

Susceptibilidad de *Trypanosoma cruzi* a diferentes venenos de serpientes de Costa Rica

Amparo Castillo-Vigil¹, Randall Loaiza¹, Rodrigo Zeledón^{1*}, Bruno Lomonte², Andrea Urbina¹ & Berta Valverde³

Se evaluaron los efectos tóxicos de los venenos de cinco serpientes costarricenses en cuanto a su capacidad tripanocida contra dos cepas de *Trypanosoma cruzi* y sus efectos en cuanto a los mecanismos de muerte celular. Los venenos de *Bothrops asper*, *Bothriechis schlegelii*, *Crotalus durissus durissus*, *Atropoides nummifer* y *A. picadoi*, mostraron actividad tripanocida contra las formas de epimastigoto, amastigoto y tripomastigoto. Los venenos de *B. asper* y de *A. nummifer* presentaron la más alta citotoxicidad para las células Vero. Los de *B. asper* y *B. schlegelii* presentaron la más alta actividad en los epimastigotos de la cepa CL, mientras que los venenos de *B. asper* y el de *A. nummifer* fueron más eficientes contra los epimastigotos de la cepa Jennifer. El veneno de *B. schlegelii* produce un efecto proliferativo en las células Vero; mientras que el de *C. d. durissus* produce el mismo efecto en los epimastigotos de la cepa CL, ambos a la concentración de 2,5 µg/mL. Los valores de CI_{50} mostraron que se requieren menores cantidades contra los amastigotos en relación con los epimastigotos. Los venenos de *B. asper* y *B. schlegelii* presentan la más alta actividad contra los amastigotos de ambas cepas. Con los tripomastigotos sanguíneos de la cepa GA, los cinco venenos ocasionaron una disminución de la motilidad en los diferentes tiempos de exposición, pero el veneno de *A. nummifer*, en las concentraciones más bajas, mostró una actividad más marcada en comparación con los otros venenos. En cuanto a los efectos de los venenos, mediados por los grados de apoptosis, necrosis o proliferación celular, se observó que estos fenómenos se presentan y tienen relación con el tipo de veneno, su concentración y el tiempo de exposición.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, veneno de serpiente, efecto tripanocida, muerte celular, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

Los venenos de serpientes son identificados como una fuente rica de enzimas de origen natural, de las cuales algunas son muy importantes desde el punto de vista médico y han tenido un marcado uso en farmacología. La composición variada de estos venenos se basa en un complejo de péptidos y proteínas, además de bajas concentraciones de carbohidratos, lípidos, aminoácidos libres, citratos e iones metálicos (Fry & Wuster, 2004). Un ejemplo de su utilización en farmacología, es el Captopril® droga antihipertensiva

derivada de péptidos potenciadores de la bradicinina presentes en el veneno de *Bothrops jararaca* (Ferreira, 1965; Fernández *et al.*, 2004; Hayashi & Camargo 2005). También existen componentes en el veneno de la serpiente de cascabel de América del Sur (*Crotalus durissus terrificus*), los cuales presentan propiedades analgésicas, de un gran interés en la industria farmacéutica (Giorgi *et al.*, 1993).

Hay pocos estudios con venenos de serpiente para probar su actividad antiparasitaria. La acción tripanocida ha sido observada con los venenos de *Bothrops jararaca*, *Cerastes cerastes*, *Naja haje* y *Eristocophis macmahoni*, principalmente contra *Trypanosoma brucei* y *T. cruzi* (Fernández-Gómez *et al.*, 1994; Coura & de Castro 2002; Gonçalves *et al.*, 2002; Merkel *et al.*, 2007).

Se ha reportado que el veneno de *Bothrops moojeni* presenta actividad anti-*Leishmania*, induciendo

¹ Laboratorio de Zoonosis, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Costa Rica

² Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

³ Laboratorio de Estudios Especializados, Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, Caja Costarricense del Seguro Social, San José, Costa Rica.

*Autor de correspondencia: rodrigozeledon@ice.co.cr

muerte celular por estrés oxidativo. En este caso, el componente responsable fue identificado como L-amino oxidasa (LAO) (Tempone *et al.*, 2001). El veneno de *B. jaracara* provoca un proceso de muerte celular programada en epimastigotos de *T. cruzi*, similar a la apoptosis de metazoarios; además, inhibe la multiplicación del parásito por la interrupción del potencial mitocondrial que causa daño al cinetoplasto. También, inhibe el crecimiento de promastigotos y amastigotos de cepas de *Leishmania* spp. (Gonçalves *et al.*, 2002; Deolindo *et al.*, 2005).

El objetivo de este estudio fue determinar y caracterizar comparativamente los posibles efectos antiparasitarios de cinco venenos de diferentes especies de serpientes de Costa Rica en las diversas etapas evolutivas de *T. cruzi*. Además, se evaluó el grado y tipo de alteración celular producidos por los venenos.

