversos sustratos tisulares, provocando así mismo varias lesiones a nivel local y sistémico. Particularmente, los venenos bothrópicos se caracterizan por su efecto hemorrágico y miotóxico, atribuido principalmente a la acción de las metaloproteinasas (SVMP), fosfolipasas A₂ (PLA₂) y L-amino ácido oxidasas (LAAOs), responsables del cuadro clínico que se presenta por envenenamiento: hemorragias, mionecrosis, alteración y destrucción de diversos tejidos (Gutiérrez y Rucavado, 2000). Se ha demostrado que además de componentes fibrinolíticos, los venenos bothrópicos contienen también componentes citotóxicos (Markland, 1998; Rodríguez-Acosta, 2001). De acuerdo con los estudios realizados, el efecto citotóxico de las toxinas ofídicas asociados con alteraciones en el ciclo de división, viabilidad celular y apoptosis, ocurren en respuesta a la acción directa o indirecta de éstas toxinas.

La toxicidad del veneno de serpientes generalmente se asocia con los efectos fisiopatológicos producidos en el envenenamiento. En la actualidad, se han venido adelantando estudios que evalúan y correlacionan la citotoxicidad de los componentes proteicos del veneno con sus efectos sobre el ciclo proliferativo, la viabilidad, muerte celular apoptótica e incluso antitumoral, pero ninguno realizado con el veneno crudo de *Bothrops asper* en un modelo “*in vitro*” o “*in vivo*”, utilizando en conjunto los parámetros que se emplean en éste estudio, éstos son: índice mitótico, viabilidad celular y apoptosis. Por lo que ésta investigación es la primera en su tipo que reporta la actividad citotóxica evaluada con los biomarcadores antes mencionados.

Hasta el momento, se ha demostrado la existencia de componentes proteicos presentes en el veneno de serpientes con actividad citotóxica capaz de bloquear el ciclo de división, disminuir la viabilidad e inducir la eliminación de células neoplásicas por apoptosis, “*in vitro*” e “*in vivo*”. Aunque son muy pocos los estudios que se han realizado con el veneno crudo, algunos también asocian su efecto citotóxico con las anteriores características.

Con el fin de encontrar similitud con las sustancias que comúnmente se emplean en el tratamiento contra el cáncer, cuyo principal mecanismo de acción es la inducción de apoptosis (Zhang and Cui, 2007), bloqueo del ciclo celular (Goepfert *et al.*, 1995), y disminución de la viabilidad de las células tumorales (Puttonen *et al.*, 2007), y en búsqueda de que el veneno de *B. asper* tenga potencial uso como terapia alternativa de la enfermedad, el objetivo de este estudio es determinar el efecto citotóxico del veneno de *Bothrops asper* en linfocitos y células mononucleares de sangre periférica humana cultivadas “*in vitro*”, mediante los ensayos de índice mitótico (IM), viabilidad

celular con azul de trypan, y apoptosis mediante microscopía de fluorescencia empleando la técnica de tinción con Naranja de Acridina/Bromuro de Etidio (NA/BE).

Por medio del presente trabajo se busca: primero, saber si el veneno de *Bothrops asper* altera el índice mitótico de los linfocitos de sangre periférica cultivados “*in vitro*”, segundo, establecer asociación entre la viabilidad celular de las células mononucleares de sangre periférica y las concentraciones de veneno que bloquean el ciclo celular, y por último determinar asociación entre la frecuencia de células apoptóticas y las concentraciones de veneno (alta, media y baja) que disminuyen el porcentaje de viabilidad celular.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La gran incidencia de accidentes ofídicos causados por mordeduras de serpientes venenosas representa un serio problema de salud pública e incluso una de las mayores preocupaciones a nivel mundial. Además, la poca, tardía, y a veces inadecuada atención médica contribuyen al empeoramiento de este problema, incluyéndolo en la categoría de enfermedades desatendidas. En razón a la alta incidencia e impacto del envenenamiento ofídico tanto en términos de morbilidad como de mortalidad; especialmente en las regiones tropicales y subtropicales de los países de Asia, África y América Latina, en donde la mayoría de la población afectada es generalmente la que habita en áreas rurales, en particular la del sector agrícola; la mayoría de los estudios realizados con venenos crudos y fracciones proteicas aisladas de los mismos se han enfocado en el entendimiento y conocimiento de los componentes y los mecanismos posiblemente responsables o implicados en los efectos fisiopatológicos que se presentan en el cuadro clínico del envenenamiento ofídico (Angel, 1983; Chippaux, 1998; Pineda y Renjifo, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2006), razón por la cual los venenos de serpientes se encuentran entre las toxinas naturales mejor caracterizadas farmacológicamente por su efecto en humanos (Marshall, 2005). No obstante, se han venido adelantando estudios que asocian la citotoxicidad del veneno con su actividad capaz de alterar el ciclo de división y la viabilidad celular, inducir apoptosis y necrosis, pero aún así, éstos siguen relacionando tal actividad con la fisiopatología producida por envenenamiento, y a pesar de que se ha estudiado el potencial efecto anticáncer de las toxinas ofídicas en términos de los efectos citotóxicos antes mencionados, estas investigaciones continúan siendo escasas.

En el campo médico, toxinológico y toxicológico, el efecto tóxico y citotóxico del veneno de *Bothrops asper* es bien conocido por las manifestaciones locales (edema, dolor, dermonecrosis, hemorragias en la piel, ampollas, mionecrosis) y sistémicas, cuando el veneno pasa a la sangre (hemorragia, hipotensión, alteraciones en la coagulación, nefrotoxicidad y trombocitopenia), producidas por su inoculación en la víctima (Otero, 1994; Rucavado *et al.*, 2000; Gutiérrez, 2002; Otero *et al.*, 2002). Debido a su poder tóxico, el veneno de esta serpiente ha llegado a ser considerado como uno de los venenos más importantes por su influencia en la patología humana (Angel, 1983).

A nivel nacional y departamental existen varios reportes de ofidismo; incluyendo los causados por las serpientes del género *Bothrops*, que son las principales responsables de la mayoría de accidentes ofídicos (90-95% de las mordeduras reportadas por año) en Latinoamérica, incluyendo Colombia, y en el departamento del Cauca, registrando casos con alto grado de envenenamiento y mortalidad (Otero, 1994; Ayerbe, 2000; Rucavado *et al.*, 2000; Gutiérrez, 2002; Otero *et al.*, 2002; Pineda y Renjifo, 2002). Sin embargo, éstos describen los casos de ofidismo desde su epidemiología, el punto de vista clínico, estadístico e incluso desde su microbiología, pero ninguno relaciona o asocia el efecto citotóxico del veneno en términos de su índice mitótico, viabilidad celular y apoptosis. A pesar de que se han realizado estudios que asocian el efecto citotóxico de los venenos de serpientes con su capacidad de bloquear el ciclo, disminuir la viabilidad celular e inducir apoptosis, y que incluso identifican como agentes responsables de tal actividad a las mismas toxinas (hemorraginas, miotoxinas y componentes fibrinolíticos)

involucradas en la patología desencadenada por envenenamiento, éstos se han llevado a cabo en otros países y siguen siendo escasos, a tal punto que es muy poco lo que se conoce y de hecho ningún estudio desarrollado en Colombia que identifique dicho efecto para ninguna especie de serpiente, así como no hay reporte alguno que identifique los mismos efectos en un mismo trabajo para el veneno de *Bothrops asper* en particular, tampoco que demuestre asociación entre estas variables (índice mitótico, viabilidad celular y apoptosis), ni que establezca su relación con el mecanismo de acción propio de las sustancias anticáncer.

El presente estudio adquiere importancia y se hace pertinente en la medida que puede ser un punto de partida para la generación de nuevo conocimiento acerca del efecto citotóxico del veneno de *Bothrops asper*, evaluado bajo los parámetros de índice mitótico, viabilidad celular y apoptosis. De ahí que sea posible considerar su potencial utilidad en el tratamiento contra enfermedades como el cáncer, una de las condiciones patológicas que afectan a gran parte de la población a nivel mundial, nacional y regional, con una elevada tasa de incidencia y mortalidad (Murillo y Gamboa, 2006). Consideración que en absoluto no es salida de contexto, si se tiene en cuenta que: primero, las sustancias que poseen propiedades anticáncer matan a las células bloqueando o impidiendo el avance de su ciclo, induciendo apoptosis y disminuyendo su viabilidad; segundo, se ha demostrado que algunas toxinas ofídicas tienen la capacidad de inducir la eliminación de células neoplásicas a través de la apoptosis; y tercero, muchos componentes proteicos del veneno de diferentes especies de serpientes han dado origen a compuestos de uso médico y farmacológico (Angel, 1983; Campbell y Lamar, 2004). Así pues, este trabajo no sólo amplía el conocimiento acerca de las propiedades citotóxicas del veneno de *B. asper*, sino que también contribuye a la investigación de efectos farmacológicos, preventivos y posiblemente terapéuticos de las toxinas ofídicas que puedan ser útiles y tener gran probabilidad de éxito en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la supervivencia y muerte celular.

Mediante la ejecución de este proyecto se pretende responder a las siguientes preguntas: ¿el veneno de *B. asper* puede alterar el ciclo celular generando disminución en el índice mitótico en linfocitos de sangre periférica cultivados “*in vitro*”? ¿el veneno de *Bothrops asper* tiene efecto citotóxico que cause disminución de la viabilidad de las células mononucleares de sangre periférica cultivadas “*in vitro*”? ¿el veneno de *Bothrops asper* tiene efecto citotóxico capaz de inducir la muerte de las células mononucleares de sangre periférica cultivadas “*in vitro*” por apoptosis y/o por necrosis?.

2. ANTECEDENTES

El alto índice de accidentalidad causado por mordeduras de serpientes ha despertado el interés de la comunidad científica en áreas como la biología, toxicología, toxinología, química, medicina, clínica e incluso física, por conocer los componentes que confieren, no sólo el efecto tóxico y patológico, sino también farmacológico a los venenos ofídicos. Lo anterior ha impulsado la realización de numerosos estudios que buscan conocer y entender de forma clara esa mezcla compleja de componentes o fracciones que constituyen el veneno de serpientes.

En el siglo XX se empiezan a realizar diversos trabajos con mayor rigurosidad científica que los que se realizaban a principios del siglo XVIII, innovadores, más detallados y tal vez con resultados más contundentes acerca de los componentes moleculares, químicos y bioquímicos del veneno de serpientes, de sus propiedades y efectos, de su mecanismo de acción e incluso, mediante el empleo de métodos químicos de separación, de la actividad de ciertas toxinas y de algunas de sus fracciones proteicas sobre componentes celulares específicos y de su asociación con ciertos efectos del envenenamiento.

Las investigaciones hechas alrededor de 1980 arrojaban resultados interesantes sobre el efecto de las toxinas ofídicas en células sanguíneas, tejido hepático, muscular y cardíaco en cultivos “*in vitro*” y en animales, generalmente ratones, afirmando que los estudios “*in vitro*” o “*in vivo*” con venenos de serpientes no siempre mantienen una relación precisa o simulan la fisiopatología del envenenamiento en el ser humano. Más bien, las propiedades tóxicas de los venenos ofídicos corresponden a las sustancias proteínicas o a los fosfolípidos con fuerte actividad enzimática presentes en ellos (Angel, 1983).

Hasta 1995 se habían realizado numerosos trabajos en los que se aislaron diversas miotoxinas de naturaleza básica a partir del veneno de serpientes del género *Bothrops*, todas ellas pertenecientes al grupo de las fosfolipasas A₂, siendo componentes cuantitativamente importantes en el veneno de algunas especies del género. En estudios “*in vivo*” se demostró que la inyección intramuscular de estas miotoxinas ejercía efecto rápido y selectivo sobre el músculo esquelético, desencadenado por una serie de eventos drásticos iniciados probablemente a nivel de la membrana plasmática, causando finalmente necrosis. Tal especificidad contrastaba con la habilidad de las miotoxinas bothrópicas de causar lisis en varios tipos celulares en cultivos “*in vitro*”. Las evidencias sugieren que estas toxinas interactúan con las membranas biológicas a nivel electrostático y penetran la bicapa lipídica, causando desestabilización y pérdida de permeabilidad selectiva a iones como el Ca⁺⁺, eventos característicos del proceso de necrosis muscular (Gutiérrez y Lomonte, 1995).

En un experimento “*in vitro*” con células endoteliales de bovino se evaluó la actividad de BaH1, la principal toxina hemorrágica purificada del veneno de *Bothrops asper*. Mediante la incubación de la hemorragina con las células endoteliales, luego de efectuar el ensayo de viabilidad celular con azul de trypan, se demostró que el efecto de BaH1 no es directamente citotóxico sobre las

células endoteliales (Borkow *et al.*, 1995). Aunque las investigaciones realizadas en esa época eran numerosas y permitieron conocer ciertos aspectos específicos del veneno, tales como: toxicidad renal, estructura de las toxinas, mecanismos de acción e identificación y características diagnósticas de los ofidios envueltos en los accidentes, toxicidad muscular, acción cardiovascular y efectos hematológicos, entre otros; eran pocos los trabajos en los que se correlacionaba el mecanismo molecular de la acción del veneno ofídico al conocimiento de los efectos toxicológicos del envenenamiento (Rodríguez-Acosta, 2001).

En 1986 se estudió la actividad farmacológica de una fosfolipasa A aislada del veneno de *Bothrops asper* en células de músculo esquelético de ratón. Al evaluar la misma toxina en cultivos “*in vitro*” se encontró que no era citotóxica en eritrocitos y en linfocitos, y que no inducía respuesta mitogénica en linfocitos (Gutiérrez *et al.*, 1986).

En relación a las búsqueda de factores con efecto anticáncer presentes en los venenos de serpientes, ésta se viene haciendo desde el año 1933 cuando Calmette *et al.*, reportó actividad antitumor del veneno de *Naja naja* sobre células de adenocarcinoma (Calmette *et al.*, 1933). Desde entonces se ha reportado acción antineoplásica de venenos procedentes de diferentes especies de serpientes. En ese mismo año, en un estudio realizado con el veneno de serpientes de la familia Viperidae (*Crotalus atrox*, *Viper ammodytes*, entre otras) y Elapidae (*Naja naja kaouthia*) en células del endotelio vascular en cultivo, se determinó la capacidad de inducir apoptosis en las mismas células del veneno de las primeras, cuya actividad es principalmente hemorrágica, contrastando con la actividad del veneno de los elápidos, que fue necrótica para las mismas células en las dosis más altas de veneno (Araki *et al.*, 1993). Dos años más tarde, las investigaciones de Maung-Maung *et al.* hechas con una toxina purificada del veneno de *Daboia russelli siamensis*, mostraron citotoxicidad sobre células HeLa (Gomes *et al.*, 2007). De forma similar, en un estudio posterior realizado con la serpiente coreana *Agkistrodon halys*, se logró identificar a la L-amino ácido oxidasa como sustancia responsable de la inducción de apoptosis en varias líneas de cultivos celulares: L1210 (mouse lymphocytic leukemia), MOLT-4 (human T-cell leukemia), RPMI1788 (human hematopoietic cell), HL60 (human promyelocytic cell), y HeLa (human epitheloid carcinoma) (Sung-Min y Doo-Sik, 1996).

Posteriormente, en un estudio realizado con una lecitina del veneno de *Bothrops jararacussu* (BJcuL), se observó que ésta suprimía la viabilidad de las líneas celulares de humano de carcinoma de ovario (OVCAR-5) y de cáncer de mama (MDAMB-435), en otras líneas celulares tumorales de humano (glioblastoma, células leucémicas y carcinoma de la vejiga urinaria) y en células del endotelio cerebral de bovino, sugiriendo que BJcuL puede ser vista como herramienta útil para combatir la progresión tumoral por la inhibición de células tumorales y del crecimiento de células endoteliales (De Carvalho *et al.*, 2001).

En el año 2006 se estudió la citotoxicidad del veneno crudo y de LmTX-I, una isoforma de la PHLA₂ purificada de *Lachesis muta muta*, en las líneas celulares MDCK (Madin-Darby canine kidney) y de músculo esquelético (C2C12) y se encontró que el veneno crudo de la serpiente disminuía significativamente la viabilidad celular de la primera línea celular y que LmTX-I no tuvo citotoxicidad en ninguna de las líneas celulares. Posterior a la incubación de las células MDCK con el veneno de *L. m. muta*, los análisis morfométricos de reacción nuclear de Feulgen

revelaron condensación en la cromatina (picnosis), aparente reducción de células en mitosis y fragmentación celular, demostrando que el veneno de *L. m. muta* tiene citotoxicidad sobre células MDCK (Damico *et al.*, 2007).

En un estudio reciente en el año 2007, al evaluar *drCT-I*, una toxina proteica termoestable aislada del veneno de la serpiente hindú *Daboia russelli russelli*, en células EAC (Ehrlich Ascites Carcinoma) “*in vitro*” y células leucémicas humanas “*in vivo*”, se observó que las células EAC disminuían significativamente en los ratones tratados con *drCT-I*, mientras que la viabilidad celular y el tiempo de supervivencia del tumor en los ratones no tratados (grupo control), aumentaba significativamente. El estudio de inhibición de crecimiento celular “*in vitro*” de células leucémicas mostró una inhibición en el porcentaje del mismo en los cultivos tratados con *drCT-I* en relación al de los cultivos no tratados. La reducción de los valores en el ensayo MTT (prueba de actividad de succinato-deshidrogenasa) después del tratamiento con *drCT-I* indicó su efecto citotóxico, lo que confirma su actividad antiproliferativa. Las observaciones en microscopio electrónico de barrido y en microscopio confocal de las células leucémicas humanas, después del tratamiento con *drCT-I*, indicaron cambios celulares característicos de la apoptosis (envaginaciones en la membrana celular, perforaciones y fragmentación nuclear). Efecto que luego fue comprobado mediante análisis con citometría de flujo. Los resultados obtenidos en los experimentos “*in vivo*” e “*in vitro*” sugieren que *drCT-I* posee potencial efecto anticáncer (Gomes *et al.*, 2007).

En un trabajo semejante a esta investigación, se estudió el efecto citotóxico de una fracción proteica aislada del veneno de *Bothrops asper*, mediante los biomarcadores de índice mitótico (IM) y apoptosis. Al evaluar el efecto citotóxico de Lys49, una fosfolipasa A₂ homóloga del veneno de *B. asper*, demostraron que la miotoxina tenía capacidad de inducir proliferación celular, apoptosis y necrosis empleando una línea celular linfoblastoide (CRL-8062) “*in vitro*” (Mora *et al.* 2005).

A la fecha, existen numerosos y diversos estudios (“*in vivo*” e “*in vitro*”) que demuestran y comprueban la actividad lítica y tóxica, no sólo del veneno de serpientes del género *Bothrops*, sino también de otras serpientes (vipéridos, crotálicos y elápidos). Incluso, estudios recientes realizados con toxinas ofídicas aisladas, demuestran que éstas tienen efecto sobre la proliferación, viabilidad y muerte celular apoptótica y necrótica, y lo correlacionan con la actividad antitumoral de los compuestos que se utilizan en el tratamiento contra el cáncer. Sin embargo, en un estudio “*in vivo*” realizado en el departamento del Cauca, se logró determinar el efecto citotóxico del veneno de *Bothrops asper* en eritrocitos de sangre periférica de ratones, las mismas células en las que se identificó su efecto genotóxico mediante el biomarcador de micronúcleos. Para explicar la citotoxicidad eritropoyética evaluada en los ratones objeto de experimentación, el trabajo sugiere la presencia de compuestos citotóxicos en el veneno de la serpiente capaces de producir muerte celular y bloqueo del ciclo normal de división (Yasnó, 2005). No obstante, hasta el momento no se ha evaluado, por lo menos en Colombia, el efecto citotóxico del veneno crudo de *Bothrops asper* a través del índice mitótico, viabilidad celular y apoptosis, o si se ha realizado un estudio semejante, no se encuentra reportado en la literatura. Razón por la cual, los resultados aquí obtenidos, constituyen el primer reporte de la actividad citotóxica del veneno crudo de *Bothrops asper* asociada con el ciclo de división, viabilidad y muerte celular apoptótica.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 VENENOS OFÍDICOS Y SUS COMPONENTES

De los animales venenosos, indudablemente las serpientes poseen el aparato más sofisticado para inocular su veneno. Éste se encuentra formado principalmente por glándulas productoras de veneno, conductos que transportan el veneno acumulado, colmillos en forma de aguja hipodérmica encargados de expulsarlo y músculos alrededor de la glándula que accionan todo el conjunto (Angel, 1983; Pineda y Renjifo, 2002). Básicamente el veneno es saliva modificada cuyas funciones principales son las de inmovilizar a la presa e iniciar el proceso de digestión. Su composición puede variar a nivel inter e intraespecífico de acuerdo con la edad, hábito, dieta, sexo, diferencias entre poblaciones, localidad geográfica, época del año y variaciones climáticas (Chippaux *et al.*, 1991; Mattison, 1995; Rodríguez-Acosta, 2001; Marshall, 2005).

El veneno se define como una secreción viscosa blanco-amarillenta de gran complejidad química, compuesta por proteínas no enzimáticas, enzimas, péptidos, nucleótidos, aminoácidos libres, lípidos, azúcares fosforilados, iones metálicos como el Na^+ , K^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Co , detritus celulares, bacterias, carbohidratos principalmente en forma de glicoproteínas, nucleósidos y aminas biogénicas (Angel, 1983). Los péptidos y las proteínas representan aproximadamente el 90-95% del peso seco del veneno. De los cationes presentes en el veneno, el sodio es el más frecuente pero su acción es aún desconocida. El zinc y el calcio se encuentran en muchas metaloproteinasas, un grupo de enzimas proteolíticas o proteasas descritas en los venenos ofídicos, especialmente en los de la familia Viperidae. Los proteomas de los venenos de serpientes incluyen toxinas con diversos efectos fisiopatológicos. Dentro de los componentes proteicos responsables de los efectos del envenenamiento se encuentran las hemotoxinas, miotoxinas, neurotoxinas, cardiotoxinas, citotoxinas, enzimas proteolíticas, mionecróticas, hemorrágicas y hemolíticas. Entre las enzimas comúnmente cuantificadas están las nucleotidasas (Francischetti *et al.*, 1998; De Roodt *et al.*, 2003; Valadão and Santoro, 2008) fosfolipasas A_2 (PLA_2), L-aminoácido oxidasas (LAAOs), metaloproteinasas (SVMP), fosfodiesterasas, fosfomonoesterasas, fosfatasas, acetilcolinesterasas, hialorunidasas, estererasas y la enzima tipo trombina. Sin embargo, no todas estas enzimas se encuentran en todos los venenos (Mattison, 1995; Markland, 1998; Rodríguez-Acosta, 2001; Pineda y Renjifo, 2002; Campbell y Lamar, 2004; Marshall, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2006).

3.2 ACTIVIDAD DE LOS VENENOS OFÍDICOS

En función de su composición, los venenos ofídicos pueden tener actividad neurotóxica, proteolítica, hemorrágica, coagulante, hemolítica y miotóxica. No obstante, ningún veneno tiene efecto totalmente hemotóxico, miotóxico o neurotóxico. Tales efectos predominan en ciertas especies (Angel, 1983; Campbell y Lamar, 2004). De esta manera, la actividad neurotóxica se ha descrito en los géneros *Crotalus* (crotoxina, crotamina), *Micrurus* (alfa y beta-neurotoxina) y

Lachesis. Todas estas neurotoxinas, probablemente relacionadas con la familia de las fosfolipasas pero más evolucionadas y a veces con multicomponentes, generalmente afectan la unión neuromuscular produciendo parálisis flácida, aunque no todos tienen el mismo sitio y modo de acción. De esta manera, existen neurotoxinas pre y postsinápticas de la unión neuromuscular (frecuentes en los venenos elapídicos, cuyo componente principal es la alfa-bungarotoxina) y, aunque éstas últimas son menos potentes, son de acción más rápida y potencialmente más letales que las primeras. Sin embargo, las kappa-toxinas y otro tipo de neurotoxinas, no sólo actúan sobre la placa neuromotora causando parálisis flácida, sino que afectan el sistema nervioso autónomo y causan hiperestimulación de otras partes del sistema nervioso, respectivamente (Rodríguez-Acosta, 2001).

La actividad hemorrágica y proteolítica se encuentra asociada habitualmente a los venenos bothrópicos y lachésicos, aunque se han descrito también en algunos crótalos. En general, las afecciones en la coagulación sanguínea, células endoteliales y plaquetas, se debe a la interacción que ejercen las proteínas y péptidos biológicamente activos (en su mayoría de tipo trombina; enzimas proteolíticas específicas del grupo metaloproteinasas) del veneno de estas serpientes con el sistema hemostático humano (Markland, 1998; Rodríguez-Acosta, 2001, Pineda y Renjifo, 2002).