MATERIALES Y METODOS

Cepas de T. cruzi y venenos

Tres cepas de *T. cruzi* fueron utilizadas: Cepa Jennifer, aislada en el 2003, de una niña costarricense de seis años en la fase aguda de la enfermedad de Chagas; Cepa GA, aislada en 1998 de un adulto costarricense también en fase aguda y la cepa brasileña CL-transgénica, donada al Laboratorio por Celeste Vega y Miriam Rolón, de la Universidad Complutense de Madrid, España. Los epimastigotos se mantuvieron a 28°C en medio LIT suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Los amastigotos fueron mantenidos en cultivos de células Vero (Lizardi *et al.*, 1990). Los tripomastigotos sanguíneos fueron obtenidos de ratones Balb/c infectados con la cepa GA y mantenidos en solución de Locke.

Los venenos liofilizados de *Bothrops asper*, *Bothriechis schlegelii*, *Crotalus durissus durissus*, *Atropoides nummifer* (= *Bothrops nummifer*) y *A. picadoi* (= *B. picadoi*) fueron donados por el Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica. Las soluciones de venenos (2 mg/mL) fueron preparadas en agua estéril y antes de ser utilizadas fueron filtradas por membranas Millipore de 0,22 µm.

Cultivos celulares

Las células Vero se cultivaron en el medio "Minimal Essential Medium" de Dulbecco (DMEM,

Sigma- Aldrich) suplementado con 10% SFB, 200 µM de HEPES, bencilpenicilina (200 U/mL), y estreptomycin (150 U/mL).

Ensayo de citotoxicidad celular

En una placa de 96 pocillos de fondo plano, se agregaron 100 µL de la suspensión de células Vero (4 x10⁵ células/mL), se incubaron por 12 horas a 37°C y luego fueron tratadas con las diferentes concentraciones de venenos de serpiente (2,5- 40 µg/mL) por 24 horas (Sánchez *et al.*, 2002). Cada muestra fue ensayada por triplicado, en tres diferentes experimentos. La viabilidad celular fue cuantificada utilizando el método de reducción de sales de bromuro de tretazolio (MTT). Se usaron 5 mg/mL de MTT y 2 mM de metasulfato de fenazina (PMS) para incrementar la sensibilidad y la reducción del formazan. La solución MTT/PMS fue agregada en cada pocillo e incubada por 45 minutos; el sobrenadante fue extraído y los cristales de formazan que quedaron en la placa se disolvieron con 100 µL de DMSO. La absorbancia fue determinada en un lector de microplacas de Elisa (Thermo LabSystems) a 540 nm (Mosmann, 1983).

Ensayo de susceptibilidad de epimastigotos de T. cruzi

La suspensión de epimastigotos a una concentración 1x10⁶ células/mL, fue adicionada en una placa de cultivo de 96 pocillos, la cual fue incubada por 72 horas a 28°C en una incubadora de 5% de CO₂. Se utilizaron las concentraciones de 2,5; 5; 10; 20 y 40 µg/mL de los venenos, que fueron preparadas en diluciones seriadas. Los epimastigotos de las cepas Jennifer y CL se cuantificaron mediante la técnica de reducción de MTT/PMS. Las concentraciones que causaban el 50% de inhibición de crecimiento (CI₅₀) fueron estimadas en porcentaje, mediante el cálculo de la cantidad de parásitos para cada concentración de veneno; los parásitos sin venenos fueron considerados como 100% de crecimiento. Cada uno de los ensayos fue realizado en triplicado.

Ensayos de susceptibilidad de amastigotos de T. cruzi

A cada pocillo se agregaron 100 µL de la suspensión de células Vero, las que se colocaron en una incubadora de 5% de CO₂, por 8 horas a 37°C. Se realizaron dos lavados con PBS para remover

células no adheridas, se procedió a infectar las células con una suspensión de tripomastigotos tomados del sobrenadante de células Vero infectadas por seis días. La concentración se ajustó a un valor tal que existiera una relación de veinte parásitos por cada célula, y se incubó por 4 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ (Neva *et al.*, 1961). El número de parásitos intracelulares se determinó indirectamente por conteo de los tripomastigotos libre en una cámara de Neubauer (Hyde & Dvorak, 1973). Cada ensayo se realizó por triplicado.

Ensayo in vitro con tripomastigotos sanguíneos

Los tripomastigotos de la cepa GA se obtuvieron de la sangre de ratones Balb/c infectados, luego se adicionaron 25 µL de una suspensión con 1x10⁶ tripomastigotos/mL a cada pocillo, 25 µL de solución de Locke, y 25 µL de medio suplementado con las concentraciones de veneno a 3x. Como control negativo se utilizaron parásitos en solución de Locke. La motilidad y el número de parásitos se estimaron en un microscopio invertido a una magnificación de 400x, utilizando el siguiente criterio: (-) parásitos sin motilidad; (+) algunos con motilidad lenta; (++) motilidad lenta; (+++): con motilidad lenta y rápida (++++): motilidad normal. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Ensayo de viabilidad celular por la medición de deshidrogenasa láctica (DHL) de la cepa CL

El ensayo cuantitativo de citotoxicidad relacionado con la DHL citosólica de epimastigotos de *T. cruzi*, fue realizado extrayendo el sobrenadante a la 24, 48 y 72 horas después de ser expuesto, con la concentración correspondientes a la CI₅₀. La suspensión de parásitos en solución de Locke fue incubada con 0,1% de Triton X-100 y los parásitos en solución de

Locke solos, se utilizaron como 100% de LDH y LDH basal, respectivamente (Lomonte *et al.*, 1999). Cada muestra fue analizada por triplicado.

Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Las alícuotas de los epimastigotos se agregaron en tubos plásticos y se centrifugaron a 3000 g. Luego se lavaron una vez con PBS y se suspendieron en 500 µL de solución permeabilizante de yoduro de propidio (IP) con 0,008 % de Igepal (Sigma) por 30 min (Mora *et al.*, 2005). Se usó un citómetro de flujo FACScalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA) y se analizaron 15000 eventos del ciclo celular.

Análisis estadísticos

Los resultados se expresan en valores promedio ± DS y se compararon utilizando la ANOVA y la prueba de Tukey para la prueba de significancia, y una prueba no paramétrica, Kruskal-Wallis ANOVA (Mora *et al.*, 2005).

RESULTADOS

Los valores de CI₅₀ para los cinco venenos de serpiente en los ensayos de citotoxicidad para células Vero, en epimastigotos y en amastigotos se pueden observar en el Tabla I. En la Fig. 1 puede verse el efecto sobre células Vero y epimastigotos de dos cepas a las 24 y 72 horas respectivamente.

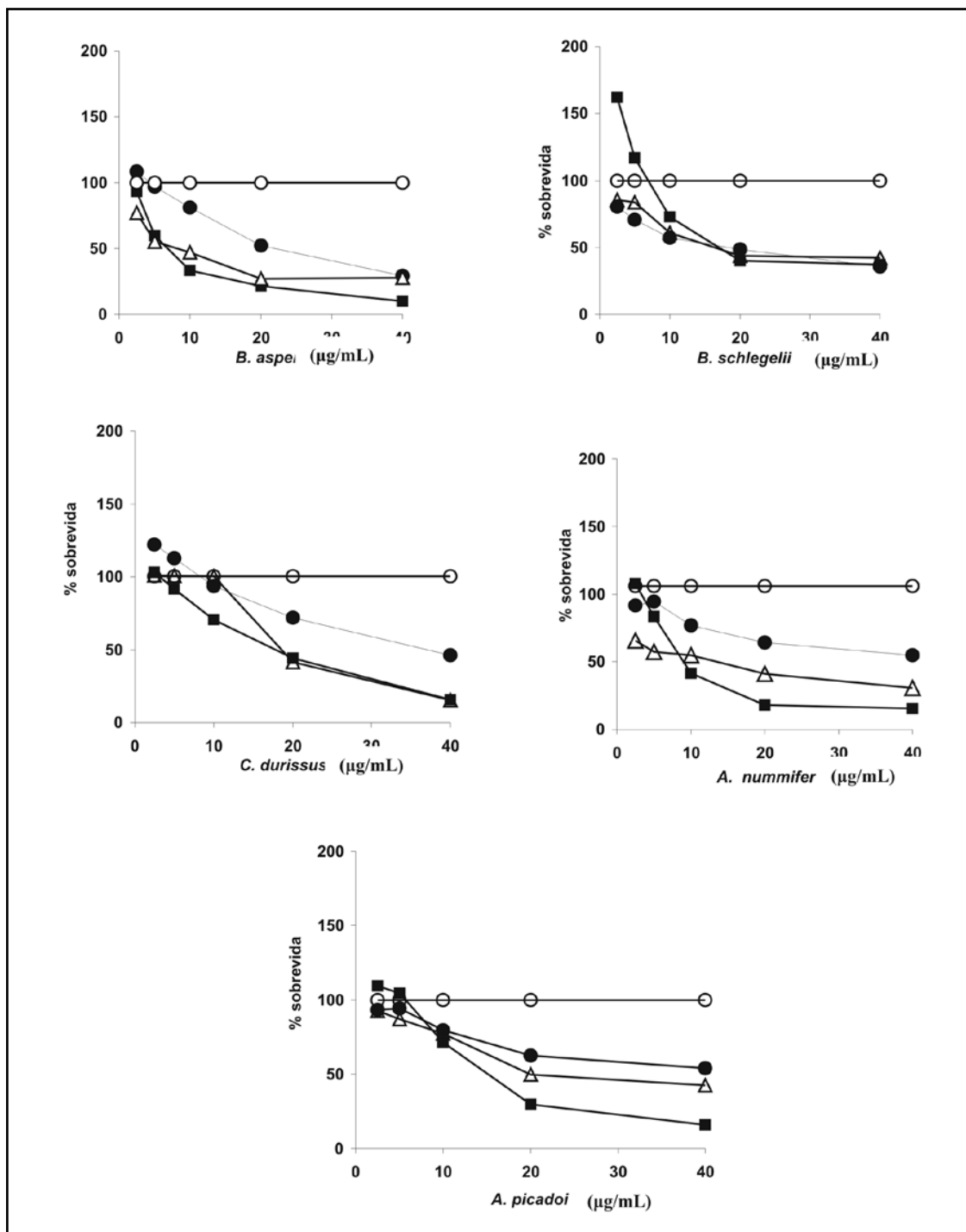
Los venenos de *B. asper* y de *A. nummifer* presentaron la más alta citotoxicidad para las células Vero. Los venenos de *B. asper* y *B. schlegelii* presentaron la más alta actividad en los epimastigotos de la cepa CL, mientras que los venenos de *B. asper*