El efecto local (daño tisular en el sitio de la mordedura), observado en envenenamiento por mordedura de serpiente, en especial del género *Bothrops*, es producido por ciertos componentes del veneno tales como las hidrolasas, principalmente las metaloproteinasas, las fosfolipasas A₂ (enzimas homólogas a las fosfolipasas A₂ de los mamíferos. Se dividen en dos clases: PLA₂ de la clase I y de la clase II, presentes en elápidos y vipéridos, respectivamente (Angulo *et al.*, 2001)) y las hialorunidasas, cuya afección sobre las fibras musculares y alteración sobre la microvasculatura local y sistémica, le confieren al veneno actividad miotóxica, hemolítica y hemorrágica (Angel, 1983; Rodríguez-Acosta, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2006).

3.3 CARACTERÍSTICAS Y GENERALIDADES DE *Bothrops asper*

Conocida comúnmente con los nombres de “mapaná”, “equis”, “terciopelo”, “cuatro narices”, “taya equis”, “barba amarilla”, entre otros, la serpiente *Bothros asper* es la responsable de la mayoría de accidentes ofídicos en Colombia. Por ser una especie adaptable, ocupa una gran variedad de hábitats, pero se distribuye principalmente en el bosque húmedo tropical y áreas donde se practican actividades de agricultura. Su hábito tiende a ser nocturno y se refugian en las bases de los árboles, hojarasca o cuevas rocosas; su récord de distribución altitudinal va hasta los 2640m. Su longitud promedio en estado adulto es de 1.2-1.8m, aunque puede alcanzar una talla máxima de 2.5m, de color generalmente café, variando de tonalidad incluso en una misma región, con manchas en forma de triángulos divergentes hacia la región ventral que configuran dibujos en forma de equis en la parte dorsal; sus escamas son quilladas y pequeñas en el dorso de la cabeza, cuya forma es triangular y en donde se encuentran las fosetas termorreceptoras (Angel, 1983; Otero, 1994; Rucavado *et al.*, 2000; Pineda y Renjifo, 2002; Campbell y Lamar, 2004).

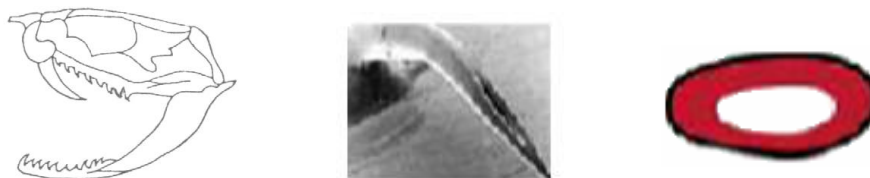
Figura 1. *Bothrops asper* (ejemplar del CIBUC)



Foto: Armando Folleco

De acuerdo con su dentadura, la serpiente *Bothros asper* y las demás serpientes de la familia Viperidae con colmillos inoculadores de veneno, se clasifican como solenoglifas. Se caracterizan por tener colmillos anteriores retractiles de hasta 4 cm de longitud perforados en su interior a modo de aguja hipodérmica y ligeramente curvos hacia atrás, lo cual les permite inocular el veneno en tejidos profundos (Angel, 1983; Otero, 1994; Pineda y Renjifo, 2002).

Figura 2. Dentadura solenoglifa (característica de los vipéridos)



Tomado de: CD-ROM Medicina Tropical y Angel, Rodrigo M. Serpientes de Colombia: Guía práctica para su clasificación y tratamiento del envenenamiento causado por sus mordeduras. En : Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín. Vol. 36. No. 1. (1983). p. 47.

3.3.1 Veneno de *Bothrops asper*. El veneno de esta especie de serpiente, al igual que el de los vipéridos en general, es principalmente hemorrágico y miotóxico, y está constituido por L-aminoácido oxidasas (LAAOs) (Stábeli *et al.*, 2007), metaloproteinasas (SVMP) y fosfolipasas A₂ (proteínas con una alta cantidad de residuos de aspartato y lisina en la posición 49) (Gutiérrez y Lomonte, 1995; Adrião-Escarso *et al.*, 2002; Gutiérrez y Rucavado, 2000), responsables de la patogénesis del daño tisular local (edema, ampollas, daño en la piel y mionescrosis), que ocasionalmente puede complicarse por infección bacteriana, y sistémico (hemorragia) producido por envenenamiento (Watanabe *et al.*, 2003; Rucavado *et al.*, 2000).

Las toxinas del veneno de *B. asper* pueden actuar de modo directo a través de la hidrólisis de la membrana plasmática de las células musculares y del sistema cardiovascular, o de modo indirecto a través de la liberación de mediadores endógenos como eicosanoides, aminas y péptidos vasoactivos, quininas y citoquinas (Angel, 1983; Gutiérrez *et al.*, 1998). Otros componentes proteicos encontradas en el veneno de *B. asper* son: batroxobina, proteinasas (en particular la enzima semejante a la trombina) y esterasas (Rodríguez-Acosta, 2001).

3.4 CICLO DE DIVISIÓN CELULAR

El ciclo celular se define como una serie ordenada de acontecimientos que conduce a la replicación de las células asegurándoles su supervivencia, e implica la duplicación de los cromosomas y la división celular. Esta serie de acontecimientos ocurre a través de cuatro fases principales: G₁, S, G₂ y M (mitosis), y adicionalmente G₀, considerada como una fase de reposo que puede durar horas, días, semanas, años o incluso permanentemente. El transcurso de una fase a la siguiente está regulado por un grupo de proteínas llamadas cinasas, ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (Cdk) (Lodish *et al.*, 2003; Houtgraaf *et al.*, 2006).

Existen diversos factores ambientales físicos (radiación ultravioleta (UV) y radiaciones ionizantes por ejemplo), químicos, biológicos e incluso intrínsecos (productos resultantes del metabolismo celular tales como las especies reactivas de oxígeno) que pueden interactuar con el genoma eucariota, activar los “checkpoints” del ciclo celular (G₁/S, S o G₂/M) y detenerlo. En ese momento la célula tiene tiempo de reparar el daño. Si éste es reparado efectivamente, la progresión del ciclo continúa, si es mal reparado la célula puede persistir con el daño o morir si el daño es muy drástico. En este orden de ideas, la homeostasis tisular depende tanto de la frecuencia de división de las células así como de su eliminación a través de la apoptosis, de ahí que la regulación de ambos procesos sea decisiva para el desarrollo normal de los organismos multicelulares, por lo que un descontrol de los mismos puede resultar en la persistencia de lesiones en el material genético que conducen a su inestabilidad y a la oncogénesis. Por una parte, las células en las que falla la reparación de una lesión en el ADN tienen a acumular exceso de daño en el mismo, y por otra parte, las células en las que el proceso de apoptosis es defectuoso tienden a sobrevivir con dicho exceso de daño y por lo tanto a acumularlo, generándose mutaciones que resultan en procesos neoplásicos (Bernstein *et al.*, 2002; Houtgraaf *et al.*, 2006).

3.5 APOPTOSIS

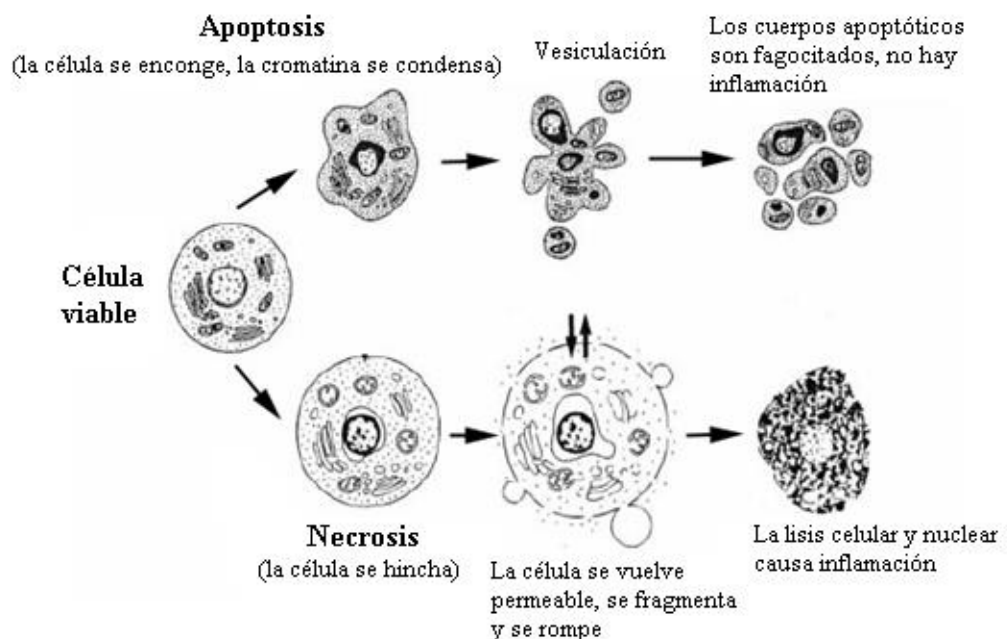
Este proceso, mediado por mecanismos celulares intrínsecos, hace referencia a un tipo de muerte celular genéticamente programada que ocurre a través de un conjunto de modificaciones morfológicas bien definidas (disminución del tamaño, condensación y fragmentación de la célula) (Lodish *et al.*, 2003; Cascales, 2003).

Durante la apoptosis se desencadena una cascada dependiente de energía no sólo de cambios morfológicos, sino también de cambios bioquímicos que conducen a la muerte y eliminación de la célula. Dichos cambios son característicos del proceso e incluyen condensación citoplasmática y

nuclear (la cromatina se condensa y se presenta en cantidades variables después de la fragmentación del núcleo), reducción del volumen celular, rompimiento en sitios específicos de proteínas celulares, fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos (vesículas de tamaño variable que contienen organelas y fragmentos nucleares), clivaje del ADN en fragmentos oligonucleosomales, y el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática, lo cual impide que se libere líquido intracelular al espacio intersticial y permite que las células que experimentan apoptosis sean fagocitadas por macrófagos o células vecinas. Las vías reguladoras de la apoptosis pueden ser extrínsecas, dependientes de receptor, o intrínsecas, dependientes de mitocondria, y cuentan con la participación de las caspasas (Willingham, 1999; Ortega-Camarillo *et al.*, 2001; Cascales, 2003; Gewies, 2003).

3.5.1 Apoptosis y necrosis. Son dos formas de muerte celular. La primera, se considera como fisiológica, es experimentada por células individuales y no implica la muerte de células vecinas en las que no se haya activado el programa de muerte. A través de la apoptosis se eliminan células que constituyen una amenaza para el normal funcionamiento del organismo. En este tipo de muerte las mitocondrias se abren y liberan citocromo C, la fosfatidilserina presente en la cara interna de la membrana se exterioriza y se une a receptores de las células que fagocitan los cuerpos apoptóticos. La necrosis es un tipo de muerte patológica y se caracteriza por la liberación de enzimas lisosomales, pérdida de la capacidad de la membrana plasmática para controlar el paso de agua e iones, rompimiento de la célula y liberación de líquido al espacio intercelular, inflamación y daño celular masivo, que puede ser causado por agentes físicos, químicos o biológicos, por falta de aporte nutricional, respiratorio o circulatorio, o por agresión mecánica (Ortega-Camarillo *et al.*, 2001; Cascales, 2003). El orden de los cambios morfológicos que ocurren durante la muerte celular por necrosis y apoptosis se muestra en la siguiente figura.

Figura 3. Diferencias morfológicas entre el proceso de apoptosis y necrosis



Adaptado de: Gewies, A. Introduction to Apoptosis. En : ApoReview. (2003). p. 5.

3.5.2 Fases de la apoptosis. Las células que mueren por apoptosis lo hacen a lo largo de cuatro fases: inductora, efectora, degradación y eliminación.

- **Fase de inducción o iniciación:** en esta fase las células reciben señales de apoptosis desde su interior o del exterior. Estos estímulos generan una respuesta similar en diferentes tipos celulares y en la mayoría de los casos convergen en una vía efectora común, y pueden ser: la ausencia de señales de supervivencia (factores de crecimiento, factores tróficos y glucocorticoides), radiaciones ionizantes, elevados niveles de oxidantes en el interior de la célula, luz UV, fármacos quimioterapéuticos, entre otros xenobióticos (Sweet *et al.*, 1999), daños en el ADN por oxidantes o por fallas en sus mecanismos de reparación, y la activación de receptores de superficie celular por ligandos de muerte específicos (vía extrínseca), tales como el TNF α que se une al receptor TNFR y el ligando FasL que se une al Fas. Durante esta fase se requiere de genes y grupos enzimáticos como las caspasas, cisteína proteasas que se presentan como zimógenos inactivos (procaspasas) y su activación, adquirida por proteólisis, es una etapa fundamental para la inducción y ejecución de la apoptosis cualquiera que sea el estímulo. Entre los genes inhibidores y promotores que participan en la regulación de la apoptosis, se incluyen los miembros de la familia Bcl-2, las caspasas, Apaf-1 (factor activador de proteasas apoptóticas), el protooncogen *c-myc* y el supresor de tumores p53 (Ortega-Camarillo *et al.*, 2001; Cascales, 2003; Gewies, 2003).
- **Fase efectora:** la mitocondria juega un papel importante en esta fase como reguladora de la apoptosis desencadenada por vía intrínseca, al integrar y propagar señales de muerte originadas en el interior de la célula tales como lesión en el ADN, estrés oxidativo y aumento patológico de Ca²⁺ intracelular. Estas señales causan disrupción de la membrana mitocondrial y la liberación de factores proapoptóticos a través de la apertura del poro de membrana o complejo del poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (PT), constituido básicamente por proteínas de la membrana interna como el traslocador de adenina nucleótido (ANT) y proteínas de la membrana externa como los canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC), lo cual provoca pérdida del potencial transmembranal ($\Delta\psi_m$) y la consecuente expansión, rompimiento y liberación de proteínas mitocondriales, desde el espacio intramembranal hacia el citosol, tales como el citocromo C, que al unirse con Apaf-1 forma el apoptosoma y desencadena la activación de la cascada de caspasas; el smac/diablo, que bloquea la acción de las proteínas inactivadoras de la apoptosis y el factor inductor de la apoptosis (AIF), que estimula la apoptosis a nivel nuclear. Este descenso de $\Delta\psi_m$ causa también pérdida del balance bioquímico de la célula, pues contribuye al incremento de especies reactivas de oxígeno y por tanto a la oxidación del glutatión, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. El control de estos cambios mitocondriales lo ejercen las proteínas proapoptóticas Bax y Bak, miembros de la familia Bcl-2, que al interactuar con VDAC, aceleran su apertura y permiten la liberación del citocromo C; el gen *bcl-2* y Apaf-1 (Ortega-Camarillo *et al.*, 2001; Cascales, 2003; Gewies, 2003).
- **Fase de degradación:** durante esta fase, a través de la intervención de enzimas catabólicas con actividad hidrolítica como las endonucleasas y las caspasas, ocurren principalmente dos eventos: degradación de proteínas y del ADN, y cambios estructurales en la membrana plasmática de las células apoptóticas a nivel de la fosfatidilserina (FS) para su reconocimiento

por macrófagos. En la fragmentación del ADN intervienen endonucleasas, y en la degradación de proteínas participan las caspasas. La degradación del ADN cromosómico en fragmentos oligonucleosomales es llevada a cabo por CAD (DNasa activada por caspasa), una endonucleasa que se encuentra en forma inactiva dentro del citoplasma formando un complejo con ICAD (inhibidor de CAD) y cuya activación, mediada por caspasas, desencadena la degradación proteolítica de diversos componentes fundamentales en el mantenimiento de la estructura celular, incluyendo elementos del núcleo y del citoplasma (β -actina, gelsolina), y proteínas implicadas en el metabolismo y reparación del ADN (Ortega-Camarillo *et al.*, 2001; Cascales, 2003).

- **Fase de eliminación:** en esta fase los cuerpos apoptóticos son eliminados o fagocitados por macrófagos que las reconocen a través de la fosfatidilserina que se ha expuesto en la cara exoplasmática de su membrana celular, evitando así la salida de contenido intracelular y por tanto la inflamación de tejidos circundantes (Ortega-Camarillo *et al.*, 2001; Cascales, 2003).

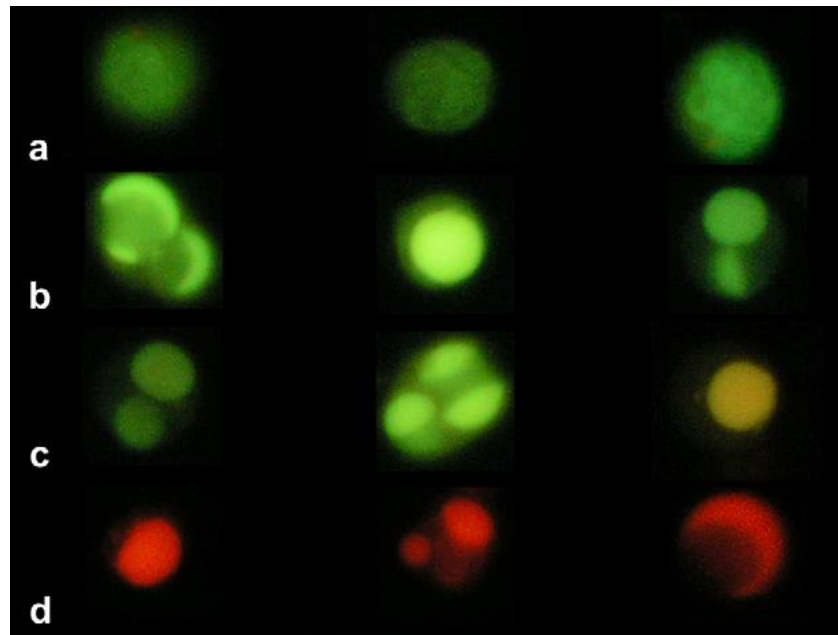
3.5.3 Significancia biológica de la apoptosis. Por medio de la apoptosis se controla el desarrollo y se mantiene la homeostasis tisular, pues a través de él se eliminan estructuras completas (la cola de los renacuajos y las membranas interdigitales de los embriones humanos), se regula el número de células de un organismo (el número de neuronas del sistema nervioso), se eliminan células anormales, dañadas, infectadas o transformadas y se puede evitar la persistencia de mutaciones múltiples que alteran el funcionamiento normal del organismo (Gewies, 2003).

El estar involucrada en diversos procesos de desarrollo, diferenciación, proliferación, regulación y función del sistema inmune, y la remoción de células defectuosas y que por tanto representan un peligro para el organismo, propone a la apoptosis como un proceso biológico de gran importancia, mediante el cual se protege la homeostasis en los tejidos y a la vez se asegura el estado de salud de un organismo. Por esta razón, la disfunción o desregulación de este evento implica una variedad de condiciones patológicas tales como el cáncer, el Alzheimer y el SIDA, asociadas con la supresión o sobreexpresión del mismo. En cuanto a la asociación entre apoptosis y cáncer, en los últimos años las evidencias han apuntado a aceptar el proceso de tumorigénesis, no sólo como resultado de la proliferación excesiva de células en respuesta a la activación de oncogenes, sino también como un proceso que depende de alteraciones en los “*checkpoints*” del ciclo celular y que involucran a la apoptosis. Debido al incremento en la tasa mitótica de las células durante las neoplasias y la disminución en la tasa de delección celular, y a la inhibición de la apoptosis en muchos tumores malignos, se plantea a la apoptosis como mecanismo clave en todas las facetas del cáncer; hiperplasia, transformación neoplásica, expansión tumoral y metástasis (Ortega-Camarillo *et al.*, 2001; Gewies, 2003).

3.5.4 Pruebas para la detección de apoptosis. Existen varias técnicas para la detección de apoptosis, cada una desarrollada para identificar los cambios morfológicos, bioquímicos y/o moleculares que caracterizan a este tipo de muerte celular. Algunos métodos son especiales para detectar cambios morfológicos (técnicas de microscopía con o sin fluorocromos), los cambios en la permeabilidad (técnicas de microscopía de fluorescencia empleando naranja de acridina, bromuro de etidio y yoduro de propidio, Hoechst) y la traslocación de la fosfatidilserina de la membrana plasmática (tinción con anexina V), la actividad de las caspasas (pruebas fluorogénicas), la fragmentación del ADN (prueba del TUNEL) y los cambios en la mitocondria

(tinción con fluorocromos tales como la rodamina) (Sweet *et al.*, 1999). El ensayo empleado en este estudio utilizando NA/BE en la tinción es apropiado para detectar los cambios morfológicos de la cromatina y los cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática (Baskić *et al.*, 2006). En la siguiente figura se muestra el color y la morfología que adquieren las células mononucleares cuando experimentan apoptosis identificadas mediante microscopía de fluorescencia utilizando tinción con NA/BE.

Figura 4. Morfología y coloración característica de las células apoptóticas (tinción con NA/BE)



a. Célula viable, b. y c. Apoptosis temprana, d. Apoptosis tardía. Tomado de: Baskić, D. *et al.* Analysis of cycloheximide – induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/Propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. En : Cell Biology International. Vol. 30 (2006); p. 928.

3.6 ACERCA DEL ESTUDIO “*IN VITRO*”

En condiciones naturales, la apoptosis se caracteriza, en su fase final, por la eliminación de células que han muerto para evitar inflamación de tejidos adyacentes mediante su fagocitosis por parte de macrófagos o células vecinas. El estudio “*in vitro*” es propicio e ideal porque facilita la posterior detección de células apoptóticas, pues en estas condiciones y por el tiempo de incubación, hay menos probabilidad de que éstas sean fagocitadas por sus vecinas (Häcker, 2000). Además, este tipo de sistema ofrece varias ventajas, entre las que cabe destacar la rapidez con la que se obtienen los resultados, la facilidad que brinda para reproducirlos, permite la cuantificación del daño inducido por el agente a estudiar, evita el sacrificio de animales, y, en ocasiones, reflejan o se aproximan a los resultados que se obtienen en los modelos “*in vivo*”, permitiendo que los resultados observados en los primeros sean extrapolables a los segundos, e incluso al sistema humano (Hassan *et al.*, 2007).

En contraste con lo anterior, se podría pensar que por tratarse de un sistema “*in vitro*”, la apoptosis, más que desencadenarse por el efecto citotóxico del veneno de *B. asper*, que es el objeto de evaluación de este estudio, podría ocurrir en respuesta a la pérdida de señales extrínsecas que mantienen la supervivencia de la célula “*in vivo*”, no obstante los linfocitos y las células del sistema inmune, en general, se mantienen viables, aún en condiciones “*in vitro*”, por la actividad de citoquinas y la expresión de la proteína Bcl-x_L; la misma que asegura que permanezcan viables “*in vivo*” debido a su función justamente antiapoptótica; le confiere confiabilidad y contundencia a los resultados aquí obtenidos, que como se verá mas adelante, apuntan al efecto apoptótico del veneno de *B. asper*. Adicionalmente, estas moléculas proteicas aseguran la supervivencia de las células mononucleares y linfocitos aún en condiciones bajas de ATP e incluso de poca proliferación celular (Rathmell and Thompson, 2002).

3.7 LINFOCITOS Y CÉLULAS MONONUCLEARES COMO MODELOS PARA EVALUAR LA CITOTOXICIDAD DEL VENENO

El motivo principal por el cual se decide tomar como modelo de citotoxicidad a los linfocitos de sangre periférica es por su sensibilidad, la misma que le confiere la propiedad de representar contundentemente y de forma cuantificable, los cambios inducidos por un xenobiótico en función del nivel de exposición. En este sentido, los linfocitos constituyen un modelo tan útil y confiable en la predicción de los efectos agudos producidos por un agente tóxico incluso en condiciones “*in vitro*”, hasta el punto que se proponen como sistema apropiado en la evaluación y desarrollo de drogas (Hassan *et al.*, 2007).

De otro lado, por ser la apoptosis un evento que depende del tipo celular, la razón fundamental por la cual se resuelve trabajar con células mononucleares de sangre periférica es porque éstas responden mejor o son más sensibles a un estímulo apoptótico en comparación con las células polimorfonucleares (Rathmell and Thompson, 2002; Baskić *et al.*, 2006). Evitándose así la interpretación de falsos negativos.