Tabla I. CI₅₀ de venenos de serpientes (µg/mL) contra células Vero (24 h), epimastigotos (72 h) y amastigotos (6 días) de *Trypanosoma cruzi*, con las cepas Jennifer y CL.

Venenos	Células Vero	Epimastigotos		Amastigotos	
		Jennifer	CL	Jennifer	CL
<i>B. asper</i>	11±3*	10±7*	25±6*	1±0,9	3±2
<i>B. schlegelii</i>	23±10	21±8*	22±5*	1±0,7	1,4±1
<i>C. durissus</i>	18±5	20±6*	39±15	4±1	6±3
<i>A. nummifer</i>	15±4*	11±6*	57±9	6±2	7±3
<i>A. picadoi</i>	16±4*	27±4	60±19	3±1	47±9

CI₅₀: Concentración que inhibe el crecimiento del 50% de los parásitos
 Los valores corresponden al promedio ± DE de 3 experimentos independientes
 * Valores con diferencias significativas en comparación con el control ($P < 0,05$)

Fig. 1. Efectos de los venenos de serpiente en el crecimiento de células Vero y en los epimastigotos de *Trypanosoma cruzi* (cepas, Jennifer y CL). (■) Células Vero (24 h); (●) Cepa CL (72h); (Δ) Cepa Jennifer (72 h), (○) Control.



y *A. nummifer* presentaron más actividad en los epimastigotos de la cepa Jennifer. Estos venenos resultaron más activos ya que se requirió una menor cantidad para inhibir la mitad de los epimastigotos. Además, se pueden observar diferencias estadísticas para los epimastigotos de ambas cepas: el CI_{50} para el veneno de *A. nummifer*, para la cepa Jennifer fue de 11 ± 6 y para la CL de 57 ± 9 ($P<0,01$); el CI_{50} para el veneno de *A. picadoi*, para la cepa Jennifer fue de 27 ± 4 y para la CL 60 ± 19 ($P<0,01$).

El veneno de *B. schlegelii* en una concentración de $2,5 \mu\text{g/mL}$ produjo un incremento de la reducción de XTT cuando se incubó por 24 horas, lo que nos indica efectos proliferativos en las células Vero (Fig. 1); también se observa el mismo efecto en los epimastigotos de la cepa CL con el veneno de *C. d. durissus* (Fig.1).

Los valores de CI_{50} para la forma de amastigoto revelaron, en general, una más alta actividad de los venenos en las cepas estudiadas en comparación con las formas de epimastigotos. Esta mayor actividad se observó con todos los venenos estudiados, excepto en el caso del veneno de *A. picadoi* que mostró que la cepa CL posee mayor resistencia en comparación con la cepa Jennifer ($P<0,01$). Los venenos de *B. asper* y *B. schlegelii* presentaron la más alta actividad contra los amastigotos. No se observan diferencias significativas entre los venenos de *B. asper*, *B. schlegelii*, *C. d. durissus* y *A. nummifer* contra la forma de amastigoto de ambas cepas.

Con los tripomastigotos de la cepa GA, los cinco venenos ocasionaron una disminución en la motilidad en diferentes tiempos de exposición. El veneno de *B. schlegelii* mostró una actividad alta, seguido del veneno de *B. asper* principalmente en las concentraciones de 10; 20 y $40 \mu\text{g/mL}$. El veneno de *A. nummifer*, en las concentraciones más bajas ($2,5$ y $5 \mu\text{g/mL}$), produjo un efecto tardío después de las 2 horas de exposición. El veneno de *A. picadoi* decrece la motilidad a altas concentraciones mientras que con las más bajas los efectos fueron menores. El veneno de *C. d. durissus* presentó, en general, una actividad más baja (Fig. 2).

En cuanto a los efectos de los venenos, mediados por los grados de apoptosis, necrosis o proliferación celular, se pudo observar que estos fenómenos se presentan y tienen relación con el tipo

de veneno, su concentración y el tiempo de exposición, con la CI_{50} , para la cepa CL.

Se pudo verificar que estos venenos inducen una disrupción de la membrana plasmática en los epimastigotos, la cual es dependiente de la dosis y el tiempo de exposición. El único veneno que mostró un efecto necrótico más marcado ($338\pm 10 \text{ U/L}$ vs. 241 ± 9 del control positivo), una hora después de iniciado el experimento, fue el de *B. asper*. Este veneno, fue capaz de producir apoptosis luego de 24 horas y puede ocasionar una toxicidad muy alta a las 48 horas induciendo tanto necrosis como apoptosis (Tabla II). En muchas de las células que lograron sobrevivir, fue capaz de activar mecanismos de reparación que produjeron un pequeño aumento, aunque significativo, en cuanto a la proliferación celular a las 48 y 72 horas (Tabla III).

El veneno de *B. schlegelii* de menor efecto necrótico que el veneno de *B. asper*, causa apoptosis desde las 24 horas que aumenta a las 72 horas de exposición (83%) (Tabla II). Los parásitos no pudieron recuperarse debido a que su membrana estaba comprometida ante el daño provocado por este veneno, ya que tanto en la fase G0/G1 como en la de proliferación había muy pocos parásitos (Tabla III).

El veneno de *C. d. durissus* tuvo mayor efecto necrótico a las 48 horas, pero fue capaz de producir apoptosis desde las 24 horas de exposición, y a las 72 horas aumentó en gran medida su actividad apoptótica (Tabla II); además, una cantidad más alta de parásitos en comparación con el control entró en la fase G0/G1 (24 h), pero el daño fue tan fuerte que los parásitos no pudieron entrar en la fase de proliferación (Tabla III).

El veneno de *A. nummifer* fue uno de los venenos que causó necrosis desde las primeras horas de observación y comenzó a producir apoptosis en mayor grado a las 24 horas. A las 48 horas, fue capaz de inducir a cierta cantidad de parásitos a que logran entrar en la fase de proliferación, la cual decrece a las 72 horas y en ese momento tanto la apoptosis como la necrosis fueron casi totales (Tablas II y III).

El veneno de *A. picadoi* también resultó muy tóxico produciendo necrosis y apoptosis; su acción se incrementó después de las 24 horas y la proliferación y la fase G0/G1 fueron muy bajas (Tablas II y III).

Tabla II. Producción de necrosis y apoptosis en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (cepa CL) utilizando los valores de CI_{50} para medir la producción de DHL y la citometría de flujo.

Tiempo (Horas)	24			48			72		
Venenos	Viabilidad %	Necrosis U/l	Apoptosis %	Viabilidad %	Necrosis U/l	Apoptosis %	Viabilidad %	Necrosis U/l	Apoptosis %
<i>B. asper</i>	13±15*	487±15*	6,5±0,1*	20±8*	494±13*	19±0,8*	15±12*	172±14	9.7±0.1*
<i>B. schlegelii</i>	14±6*	154±4	6,3±0,1*	18±6*	311±12*	14±0,4*	19±9*	175±3	83±1.4*
<i>C. durissus</i>	20±10*	160±12	5,8±0,02*	20±5*	340±9	17,4±0,5*	17±3*	158±7	74±7*
<i>A. nummifer</i>	13±9*	257±9	3,9±0,03*	15±8*	357±11	5,6±0,1	20±11*	177±12	85±4*
<i>A. picadoi</i>	21±5*	308±1*	18±0,1*	112±16	288±13	23±2*	50±9*	167±9	92±4*
Control Neg.	0	-	2,3±0,03	0	-	7,8±0,6	0	-	1.7±0.1
Control Pos.	100±5	164±5	-	100±10	344±6	-	100±8	171±3	-

U/L = Actividad de la enzima DHL en Unidades por litro.

* Valores mayores con diferencias significativas en comparación con el control ($P<0,05$)**Tabla III. Epimastigotes de CL en las fases G0/G1 y en la Fase de Proliferación después de la exposición con la CI_{50} de diferentes venenos de serpiente**

Tiempo (Horas)	24		48		72	
Venenos	G0/G1 %	Fase de proliferación %	G0/G1 %	Fase de proliferación %	G0/G1 %	Fase de proliferación %
<i>B. asper</i>	72±1	24,2±1,9	62±1,4**	19±1,5*	34±0,9**	21±1,5*
<i>B. schlegelii</i>	79±1,2*	24±0,6	64±1,5**	22±0,4*	9±0,9**	3±0,4**
<i>C. durissus</i>	68±0,82	26±0,31	72±2,8	11±0,5**	16±0,3**	5±0,5**
<i>A. nummifer</i>	75±1,73	22±0,39**	74±1,4	21±0,02*	10±1,3**	0,7±0,02**
<i>A. picadoi</i>	67±1,5**	14±0,3**	67±3,4	7±0,04**	5±0,8**	0,2±0,04**
Control Neg.	72±1,3	26±2	76±1,8	16±2	48±0,9	19±2