3.8 ENSAYOS ESCOGIDOS PARA DETERMINAR LA CITOTOXICIDAD DEL VENENO

En principio, las pruebas citotóxicas se realizan con el objetivo de identificar el grado de lesión celular manifestado en alteraciones de su ciclo de división, mecanismos de reparación, morfología o cinética, como consecuencia de exposición o tratamiento con un agente físico, químico o biológico. Una sustancia con efecto citotóxico puede matar a la célula, enfermarla o bloquearla impidiendo el avance de su ciclo proliferativo. De esta manera, el estudio del efecto del veneno de *Bothrops asper*, a través del ensayo de **índice mitótico** (definido como el número de células que se encuentran en división en relación al número total de células), provee información importante de su actividad citotóxica o “citostática” capaz de bloquear o detener el ciclo de división celular. A su vez, una detención en el ciclo proliferativo indica evidentemente que la célula y su ADN está sufriendo daño, y que ha dejado de dividirse para darse tiempo de repararlo e impedir que persista y resulte en una condición patológica (Fenech *et al.*, 1999). Así pues, el índice de proliferación celular se convierte en un biomarcador útil de citotoxicidad, debido a que permite identificar

algún bloqueo en el ciclo celular, ocasionado por lesiones a la célula en etapas premitóticas (generalmente en la fase de síntesis de ADN) o en la fase mitótica, especialmente en estructuras necesarias para la división celular como las fibras del uso acromático. Dado que el índice mitótico (IM) representa la frecuencia de células en división; que es mayor en las células tumorales que en las normales; la cuantificación del IM puede ser útil en la evaluación de compuestos con potencial actividad antitumoral (Ikeda *et al.*, 2000).

A través de la **viabilidad celular**, se puede inherentemente conocer el estado de supervivencia de la célula, condicionado a su vez por el grado de resistencia de la misma para sobrellevar y por tanto sobrevivir al daño inducido por un agente citotóxico. Generalmente los cambios en la viabilidad celular se asocian con alteraciones en la membrana celular, puesto que cuando la célula sufre un daño drástico, pierde su capacidad para controlar el flujo de iones y por tanto se vuelve aún más permeable a los compuestos que conducen finalmente a su muerte. Tan importante es la viabilidad, que se ha tomado en cuenta en el estudio de enfermedades o patologías asociadas con el incremento de muerte o supervivencia celular, y se considera útil en la evaluación del comportamiento e incluso efectividad (esta efectividad se refiere a la inducción de muerte o pérdida de viabilidad celular como consecuencia de un efecto anticancerígeno) de compuestos con capacidad de inducir muerte celular (Puttonen *et al.*, 2007).

Por último, a través de la muerte celular apoptótica, la célula no sólo asegura el transcurso normal de su ciclo de división, sino que también impide que una lesión en el ADN persista a través del mismo y se exprese en una mutación. Es por esta razón que la **apoptosis** se considera como un importante evento de eliminación de células neoplásicas y cancerígenas (Fenech *et al.*, 1999; Bernstein *et al.*, 2002; Hougraaf *et al.*, 2006). Con base en esto, y teniendo en cuenta algunos aspectos de toxicología comparativa y estimando el nivel de exposición de las células blanco a un agente tóxico; los cambios moleculares, bioquímicos y morfológicos que ocurren durante la apoptosis son útiles como biomarcadores de respuesta en la medida en que constituyen un monitor cualitativo y cuantitativo de estrés y toxicidad celular inducida por xenobióticos (Sweet *et al.*, 1999).

En cuanto a la técnica empleada para la detección de apoptosis, el principio de selección de la misma lo constituyen dos de los eventos característicos observados en el proceso; cambios morfológicos en el núcleo y cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática (expresados en la permeabilidad de la membrana al colorante empleado en la tinción), eventos que se han tenido en cuenta en ensayos que buscan la utilidad de la apoptosis como biomarcador de respuesta por exposición a xenobióticos, y que incluso se encuentran ya validados (Sweet *et al.*, 1999). Por medio de la técnica de microscopía de fluorescencia empleando NA/BE en la tinción, no sólo se pueden detectar células apoptóticas y sus estadios, sino que también se pueden diferenciar células viables y necróticas. Esto la constituye como una de las técnicas más empleadas, recomendadas, e incluso propuesta como el método correcto y apropiado para evaluar los cambios morfológicos nucleares de las células que experimentan apoptosis. Cabe mencionar que estas ventajas han predominado sobre otras técnicas de tinción igualmente utilizadas para detectar células apoptóticas tales como: May Grünwald – Giemsa, anexina V/ioduro de propidio y electroforesis en gel de agarosa (Baskić *et al.*, 2006).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto citotóxico del veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) en células mononucleares de sangre periférica cultivadas “*in vitro*”, mediante los ensayos de índice mitótico, viabilidad celular y apoptosis.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Cuantificar la concentración proteica del veneno de *Bothrops asper* mediante espectrofotometría con luz ultravioleta (UV).

Identificar el efecto citotóxico del veneno de *B. asper* mediante la prueba de índice mitótico (IM) en linfocitos de sangre periférica cultivados “*in vitro*”.

Determinar la viabilidad celular de las células mononucleares cultivadas “*in vitro*” y establecer su asociación con las concentraciones del veneno de *B. asper* que bloquean el ciclo celular.

Identificar el efecto apoptótico y necrótico del veneno de *B. asper*, en células mononucleares de sangre periférica cultivadas “*in vitro*”, por microscopía de fluorescencia mediante la técnica de tinción con Naranja de Acridina/Bromuro de Etidio (NA/BE).

5. HIPÓTESIS

Si el veneno de *Bothrops asper* tiene efecto citotóxico que bloquee el ciclo proliferativo celular, se espera que el índice mitótico en las células tratadas con las distintas concentraciones del veneno de *B. asper*, disminuya significativamente respecto al IM de las células del control negativo (no tratadas), de lo contrario el IM de las células tratadas será igual o incluso mayor que el de las no tratadas.

Si el veneno de *Bothrops asper* tiene efecto citotóxico que disminuya la viabilidad celular de las células mononucleares de sangre periférica cultivadas “*in vitro*”, se espera que el porcentaje de viabilidad celular reduzca significativamente en las células tratadas con las concentraciones de veneno de *B. asper* que bloquean el ciclo celular (alta, media y baja) en relación a las del grupo control, de lo contrario dicho porcentaje será igual o incluso mayor.

Si el veneno de *Bothrops asper* tiene efecto citotóxico que induzca apoptosis, se espera que el porcentaje de células apoptóticas aumente significativamente en las células mononucleares de sangre periférica cultivadas “*in vitro*” tratadas con las concentraciones experimentales del veneno de *B. asper*, respecto a las del grupo control, de lo contrario dicha proporción será igual o incluso menor.

6. METODOLOGÍA

6.1 TIPO DE ESTUDIO

El estudio es de tipo experimental, con comparación de dos grupos (grupo tratado o grupo experimental y grupo no tratado o grupo control). El diseño del experimento fue de bloques completos aleatorizados. El registro de la variable se hizo posteriormente al tratamiento. Una vez cuantificado el veneno de *B. asper*, se realizaron tres pruebas para evaluar la citotoxicidad del mismo, cada prueba se repitió tres veces; la primera prueba fue la de índice mitótico con sangre periférica, en la cual se definieron las concentraciones experimentales del veneno (alta, media y baja) con las que se desarrollaron las pruebas siguientes, la segunda fue la de viabilidad celular con azul de trypan y la tercera fue la de apoptosis, cuya detección se hizo por microscopía de fluorescencia empleando naranja de acridina y bromuro de etidio (NA/BE) en la tinción celular. En todos los ensayos hubo un control positivo y un control negativo. La concentración óptima del control positivo (H₂O₂) empleado en las dos últimas pruebas se definió previamente con el ensayo de apoptosis. Las pruebas de viabilidad celular y apoptosis se llevaron a cabo con células mononucleares de sangre periférica cultivadas “*in vitro*”.

6.2 VARIABLES

Surgen cuatro variables en el estudio: la variable independiente, que es la concentración del veneno y tres variables dependientes: el índice mitótico, el porcentaje de viabilidad celular y el porcentaje de células apoptóticas. Todas las variables son de naturaleza cuantitativa continua. Las variables se miden a escala razón y pueden resumirse en todas las estadísticas existentes. No obstante, para el análisis estadístico, la concentración del veneno fue categorizada como concentración alta, concentración media y concentración baja, y sin veneno o control negativo.

6.3 EXTRACCIÓN DE VENENO

El veneno se obtuvo de un individuo de *Bothrops asper* en estado adulto procedente de la localidad de Bajo Palacé (Totoró – Cauca), mantenido en el serpentario del CIBUC (Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Cauca) por personal capacitado, en condiciones de luz natural, humedad (alrededor del 70%) y temperatura (22.5°C en promedio) controladas, alimentado con pollos y ratones mantenidos en condiciones similares en la misma instalación.

La extracción de veneno se realizó inmovilizando el cuerpo y sujetando la cabeza de la serpiente provocando la apertura de su boca y por tanto su mordedura sobre un embudo de vidrio estéril cubierto con papel parafilm, el veneno extraído fue colectado en un tubo falcon de fondo cónico de polipropileno igualmente estéril, unido directamente al embudo. Una vez obtenido el veneno,

se llevó a un tubo eppendorf estéril de 1mL y fue centrifugado a 12000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de -8°C con el fin de descartar el precipitado que contiene los componentes inactivos del veneno y conservar el sobrenadante, a partir del cual se calculó la concentración proteica del mismo. Finalmente, el veneno fue debidamente sellado, rotulado y preservado a una temperatura de -80°C, hasta el momento de su cuantificación.

6.4 CUANTIFICACIÓN PROTEICA, ESTERILIZACIÓN Y DILUCIÓN DEL VENENO

El procedimiento para cuantificar la concentración proteica del veneno consistió en preparar una primera solución a un factor de dilución F_{d1} de 21 ($F_d = V_2/V_1$), tomando 100 μL (V_1) de veneno y llevándola a un volumen final de 2100 μL (V_2), luego se preparó una segunda solución a un factor F_{d2} de 50, tomando 40 μL (V_1) de la solución inicial y llevándola a un volumen total de 2000 μL (V_2). Ésta última fue llevada al espectrofotómetro. El blanco con el que previamente se calibró el equipo, fue una solución de NaCl al 0.9%, que también fue empleado como solvente del veneno.

Luego de obtener la lectura de absorbancia arrojada por el espectrofotómetro, la concentración proteica del veneno se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Cfv_{(mg/mL)} = (A_{280})(F_{d1})(F_{d2})$$

En donde:

Cfv = Concentración final del veneno crudo.

A_{280} = Valor de absorbancia a 280 nanómetros (longitud de onda a la cual se leen las proteínas en el espectrofotómetro).

F_d = Factor de dilución equivalente a V_2/V_1 , donde V_1 es el volumen inicial y V_2 el volumen final.

Posteriormente a su determinación proteica, se preparó una solución madre con la cantidad de veneno extraído mas NaCl al 0.9%. Después de haberlo diluido, el veneno fue esterilizado por filtración (primero con un filtro miliporo de 45 μm y luego con uno de 0.22 μm), y finalmente almacenado en alícuotas a -20°C en una nevera del laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, hasta el momento de su utilización.

Para hacer las diluciones del veneno con las que fueron tratados los cultivos en las pruebas de citotoxicidad, se partió de la solución madre, que fue la más concentrada, se diluyó con un factor de 10, de tal manera que las concentraciones de todas las soluciones fueron equivalentes a la décima parte de la anterior, y así sucesivamente hasta llegar a la última dilución, que fue la de menor concentración.

6.5 TRATAMIENTOS

En los tres ensayos, los tratamientos fueron los siguientes: **control negativo:** solución de NaCl al 0.9%, que fue el solvente del veneno. **Concentraciones experimentales de veneno:** en el primer ensayo de índice mitótico (IM) fueron ocho concentraciones de veneno (preparadas como se indica en el numeral 6.4), en el segundo fueron cuatro y en el tercero fueron tres. Las concentraciones alta, media y baja de veneno con las que se trataron los cultivos en las pruebas de viabilidad celular y apoptosis fueron escogidas de acuerdo a la curva dosis-efecto resultante del ensayo de IM. El criterio de selección de las mismas se describe más adelante en el numeral 6.7.1. **Control positivo:** en el ensayo de IM se utilizó mitomicina C (MMC) (SIGMA M-4287), sustancia cuyo efecto ha sido identificado como mutagénico, clastogénico en células de mamífero, incluyendo linfocitos de sangre humana tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” (Sehlmeyer *et al.*, 1996), y citotóxico capaz de bloquear el ciclo celular (Goeptar *et al.*, 1995). En el ensayo de viabilidad celular y apoptosis el control positivo fue peróxido de hidrógeno (H₂O₂), cuya concentración se eligió luego de hacer la curva dosis-efecto en la calibración de la prueba de apoptosis con H₂O₂ por medio de la técnica de tinción con NA/BE. Después de ensayar con 4 concentraciones de H₂O₂, la concentración óptima del mismo fue aquella bajo la cual se indujo un buen porcentaje de células apoptóticas (estadísticamente mayor al porcentaje observado en el control negativo). Se decide emplear peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como control positivo porque, además de ser un potente agente oxidante capaz de inducir apoptosis en linfocitos humanos (Marini *et al.*, 1996), puede también alterar la viabilidad celular (Lee *et al.*, 2005)

6.6 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

Las muestras de sangre periférica fueron extraídas por venipunción en condiciones asépticas por personal capacitado, en horas de la mañana y en ayuno para minimizar efectos confusos de factores de dieta (Fenech *et al.*, 1999). Las muestras para el ensayo de IM se tomaron con jeringas previamente heparinizadas y para los ensayos de viabilidad celular y apoptosis con tubos vacuntainer igualmente heparinizados.

La persona de la cual se obtuvo las muestras de sangre durante el estudio se eligió teniendo en cuenta los siguientes criterios de inclusión: persona en edad adulta, de sexo masculino y saludable. Los criterios de exclusión fueron: consumo de bebidas alcohólicas o de cigarrillo, persona expuesta ocupacionalmente a sustancias químicas, padecer enfermedades como la hepatitis, consumo de psicotrópicos y de medicamentos como resultado de algún tratamiento médico prolongado.

6.7 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Se llevaron a cabo tres ensayos, el primero se efectuó bajo los parámetros de índice mitótico, el segundo bajo los de viabilidad celular y el último bajo los de apoptosis. En el ensayo de IM se definieron las dosis experimentales de veneno que se emplearon en los dos ensayos siguientes.

6.7.1 Ensayo de índice mitótico (IM). El procedimiento efectuado para este ensayo fue el siguiente:

- **Cultivo celular.** Se realizaron cultivos de 5 mL a partir de 0.5 mL de sangre total, 4.5 mL de medio RPMI-1640 (SIGMA R7509) suplementado (suero bovino fetal (LONZA 14-502F) a una concentración final del 10%, L-glutamina y antibiótico (SIGMA A-5955), ambos a una concentración final del 1%) y 0.1mL de PHA. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C hasta el tiempo de cosecha.
- **Tratamiento.** Transcurridas 24 horas desde de la siembra, los cultivos fueron tratados con 0.1 mL de solución de NaCl al 0.9% (control negativo), 0.1mL de MMC (control positivo) para una concentración final en el medio de 0.5µg/mL, y 0.1 mL de distintas concentraciones de veneno así: en el primer ensayo con ocho concentraciones a una concentración final de 6×10^4 ng/mL, 6×10^3 ng/mL, 600 ng/mL, 60 ng/mL, 6 ng/mL, 0.6 ng/mL, 6×10^{-2} ng/mL y 6×10^{-3} ng/mL. En el segundo ensayo con cuatro (6×10^3 ng/mL, 600 ng/mL, 6 ng/mL y 6×10^{-3} ng/mL), y en el tercer ensayo con tres (6×10^3 ng/mL, 6 ng/mL y 6×10^{-3}).
- **Cosecha.** 46 horas después de la siembra, los cultivos fueron tratados con colcemid a una concentración final de 0.1µg/mL y dos horas más tarde se centrifugaron a 1000 rpm por 9 minutos. Las mismas centrifugaciones se manejaron durante todo el protocolo. Luego de descartar el sobrenadante, se agregaron 6 mL de solución hipotónica (KCl 0.075M) a cada cultivo y se incubaron a 37°C en baño maría durante 20 minutos. Pasado el tiempo de incubación, los cultivos fueron prefijados con 2 mL de fijador Carnoy (metanol:ácido acético: 3:1) y centrifugados. Se retiró el sobrenadante y se fijaron tres veces mas, cada una con 5 mL de Carnoy, centrifugando y descartando el sobrenadante después de cada fijación. En la primera fijación, la suspensión celular se mantuvo en refrigeración por 20 minutos. Posteriormente se realizó el goteo con la suspensión celular resultante de la última fijación sobre placas frías y previamente limpias. Después de tres días se realizó la tinción de los extendidos mitóticos utilizando solución de Giemsa (SIGMA G5637) al 10%. Luego se procedió a la observación y lectura de placas (en microscopio de luz NIKON, objetivo de 40X). Finalmente, el índice mitótico (IM) se calculó así:

$$IM = \frac{\text{No. de células en mitosis}}{\text{No. total de células analizadas (2000)}} \times 100$$

- **Selección de las concentraciones experimentales de veneno.** Una vez realizada la prueba de IM y obtenida la respectiva curva dosis-efecto, las concentraciones experimentales de veneno con las cuales se trataron las células mononucleares de sangre periférica cultivadas “*in vitro*” en las pruebas de viabilidad celular y apoptosis, fueron escogidas bajo los siguientes parámetros:

Concentración alta: fue la que disminuyó el IM hasta un 30% del registrado en el control negativo.

Concentración media: fue la que disminuyó el IM a un 50% en relación al control negativo.

Concentración baja: fue en la que se obtuvo un IM menor respecto del control negativo en 1%.

6.7.2 Selección de la concentración óptima de H₂O₂ a emplear como control positivo. La selección de la concentración óptima de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (CARLO ERBA 412072005) a emplear como control positivo en los ensayos de viabilidad celular y apoptosis para determinar el efecto citotóxico del veneno, se realizó a través del ensayo de apoptosis, y consistió en realizar microcultivos de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- **Aislamiento de células mononucleares.** En cámara de flujo laminar y tubos de poliestireno estériles, se preparó una mezcla de sangre y PBS pH 7.4 (0.01M) (SIGMA P5368) estéril en relación 1:1 (10 mL de sangre + 10 mL de PBS) (Fenech *et al.*, 1999), que luego fue transferida cuidadosamente a otro tubo que contenía 5 mL de histopaque (SIGMA 1077-1). Este último tubo se centrifugó a 2600 rpm durante 30 minutos. La capa opaca y delgada formada después de la centrifugación (ubicada entre la capa de plasma y de histopaque), que contenía a las células mononucleares (linfocitos y monocitos), fue aislada y lavada con PBS dos veces más. Cada lavado se hizo a 1200 rpm por 12 minutos. Del precipitado celular resultante del último lavado se tomaron 20 µL que se mezclaron con 20 µL de azul de trypan (SIGMA T0776). De ésta última mezcla se tomaron 20 µL y se llevaron al hemocitómetro para el conteo de células, se calculó el porcentaje de viabilidad celular considerado aceptable a partir del 95% (Gomes *et al.*, 2007), y finalmente, conociendo el número de células vivas (incoloras) se logró ajustar el volumen necesario de suspensión celular a sembrar a una densidad de 3×10^5 células/mL.
- **Cultivo celular.** Se suspendieron 200 µL de precipitado celular (con una densidad de 3×10^5 células/mL) en 290 µL de medio RPMI 1640 suplementado (ver cultivo celular en el numeral 6.7.1.) y 10 µL de PHA (concentración final en el medio del 2%) para completar un volumen total de 500 µL por cada microcultivo. Luego, los cultivos se llevaron a incubación y se mantuvieron a 37°C hasta el tiempo del lavado.
- **Tratamiento.** 24 horas después de la siembra, los microcultivos se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos e inmediatamente a 1600 rpm por 2 minutos, en cámara de flujo laminar se les retiró a cada uno 400 µL de sobrenadante, se agregaron 380 µL de medio RPMI-1640 con L-glutamina a una concentración final del 1% sin suero bovino fetal. Cada tubo fue tratado con su respectivo tratamiento, agregándole 10 µL de 4 concentraciones de H₂O₂ (25 µM, 50 µM, 75 µM y 100 µM, equivalentes a una concentración final de 0.5 µM, 1 µM, 1.5 µM y 2 µM, respectivamente) y 10 µL de NaCl al 0.9% al tubo del control negativo. Luego se volvieron a incubar a 37°C por 24 horas más.
- **Lavado.** Transcurrido el tiempo de acción del tratamiento (24 horas), los microcultivos fueron centrifugados a 1200 rpm por 5 minutos e inmediatamente a 1600 rpm por 2 minutos,

se descartó el sobrenadante, se adicionó a cada uno 400 μL de PBS y se centrifugaron una vez más de la misma manera. Finalmente se retiraron 400 μL de sobrenadante y se dejaron 100 μL de suspensión celular para la prueba de apoptosis empleando tinción con naranja de acridina (SIGMA A-6014)/bromuro de etidio (SIGMA E8751). Luego de la observación en el microscopio, se registraron las células viables, apoptóticas y necróticas (ver los parámetros en el numeral 6.7.4).

6.7.3 Ensayo de viabilidad celular con azul de trypan. En este ensayo se llevó a cabo el mismo procedimiento efectuado en el ensayo anterior para el aislamiento, cultivo, tratamiento y lavado de células (ver numeral 6.7.2), conservando el tiempo y las mismas condiciones. En este ensayo los tratamientos fueron las tres concentraciones de veneno (alta, media y baja) definidas en el prueba de IM, el control positivo (H_2O_2 50 μM) cuya concentración fue definida en el ensayo anterior, y el control negativo (NaCl al 0.9%). Luego de 24 horas del tratamiento, se realizó el lavado con PBS, del cual se dejaron 100 μL de suspensión celular. Para determinar la viabilidad de la células se mezclaron 10 μL de suspensión celular con 10 μL de azul de trypan al 0.05% disuelto en PBS estéril, se tomó 10 μL de la mezcla anterior y se llevaron a un portaobjetos previamente limpio para el conteo celular. En total se contaron 100 células (en microscopio de luz, objetivo de 40X), incluyendo las vivas (incolores) y las muertas (coloreadas de azul) (Plewa *et al.*, 2004). Finalmente el porcentaje de viabilidad celular fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ células viables} = \frac{\text{células viables}}{\text{células no viables} + \text{células viables (100 en total)}} \times 100$$

6.7.4 Ensayo de apoptosis. De la misma suspensión celular de la cual se tomaron las células para la prueba de viabilidad celular, se tomaron también las células para la ejecución de la prueba de apoptosis. El procedimiento para la tinción celular fue el siguiente:

Tinción con Naranja de acridina/Bromuro de etidio (NA/BE). Sobre un portaobjetos previamente limpio se puso 1 μL de mezcla de Naranja de Acridina/Bromuro de etidio (preparada a partir de 1.25 μL de NA a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con 1.25 μL de BE a la misma concentración, y diluyendo ambos colorantes en 22.5 μL de PBS), se adicionaron 25 μL de suspensión celular (con una densidad aproximada de 1.5×10^5 células/mL) sobre la mezcla anterior e inmediatamente se llevó la placa al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400 con filtro BA515, con filtro de excitación de 450-490nm, con lámpara de mercurio de 100W, objetivo 40X plan Fluor) para la observación de las células, cuya clasificación se realizó de acuerdo con los parámetros establecidos por Baskić *et al.* en el 2006, teniendo en cuenta el aspecto o estado morfológico de la cromatina y su emisión de fluorescencia, de la siguiente manera: **células viables**, que fueron aquellas cuya cromatina era verde homogénea (VH) y de tamaño normal; **células en apoptosis temprana**, que fueron las células que conservaban el color verde de las células viables y su membrana celular intacta pero tenían núcleo con cromatina lobulada (VL). Cabe aclarar que no todas las células apoptóticas eran de color verde y cromatina fragmentada, observándose en algunos casos de apoptosis temprana redondeamiento del núcleo, diferenciable del núcleo de una célula viable por ser más brillante (incluyendo las células que aún mantenían el color verde) y más

pequeño debido a su encogimiento, evento característico de la apoptosis que indica condensación de la cromatina. También se incluyeron dentro de este grupo las células con cromatina color verde–amarillo o amarillo–naranja, observadas así porque el bromuro de etidio, que marca únicamente las células no viables de color naranja, comienza a penetrar a través de su membrana, permitiendo así la identificación del paso de una célula en apoptosis temprana a apoptosis tardía (ver figura 11. c) y 11. d)); **células en apoptosis tardía**, constituido por las células con cromatina anaranjada y dividida en fragmentos (NF), y **células necróticas**, que fueron aquellas con núcleo naranja o rojo anaranjado con cromatina homogénea (NH), observadas así porque su membrana se ha degradado a tal punto que se hace completamente permeable al bromuro de etidio (Baskić *et al.*, 2006). El porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas, se calculó mediante las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ células vivas} = \frac{VH}{VH + VL + NH + NF} \times 100$$

$$\% \text{ células apoptóticas} = \frac{VL + NF}{VH + VL + NH + NF} \times 100$$

$$\% \text{ células necróticas} = \frac{NH}{VH + VL + NH + NF} \times 100$$

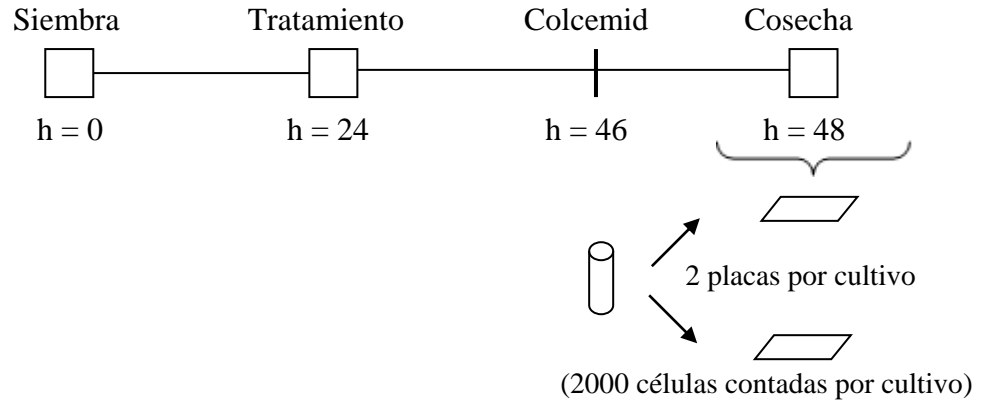
6.8 DISEÑO EXPERIMENTAL

A continuación se muestra el diseño experimental de cada una de las pruebas realizadas, en donde el tamaño de muestra equivale al número total de cultivos sembrados en cada ensayo, teniendo en cuenta el número de repeticiones del mismo, que fue igual a tres. La unidad experimental es cada cultivo y la unidad de muestreo es igual al número de células contadas en cada uno de ellos.