* Valores mayores con diferencias significativas en comparación con el control ($P<0,05$)** Valores menores con diferencias significativas en comparación con el control ($P<0,05$)

DISCUSIÓN

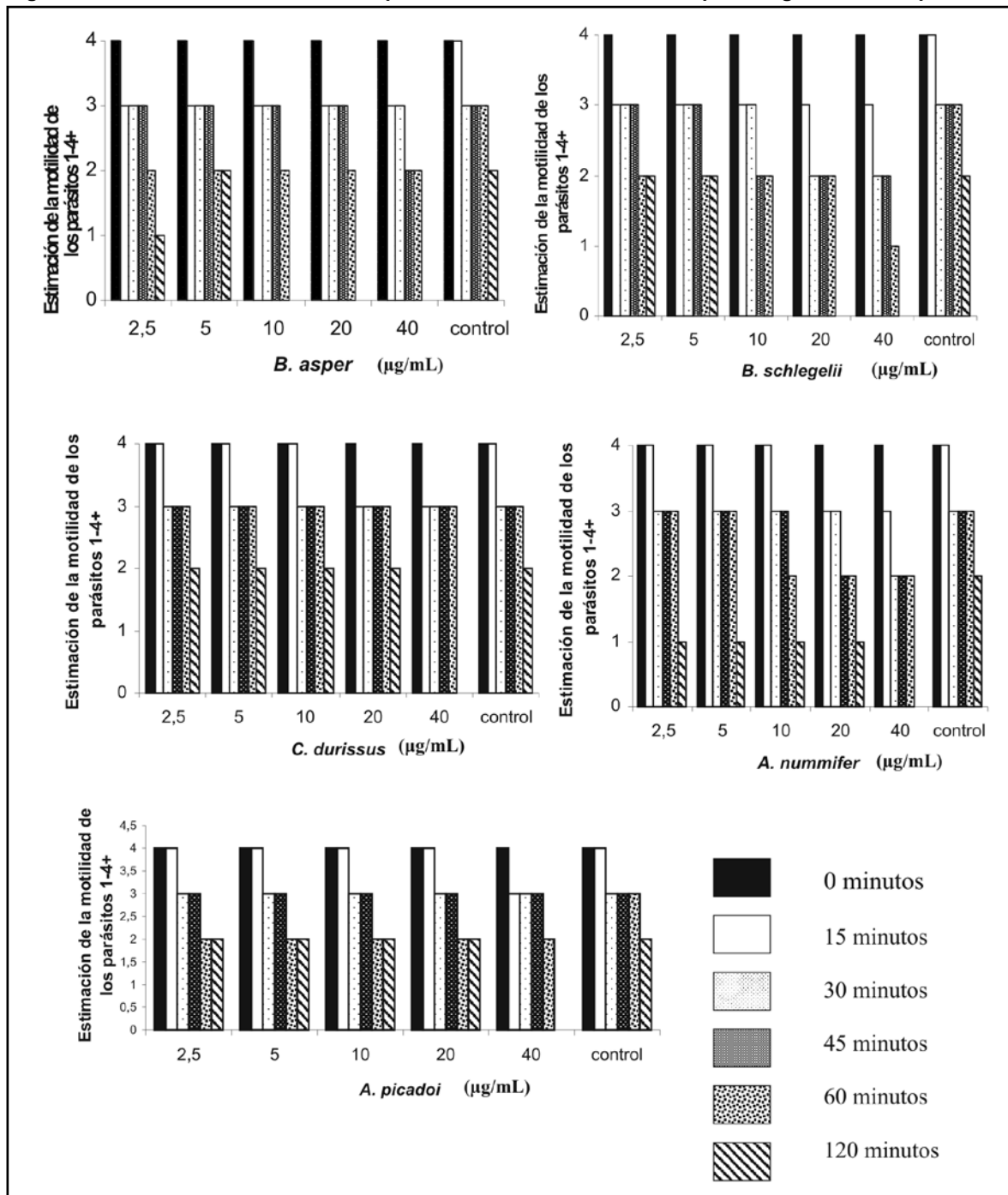
Se presentaron diferencias significativas entre los valores de la CI_{50} obtenidos para las células Vero, y para las formas de epimastigotes y de amastigotes, lo que nos indica que existen mecanismos diferentes en cuanto al modo de acción y a la toxicidad de estos venenos contra las membranas de *T. cruzi* y de las células Vero debido a los diferentes componentes de membranas. Por ejemplo, miotoxinas Lys49 tienen diferentes actividades debido probablemente a su interacción con sitios efectores en la membrana con la región C-terminal y con regiones hidrofóbicas; además, tienen la capacidad de provocar un desbalance en las

membranas biológicas, al provocar el influjo de iones que causan alteraciones intracelulares y muerte celular (Lomonte *et al.*, 2003).