6.8.1 Ensayo de IM. En el primer ensayo de IM se sembraron 10 cultivos; uno por cada tratamiento, en el segundo ensayo se sembraron 12 cultivos y en el tercer ensayo 10. En los dos últimos ensayos se sembraron dos cultivos por tratamiento. Se montaron 2 placas por cada cultivo para un total de 4 placas por tratamiento y se contaron 2000 células por cultivo (1000 células por placa, 4000 células por tratamiento). Los resultados fueron expresados en términos de porcentaje.

El procedimiento efectuado en el ensayo se ilustra a continuación:

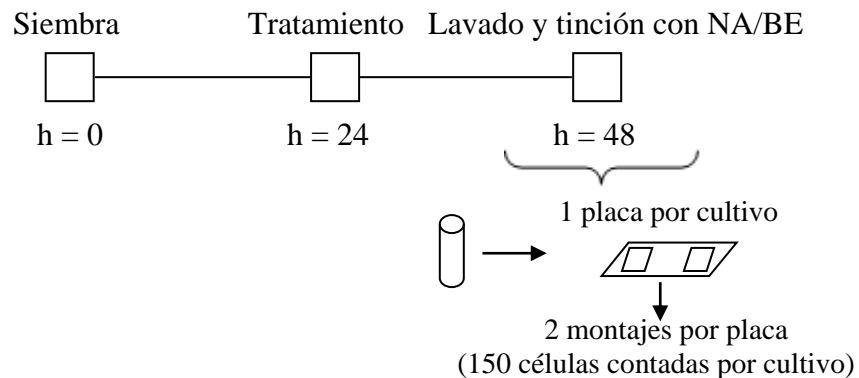
Figura 5. Protocolo experimental para el ensayo de IM



6.8.2 Selección de la concentración óptima de H₂O₂ a emplear como control positivo. En cada ensayo se sembraron 10 microcultivos, 2 por tratamiento, se montó una placa por cultivo (2 preparaciones por placa); 2 placas por tratamiento y se contaron 150 células por cultivo para un total de 300 células por tratamiento. El ensayo se repitió 3 veces, de manera que hubo 30 cultivos en total. Los datos se expresaron en porcentaje.

El protocolo ejecutado en el ensayo fue el siguiente:

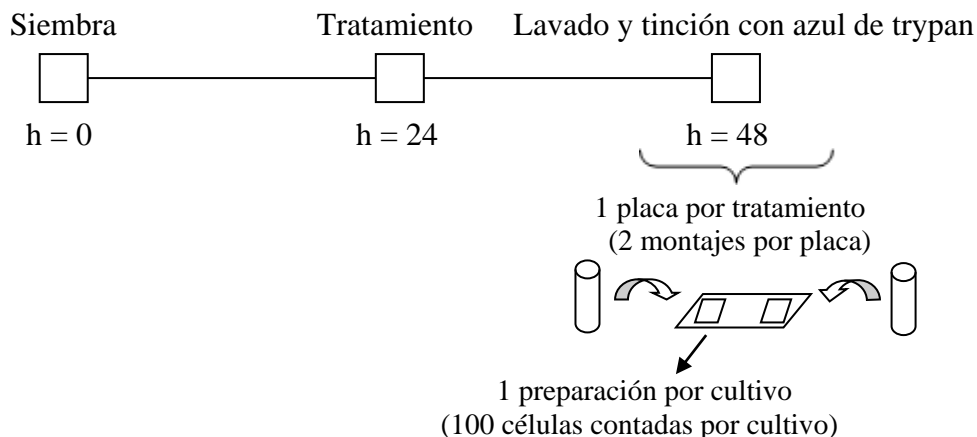
Figura 6. Protocolo experimental para la selección de la concentración óptima de H₂O₂



6.8.3 Ensayo de viabilidad celular con azul de trypan. Al igual que en el ensayo anterior, en éste se sembraron 10 microcultivos, 2 por tratamiento. Por cada tratamiento se montó una placa (2 montajes por placa, 1 preparación por cultivo). Se contaron 100 células por cultivo para un total de 200 células por tratamiento. Se realizaron 3 repeticiones de la prueba. Los datos se registraron en porcentaje.

El procedimiento a seguir en el ensayo se ilustra a continuación:

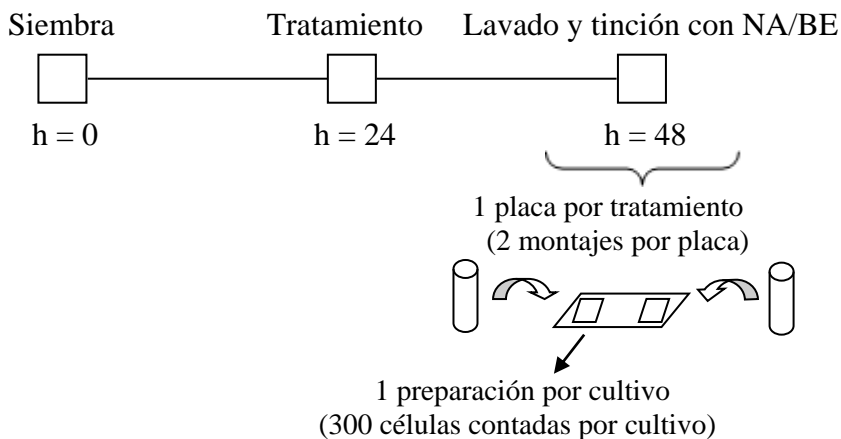
Figura 7. Protocolo experimental para la prueba de viabilidad celular



6.8.4 Ensayo de apoptosis. Los cultivos fueron los mismos que se sembraron para la prueba anterior y la tinción se realizó con la misma suspensión celular. Se montó una placa por tratamiento con dos preparaciones; una por cada cultivo. Se contaron 300 células por cultivo para un total de 600 células por tratamiento. Los datos fueron registrados en porcentaje.

El protocolo experimental que se llevó a cabo para realización del ensayo se resume en la siguiente figura:

Figura 8. Protocolo experimental para la prueba de apoptosis



6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en todos los ensayos fueron analizados con el software estadístico SPSS (Statistical Package to Social Scientific) versión 11.5. Se realizó análisis estadístico descriptivo y prueba de hipótesis para cada uno ellos. Debido al tamaño de la muestra se aplicó la prueba no paramétrica de significancia estadística Kruskal-Wallis. Los análisis de correlación se efectuaron con el coeficiente de correlación de Spearman. En todos se tuvo en cuenta un nivel de significancia máximo de 0.05 ($P \leq 0.05$).

En el ensayo de IM se realizó análisis estadístico de correlación mediante el coeficiente de correlación de Spearman y análisis de regresión cuadrática, ambos para establecer asociación entre la concentración del veneno y el número de células en mitosis. A partir de allí, fueron escogidas las concentraciones experimentales de veneno (alta, media y baja) que se emplearon en los ensayos de viabilidad celular y apoptosis.

En la calibración de la prueba de apoptosis con H_2O_2 se aplicó análisis estadístico descriptivo, prueba de Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples de Duncan con el fin de elegir la concentración óptima del control positivo a emplear en los ensayos de viabilidad celular y apoptosis. Adicionalmente se calculó el coeficiente de correlación de Spearman para establecer asociación entre la concentración del H_2O_2 y el porcentaje de células apoptóticas y necróticas, así como también la asociación entre los dos porcentajes.

Para el ensayo de viabilidad celular con azul de trypan se llevó a cabo la prueba de Kruskal-Wallis. En el ensayo de apoptosis además de la anterior, se realizó también análisis estadístico de correlación con el coeficiente de Spearman y curva de regresión lineal para establecer asociación entre las concentraciones de veneno y el porcentaje de células apoptóticas, necróticas y viables. Se aplicó prueba de comparaciones múltiples HSD de Tukey para conocer el porcentaje de dichas células que le correspondía a cada tratamiento.

Finalmente, se realizó análisis de correlación y de regresión lineal simple para establecer asociación entre: el porcentaje de viabilidad celular (con la tinción de NA/BE) y el porcentaje de células apoptóticas, y el porcentaje de viabilidad celular (con la tinción de NA/BE) y el porcentaje de viabilidad celular con azul de trypan.

7. RESULTADOS

7.1 CUANTIFICACIÓN PROTEICA DEL VENENO

La concentración de proteína del veneno crudo de *Bothrops asper* fue de 127.05 mg/mL y la concentración de la solución madre a partir de la cual se prepararon las ocho diluciones de veneno, fue de 30 mg/mL.

7.2 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

7.2.1 Ensayo de índice mitótico (IM). En la tabla 1 se registran los promedios de IM obtenidos en *n* repeticiones del experimento, para cada una de las ocho concentraciones del veneno de *Bothrops asper* a partir de las cuales se escogieron las concentraciones empleadas en los ensayos siguientes de citotoxicidad (viabilidad celular y apoptosis). Para algunas concentraciones sólo se reporta el resultado de un experimento, ya que hacen parte de aquellas que se incluyeron en el ensayo inicial de IM, y que luego fueron descartadas.

Tabla 1. Promedios de IM, con sus respectivas medidas de variabilidad y *n* repeticiones, obtenidos para cada una de las concentraciones experimentales del veneno de *Bothrops asper*

Concentración de veneno (ng/mL)	Promedio de IM (%) ± Error estándar (<i>n</i> *)	Desviación estándar
0.000 (control negativo)	3.80 ± 0.20 (5)	0.45
0.006**	3.76 ± 0.32 (5)	0.72
0.06	3.35 (1)	
0.6	4.45 (1)	
6.0**	2.53 ± 0.24 (3)	0.42
60	2.95 (1)	
600	2.21 ± 0.20 (5)	0.46
6000**	1.63 ± 0.17 (85)	0.38
60000	0.55 (1)	
MMC (control positivo)	0.49 ± 0.10 (5)	0.23

P = 0.000***

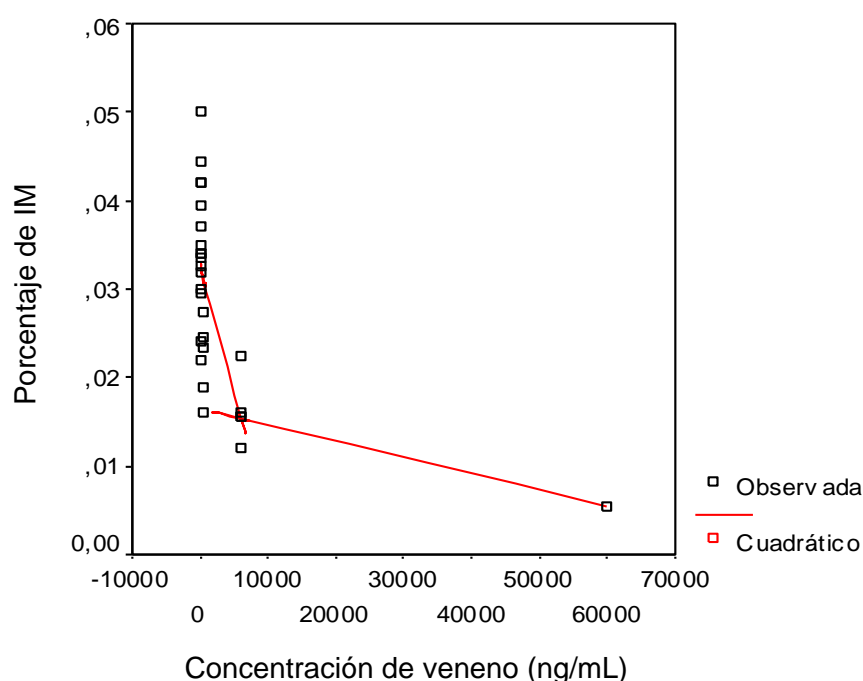
* Tamaño de la muestra (repeticiones). 2000 células analizadas por repetición.

** Concentraciones de veneno escogidas para los ensayos de viabilidad celular y apoptosis.

*** Nivel de significancia para comparar las concentraciones de veneno, calculado mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

De acuerdo con el coeficiente de correlación de Spearman ($R = -0.878$, $P = 0.000$), existe asociación negativa o inversamente proporcional entre la concentración del veneno de *B. asper* y el número de células en división, habiendo disminución del IM a medida que aumenta la concentración del veneno. El coeficiente de determinación ($R^2 = 0.77$) indica que la variabilidad observada en el IM depende en un 77% de la variabilidad de la concentración del veneno. La curva de regresión que se muestra en la figura 9 y que se describe mediante la ecuación cuadrática: $y = b_0 + b_1X + b_2X^2 = y = 0.0327 + -3.0 \times 10^{-6} (x) + 4.5 \times 10^{-11} (x^2)$ (en donde “y” es la variable dependiente (IM) y x es la concentración del veneno), indica una correlación negativa entre la concentración de veneno y el IM, en donde el IM disminuye con el incremento de la concentración del veneno, especialmente en las concentraciones que están por debajo de los 6000 ng/mL.

Figura 9. Concentración de veneno Vs. Índice mitótico (IM)



Con base en el análisis de asociación del modelo cuadrático anterior, y los parámetros de selección mencionados en el numeral 6.7.1, las tres concentraciones de veneno escogidas para los ensayos de viabilidad celular y apoptosis fueron las siguientes: **concentración alta** = 6000 ng/mL, **concentración media** = 6 ng/mL y **concentración baja** = 6×10^{-3} ng/mL.

7.2.2 Selección de la concentración óptima de H₂O₂ a emplear como control positivo. El promedio de células apoptóticas y necróticas obtenido en n ($n = 3$) repeticiones del experimento, para cada una de las concentraciones de H₂O₂, se resume en la tabla 2, en donde se puede notar que a un incremento en la concentración de H₂O₂ le correspondió así mismo un aumento en el porcentaje de células apoptóticas, caso contrario a lo observado con el porcentaje de células necróticas, el cual disminuía a medida que aumentaba la concentración de H₂O₂. Esta variación se ilustra en la figura 10.

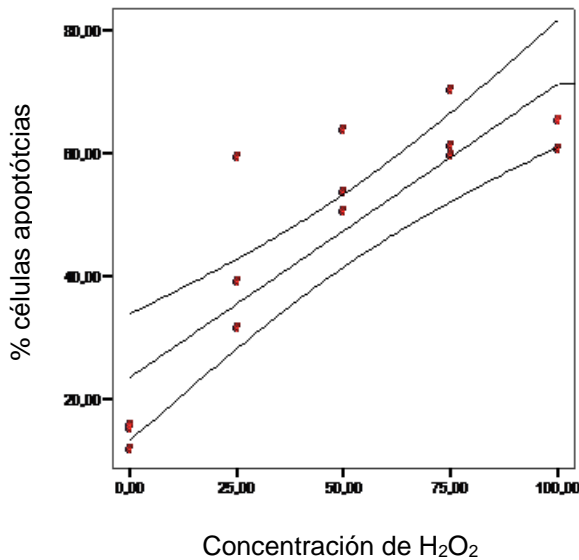
Tabla 2. Porcentaje promedio de células apoptóticas y necróticas, con sus respectivas medidas de variabilidad y *n* repeticiones, obtenido para las concentraciones de H₂O₂

Concentración de H ₂ O ₂ (μM)	Células	Promedio de células (%) ± Error estándar (<i>n</i> *)	Desviación estándar
0.0 (control negativo)	Apoptóticas	13.73 ± 1.23 (3)	2.14
0.5		42.73 ± 8.23 (3)	14.26
1.0		55.33 ± 3.93 (3)	6.81
1.5		63.06 ± 3.30 (3)	5.71
2.0 (control positivo)		63.06 ± 1.53 (3)	2.66
P = 0.026**			
0.0 (control negativo)	Necróticas	32.06 ± 5.85 (3)	10.13
0.5		22.53 ± 2.04 (3)	3.53
1.0		18.53 ± 0.47 (3)	0.81
1.5		17.53 ± 1.44 (3)	2.50
2.0 (control positivo)		12.43 ± 1.29 (3)	2.23
P = 0.018**			

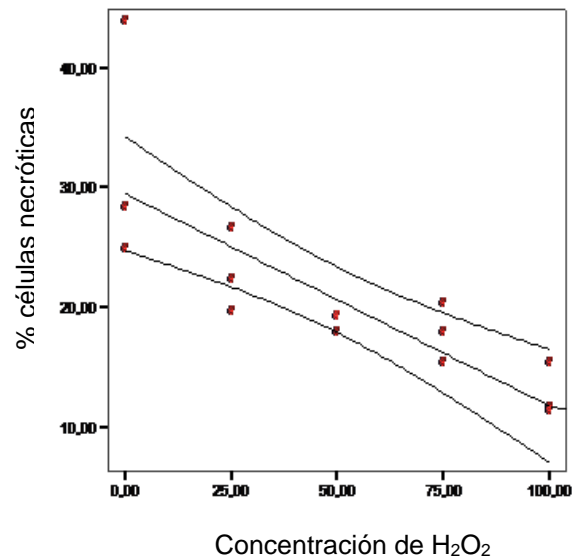
* Tamaño de la muestra (repeticiones). 300 células analizadas por repetición.

** Nivel de significancia para comparar las concentraciones de H₂O₂, calculado mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Figura 10. Variación del porcentaje de células apoptóticas y necróticas respecto de las distintas concentraciones de H₂O₂



a) Concentración de H₂O₂ Vs. Porcentaje de células apoptóticas



b) Concentración de H₂O₂ Vs. Porcentaje de células necróticas

De acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis, existe diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de H₂O₂ respecto del porcentaje de células apoptóticas (P = 0.026), y respecto del porcentaje de células necróticas (P = 0.018). Esto evidentemente indica que la concentración de H₂O₂ influye en el porcentaje de ambos tipos celulares, encontrándose una correlación positiva (R = 0.874, P = 0.000) entre la concentración de H₂O₂ el porcentaje de células apoptóticas (figura 10. a)), y una correlación negativa (R = -0.908, P = 0.000) entre la concentración de H₂O₂ y las células necróticas (figura 10. b)). Adicionalmente se encontró asociación negativa o inversamente proporcional (R = -0.849, P = 0.000) entre el porcentaje de células apoptóticas y el de células necróticas, lo cual indica que a medida que incrementa el porcentaje de células apoptóticas, el porcentaje de células necróticas disminuye. Debido a que el porcentaje de células apoptóticas fue notoriamente mayor que el de células necróticas, se sugiere que el H₂O₂ induce principalmente apoptosis con reacción dosis-efecto positiva. Con base en lo anterior y en la prueba de comparaciones múltiples de Duncan, la concentración de H₂O₂ bajo la cual se indujo un porcentaje considerable de células apoptóticas y un porcentaje no muy alto de células necróticas fue 50 µM (1 µM en el medio de cultivo), que fue finalmente la concentración óptima escogida como control positivo para los ensayos de viabilidad celular y apoptosis. En cuanto a los criterios de selección de su concentración óptima, también se tuvo en cuenta que se ha demostrado que en comparación con concentraciones incluso mayores de H₂O₂, la fragmentación oligonucleosómica del ADN, uno de los eventos característicos de la apoptosis, puede ser claramente detectada mediante electroforesis con gel de agarosa en células tratadas con una concentración equivalente a 50 µM de H₂O₂ (Marini *et al.*, 1996). Además, se ha demostrado que esa misma concentración de peróxido de hidrógeno incrementa la actividad caspasa y que por tanto induce apoptosis en linfocitos T Jurkat (Hampton and Orrenius, 1997).

7.2.3 Ensayo de viabilidad celular con azul de trypan. De acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis, no existe diferencia estadísticamente significativa (P = 0.595) entre las concentraciones experimentales de veneno (alta, media y baja) que inicialmente deprimieron el IM y el porcentaje de viabilidad celular, lo cual indica que la concentración del veneno de *B. asper* no influye en la viabilidad celular. El porcentaje promedio de células viables obtenido en *n* (*n* = 6) repeticiones del experimento, para cada una de las concentraciones experimentales de veneno (alta, media y baja) se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 3. Porcentaje promedio de células viables, con sus respectivas medidas de variabilidad y *n* repeticiones, para las concentraciones experimentales de veneno

Concentración de veneno (ng/mL)	Promedio de células viables (%) ± Error estándar (<i>n</i> *)	Desviación estándar
0.000	67.33 ± 2.32 (6)	5.68
0.006	61.50 ± 2.43 (6)	5.96
6.0	65.00 ± 3.77 (6)	9.25
6000	61.33 ± 3.09 (6)	7.58
H ₂ O ₂	67.17 ± 4.15 (6)	10.17

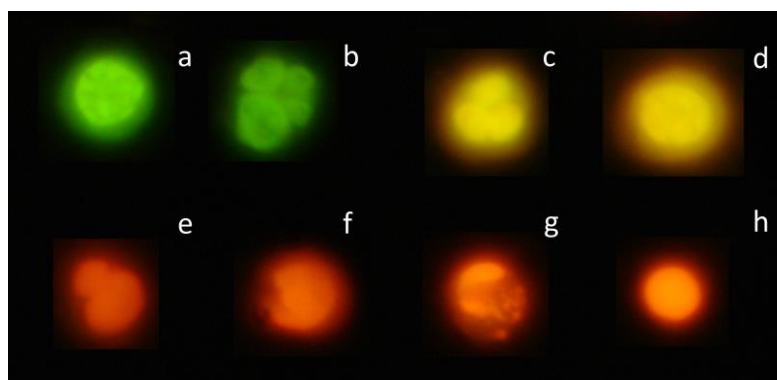
P = 0.595**

* Tamaño de la muestra (repeticiones). 100 células analizadas por repetición.

** Nivel de significancia para comparar las concentraciones de veneno, calculado mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

7.2.4 Ensayo de apoptosis. La morfología y coloración de las células observadas en el microscopio de fluorescencia (objetivo 100X) mediante la tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BE) se muestran en las microfotografías de la figura 11. Siguiendo los parámetros establecidos por Baskić *et al.* (2006) para la clasificación de células apoptóticas, necróticas y viables de acuerdo al estado morfológico de la cromatina y su emisión de fluorescencia, se diferenciaron cuatro grupos: células viables, células en apoptosis temprana, células en apoptosis tardía, y células necróticas.

Figura 11. Morfología y coloración de células viables, apoptóticas y necróticas teñidas con NA/BE



- a) célula viable, b) – d) células en apoptosis temprana, e) – g) células en apoptosis tardía
h) célula necrótica.

En la tabla 4 se registra el porcentaje promedio de células viables, apoptóticas y necróticas obtenido en n ($n = 6$) repeticiones del experimento, para cada una de las concentraciones experimentales del veneno de *B. asper* (alta, media y baja), mediante la tinción con NA/BE.

Tabla 4. Porcentaje promedio de células viables, apoptóticas y necróticas, con sus respectivas medidas de variabilidad y *n* repeticiones, obtenido para las concentraciones experimentales de veneno empleando la tinción con NA/BE

Concentración de veneno (ng/mL)	Células	Promedio de células (%) ± Error estándar (<i>n</i> *)	Desviación estándar
0.000	Viables	56.33 ± 2.69 (6)	6.58
0.006		39.17 ± 1.65 (6)	4.05
6.0		49.39 ± 0.76 (6)	1.87
6000		38.17 ± 3.18 (6)	7.79
H ₂ O ₂		40.89 ± 1.29 (6)	3.16
P = 0.000			
0.000	Apoptóticas	33.67 ± 1.57 (6)	3.85
0.006		46.89 ± 2.21 (6)	5.41
6.0		37.89 ± 0.47 (6)	1.17
6000		52.78 ± 3.28 (6)	8.05
H ₂ O ₂		44.22 ± 0.59 (6)	1.44
P = 0.000			
0.000	Necróticas	10.00 ± 1.16 (6)	2.84
0.006		13.94 ± 1.22 (6)	2.98
6.0		12.72 ± 0.96 (6)	2.36
6000		9.056 ± 0.86 (6)	2.10
H ₂ O ₂		14.89 ± 1.08 (6)	2.64
P = 0.009			

* Tamaño de la muestra (repeticiones). 300 células analizadas por repetición.

** Nivel de significancia para comparar las concentraciones de veneno, calculado mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Con base en la prueba de significancia estadística de Kruskal-Wallis, las concentraciones de veneno (alta, media y baja) influyen tanto en el porcentaje de viabilidad celular (P = 0.000) como en el de células apoptóticas (P = 0.000) y células necróticas (P = 0.009). Según la prueba de comparaciones múltiples HSD de Tukey, se logró establecer que las concentraciones del veneno de *B. aper* de mayor efecto sobre la viabilidad celular y el porcentaje de células apoptóticas, y que difieren significativamente del control negativo, fueron las concentraciones alta (6000 ng/mL) y baja (6×10^{-3} ng/mL).

De acuerdo con el coeficiente de correlación de Spearman, no existe asociación entre la concentración del veneno y el porcentaje de células necróticas (R = -0.068, P = 0.720). Contrario a lo anterior, se encontró asociación positiva entre las concentraciones de veneno y el porcentaje de células apoptóticas (R = 0.588, P = 0.001), y una asociación negativa entre la concentración de veneno y el porcentaje de células viables (R = -0.529, P = 0.003), lo cual indica un aumento en el porcentaje de células apoptóticas y una disminución en la viabilidad celular a medida que aumenta la concentración de veneno. La variación del porcentaje de células apoptóticas, necróticas y

viables, en relación a las concentraciones experimentales de veneno, se muestra en los siguientes gráficos de barras:

Figura 12. Concentración de veneno Vs. porcentaje de células apoptóticas

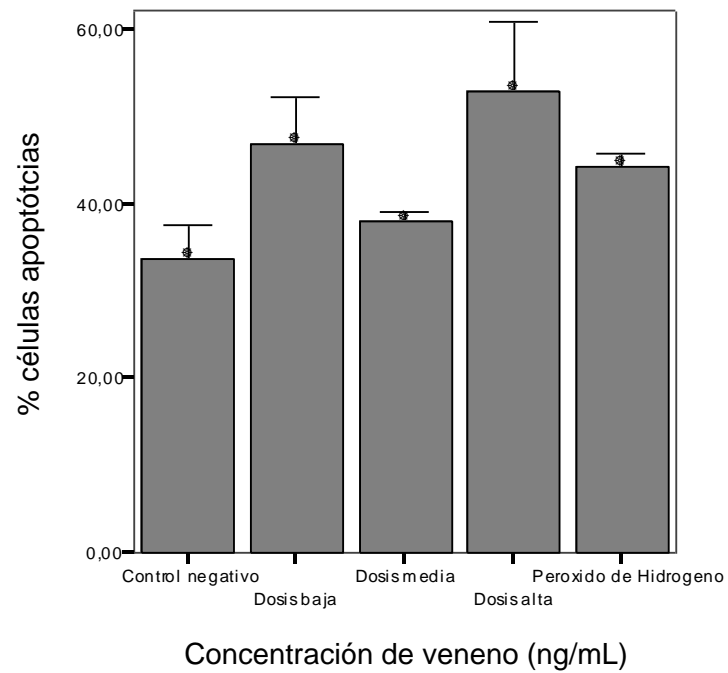


Figura 13. Concentración de veneno Vs. porcentaje de células necróticas

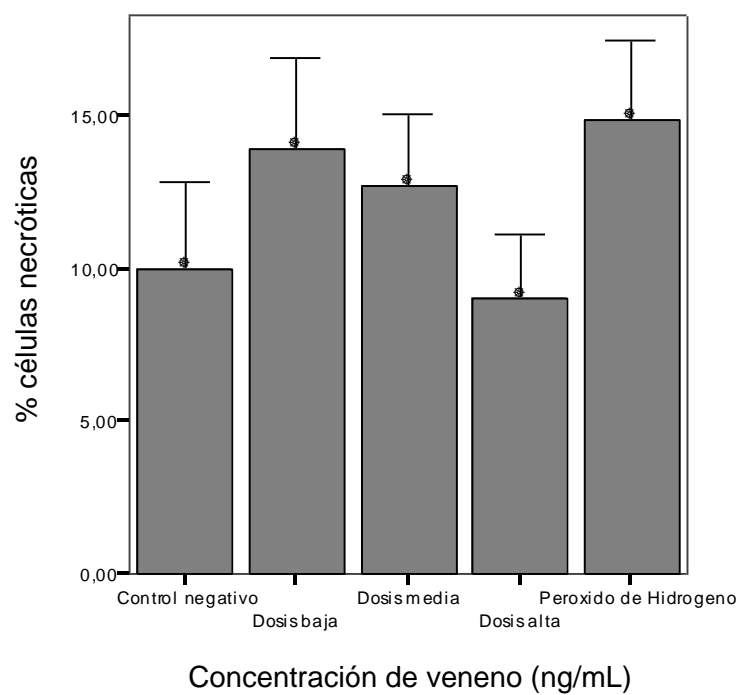
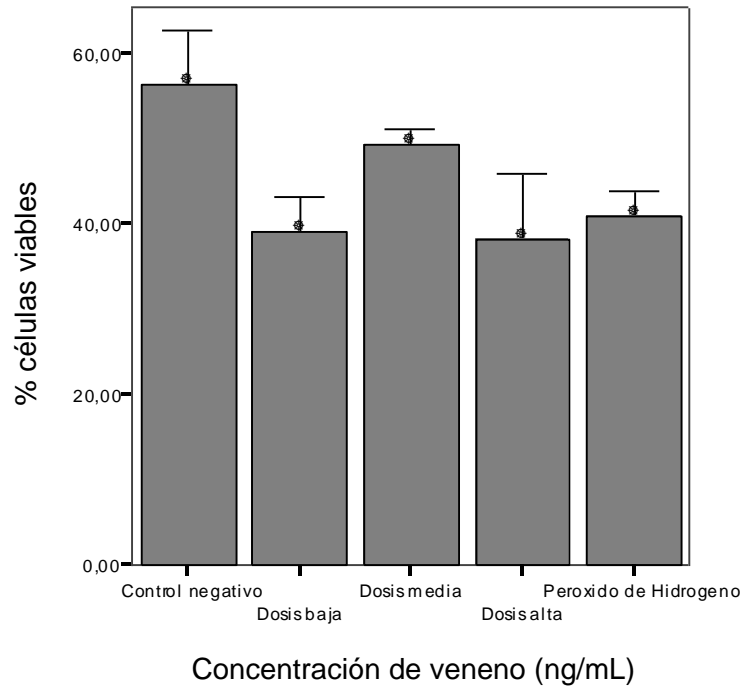


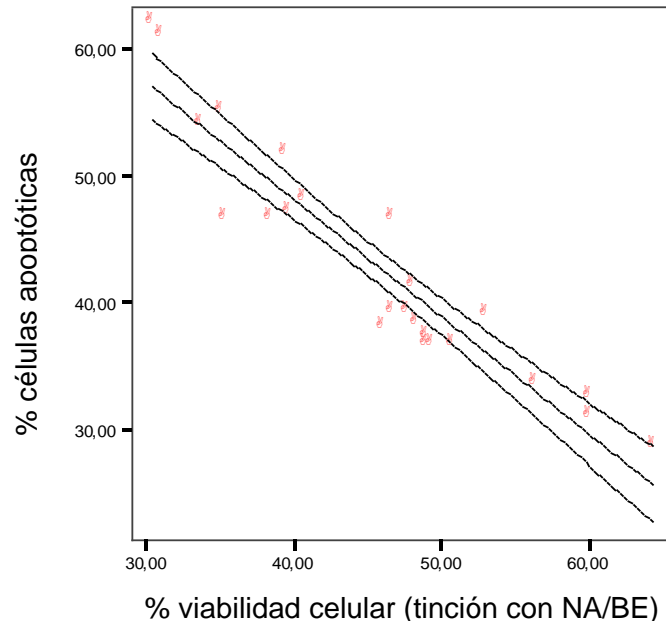
Figura 14. Concentración de veneno Vs. porcentaje de células viables (tinción con NA/BE)



El mayor porcentaje de células apoptóticas (53%), de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples HSD de Tukey, corresponde a la concentración alta de veneno (6000ng/mL), seguido de la concentración baja (6×10^{-3} ng/mL) y media (6 ng/mL en el medio), con un porcentaje de 47% y 38%, respectivamente. En coherencia con lo anterior, el porcentaje de células viables más bajo (38%) corresponde a la concentración alta de veneno, que fue la que indujo el mayor porcentaje de células apoptóticas, seguido del 39% y 49%, correspondiente a la concentración baja y media de veneno, respectivamente. Por el contrario, el porcentaje de células necróticas no mostró estar asociado al de células apoptóticas ni al de células viables, aunque se notó una ligera disminución a medida que aumentaba la concentración del veneno, correspondiéndole el porcentaje más alto (14%) de células necróticas a la concentración baja, seguido de la concentración media y alta del mismo con un 13% y 9%, respectivamente.

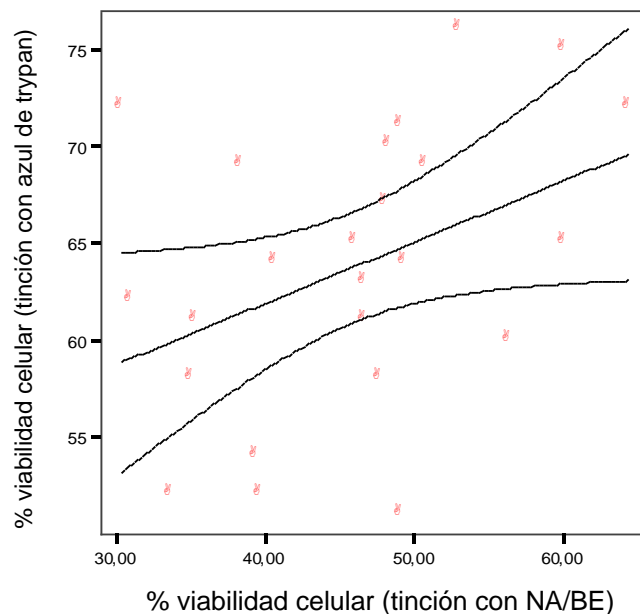
Con base en el análisis de correlación y regresión lineal simple, se identificó asociación lineal negativa o relación inversamente proporcional entre el porcentaje de viabilidad celular y el porcentaje de células apoptóticas ($R = -0.940$, $P = 0.000$), habiendo una disminución en el porcentaje de células viables a medida que incrementa el porcentaje de células apoptóticas. El coeficiente de determinación ($R^2 = 0.88$) indica que la variabilidad del porcentaje de células apoptóticas depende en un 88% de la variabilidad del porcentaje de viabilidad celular. La curva de regresión lineal que confirma tal asociación se muestra en la siguiente figura:

Figura 15. Porcentaje de células viables Vs. porcentaje de células apoptóticas



No se encontró asociación entre el porcentaje de viabilidad celular y el porcentaje células necróticas y tampoco entre el porcentaje de células apoptóticas y el porcentaje de células necróticas, pero sí una asociación positiva ($R = 0.409$, $P = 0.047$) entre el porcentaje de viabilidad celular obtenido en el ensayo con azul de trypan y el porcentaje de viabilidad celular obtenido en la tinción con NA/BE en la prueba de apoptosis, lo cual señala una correspondencia de la viabilidad celular observada en ambas técnicas de tinción. Éste último resultado se ilustra en la siguiente figura:

Figura 16. Porcentaje de viabilidad celular con NA/BE Vs. porcentaje de viabilidad celular con azul de trypan



8. DISCUSIÓN

8.1 CUANTIFICACIÓN PROTEICA DEL VENENO

La concentración proteica del veneno de *Bothrops asper*, equivalente a 127.05 mg/mL, de acuerdo con Thomas & Griessel (1999), se encuentra dentro del rango establecido para la especie (100 – 310 mg/mL). Aunque el valor ideal sería aquel que esté más cercano al del promedio (205 mg/mL), la concentración obtenida, que se encuentra por debajo del mismo, se explica por la variabilidad de los venenos ofídicos, incluso a nivel individual, en función de diversos factores que condicionan su concentración tales como: hábitat, variaciones estacionarias, dieta, edad (estudios han demostrado que la concentración del veneno de una serpiente, incluida la actividad de algunos de sus componentes, tiende a ser mayor en su estado juvenil, y el individuo del cual se extrajo el veneno se encontraba en estado adulto), dimorfismo sexual, origen de la serpiente, procedimiento y frecuencia de desvenenamiento, condiciones de cautiverio e incluso el almacenamiento del veneno después de ser extraído (Chippaux *et al.*, 1991).

8.2 CITOTOXICIDAD DEL VENENO

En función de sus componentes con actividad tóxica, lítica y farmacológica, principalmente péptidos, proteínas y enzimas, y de su capacidad para interactuar directa o indirectamente (mediante la liberación de factores endógenos) con diversos sustratos tisulares tanto “*in vivo*” como “*in vitro*”, los venenos ofídicos, además de ejercer toxicidad en músculos y nervios, causar dolor y edema, pueden alterar la homeostasis del sistema cardiovascular, incluyendo eritrocitos, plaquetas, leucocitos, proteínas del plasma (entre ellas los factores de coagulación sanguínea) y las paredes de los vasos sanguíneos. Generalmente el efecto citotóxico del veneno crudo y de las toxinas aisladas a partir de los mismos se asocia con los efectos fisiopatológicos causados por el envenenamiento. De esta forma, tal citotoxicidad ha sido atribuida a la actividad de metaloproteinasas, desintegrinas, lectinas tipo C, proteínas ricas en cisteína, L-aminoácido oxidasas (LAAOs) y fosfolipasas A₂ (generalmente las de carácter básico, que son las variantes del aminoácido aspartato o lisina en la posición 49 de la proteína: PLA₂ Lys-49 o PLA₂ Asp-49) (Gutiérrez and Rucavado, 2000; Petricevich *et al.*, 2000; Xiao-Yan *et al.*, 2006). Las alteraciones en leucocitos (grupo celular que incluye a los linfocitos), asociadas con la respuesta inflamatoria, han sido atribuidas a la actividad de metaloproteinasas, por medio de una vía que implica el clivaje de la glicoproteína ligando-1 de la P-selectina (PSGL-1) (una glicoproteína expresada constitucionalmente en la membrana celular de la mayoría de linfocitos T de sangre periférica humana), desintegrinas y PLA₂ a través de mecanismos, que a pesar de que no se tienen muy claros para estas dos últimas, parecen estar mediados por su especificidad y afinidad, en especial de las PLA₂ y metaloproteinasas, con sitios de unión o receptores presentes en los fosfolípidos de membrana (Xiao-Yan *et al.*, 2006).

De otro lado, el efecto citotóxico de las toxinas ofídicas asociado con la proliferación, viabilidad y muerte celular (apoptótica o necrótica) se atribuye principalmente a las metaloproteinasas, desintegrinas (Araki *et al.*, 2002), PLA₂ y L-aminoácido oxidasas, constituyentes principales de los venenos de la familia Viperidae y Crotalidae, responsables también de las alteraciones patológicas a nivel local y sistémico, anteriormente mencionadas, en parte por su capacidad de degradar la matriz extracelular e interferir en la adhesión de la célula a la misma (Sung-Min and Doo-Sik, 1996; Adrião-Escarso *et al.*, 2002; Mora *et al.*, 2005; Damico *et al.*, 2007), a través de un mecanismo que puede ser dependiente o independiente de su actividad catalítica (Chakraborti, 2003), y aunque continúa en estudio, sugiere la acción directa o indirecta de estas toxinas sobre las células blanco. La primera, clivando o degradando directamente proteínas integrales de membrana, principalmente integrinas, un tipo de moléculas de adhesión celular (presentes también en leucocitos) que median la comunicación intercelular y entre la célula y la matriz extracelular o, alterando gradientes iónicos de la membrana celular, causando despolarización, desestabilización de su permeabilidad y por tanto su disrupción en respuesta a la interacción electrostática de la bicapa lipídica, cargada negativamente con la región C-terminal de estas toxinas, cuyo residuo catiónico e hidrofóbico le permite penetrar a través de la misma (Mora *et al.*, 2005; Xiao-Yan *et al.*, 2006). La segunda, que es la forma indirecta, ocurre a través de la liberación o activación de mediadores endógenos entre los cuales se incluyen algunas citocinas como la IL-10, el ligando del factor de necrosis tumoral α (TNF α) y el interferón gamma (IFN γ), moléculas proteicas que además de estar implicadas en la respuesta infamatoria generada por envenenamiento, también se encuentran involucradas en la transducción de señales de regulación del ciclo de proliferación, supervivencia y muerte celular apoptótica. El óxido nítrico (NO) (Petricevich *et al.*, 2000; Ortega-Camarillo *et al.*, 2001; Rathmell and Thompson, 2002); algunos lisofosfolípidos internos (Vadas, 1997); peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Damico *et al.*, 2007); fosfolipasas endógenas presentes en las células humanas homólogas a las PLA₂s ofídicas y se encuentran implicadas en diversos mecanismos fisiológicos, de defensa y en la proliferación celular (Vadas, 1997; Mora *et al.*, 2005); y algunas proteínas del plasma (Xiao-Yan *et al.*, 2006), entre otros.

8.2.1 Efecto citotóxico del veneno sobre el índice mitótico (IM). En relación al control negativo, la disminución del IM en los linfocitos de sangre periférica humana tratados con las tres concentraciones experimentales de veneno, fue significativa e inversamente proporcional con el aumento de su concentración, observándose el menor IM en la concentración alta (6000 ng/mL). Esto constituye una evidencia de la actividad citotóxica o antimitogénica del veneno de *Bothrops asper*, capaz de deprimir el número de células en proliferación.

Varios estudios realizados “*in vitro*” e “*in vivo*” con toxinas ofídicas; la mayoría con fracciones proteicas aisladas del veneno de varias especies de serpientes, y otros, en menor proporción, con el veneno crudo de algunas especies, entre las que se incluyen las de familia Viperidae; reportan el efecto citotóxico de las mismas sobre la proliferación celular de células normales y tumorales.

Se sabe que las células eucariotas responden a cierto daño bloqueando o impidiendo el avance normal de su ciclo de división. En ese momento, la célula puede reparar el daño o morir por apoptosis o necrosis si el daño es severo (Bernstein *et al.*, 2002; Houtgraaf *et al.*, 2006). Así pues, el efecto citotóxico del veneno de *Bothrops asper*, reflejado en la disminución del número de linfocitos en metafase, se debe a la capacidad del mismo de inducir muerte celular puesto que el

daño causado por los componentes del veneno es tal, que excede la capacidad de reparación de la célula. De este modo, según lo indica el porcentaje de células apoptóticas y necróticas encontrado en el ensayo de apoptosis realizado con células mononucleares mediante la tinción con NA/BE, se puede afirmar que la disminución en el IM puede responder o estar estrechamente relacionada con la muerte apoptótica. La correlación encontrada ($R = 0.588$) entre las concentraciones de veneno (alta, media y baja) que lograron disminuir considerablemente el IM y el porcentaje de células apoptóticas, apoyan esta idea. La correlación entre estas dos variables (disminución del IM y apoptosis) ha sido reportada en estudios realizados con el veneno de varias especies de serpientes (Araki *et al.*, 1993; Sung-Min and Doo-Sik, 1996; Zhao *et al.*, 2002), incluso en células de leucemia humana (Sheng-Huei *et al.*, 2005). Cabe mencionar que este efecto se ha reportado también con una fosfolipasa A₂ (MT-II) aislada a partir del veneno de *Bothrops asper* (Mora *et al.*, 2005). Las vías o mecanismos posiblemente implicados en la inducción de apoptosis y necrosis por la acción del veneno se explicarán más adelante en el numeral 8.2.3 y 8.2.4.

Complementando lo anterior, en función de la asociación establecida entre el bloqueo del ciclo celular y la apoptosis como vía de muerte en él implicada, se ha propuesto denominarle “catástrofe mitótica” o “muerte mitótica” al fenómeno que implica similitud de características morfológicas de la mitosis y apoptosis, y que al sugerir una vía común de proliferación y muerte celular, propone a la apoptosis como una forma abortiva de la mitosis (Erempeisa *et al.*, 2000). Este planteamiento, que puede parecer extremo, confirma la idea de que la inhibición del ciclo celular por causa del efecto citotóxico del veneno se deba o esté estrechamente ligada a la muerte celular apoptótica inducida por las mismas concentraciones que deprimieron el IM.

En relación a la fase del ciclo celular en la cual los linfocitos detienen su proliferación en respuesta al efecto citotóxico del veneno, se sabe que la fase G₀/G₁, específicamente G₁, es el periodo en el cual la célula es susceptible a la inducción de apoptosis (Ortega-Camarillo *et al.*, 2000). Teniendo en cuenta que éste fue el principal tipo de muerte celular encontrado a causa del efecto citotóxico del veneno de *B. asper*, que también fue capaz de disminuir el IM, y que por tanto se cree que la muerte celular apoptótica sea la causa de dicha disminución, se puede plantear que las células que dejaron de dividirse a causa del efecto inhibitorio de los componentes tóxicos del veneno se detuvieron en la fase G₁ del ciclo celular. El bloqueo en esta etapa del ciclo celular por la actividad antimitogénica de las toxinas ofídicas fue comprobada en una línea celular humana del endotelio de cordón umbilical (ECV304) cultivada con una metaloproteinasas básica (TSV-DM) aislada de *Trimeresurus stejnegeri* (Viperidae), en donde, además de observarse que las células tratadas detenían su división en la fase G₀ y G₁ del ciclo celular, se observó también que la cantidad de dichas células aumentaba de manera dependiente de la concentración de la toxina (Shao-Gui *et al.*, 2006). Esto indica que la capacidad del veneno y de sus componentes de bloquear la proliferación celular aumenta a medida que incrementa su concentración. En otro estudio realizado con células de leucemia humana, se encontró que CTX III, una cardiotoxina purificada del elápidio *Naja naja atra*, lograba inhibir el ciclo proliferativo de la línea celular objeto de experimentación, y que además incrementaba la población celular en G₁, efecto que se correlacionó directamente y se atribuyó a su muerte apoptótica (Sheng-Huei *et al.*, 2005). Más adelante se demostró que la misma cardiotoxina tenía la capacidad de detener el ciclo celular en la fase G₂/M, y que dicha inhibición se asociaba a una marcada disminución en los niveles de ciertas proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular tales como las ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (Sheng-Huei *et al.*, 2007).

El efecto citotóxico de los venenos ofídicos asociado con la inhibición de la proliferación celular se atribuye a sus componentes proteicos. En este caso, el bloqueo del ciclo celular por acción del veneno de *Bothrops asper* puede deberse a la actividad de las PLA₂ (Gutiérrez y Lomonte, 1995; Adrião-Escarso *et al.*, 2002) y L-aminoácido oxidasas (LAAOs) presentes en él (Stábeli *et al.*, 2007). El efecto biológico de las LAAOs es indirecto y se debe a su capacidad de producir H₂O₂ a través de una reacción enzimática que involucra la oxidación de los L-amino ácidos. A su vez, un aumento en la concentración de H₂O₂, además de causar la ruptura de la membrana celular, puede detener el ciclo celular e inducir apoptosis (Sung-Min and Doo-Sik, 1996; Damico *et al.*, 2007). El incremento de este potente agente oxidante puede lesionar el ADN, generar estrés celular, y de esta manera inducir la expresión de p53 (Lian-Kun *et al.*, 2003). Simultáneamente, la síntesis elevada y constante de esta proteína, además de causar la detención del ciclo celular a través de la activación de la p21, proteína encargada de inhibir el ciclo proliferativo en la fase G₁, puede también activar la expresión de Bax y Fas, proteínas directamente implicadas en la muerte celular apoptótica por vía intrínseca mediada por mitocondria y por vía extrínseca mediada por receptor, respectivamente (Ortega-Camarillo *et al.*, 2001; Rathmell and Thompson, 2002; Cascales, 2003).