En el caso de los epimastigotes, los venenos más activos fueron los de *B. schlegelii* y *B. asper* con la cepa CL, mientras que con la cepa Jennifer lo fueron los venenos de *B. asper* y de *A. nummifer*, probablemente debido a diferentes susceptibilidades de las cepas en presencia de varios tipos del veneno (Croft & Brun, 2003).

El valor de CI_{50} para *B. jararaca* (10 µg/mL) para la cepa Y de *T. cruzi* fue similar al valor obtenido

Fig. 2. Actividad de los venenos de serpientes en la motilidad contra tripomastigotos de la cepa G



para los venenos de *B. asper* y *A. nummifer* al usar los epimastigotos de la cepa Jennifer (Deolindo *et al.*, 2005). Esto sugiere que podría existir un efecto común entre estos tres venenos. En el caso de epimastigotos, la cepa CL fue más resistente para todos los venenos en comparación con la Jennifer.

En cuanto a los amastigotos, todos los venenos fueron muy activos para ambas cepas, con excepción del veneno de *A. picadoi* en el caso de la cepa CL. Los valores de CI_{50} obtenidos con los cinco venenos en la forma de amastigoto de *T. cruzi* fueron menores en comparación con la CI_{50} con la forma de

epimastigoto, para el veneno de *B. jararaca*, aunque guardan una similitud con la CI_{50} del veneno de *C. cerastes* (Deolindo *et al.*, 2005; Fernández Gómez *et al.*, 1994).

Por otra parte, los venenos de serpientes más prometedores en contra de amastigotos, son los de *B. asper* y *B. schlegelii*, debido a su actividad con ambas cepas estudiadas, ya que también demostraron que la toxicidad fue mayor para amastigotos en comparación con las células Vero.

Los tripomastigotos sanguíneos de la cepa GA mostraron aglutinación después de 2 horas (20 y 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$) con todos los venenos. El veneno de *B. jararaca* produce este efecto después de 24 horas con una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En otro estudio se demuestra que el veneno *C. cerastes*, inhibe el crecimiento de tripomastigotos sanguíneos, y de amastigotos con una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fernández Gómez *et al.*, 1994).

Los venenos de *B. schlegelii* y *B. asper* presentaron una acción rápida contra los tripomastigotos sanguíneos disminuyendo su movimiento, principalmente en concentraciones más altas, mientras que el veneno de *A. nummifer*, en las concentraciones más bajas, mostró una actividad marcada en comparación con los otros venenos. Esto convierte a este veneno en el mejor candidato para el desarrollo de una futura droga tripanocida contra la forma de tripomastigoto sanguíneo. Al comparar las actividades del veneno de *A. nummifer* con el veneno de *C. cerastes*, a una concentración de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se observa que se comportan en forma similar durante los primeros 30 minutos (Fernández Gómez *et al.*, 1994).

El veneno de *B. asper* fue uno de los que presentó más actividad en todas las pruebas. Cuando los mecanismos de muerte fueron evaluados se nota que la necrosis compromete la membrana desde la primera hora de exposición, pero se da la combinación apoptosis/necrosis en los siguientes tiempos, debido probablemente a las fosfolipasas PLA2 del veneno (Mora *et al.*, 2005).

Los venenos de *B. schlegelii*, *C. d. durissus*, *A. nummifer* comprometen la membrana de los epimastigotos desde la primera hora de observación, siendo la necrosis el mecanismo de

muerte predominante; la población que logra sobrevivir presenta una apoptosis tardía, afectando el ciclo celular normal.

Los venenos de *B. schlegelii*, *A. nummifer* podrían presentar las fosfolipasas que inducen a la proliferación celular. Una cantidad pequeña de las concentraciones más bajas del veneno promovieron la proliferación de las células Vero y de los epimastigotos de *T. cruzi*. Se ha dicho que las fosfolipasas (PLA2) están asociados a proliferación de líneas celulares, como son las fosfolipasas obtenidas de *B. asper* y *Agkistrodon blomhoffi*. También el veneno entero de *Crotalus durissus collilineatus* aumenta la proliferación de los promastigotos de *Leishmania amazonensis* (Mora *et al.*, 2005; Passero *et al.*, 2007).

El veneno de *A. picadoi* es uno de los venenos más tóxicos que destruye la membrana de los epimastigotos provocando necrosis y apoptosis muy altas, no dando oportunidad a que se recuperen los epimastigotos y que estos puedan proliferar.

Es importante destacar que nuestros estudios podrían considerarse preliminares ya que se utilizaron venenos enteros y sería necesario llevar a cabo el fraccionamiento de los componentes de aquellos con mayor actividad tripanocida. Las diversas fracciones activas del veneno se deben probar independientemente tanto in vitro como en modelos animales y proceder a su modificación química, una vez conocida la molécula activa, para mitigar sus propiedades tóxicas o sus posibles efectos secundarios en el hospedero. Otro detalle es que para elaborar una droga en el futuro, es importante que no contenga el componente responsable de la proliferación celular ya que se demuestra que los venenos costarricenses también pueden inducir proliferación en los epimastigotos de *T. cruzi*, como se había demostrado en estudios anteriores en *Leishmania* spp. y en células linfoides, lo que podría suceder con las demás formas del parásito.