Otro mecanismo plantea la participación de la fosfatidilcolina, uno de los principales fosfoglicéridos que constituyen la bicapa lipídica de la membrana plasmática, como cofactor para que las PLA₂ del veneno ejerzan citotoxicidad disminuyendo la proliferación celular a través de la inactivación de la proteína cinasa C (PKC), una proteína soluble sin actividad catalítica que en condiciones homeostáticas, se encuentra en el citosol (Lodish *et al.*, 2003) y cuya activación depende de los niveles de Ca²⁺ citosólico y de las PLA₂ endógenas, que a su vez pueden ser estimuladas o inhibidas por las PLA₂ exógenas, en este caso las del veneno. Teniendo en cuenta que la activación, tanto de la proteína cinasa C como la de las PLA₂ endógenas desencadena una gran variedad de respuestas celulares que incluyen procesos tan importantes como el metabolismo y proliferación celular, se puede entonces confirmar la idea de que la inhibición o bloqueo del ciclo celular por la acción de las PLA₂ del veneno, posiblemente ocurra vía PKC, en donde parece ser necesaria la interacción de estas toxinas con la fosfatilcolina, que se cree es su sustrato (Fuly *et al.*, 2000; Xiao-Yan *et al.*, 2006).

La disminución de células proliferativas a causa de las toxinas ofídicas se ha reportado en células MDCK (Madin-Darby canine kidney), “*in vitro*”, tratadas con veneno crudo de *Lachesis muta muta* (Damico *et al.*, 2007), en linfocitos de sangre periférica humana cultivados con una fosfolipasa A₂ (LM-PLA₂) purificada a partir del veneno de la misma especie (Fuly *et al.*, 2000) y en células de melanoma humano (skmel-28), “*in vitro*”, tratadas con dos metaloproteinasas (Jara y Jari) aisladas del veneno de *Bothros jararaca* (Côrrea *et al.*, 2002). Sin embargo, Gutiérrez *et al.* (1986), al evaluar la actividad de una fosfolipasa A₂ aislada del veneno de *Bothrops asper* en eritrocitos, linfocitos y macrófagos de ratón, no encontró citotoxicidad de la toxina para las células tratadas con la misma y tampoco respuesta mitogénica en linfocitos (Gutiérrez *et al.*, 1986), indicando que la toxina no tiene actividad citotóxica capaz de inhibir o inducir proliferación celular en linfocitos. En contraste con lo anterior, un estudio realizado por Mora *et al.* (2005), demuestra que MT-II, una PLA₂ Lys49 aislada del veneno *B. asper*, además de inducir daño en la membrana plasmática de una línea celular linfoblastoide, puede inducir también necrosis, apoptosis y proliferación celular dependiendo de la concentración de la miotoxina (Mora *et al.*, 2005). Estos resultados no sólo confirman el amplio espectro de actividades que pueden ejercer las toxinas ofídicas, sino también los distintos sustratos tisulares con los que pueden interactuar dependiendo de la afinidad entre la célula, principalmente de la membrana plasmática,

con los componentes del veneno, siendo algunos tipos celulares más susceptibles que otros a la acción de los mismos, lo cual depende a su vez de gradientes iónicos, polarización, dominios fosfolipídicos de la membrana celular y de la carga neta e hidrofobicidad de los componentes proteicos del veneno (Mora *et al.*, 2005; Xiao-Yan *et al.*, 2006). De otra parte, la diferencia en el comportamiento del veneno crudo y de sus toxinas purificadas, constituye una prueba contundente de la capacidad que tienen estos componentes de actuar individual y/o sinérgicamente, lo que en parte determina mayor o menor toxicidad del veneno (Gremsky *et al.*, 2007). Esto podría explicar la similitud de los efectos producidos por el veneno crudo y por algunas de las miotoxinas purificadas del mismo, y el contraste de la actividad antimitogénica del veneno de *B. asper* encontrada en este estudio con el efecto totalmente contrario reportado por Mora *et al.* (2005). Por demás, las toxinas ofídicas y su modo de acción es un campo aún muy amplio por explorar pero de gran utilidad por su potencial y valiosa utilidad en el tratamiento, o incluso cura de ciertas enfermedades.

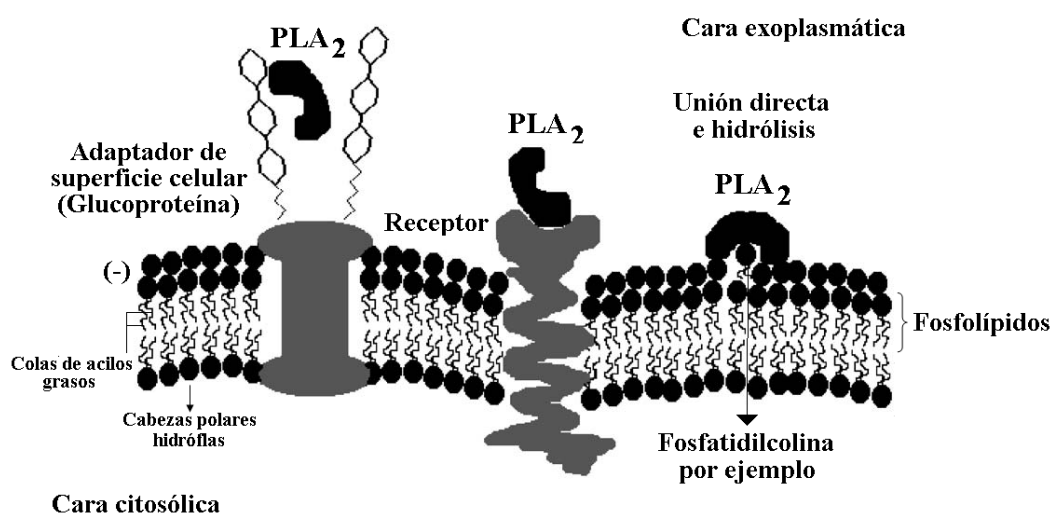
8.2.2 Efecto citotóxico del veneno sobre la viabilidad celular. La viabilidad celular se evaluó con dos técnicas de tinción, la primera se realizó con azul de trypan y la segunda se determinó en el ensayo de apoptosis, mediante la tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio (NA/BE). De acuerdo con el porcentaje de células viables identificadas en la tinción con azul de trypan, las concentraciones experimentales de veneno no influyen en la viabilidad celular. Resultados similares se han reportado empleando el mismo sistema “*in vitro*” y la misma técnica de tinción con células endoteliales y de melanoma cultivadas con el veneno crudo de algunos vipéridos y crotálicos (Borkow *et al.*, 1994), con células del endotelio bovino tratadas con BaH1, la principal metaloproteínasa hemorrágica del veneno de *B. asper* (Borkow *et al.*, 1995), y en células endoteliales humanas y murinas incubadas con BaP1, una metaloproteínasa aislada del veneno de *B. asper* cuantificando la liberación de lactato deshidrogenasa, una enzima indicadora de daño celular (Rucavado *et al.*, 1995). Estos reportes señalan que el veneno y las toxinas aisladas de los mismos no ejercen actividad citotóxica directa sobre las células con las que se ha experimentado.

Por el contrario, los resultados obtenidos en la tinción con NA/BE indican que las concentraciones experimentales de veneno influyen en la viabilidad celular causando una disminución significativa del porcentaje de células viables ($P = 0.000$) en relación al control negativo, especialmente en la concentración alta (38%) y baja (39%) de veneno. Adicionalmente, se encontró una ligera asociación positiva ($R = 0.409$, $P = 0.047$) entre el porcentaje de viabilidad celular determinado con azul de trypan y con el observado en la técnica de tinción con NA/BE. Esta variabilidad de respuesta en las dos técnicas de tinción propone que la viabilidad celular podría no ser un parámetro confiable para evaluar la citotoxicidad del veneno, pero con base en que algunos estudios han evaluado la alteración de la viabilidad celular a causa de las toxinas ofídicas empleando veneno crudo de *Lachesis muta* (Damico *et al.*, 2007) y de *Bothrops leucurus* (Gremski *et al.*, 2007), y una fosfolipasa A₂ Lys49 (miotoxina II (MT-II)) del veneno de *Bothrops asper* (Villalobos *et al.*, 2007) incluso como control positivo (Rucavado *et al.*, 1995), y que a su vez han evidenciado un notorio efecto citotóxico sobre la viabilidad celular de forma dosis y tiempo-dependiente, podría ser más consecuente pensar que el veneno de *B. asper* ejerza actividad citotóxica disminuyendo la viabilidad celular. Por tal motivo, y porque los resultados obtenidos en la segunda prueba apuntan a la citotoxicidad del veneno sobre la viabilidad celular, se explicarán las diferentes vías por las cuales el veneno puede dañar a célula hasta el punto de causar su muerte.

Ahora bien, la disminución de la viabilidad celular, generalmente asociada con el deterioro de la membrana plasmática, ocasionado por desequilibrio electrostático y alteración de su permeabilidad condicionada a su vez por la capacidad de controlar el flujo de iones y moléculas desde el interior al exterior de la célula o viceversa, puede ocurrir en respuesta a la acción directa o indirecta, en este caso, del veneno de *B. asper*. El daño directo es causado principalmente por las fosfolipasas A₂ (PLA₂) (Lomonte *et al.*, 1999), proteínas capaces de hidrolizar los grupos acilo (en la posición *sn*-2) de los ácidos grasos que constituyen la bicapa lipídica de la membrana celular liberando ácidos grasos libres insaturados y lisofosfolípidos, produciendo disrupción de la membrana y finalmente la muerte o pérdida de la viabilidad de la célula (Vadas, 1997; Mora *et al.*, 2005). Se ha propuesto que la fosfatidilcolina, uno de los principales fosfoglicéridos presentes en la superficie de la membrana plasmática, funciona como receptor específico de las PLA₂, convirtiéndose en el blanco de la acción directa de estas miotoxinas (Vadas, 1997; Xiao-Yan *et al.*, 2006). A nivel electrostático, esta afinidad o preferencia de las PLA₂ por los fosfolípidos de la cara exoplasmática de la célula cargados negativamente, que es en esencia la que determina el efecto miotóxico y citotóxico del veneno, se atribuye a los residuos de aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos cercanos a la región C-terminal de estas proteínas (Vadas, 1997; Adrião-Escarso *et al.*, 2002; Villalobos *et al.*, 2007). Aunque también se ha sugerido una participación importante de la región N-terminal (Angulo *et al.*, 2001).

Se ha planteado que la interacción entre las PLA₂ del veneno y la membrana plasmática puede ocurrir a través tres vías que determinan su afinidad y especificidad. La primera propone la presencia de glucoproteínas expresadas constitucionalmente como sitios de unión o adaptadores de superficie celular. La segunda sugiere la existencia de receptores específicos, y la tercera señala la unión directa de estas miotoxinas a la superficie de la membrana causando hidrólisis de fosfolípidos, entre de los cuales, la fosfatidilcolina parece ser uno de los más comunes (Chakraborti, 2003; Xiao-Yan *et al.*, 2006). Estos mecanismos hipotéticos de interacción se modelan en la siguiente figura:

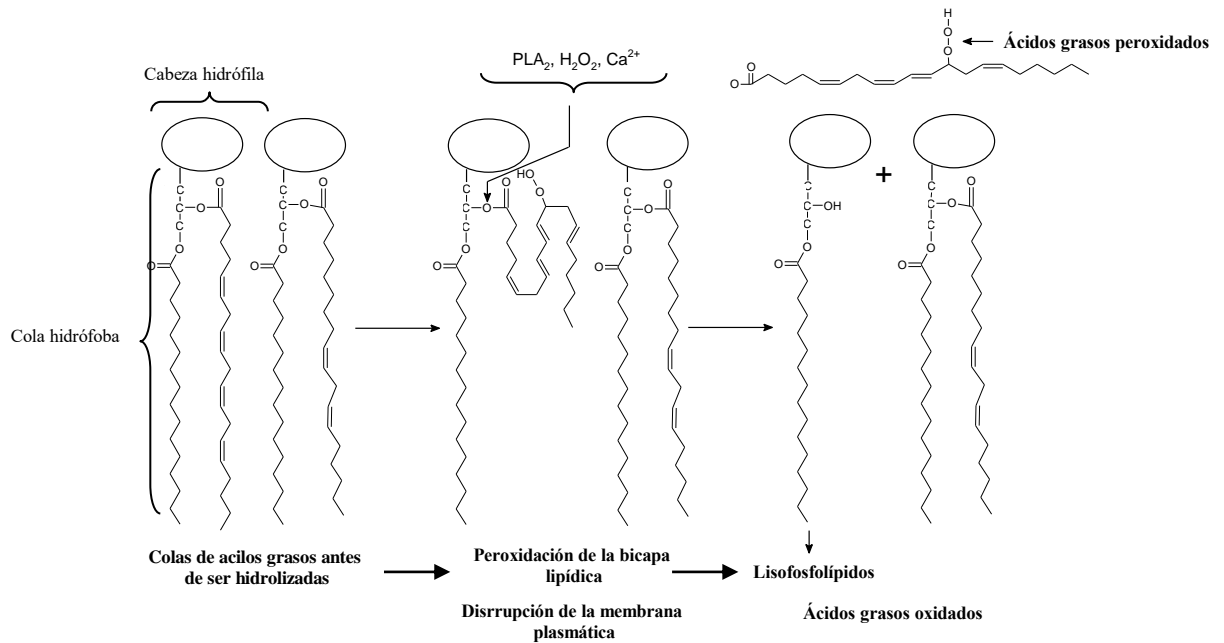
Figura 17. Vías hipotéticas de interacción entre las PLA₂ y la bicapa fosfolipídica



Adaptado de: Chakraborti, S. Phospholipase A₂ isoforms: a perspective. *En* : Cellular Signalling. Vol. 15 (2003); p. 648.

Conociendo ahora las posibles vías por las cuales las PLA₂ pueden unirse a la membrana plasmática, en la siguiente figura se ilustra de forma esquemática la hidrólisis de fosfolípidos por su acción directa e indirecta. Esta última mediada por la activación de las PLA₂ endógenas y el aumento de agentes oxidantes generados a través de reacciones enzimáticas desencadenadas por los componentes tóxicos del veneno, como las LAAOs.

Figura 18. Hidrólisis de fosfolípidos de membrana por vía directa e indirecta



Adaptado de: Chakraborti, S. Phospholipase A₂ isoforms: a perspective. *En* : Cellular Signalling. Vol. 15 (2003); p. 638.

La disrupción de la membrana plasmática por la acción directa de las PLA₂ del veneno genera un desbalance electrolítico, permitiendo que el calcio (Ca²⁺) extracelular entre rápidamente a la célula y que por tanto aumente su concentración en el citosol y finalmente se desencadene ruptura celular. Es por esta razón que el incremento intracelular de este electrolito se encuentra directamente asociado a la acción citolítica de estas miotoxinas. Adicionalmente, el calcio puede entrar al núcleo celular a través de receptores del retículo nucleoplásmico y alterar procesos que incluyen la replicación del ADN, expresión de genes y la actividad de ciertas enzimas. Así pues, queda claro que el control de permeabilidad al calcio y consecuentemente de su concentración en el citosol, depende del mantenimiento de la integridad de la membrana celular (Villalobos *et al.*, 2007).

La disminución de la viabilidad por daño celular directo puede deberse también a la citotoxicidad de las metaloproteinasas, uno de los principales componentes de los venenos bothrópicos con actividad hemorrágica, capaces de producir disrupción de estructuras subcelulares por desbalance metabólico y finalmente la muerte de la célula (Gutiérrez y Rucavado, 2000; Gremski *et al.*, 2007).

En la vía indirecta, las PLA₂ endógenas y la fosfatidilcolina se desempeñan como cofactores facilitadores de la actividad citotóxica inducida por las PLA₂ del veneno (exógenas). De este modo, las PLA₂ básicas (Lys-49 o Asp-49) del veneno, al generar colapso de gradientes iónicos, despolarización y aumento de Ca²⁺ citosólico debido a su entrada excesiva desde el exterior de la célula (Mora *et al.*, 2005; Villalobos *et al.*, 2007), activan las PLA₂ endógenas, específicamente las fosfolipasas citosólicas calcio-dependientes (Chakraborti, 2003). Una vez activadas, las PLA₂ endógenas hidrolizan la bicapa liposomal produciendo lisofosfolípidos y ácidos grasos insaturados, desestabilizan la membrana y hacen más susceptible a la célula para sufrir daño oxidativo. Adicionalmente, el aumento de la concentración de estos lisofosfátidos con actividad lítica en la membrana y en el espacio intra e inter celular, que como se mencionó anteriormente también pueden ser producto de la acción directa de las PLA₂ del veneno, desencadena citólisis y en consecuencia la muerte de la célula. Con base en lo anterior, se ha propuesto que la presencia de cofactores y la modificación o perturbación de la bicapa lipídica mediante la inducción de microdominios de asimetría de membrana, ayudan a potenciar la acción de las PLA₂ exógenas por vía indirecta al hacer que la membrana celular se vuelva permeable a los componentes tóxicos del veneno (Vadas, 1997).

Por otra parte, las L-aminoácido oxidasas (LAAOs), un grupo de enzimas presentes en los venenos de los vipéridos, incluyendo los del género *Bothrops* (Stábeli *et al.*, 2007), pueden influir también en la pérdida de la viabilidad de la célula de modo indirecto catalizando la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por unión directa a los L-aminoácidos de la superficie celular. De esta manera, el incremento local de la concentración de H₂O₂ generado por esta reacción enzimática, además de desencadenar peroxidación lipídica por la unión del H₂O₂ a los ácidos grasos de la membrana celular (ver figura 18), puede inducir también daño oxidativo a otras macromoléculas como el ADN y proteínas (Sung-Min and Doo-Sik, 1996). Cabe mencionar que la peroxidación lipídica ocurre en condiciones de estrés oxidativo, en este caso, las que crea el veneno a través de la producción de agentes oxidantes y su interacción con los componentes de la membrana celular incrementando el nivel de residuos lipídicos oxidados. Esta condición es también determinada por la capacidad de defensa del sistema antioxidativo de la célula, que evidentemente ha sido excedida por las citotoxinas del veneno, permitiendo que éstas ejerzan su actividad (Chakraborti, 2003). Otro mediador endógeno involucrado en el daño y pérdida de la viabilidad celular causada por oxidación, es el óxido nítrico (NO), cuya habilidad para generar peroxinitritos y radicales hidroxilo, le permite promover daño oxidativo a los constituyentes encargados del mantenimiento de la estructura y control de la permeabilidad celular (Petricevich *et al.*, 2000).

Con base en la acción sinérgica de los componentes del veneno, se podría plantear entonces que los ácidos grasos y lisofosfátidos producidos, bien sea por hidrólisis directa o indirecta de las PLA₂, podrían también ser oxidados por el H₂O₂ generado por la reacción enzimática de las LAAOs, lo que a su vez podría incrementar o potenciar el efecto citotóxico del veneno relacionado con el daño celular por disrupción de la membrana plasmática.

Otra de las vías indirectas implicadas en la pérdida de la viabilidad celular por acción del veneno señala la participación individual y sinérgica de las metaloproteinasas como responsables de la degradación de los componentes proteicos de la matriz extracelular (ECM por sus siglas en inglés) y por consiguiente de la lisis de la célula por pérdida de comunicación con las señales de

supervivencia llevadas por los mismos (Gremski *et al.*, 2007). Recordemos que la ECM, además de constituir un marco de sostén, organización, comunicación y adhesión celular, es también la vía de desplazamiento celular y de transporte de señales de transducción implicadas en el crecimiento y diferenciación celular (Lodish *et al.*, 2003). Esta disminución de la viabilidad celular asociada con la proteólisis de la matriz extracelular por acción de las metaloproteinasas ofídicas, se ha reportado también en células HeLa (Krieger and Sobreiro, 2006) y en células del endotelio vascular de cordón umbilical humano (Wen-Bin *et al.*, 2003).

Como se mencionó anteriormente, el porcentaje más bajo de viabilidad celular (38%) determinado en la tinción con NA/BE, se encontró en la concentración alta del veneno de *B. asper*, seguido de la concentración baja (39%). De forma similar, Gremski *et al.* (2007) observan que el menor porcentaje de viabilidad de células endoteliales tratadas con veneno crudo de *B. leucurus* disminuye considerablemente bajo la concentración alta (100 µg/mL), explicando que mayores cantidades o concentraciones de veneno logran inducir así mismo la lisis de la mayoría de células (Gremski *et al.*, 2007). Aunque se ha observado también disminución considerable de la viabilidad celular inducida por bajas concentraciones de veneno. Corrêa *et al.* (2002) encontraron que el menor porcentaje de viabilidad celular en células de melanoma humano “*in vitro*” y en células metastásicas de pulmón “*in vivo*”, lograba inducirse con la concentración más baja de una metaloproteinasa aislada del veneno de *B. jararaca* (Corrêa *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos en éste y en otros estudios que evidencian la reducción de la viabilidad celular en tejidos neoplásicos por la acción citotóxica de los componentes de los venenos ofídicos, incluyendo los bothrópicos, permite pensar una vez más en el potencial uso que se le puede dar a este tipo de toxinas en procedimientos que busquen combatir la progresión tumoral.

8.2.3 Efecto apoptótico inducido por el veneno. Se encontró una asociación directamente proporcional entre las concentraciones experimentales de veneno y el porcentaje de células apoptóticas registradas en cada una de ellas ($R = 0.588$, $P = 0.001$), correspondiéndole a la concentración alta (6000ng/mL) y baja (6×10^{-3} ng/mL en el medio) de veneno, los porcentajes más altos de células apoptóticas: 53% y 47%, respectivamente. Esto indica que el veneno de *Bothrops asper* tiene la capacidad de inducir apoptosis en células mononucleares de sangre periférica humana y que el efecto apoptótico es más notorio en la concentración alta de veneno. Lo anterior es corroborado por el porcentaje de células viables encontrado bajo las concentraciones de veneno que lograron inducir el mayor porcentaje de células apoptóticas, pues el menor porcentaje de viabilidad celular (38%) se registró en la concentración alta, que fue aquella en la que se obtuvo el mayor porcentaje de células apoptóticas, seguido del que se registró en la concentración baja (39%), que fue aquella en la que se obtuvo el segundo porcentaje mas alto de células apoptóticas. Con base en esto y con el coeficiente de correlación hallado para las dos variables ($R = -0.940$, $P = 0.000$), se puede afirmar que el veneno de *B. asper*, además de influir en la viabilidad celular (determinada mediante la tinción con NA/BE), disminuyéndola a medida que aumenta su concentración, puede también inducir apoptosis bajo las mismas concentraciones que logran disminuir el porcentaje de células viables. En adición, dicha afirmación se apoya en el coeficiente de determinación (R^2), el cual indica que la variabilidad del porcentaje de células apoptóticas depende en un 88% de la variabilidad de la viabilidad celular.

El porcentaje más bajo de células apoptóticas (38%) y el porcentaje más alto de células viables (49%) se encontró en la concentración media de veneno, por lo que se podría sugerir que la concentración media (6 ng/mL en el medio) del veneno de *B. asper* es subcitotóxica para las células mononucleares y que por tal motivo las células tratadas con ésta respondieron en forma distinta a la observada en las otras dos concentraciones (alta y baja). El considerar la concentración media de veneno como subcitotóxica, no sería del todo incoherente si se tiene en cuenta que bajo las concentraciones de veneno así clasificadas, se ha encontrado una respuesta distinta, generalmente más baja, que implica poca alteración de los parámetros morfológicos a evaluar, a la que muestran los modelos celulares tratados con concentraciones citotóxicas (Mora *et al.*, 2005).

Es claro que los resultados obtenidos en este ensayo mediante microscopía de fluorescencia empleando NA/BE en la tinción, apuntan a la capacidad inductora de apoptosis del veneno de *Bothrops asper*. Este efecto se atribuye a la acción citotóxica de los componentes del veneno tales como las PLA₂, L-aminoácido oxidasas (LAAOs) y metaloproteinasas, que como ya se ha referido anteriormente, también se encuentran implicados en la fisiopatología del envenenamiento y además han mostrado ejercer actividad citotóxica capaz de influir en el ciclo de división (disminuyendo el IM) y en la viabilidad celular. Asumiendo que el efecto apoptótico del veneno de *B. asper* se debe a la actividad de estas toxinas, se explicará a continuación las vías y los mediadores implicados en su modo de acción, en donde se sugiere el mecanismo mediante el cual logran inducir la muerte celular apoptótica, en este caso de las células mononucleares, “*in vitro*”.

En principio, existen principalmente dos vías mediante las cuales las células del sistema inmune y en general las células de los mamíferos pueden morir por apoptosis: la primera (vía intrínseca), ocurre como resultado de la pérdida de señales de supervivencia, y la segunda (vía extrínseca), a través de la activación de receptores de muerte. La muerte desencadenada por vía intrínseca está mediada por la mitocondria e implica la desregulación de su homeostasis por pérdida del potencial transmembranal ($\Delta\Psi_m$) debido al aumento de osmolaridad en la matriz. La muerte por vía extrínseca ocurre a través de la activación de los receptores de superficie celular de la familia TNF, tales como TNF y Fas, cuya unión con sus respectivos ligandos (TNF α y FasL) transmiten señales que dan inicio al programa apoptótico (Ortega-Camarillo *et al.*, 2001; Rathmell and Thompson, 2002).

Tanto en la vía intrínseca como en la vía extrínseca, las caspasas cumplen una importante función como mediadoras del proceso apoptótico ejerciendo su actividad proteolítica, tanto en la fase de iniciación como en la fase efectora. Dentro de las caspasas iniciadoras, la caspasa 9 participa en la vía mediada por mitocondria, y las caspasas 8 y 10, en la vía desencadenada por la activación de receptores de muerte. Dentro de las caspasas efectoras, la caspasa 3 interviene en la vía intrínseca mitocondrial. Se ha demostrado que las toxinas ofídicas tienen la capacidad de inducir la activación de estas caspasas y desencadenar así la muerte celular por apoptosis (Maruyama *et al.*, 2005; Sheng-Huei *et al.*, 2005).

Las toxinas ofídicas pueden desencadenar apoptosis por vía intrínseca y extrínseca. La vía intrínseca puede ser activada por las L-aminoácido oxidasas (LAAOs), cuya capacidad de generar y aumentar la concentración de H₂O₂ intracelular (Sung-Min and Doo-Sik, 1996) le confiere

indirectamente la habilidad para inducir la desestabilización, y ocasionalmente la ruptura, de la membrana externa de la mitocondria y por consiguiente la liberación de factores proapoptóticos o proteínas activadoras de capas tales como el citocromo C desde el espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citosol, dando inicio a la proteólisis de componentes fundamentales del núcleo y del citoplasma implicados en el mantenimiento de la estructura celular, y de proteínas relacionadas con el metabolismo y reparación del ADN, contribuyendo así a la expresión de cambios bioquímicos y morfológicos propios de las células que experimentan apoptosis. La liberación de citocromo C, junto con el desacoplamiento de la cadena respiratoria, constituyen uno de los eventos tempranos de la apoptosis mediada por mitocondria. Una vez en el citosol, el citocromo C se une a Apaf-1 (factor activador de proteasas apoptóticas) y a la procaspasa 9 en presencia de dATP para formar el apoptosoma, promover la activación de la caspasa 3 a través de su clivaje, y desencadenar la cascada proteolítica que da lugar a los cambios característicos de la apoptosis, estos son: condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, encogimiento o contracción de la célula (reflejado en la disminución de su tamaño), formación de vesículas o evaginaciones en la membrana plasmática y formación de cuerpos apoptóticos (Ortega-Camarillo *et al.*, 2001; Rathmell and Thompson, 2002). Un estudio realizado con CTX III, una cardiotoxina aislada del veneno de *Naja naja atra*, demostró que la toxina era capaz de inducir apoptosis en células de leucemia humana a través de un mecanismo dependiente de mitocondria y de caspasa, observándose que la activación de la caspasa 9 y posteriormente de la caspasa 3, ocurría en forma lineal y específica en respuesta a la liberación del citocromo C de la mitocondria. Adicionalmente se logró indentificar la degradación de proteínas involucradas en el metabolismo y reparación del ADN como la poli (ADP ribosa) polimerasa (PARP), y en el mantenimiento de la estructura celular, como la β -actina, como consecuencia de la actividad de la caspasa 3 (Sheng-Huei *et al.*, 2005).

En el desacoplamiento de la cadena respiratoria, otro de los cambios tempranos asociados con la alteración de la mitocondria, la vía de señalización de la ceramida desempeña un importante papel en la inducción de la muerte celular apoptótica (Ortega-Camarillo *et al.*, 2001). Recuérdese que la ceramida es un esfingolípido, una clase de lípido abundante en la membrana celular de animales y vegetales, cuya significancia biológica radica en la función que ejerce en la célula como molécula señal, especialmente en el control de su supervivencia, proliferación y muerte. Se ha demostrado que las PLA₂ (ácidas, básicas y neutras) del veneno de los vipéridos incrementan el nivel intracelular de ceramida y que este aumento se encuentra asociado con la apoptosis, por lo que se sugiere que las PLA₂ ofídicas inducen este tipo de muerte celular mediante un mecanismo que involucra el incremento en la generación del esfingolípido. La generación de la ceramida también puede ser inducida por estímulos como radiaciones (ionizantes y UV), agentes quimioterapéuticos, y citocinas, tales como el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y el interferón gamma (IFN γ) (Zhao *et al.*, 2002), moléculas proteicas que pueden incrementarse por la acción de las toxinas ofídicas y que participan activamente en el efecto inflamatorio y choque séptico asociado a la fisiopatología del envenenamiento. De acuerdo con lo reportado por Petricevich *et al.*, 2000, dicho aumento en el nivel de citocinas puede ser inducido por la actividad del veneno crudo de *Bothrops asper* y de *Bothrops jararaca* mediante un mecanismo que aún es desconocido (Petricevich *et al.*, 2000), pero en el que se reconoce la intervención de las metaloproteinasas (Gutiérrez y Rucavado, 2000).

Otro de los factores importantes en la inducción de apoptosis por vía mitocondrial, es sin duda el estado oxidativo de la célula, el cual depende de su capacidad antioxidante y de la concentración

de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (OH). Se ha propuesto que la apoptosis inducida por toxinas ofídicas puede estar mediada por el aumento intracelular de ROS y de la expresión de la proteína supresora tumoral p53, cuya función es controlar la reparación del DNA, inhibir la progresión del ciclo celular e inducir apoptosis cuando el ADN ha sido lesionado (Lian-Kun *et al.*, 2003) bien sea de modo indirecto por los metabolitos bioactivos producidos por la acción de los componentes del veneno, dentro de los que se incluyen los radicales libres de oxígeno y los lisofosfátidos generados, en su orden, por el efecto citotóxico de las LAAOs y PLA₂; o de forma directa por la actividad nucleotidasa, DNAsa y RNAsa asociada a la capacidad que tienen los venenos ofídicos, incluyendo los bothrópicos, de hidrolizar los enlaces fosfodiéster (De Roodt *et al.*, 2003; Valadão and Santoro, 2008).

La especie reactiva de oxígeno comúnmente generada por la acción de los componentes proteicos del veneno, específicamente de las LAAOs o de otras proteínas con efecto biológico similar, es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que al unirse y oxidar a macromoléculas como lípidos, proteínas e incluso el ADN, genera estrés oxidativo, expresado en las características morfológicas que identifican a las células apoptóticas tales como fragmentación nuclear y vesiculaciones de la membrana celular (Sung-Min and Doo-Sik, 1996). Una lesión no reparada en el ADN o las condiciones de estrés celular creadas por el incremento de H_2O_2 pueden inducir la expresión constante de p53, lo que constituye un estímulo para que se lleve a cabo la apoptosis mitocondrial (Ortega-Camarillo *et al.*, 2001; Cascales, 2003). De este modo, se sugiere que el incremento de peróxido de hidrógeno producido por las toxinas ofídicas puede desencadenar apoptosis a través de la expresión de la proteína p53 (Lian-Kun *et al.*, 2003).

Además del potencial redox u óxido-reductor (Rathmell and Thompson, 2002), el flujo de iones como el Ca^{2+} es determinante en el mantenimiento de la homeostasis celular. De ahí que un descontrol en el flujo celular de este electrolito se asocie con condiciones de estrés que conducen a la muerte de la célula (Bernstein *et al.*, 2002). Las toxinas ofídicas tales como las fosfolipasas A₂, presentes también en el veneno de *B. asper*, pueden incrementar la concentración de Ca^{2+} en el citosol al perturbar la permeabilidad de la membrana plasmática, inducir desregulación en la membrana mitocondrial y desencadenar así la apoptosis por vía intrínseca (Mora *et al.*, 2005; Mora *et al.*, 2006). El aumento de calcio citosólico ocurre aún en condiciones “*in vitro*” y puede activar las fosfolipasas endógenas, las nucleasas y proteasas contenidas en el núcleo y citoplasma. Estas dos últimas enzimas, junto con las caspasas, participan activamente en la fase de degradación de la apoptosis, hidrolizando ciertos constituyentes que mantienen la estructura de la célula, entre los que se incluyen algunas proteínas del citoesqueleto y proteínas implicadas en el metabolismo y reparación del ADN (Ortega-Camarillo *et al.*, 2001; Bernstein *et al.*, 2002). Adicionalmente, el ácido araquidónico (AA), uno de los ácidos grasos producidos por la hidrólisis de fosfolípidos inducida por las PLA₂ del veneno, pueden también desestabilizar la mitocondria, inducir la liberación del citocromo C, y por tanto dar inicio a la muerte celular apoptótica (Zhao *et al.*, 2002).

Es importante mencionar que la apoptosis por vía mitocondrial esta mediada por la regulación de los miembros pro- y anti- apoptóticos de la familia Bcl-2. Estos son principalmente Bcl-2, Bcl-xL, que actúan como inhibidores de la apoptosis, y Bad, Bax, Bak, entre otros, que actúan como sus promotores. En condiciones homeostáticas, Bcl-2 y Bcl-xL se encuentran en la cara externa de la

membrana mitocondrial, y Bax, Bad y Bak en el citosol. En presencia de un estímulo apoptótico, la activación de estas tres últimas proteínas implica su traslocación a la mitocondria, en donde se unen a Bcl-2 y Bcl-x_L para inhibir su función antiapoptótica y desestabilizar así la integridad mitocondrial (Ortega-Camarillo *et al.*, 2001; Bernstein *et al.*, 2002; Rathmell and Thompson, 2002). Un estudio realizado con una fracción proteica (ACTX-8) aislada del veneno del vipérido *Agkistrodon acutus*, demostró que la toxina inducía apoptosis mitocondrial a través del aumento en los niveles de expresión de las proteínas Bax, Bad y Bak, cuya activación se encontró directamente asociada con la alteración del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), la liberación del citocromo C hacia el citosol y la consecuente activación de las caspasas 9 y 3 (Zhang and Li-Jun, 2007). Con base en lo anterior y teniendo en cuenta que las proteínas Bcl-x_L, Bak y Bax también se expresan en células normales del sistema inmune, especialmente en linfocitos, aún en condiciones “*in vitro*” (Rathmell and Thompson, 2002), es posible que el veneno de *B. asper* no sólo tenga la capacidad de promover apoptosis mitocondrial en células mononucleares, sino que también pueda inducir la activación de los miembros de la familia Bcl-2, cuya participación es determinante en el proceso de muerte celular apoptótica por vía intrínseca tanto “*in vivo*” como “*in vitro*”.

Así como las células pueden morir por ausencia de señales de crecimiento y supervivencia (apoptosis por vía intrínseca mediada por mitocondria), también pueden hacerlo al recibir señales directas de muerte. En las células del sistema inmune, incluyendo los linfocitos de sangre periférica, los encargados de iniciar este tipo de señalamiento son los miembros de la familia TNF, principalmente el TNF α y el ligando FasL, cada uno con afinidad por sus receptores específicos de superficie celular: TNFR y Fas, respectivamente. La unión de estos ligandos con sus receptores de muerte conducen a la activación de las caspasas, generalmente de la caspasa 8 (Ortega-Camarillo *et al.*, 2001; Rathmell and Thompson, 2002).

Existe evidencia que demuestra que el veneno crudo de algunas serpientes (*B. asper* y *B. jararaca*) y componentes proteicos tales como las metaloproteinasas, pueden inducir la liberación de factores proinflamatorios, que además de participar en la patogénesis del envenenamiento, pueden inducir muerte celular apoptótica “*in vitro*” e “*in vivo*” (Gutiérrez y Rucavado, 2000). Entre estos factores proinflamatorios se encuentran algunas interleucinas (IL-6, IL-8, IL-1, IL-10, entre otras), el TNF α , IFN γ (Petricevich *et al.*, 2000; Corrêa *et al.*, 2002; Gallagher *et al.*, 2005) y Fas. Adicionalmente, algunas toxinas tienen la capacidad de promover apoptosis por vía intrínseca y extrínseca. Tal es el caso de una L-aminoácido oxidasa aislada del veneno de *Agkistrodon acutus*, una toxina que puede inducir apoptosis promoviendo la expresión de la proteína Fas y la activación de las caspasas 9 y 3 como consecuencia de la disrupción de la membrana mitocondrial (Zhang and Cui, 2007).

Las metaloproteinasas pueden promover apoptosis a través de la liberación de TNF α (Gallagher *et al.*, 2005) y la degradación de los componentes de la matriz extracelular (Gutiérrez y Rucavado, 2000). La expresión de TNF α trae consigo el clivaje de las integrinas, proteínas integrales de membrana encargadas de mediar la interacción entre las células y la matriz. De esta manera, las metaloproteinasas, al degradar las integrinas y los componentes de la matriz extracelular por su acción proteolítica, provocan un aislamiento físico por pérdida de señales de transducción e inducen *anoikis*, un tipo de muerte celular apoptótica que ocurre en respuesta a la ausencia de comunicación entre la célula y la matriz extracelular. Esta pérdida de señales de transducción

implica así mismo la pérdida de señales estimuladoras de crecimiento, proliferación y supervivencia celular (Araki *et al.*, 2002; Gallagher *et al.*, 2005; Tanjoni *et al.*, 2005).

Debido a que la apoptosis puede ocurrir en respuesta a la acción de un agente cito o genotóxico lesivo para el ADN (Fenech *et al.*, 1999; Israels and Israels, 1999; Bernstein *et al.*, 2002; Lian-Kun *et al.*, 2003; Houtgraaf *et al.*, 2006), podría proponerse a la apoptosis como biomarcador no sólo de citotoxicidad sino también de genotoxicidad. Con base en que el veneno de los vipéridos, incluyendo los bothrópicos pueden causar daño en el material genético por su actividad nucleotidasa, DNasa y RNasa, asociada a su vez con su capacidad de hidrolizar enlaces fosfodiéster (De Roodt *et al.*, 2003; Valadão and Santoro, 2008), cabe plantear que el efecto apoptótico inducido por el veneno de *B. asper* se debe a la cito y/o genotoxicidad ejercida por el mismo. Idea que se complementa con la genotoxicidad evaluada “*in vitro*” del veneno de la misma especie, reflejada en la expresión de micronúcleos en células de sangre periférica de ratón (Yasnó, 2005). Así pues, el efecto genotóxico del veneno de *B. asper* queda como campo abierto a la investigación.

Finalmente, la importancia de que el veneno de *B. asper* induza muerte celular apoptótica, bien sea por su efecto cito o genotóxico, a través de vía intrínseca y/o extrínseca, radica en que mediante la activación y ejecución de este relevante evento biológico se asegura la supervivencia y funcionamiento normal de la célula, puesto que se impide que un daño en el ADN persista a través del ciclo celular y se exprese como una mutación que posiblemente conduzca al desarrollo de enfermedades como el cáncer (Fenech *et al.*, 1999; Houtgraaf *et al.*, 2006). Adicionalmente, se ha demostrado que la inducción de apoptosis es el principal mecanismo de los agentes anticáncer (Lian-Kun *et al.*, 2003; Zhang and Cui, 2007), y que los venenos crudos de elápidos, vipéridos y crotálicos, y ciertas toxinas aisladas con actividad antitumoral, promueven la eliminación de células neoplásicas “*in vivo*” e “*in vitro*” e inhiben el proceso de angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos inducida por el tumor para nutrirse) (Wen-Bin *et al.*, 2003) a través de la apoptosis (Abu-Sinna *et al.*, 2003; Debnath *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2007; Stábeli *et al.*, 2007). Por lo tanto, es posible proponer al veneno de esta especie de serpiente o a sus componentes proteicos aislados como una vía alterna o nueva modalidad terapéutica para combatir la progresión tumoral, pues es claro que su acción es similar a la de los compuestos que se emplean comúnmente en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, el potencial uso de las toxinas que constituyen al veneno de *B. asper* al igual que el de muchos otros venenos, requiere no sólo de más estudio, sino también de resultados que apunten al esclarecimiento del (los) mecanismo (s) mediante el (los) cual (es) el veneno y sus componentes logran inducir la activación de factores endógenos vinculados a la muerte celular apoptótica por vía mitocondrial y por vía mediada por receptor.

8.2.4. Efecto necrótico inducido por el veneno. El veneno de *B. asper* influyó en el porcentaje de células necróticas ($P = 0.009$), correspondiéndole el mayor porcentaje (14%) a la concentración baja de veneno (6×10^{-3} ng/mL en el medio) y el porcentaje más bajo (9%), a la concentración alta (6000 ng/mL en el medio de cultivo). Además, el porcentaje de necrosis no mostró estar asociado con el de apoptosis, ni con el de viabilidad celular. Los resultados indican que el veneno de *B. asper* puede inducir necrosis, pero teniendo en cuenta que el porcentaje de células apoptóticas fue notoriamente mayor que el de células necróticas, especialmente en la concentración alta, se puede plantear que el efecto apoptótico predomina sobre el necrótico.

Efecto similar se registró en un estudio que evaluó la muerte celular apoptótica y necrótica inducida por el veneno de algunos vipéridos y elápidos en células del endotelio vascular (VEC), en donde se encontró que los venenos de los primeros, cuya actividad es hemorrágica, logran inducir principalmente apoptosis, mientras que los segundos, de actividad neurotóxica, inducían necrosis a altas dosis (Araki *et al.*, 1993). Sin embargo, otros reportes señalan que la muerte necrótica es característica de la fisiopatología producida por el envenenamiento bothrópico (Lomonte *et al.*, 1999; Gutiérrez y Rucavado, 2000; Petricevich *et al.*, 2000).

La necrosis se define como un tipo de muerte celular traumática y pasiva, caracterizada por hinchamiento y lisis celular por daño drástico en la membrana plasmática con la consecuente liberación de enzimas degradativas y mediadores inflamatorios que afectan y provocan la muerte de las células circundantes, y ocurre como consecuencia de un excesivo daño en el ADN, un desbalance importante en el flujo de iones (Ca^{2+} , Na^+ y K^+) asociado con el aumento patológico principalmente del ion Ca^{2+} , una “catástrofe energética” vinculada a una disminución significativa de ATP (Bernstein *et al.*, 2002) o por excesivas condiciones de estrés oxidativo (Fenech *et al.*, 1999). Las toxinas ofídicas tales como las fosfolipasas A_2 (PLA_2), metaloproteinasas y L-aminoácido oxidasas (LAAOs) pueden inducir muerte celular necrótica. Las PLA_2 , lo hacen a través del aumento patológico de Ca^{2+} citosólico y disrupción de la membrana celular (Mora *et al.*, 2005; Mora *et al.*, 2006). Las metaloproteinasas lo hacen proteolizando los componentes de la matriz extracelular y proteínas integrales de membrana, impidiendo la comunicación célula-célula y célula-matriz, y provocando el incremento en los niveles de $\text{TNF}\alpha$, que puede causar acidosis metabólica (Petricevich *et al.*, 2000). Por último, las LAAOs, promueven necrosis al generar estrés oxidativo por la producción y elevación en la concentración de H_2O_2 intracelular (Sung-Min and Doo-Sik, 1996). Adicionalmente, se ha revelado que el veneno bothrópico tiene actividad ATPasa (Valadão and Santoro, 2008), lo cual puede contribuir a la “catástrofe energética” antes mencionada y facilitar o potenciar la muerte celular por necrosis.

De otro lado, se ha revelado que en condiciones “*in vitro*”, el fenómeno de muerte celular que se identifica como necrosis, corresponde a los cambios bioquímicos y morfológicos que ocurren en la fase final de la apoptosis, en donde las señales, que en un principio activaron la muerte apoptótica de la célula, comienzan a desaparecer, dando lugar a cambios aún más drásticos (aumento excesivo y patológico de Ca^{2+} y H_2O_2 intracelular, disrupción de la membrana plasmática y una considerable disminución en los niveles de ATP) que conducen finalmente a lo que algunos autores denominan **necrosis secundaria** (Sung-Min and Doo-Sik, 1996; Cascales, 2003; Baskić *et al.*, 2006) o “**necroptosis**” (Nigam *et al.*, 2008).

Ahora bien, el porcentaje de células necróticas encontrado en el ensayo de fluorescencia con NA/BE, que fue considerablemente menor al de células apoptóticas, se puede atribuir a la actividad de las PLA_2 , metaloproteinasas o LAAOs del veneno de *B. asper*, o, por tratarse de un estudio “*in vitro*”, puede corresponder a un estadio final de la apoptosis. Idea que no puede dejarse de lado si se tiene en cuenta que los cambios que suceden en la fase de degradación de la apoptosis coinciden con las alteraciones que ocurren en la etapa inicial de la necrosis. Éstos incluyen la liberación de enzimas degradativas (endonucleasas) y la hidrólisis de componentes ultraestructurales de la célula encargados del mantenimiento de su estructura (Fenech *et al.*, 1999; Ortega-Camarillo *et al.*, 2001).

A raíz del planteamiento de que el efecto apoptótico del veneno de *B. asper* prima sobre el necrótico, surge una pregunta: ¿cómo la célula asegura que su muerte ocurra principalmente por apoptosis más que por necrosis?. Si bien esa decisión depende de la condición metabólica determinada por el estado redox intracelular (oxidante/antioxidante), los niveles de ATP, la fluctuación iónica y el grado de daño de la membrana plasmática, para que la célula opte por la vía apoptótica, las anteriores condiciones deben presentarse a su favor. Esto implica un nivel de daño celular no muy severo, principalmente en el ADN, que asegure el mantenimiento de ATP para evitar una “catástrofe energética”, que las concentraciones de iones como el Ca^{2+} dependientes del mismo permanezcan constantes, y que por lo tanto las caspasas, consideradas como las verdaderas ejecutoras de la apoptosis y que también requieren de ATP o dATP, puedan ejercer su función (Fenech *et al.*, 1999; Bernstein *et al.*, 2002).

El encontrar un bajo porcentaje de células necróticas y el hecho de que la apoptosis sea el efecto predominante del veneno de *B. asper*, constituye un motivo más para pensar en el potencial uso que se le puede destinar al veneno de esta especie en la terapia contra enfermedades como el cáncer, pues a través de la inducción de apoptosis, el efecto citotóxico del veneno asegura que la muerte de las células sea individual y selectiva, y no por el contrario masiva, lesiva y por consiguiente patológica.

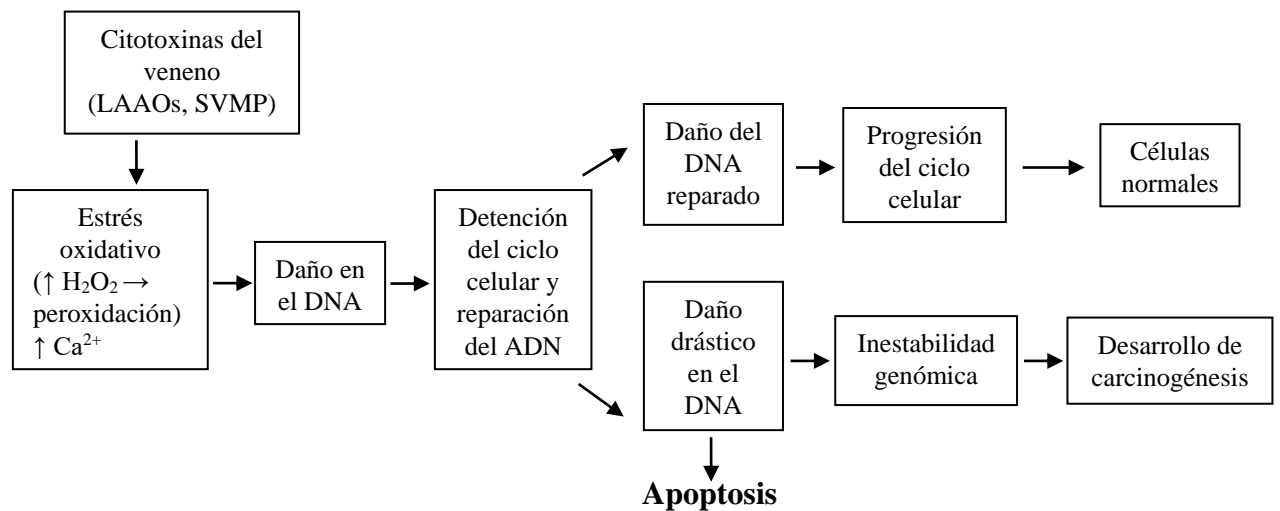
8.2.5 Correlación entre índice mitótico, viabilidad celular y apoptosis. Es claro que el veneno de *Bothrops asper* tiene efecto citotóxico capaz de disminuir el número de células en división, la viabilidad celular y de inducir muerte celular apoptótica y necrótica. Esta última en menor proporción. La relación entre estas tres variables está dada por un momento fundamental en el ciclo de división celular: el espacio de tiempo que la célula toma para reparar el daño causado principalmente por los componentes proteicos (con o sin actividad enzimática) del veneno. Este lapso, reflejado en la disminución del número de células en metafase como consecuencia de la detención del ciclo proliferativo, representa un estado decisivo en el que las condiciones metabólicas de la célula (estado redox, niveles de ATP y Ca^{2+} intracelular, y transducción de señales extrínsecas implicadas en la supervivencia de la célula) determinan el transcurso normal de su división o su muerte en caso de que el daño producido exceda su capacidad de reparación. Si la célula activa su maquinaria de muerte, ésta puede ocurrir por dos vías: apoptótica o necrótica, aunque esta última en condiciones “*in vitro*” puede ser efecto tardío de la primera. A su vez, la muerte celular (bien sea por apoptosis o necrosis) implica de manera inherente la pérdida de su viabilidad. Hecho que se comprueba con el porcentaje de células apoptóticas y viables encontrado en el ensayo de apoptosis mediante la tinción con NA/BE, en donde la correlación negativa casi perfecta ($R = -0.940$, $P = 0.000$) entre las dos variables, señala que en la medida en que la célula muere, en este caso, principalmente por apoptosis, pierde así mismo su viabilidad o su capacidad para mantenerse viva, puesto que el programa apoptótico así lo determina.

El hecho de que las concentraciones de veneno que en un principio lograron disminuir el índice mitótico hayan inducido también apoptosis, permite pensar que el bloqueo del ciclo de división y la muerte celular apoptótica comparten una vía común (Sheng-Huei *et al.*, 2007). La correlación ya establecida en diversos estudios, incluyendo los que evalúan la citotoxicidad de los venenos y los fracciones proteicas aisladas de los mismos, entre el bloqueo del ciclo proliferativo en la etapa G_1 y la apoptosis, corroboran este planteamiento. En complemento con lo anterior, a través de la muerte celular apoptótica, la célula impide que una lesión inicial en el ADN persista a través del

ciclo y se acumule resultando en una mutación. De allí la importancia del efecto antimitótico y apoptótico inducido por el veneno de *B. asper*, relacionado al mismo tiempo con la pérdida de la viabilidad celular, que por ser semejante al de las sustancias que se emplean en el tratamiento para combatir la progresión tumoral, puede constituir una herramienta clave para el desarrollo de una vía terapéutica alterna contra el cáncer.

Con el ánimo de promover un mejor entendimiento de la relación entre el bloqueo del ciclo, pérdida de la viabilidad, muerte celular apoptótica, y carcinogénesis, se ha realizado el esquema que se ilustra a continuación y que intenta representar e integrar estos eventos, en donde las citotoxinas del veneno pueden participar en la inducción de daño celular.

Figura 19. Daño celular, detención del ciclo de división, apoptosis y carcinogénesis



Adaptado de: Bernstein *et al.* DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *En* : Mutation Research. Vol. 511 (2002); p. 146.

De acuerdo con lo que se ha visto y con base en la anterior figura, podría pensarse que el veneno de *B. asper*, por tener posible efecto genotóxico, en lugar de tener potencial aplicabilidad en el tratamiento contra el cáncer, podría ser mas bien un agente promotor o contribuyente de su desarrollo; pero teniendo en cuenta que la causa principal de la disminución de células en metafase manifestada en el IM fue atribuida a la inducción de apoptosis, y que adicionalmente la pérdida de la viabilidad celular se correlacionó en alto grado con este tipo de muerte; es muy posible que el bloqueo del ciclo proliferativo por efecto del veneno no implique acumulación del daño causado por él, sino que por el contrario, involucre el mantenimiento de la integridad tisular debido a que mediante la inducción de muerte celular apoptótica se promueve la eliminación de células portadoras de daño acumulable y por tanto responsables de la inestabilidad genética que conduciría al cáncer.

En relación a los candidatos responsables del efecto citotóxico y posiblemente genotóxico del veneno de *B. asper*, interesantemente parecen ser los mismos a los que se les atribuyen las consecuencias fisiopatológicas producidas por envenenamiento, y aunque el mecanismo mediante el cual éstos logran inducir los efectos citotóxicos aquí reportados (bloqueo del ciclo y disminución de la viabilidad celular, y muerte celular apoptótica y necrótica) no se tiene completamente claro, se sugiere que estas toxinas ejercen su acción de modo directo por hidrólisis lipídica de la membrana plasmática o de modo indirecto, a través de la liberación de mediadores endógenos que potencian su actividad. Estos componentes proteicos, también llamados citotoxinas, son esencialmente: PLA₂, SVMP (metaloproteinasas) y LAAOs. En ese orden de ideas, se puede afirmar que la diversidad de efectos citotóxicos inducidos por el veneno de *Bothrops asper* responden a la gran variedad no sólo de sus componentes, sino también al modo de acción de los mismos.

9. CONCLUSIONES

La concentración proteica del veneno de *Bothrops asper* es 127.05 mg/mL.

El veneno de *Bothrops asper* tiene efecto citotóxico capaz de inhibir o impedir el ciclo normal de división celular en linfocitos de sangre periférica humana “*in vitro*”.

El veneno de *Bothrops asper* tiene efecto citotóxico capaz de disminuir la viabilidad celular en células mononucleares de sangre periférica “*in vitro*”.

El veneno de *B. asper* tiene actividad citotóxica y posiblemente genotóxica capaz de inducir apoptosis en células mononucleares de sangre periférica “*in vitro*”.

El efecto apoptótico inducido por la actividad citotóxica del veneno de *B. asper*, predomina sobre el necrótico.

El porcentaje de células necróticas posiblemente responda al efecto citotóxico del veneno de *Bothrops asper* o puede ocurrir como efecto secundario de la apoptosis “*in vitro*” (necrosis secundaria).

El efecto citotóxico del veneno de *Bothrops asper* asociado con el bloqueo del ciclo de división, disminución de la viabilidad celular e inducción de apoptosis, posiblemente se deba a la actividad directa o indirecta de las mismas toxinas que producen la fisiopatología característica del envenenamiento bothrópico. Estas citotoxinas incluyen a las fosfolipasas A₂ (PLA₂), metaloproteinasas (SVMP), L-amino ácido oxidasas (LAAOs), y adicionalmente a las DNAsas, RNAsas, nucleotidasas y ATPasas.

En función de su actividad citotóxica, semejante a la que ejercen las sustancias empleadas para combatir la progresión tumoral (bloqueo del ciclo, disminución de la viabilidad celular y apoptosis), el veneno de *Bothrops asper* podría ser una modalidad alterna potencialmente útil en el tratamiento de enfermedades como el cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

ABU-SINNA, Gamal *et al.* Fractionation and characterization of *Cerastes cerastes cerastes* snake venom and the antitumor action of its lethal and non-lethal fractions. En : *Toxicon*. Vol. 42 (2003); p. 207-215.

ADRIÃO-ESCARSO, Sílvia H. *et al.* Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. En : *Biochemil Pharmacology*. Vol. 64 (2002); p. 723-732.

ANGEL, M. Rodrigo. Serpientes de Colombia: Guía práctica para su clasificación y tratamiento del envenenamiento causado por sus mordeduras. En : *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. Vol. 36, No. 1 (1983); p. 11-43, 81-83, 103-130.

ANGULO, Yamileth *et al.* Immunochemical properties of the N-terminal helix of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. En : *Toxicon*. Vol. 39 (2001); p. 879-887.

ARAKI, Satohiko *et al.* Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venom in vascular endothelial cells. En : *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 190, No. 1 (1993); p. 148-153.

_____ *et al.* Involvement of specific integrins in apoptosis induced by vascular apoptosis-inducing protein 1. En : *Toxicon*. Vol. 40 (2002); p. 535-542.

AYERBE, Santiago. Ofidismo en el departamento del Cauca, Colombia: epidemiología, etiología, clínica y complicaciones. En : *Rev. Fac. Cienc. Salud Univ. Cauca*. Vol. 2, No. 4 (2000); p. 21-27.

BASKIĆ, Dejan *et al.* Analysis of cycloheximide – induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/Propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. En : *Cell Biology International*. Vol. 30 (2006); p. 924-932.

BERNSTEIN, Carol *et al.* DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. En : *Mutation Research*. Vol. 511 (2002); p. 145-178.

BORKOW, G. *et al.* Effect of various Viperidae and Crotalidae snake venoms on endothelial cells “*in vitro*”. En : *Toxicon*. Vol. 32, No. 12 (1994); p. 1689-1695.

_____ ; GUTIERREZ, J. M. and OVADIA, M. “*in vitro*” activity of BaH1, the main hemorrhagic toxin of *Bothrops asper* snake venom on bovine endothelial cells. En : *Toxicon*. Vol. 33, No. 10 (1995); p. 1387-1391.

CALMETTE, A.; SAENZ, A. and COSTIL, L. Effets du venin de cobra sur les greffes cancéreuses et sur le cancer spontané (adénocarcinome) de la souris. En : *C. R. Acad. Sci.* Vol. 197 (1933); p. 205-209, citado por GOMES, Antony *et al.* A Heat Stable protein Toxin (*drCT-I*) from Indian Viper (*daboia russelli russelli*) Venom Having Antiproliferative, Cytotoxic and Apoptotic Activities. En : *Toxicon*. Vol. 49 (2007); p.46-56.

CAMPBELL, Jonathan A. and LAMAR, William W. *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Ithaca : Comstock Publishing Associates. Cornell University Press, 2004. v. 1, p.1-7, 371-375.

CASCALES, Angosto María. Bases moleculares de la apoptosis. En : *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* Vol. 69 (2003); p. 43-70.

CHAKRABORTI, Sajal. Phospholipase A2 isoforms: a perspective. En : *Cellular Signalling*. Vol. 15 (2003); p. 637-665.

CHIPPAUX, J. Snake bites: Appraisal of the Global Situation. En : *Bull World Health Organ*. Vol. 76, No. 5 (1998); p. 515-524.

_____ ; WILLIAMS, V. and WHITE, J. Snake venoms variability: methods of study, results and interpretation. En : *Toxicon*. Vol. 29, No. 11 (1991); p. 1279-1303.

CORRÊA, Mário César *et al.* Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. En : *Toxicon*. Vol. 40 (2002); p. 739-748.

DAMICO, Daniela *et al.* Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A2 (*LmTX-I*) in cultured cells. En : *Toxicon*. Vol. 49 (2007); p. 678-692.

DEBNATH, Anindita *et al.* Venom of Indian monocellate cobra and Russell’s viper show anticancer activity in experimental models. En : *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 111 (2007); p. 681-684.

DE CARVALHO, Daniela D. *et al.* Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. En : *Toxicon*. Vol. 39 (2001); p. 1471-1476.

DE ROODT, Adolfo Rafael; LITWIN, Silvana and ANGEL, Sergio O. Hydrolysis of DNA by 17 snake venoms. En : *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. Vol. 135 (2003); p. 469-479.

ERENPREISA, J. E. *et al.* Arrest in metaphase and anatomy of mitotic catastrophe: mild heat shock in two human osteosarcoma cell lines. En : *Cell Biology International*. Vol. 24, No. 2 (2000); p. 61-70.

FENECH, Michael *et al.* Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. En : *Mutagenesis*. Vol. 14, No. 6 (1999); p. 605-612.

FRANCISCHETTI, Ivo M. B. *et al.* *Bothrops* sp. Snake Venoms: Comparison of Some Biochemical and Physicochemical Properties and Interference in Platelet Functions. En : *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 119C, No. 1 (1998); p. 21-29.

FULY, A. L.; GUIMARÃES, J. A. and MORAES, V. L. Inhibition of lymphocyte activation by a phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* snake venom. En : *Toxicon*. Vol. 38 (2000); p. 517-518. Resumen en: *Abstracts/Toxicon*. (2000); p. 487-595.

GALLAGHER, Paul *et al.* Role of the snake venom toxin jarahagin in proinflammatory pathogenesis: “in vitro” and “in vivo” gene expression analysis of the effects of the toxin. En : *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 441 (2005); p. 1-15.

GEWIES, Andreas. Introduction to Apoptosis. En : *ApoReview*. p. 1-26.

GOEPTAR, Arnold R. *et al.* The cytotoxicity of mitomycin C and Adriamycin in genetically engineered V79 cell lines and freshly isolated rat hepatocytes. En : *Chemico-Biological Interactions*. Vol. 97 (1995); p. 149-168.

GOMES, Antony *et al.* A Heat Stable protein Toxin (*drCT-I*) from Indian Viper (*daboia russelli russelli*) Venom Having Antiproliferative, Cytotoxic and Apoptotic Activities. En : *Toxicon*. Vol. 49 (2007); p. 46-56.

GREMSKI, L. H. *et al.* Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. En : *Toxicon*. Vol. 50 (2007); p. 120-134.

GUTIÉRREZ, J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en América Latina. En : *Rev. Biol. Trop.* Vol. 50, No. 2 (2002); 17pp.

_____ ; THEAKSTON, R. D. and WARREL, D. A. Confronting de Neglected problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership. En : *PLoS Med.* Vol. 3, No. 6 (2006); 17 pp.

_____ *et al.* Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. En : *Toxicon*. Vol. 36, No. 11 (1998); p. 1529-1538.

_____ *et al.* Pharmacological activities of a toxic phospholipase A isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. En : *Comp. Biochem. Physiol. C.* Vol. 84, No. 1 (1986); p. 159-164.

_____ and LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. En : *Toxicon*. Vol. 33, No. 11 (1995); p. 1405-1424.

_____ and RUCAVADO, Alexandra. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. En : *Biochimie*. Vol. 82 (2000); p. 841-850.

HÄCKER, Georg. The morphology of apoptosis. En : *Cell Tissue Res.* Vol. 301 (2000); p. 5-14.

HAMPTON, M. B. and ORRENIUS, S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. En : *FEBS Lett.* Vol. 414 (1997); p. 552-556, citado por FENECH, Michael *et al.* Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. En : *Mutagenesis*. Vol. 14, No. 6 (1999); p. 605-612.

HASSAN, S. B. *et al.* Primary lymphocytes as predictors for species differences in cytotoxic drug sensitivity. En : *Toxicology "in vitro"*. Vol. 21 (2007); p. 1174-1181.

HOUTGRAAF, Jaco H.; VERSMISSEN, Jorie and GIESSEN, Wim J. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. En : *Cardiovascular Revascularization Medicine*. Vol. 7 (2006); p. 165-172.

IKEDA, Kayo *et al.* A convenient Method for the Evaluation of Anti-Tumor Agentes Affecting the Cell Cycle. En : Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 90, No. 5 (2000); p.514-516.

ISRAELS, Lyonel G. and ISRAELS, Esther D. Apoptosis. En : Stem Cells. Vol. 17 (1999); p. 306-313.

KRIEGER, Caroline and SOBREIRO, Heloisa. Effect of rACLF, a recombinant snake venom metalloproteinase on cell viability, chemokine expression and degradation of extracellular matrix proteins En : Toxicon. Vol. 48 (2006); p. 641-648.

LEE, Soo Chung *et al.* Synergistic effects of hydrogen peroxide and ethanol on cell viability loss in PC12 cells by increase in mitochondrial permeability transition. En : Biochemical Pharmacology. Vol. 70 (2005); p. 317-325.

LIAN-KUN, Sun *et al.* Apoptotic effect in the glioma cells induced by specific protein extracted from Okinawa Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom in relation to oxidative stress. En : Toxicology “in vitro”. Vol. 17 (2003); p. 169-177.

LODISH, Harvey *et al.* Biología celular y molecular. 4 ed. España : Panamericana, 2003. p. 11, 491, 529, 890, 893, 970, 971, 976, 977, 1044-1045.

LOMONTE, Bruno *et al.* Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A₂ on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells “in vitro”. En : Toxicon. Vol. 37 (1999); p. 145-158.

MARINI, Marina *et al.* Apoptosis of Human Lymphocytes in the Absence or Presence of Internucleosomal DNA cleavage. En : Biochemical and Biophysical research Communications. Vol. 229 (1996); p. 910-915.

MARKLAND, F. Snake venoms and the hemostatic system. En : Toxicon. Vol. 36, No. 12 (1998); p. 1749-1800.

MARSHALL, D. McCue. Enzyme Activities and biological functions of snake venoms. En : Applied Herpetology. Vol. 2 (2005); p. 109-123.

MARUYAMA, Jiro *et al.* Severe cell fragmentation in the endothelial cell apoptosis induced by snake apoptosis toxin VAP1 is an apoptotic characteristic controlled by caspases. En : Toxicon. Vol. 46 (2005); p. 1-6.

MATTISON, Christopher. The Encyclopedia of Snakes. New York : Checkmark Books, 1995. p. 10, 17-19, 47, 70, 115-116, 245.

MORA, Rodrigo *et al.* A Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. En : Toxicon. Vol. 45 (2005); p. 651-660.

_____ *et al.* Calcium plays a key role in the effects induced by snake venom Lys49 phospholipase A₂ homologue on a lymphoblastoid cell line. En : Toxicon. Vol. 47 (2006); p. 75-86.

MURILLO, M. Raúl Hernando y GAMBOA, Oscar. Investigación y situación del cáncer en Colombia. En : Innovación y Ciencia. Vol. 8, No. 1 (2006); p. 38-47.

NIGAM, Manisha *et al.* Centchroman induces G₀/G₁ arrest and Caspase-dependent Apoptosis involving Mitochondrial Membrane Depolarization in MCG-7 and MDA MB-231 Human Breast Cancer Cells. En : Life Sciences. Vol. 82 (2008); p. 577-590.

ORTEGA-CAMARILLO, Clara *et al.* La apoptosis y su importancia biomédica. En : Gac. Méd. Méx. Vol. 137, No. 6 (2001); p. 563-574.

OTERO, Rafael. Manual de diagnóstico y tratamiento del accidente ofídico. Universidad de Antioquia. Medellín-Colombia : Yuluka, 1994. p. 9-19.

_____ *et al.* Características bioquímicas y capacidad neutralizante de cuatro antivenenos polivalentes frente a los efectos farmacológicos y enzimáticos del veneno de *Bothrops asper* y *Porthidium nasutum* de Antioquia y Chocó. En : Iatreia. Vol. 15, No. 1 (2002); p. 5-15.

PINEDA, Daniel y RENJIFO, Juan M. Accidente ofídico. En : Pineda D. Accidentes por animales venenosos. Bogotá-Colombia : División de Biblioteca y Publicaciones. Instituto Nacional de Salud, 2002. p. 17-63.

PETRICEVICH, Vera L. *et al.* Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. En : Toxicon. Vol. 38 (2000); p. 1253-1266.

PLEWA, Michael J.; WAGNER, Elizabeth D. and JAZWIERSKA, Paulina. Halonitromethane Drinking Water disinfection Byproducts: Chemical Characterization and mammalian Cell Cytotoxicity and Genotoxicity. En : Environ. Sci. Technol. Vol. 38 (2004); p. 62-68.

PUTTONEN, Katja A. *et al.* Different viabilities and toxicity types after 6-OHDA and Ara-C exposure evaluated by four assays in five cell lines. En : Toxicology “in vitro”. Vol. 30 (2007); p. 2-8.

RATHMELL, Jeffrey C. and THOMPSON, Craig B. Pathways of Apoptosis in Lymphocyte development, Homeostasis, and Disease. En : Cell. Vol. 109 (2002); p. 97-107.

RODRÍGUEZ-ACOSTA, Alexis. Los venenos y el síndrome de envenenamiento ofídico. En : Rev. Med. Trop. No. 9 (2001); 13pp.

RUCAVADO, Alexandra *et al.* Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: Effectiveness of early *in situ* administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa₂ EDTA. En : Am. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 63, No. 5 (2000); p. 313-319.

_____ *et al.* Local Tissue Damage Induced by BaP1, a Metalloproteinase Isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) Snake Venom. En : Experimental and Molecular Pathology. Vol. 63 (1995); p. 186-199.

SEHLMAYER, Ulrich *et al.* Low mutagenic effects of mitomycin C in undifferentiated embryonic PI 9 cells are correlated with efficient cell cycle control. En : Mutation Research. Vol. 354 (1996); p. 103-112.

SHAO-GUI, Wan *et al.* A snake venom metalloproteinase that inhibited cell proliferation and induced morphological changes of ECV304 cells. En : Toxicon. Vol. 47 (2006); p. 480-489.

SHENG-HUEI, Yang *et al.* Induction of apoptosis in human leukemia K562 cells by cardiotoxin III. En : Life Sciences. Vol. 76 (2005); p. 2513-2522.

_____ *et al.* Involvement of c-jun N-terminal kinase in G2/M arrest and caspase-mediated apoptosis induced by cardiotoxin III (*Naja naja atra*) in K562 leukemia cells. En : Toxicon. Vol. 49 (2007); p. 966-974.

STÁBELI, Rodrigo G. *et al.* Citotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: Biochemical and functional characterization. En : International Journal of Biological Macromolecules. Vol. 41 (2007); p. 132-140.

SUNG-MIN, Suhr and DOO-SIK, Kim. Identification of the Snake Venom Substance That Induces Apoptosis. En : Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 224 (1996); p. 134-139.

SWEET, Leonard I. *et al.* Xenobiotic-induced apoptosis: significance and potential application as a general biomarker of response. En : Biomarkers. Vol. 4, No. 4 (1999); p. 337-248.

TANJONI, I. *et al.* Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. En : Apoptosis. Vol. 10, No. 4 (2005); p. 851-861.

THOMAS, Séan & GRIESSEL, Eugene. LD₅₀ for various snakes [online]. Dic. 1999. Available from internet: URL:<http://www.seanthomas.net/oldsite/ld50tot.html>.

VADAS, Peter. Group II phospholipases A₂ are indirectly cytolytic in the presence of exogenous phospholipid. En : Biochimica et Biophysica Acta 1346. (1997); p. 193-197.

VALADÃO, Sales Paulo B. and SANTORO, Marcelo L. Nucleotidase and DNase activities in Brazilian snake venoms. En : Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Vol. 147 (2008); p. 85-95.

VILLALOBOS, Juan Carlos *et al.* Cytotoxicity induced in myotubes by a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops asper*: Evidence of rapid plasma membrane damage and a dual role for extracellular calcium. En : Toxicology “in vitro”. Vol. 21 (2007); p. 1382-1389.

WATANABE, Leandra *et al.* Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. En : Protein Sci. Vol. 12 (2003); p. 2273-2281.

WEN-BIN, Wu; HUI-CHIN, Peng and TUR-FU, Huang. Desintegrin causes proteolysis of β -catenin and apoptosis of endothelial cells: Involvement of cell-cell and cell-ECM interactions in regulating cell viability. En : Experimental Cells Research. Vol. 286 (2003); p. 115-127.

WILLINGHAM, Mark C. Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis. En : The Journal of Histochemistry & Cytochemistry. Vol. 47, No. 9 (1999); p. 1101-1107.

XIAO-YAN, Du *et al.* Blood cells as target of snake toxins. En : Blood cells, molecules and diseases. Vol. 36 (2006); p. 414-421.

YASNÓ, Felipe. Determinación del efecto citotóxico y genotóxico “in vivo” del veneno crudo de serpiente *Bothrops asper* en eritrocitos de sangre periférica de ratones (*Mus musculus*) mediante

el biomarcador micronúcleos. Popayán, 2005, p. 13-58. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de Educación. Departamento de Biología.

ZHANG, Liang and LI-JUN, Wei. ACTX-8, a cytotoxic L-amino acid oxidase isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom, induces apoptosis in Hela cervical cancer cells. En : Life Sciences. Vol. 80 (2007); p. 1189-1197.

_____ and CUI, Li. A cytotoxin isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom induces apoptosis via Fas pathway in A549 cells. En : Toxicology “in vitro”. Vol. 21 (2007); p. 1095-1103.

ZHAO, Sheng *et al.* Secretory phospholipase A₂ induces apoptosis via a mechanism involving ceramide generation. En : Biochimica et Biophysica Acta 1581. (2002); p. 75-88.