AGRADECIMIENTOS

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD), por la beca para estudios de Maestría otorgada a la autora principal, al personal del Laboratorio de Zoonosis de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica y a la Dra. Cecilia Díaz por su colaboración en los análisis de apoptosis y ciclo celular.

Susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to different Costa Rican snake venoms

SUMMARY

The trypanocide effect of venoms from five Costa Rican species of snakes was evaluated against two strains of *Trypanosoma cruzi* and their cellular toxic effects were likewise observed. The venoms of *Bothrops asper*, *Bothriechis schlegelii*, *Crotalus durissus durissus*, *Atropoide nummifer* and *A. picadoi* showed evident trypanocide action against epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes. The venoms of *B. asper* and *B. schlegelii* were shown to be the most active against the epimastigotes of the CL strain, whereas those of *B. asper* and *A. nummifer* were more effective against the epimastigotes of the Jennifer strain. The venoms of *B. schlegelii* and *C.d. durissus*, at the lowest concentrations of 2.5 µg/mL, were able to trigger a proliferative effect on Vero cells and epimastigotes of the CL strain, respectively. The IC₅₀ values showed that lower amounts of venoms are necessary in order to inhibit amastigotes as compared to epimastigotes. The venoms of *B. asper* and *B. schlegelii* exhibited the highest activity against amastigotes of both *T. cruzi* strains. All venoms were able to arrest motility of blood trypomastigotes of the GA strain at different times and the most active in this case was *A. nummifer* venom. The toxic effects of the venoms measured by the degree of apoptosis, necrosis and cell proliferation that they produced showed that all these events occur and are related to the type of venom, its concentration and exposure time.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, snake venom, trypanocidal action, cell death, Costa Rica.

REFERENCIAS

- Chiari E. & Camargo E. P.(1984). Culturing and cloning of *Trypanosoma cruzi*.p.23-26. En: *Genes and Antigens of Parasites*. A Laboratory Manual (C.M. Morel ed.) 2nd. Ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.
- Coura J. R. & Castro S. A.(2002). Critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **97**: 3-24.
- Croft S. L. & Brun R. (2003). In vitro and in vivo models for the identification and evaluation of drugs against *Trypanosoma* and *Leishmania* spp. 185-192. En: *Drugs against parasitic diseases: R and D methodologies and issues. Discoveries and drug development*. UNDP/ World Bank / WHO. Special Programmed for Research and Training in Tropical Disease (TDR).
- Deolindo P., Texeira-Ferrer A., Melo E., Arnouldt A., De Souza W., Alves E. & Damatta R. (2005). Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **100**: 33-38.
- Fernández J., Neshich G. & Camargo A. (2004). Using bradikinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. *Gen. Molec. Res*. **3**: 554-563.
- Fernández-Gómez R., Zerrouk H., Sebti F., Loyens M., Benslimane A & Ouaiissi A. (1994). Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different venoms: Preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which interact with the parasite. *Toxicon*. **32**: 875-882.
- Ferreira S. H. (1965). A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br. J. Pharmacol*. **24**: 163-169.
- Fry B. G. & Wuster W. (2004). Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analyses of toxin sequences. *Mol. Biol. Evol*. **21**: 870-883.
- Giorgi R., Bernardi M. M. & Cury Y. (1993). Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. **31**: 1257-65.
- Gonçalves A. R., Soares M. J., DE Souza W., Damatta R. A. & Alves E. W. (2002). Ultrastructural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Parasitol. Res*. **88**: 598-602.
- Hayashi M. & Camargo A. (2005). The bradikinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. *Toxicon*. **45**: 1163-70.

- Hyde T. P. & Dvorak J. A. (1973). *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. Quantitative analysis of the penetration phase. *Exper. Parasitol.* **34**: 284-294.
- Lizardi K., Urbina J. & DE Souza W. (1990). Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 2097-2105.
- Lomonte B., Angulo Y., Rufini S., Cho W., Giglio J., Ohno M., Daniele J., Geoghegan P. & Gutierrez J.M. (1999). Comparative study of the cytotoxic activity of myotoxic phospholipases A2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. *Toxicon.* **37**: 145-158.
- Lomonte B., Angulo Y. & Calderón L. (2003). An overview of Lys-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon.* **42**: 885-901.
- Merkel P., Beck A., Muhammad K., ALI S., Schönfeld C., Wolfgang V. & Duszenko M. (2007). Spermine isolated and identified as the major trypanocidal compound from the snake venom of *Eristocophis macmahoni* causes autophagy in *Trypanosoma brucei*. *Toxicon.* **50**: 457-469.
- Mora R., Valverde B., Diaz C., Lomonte B. & Gutiérrez J.M. (2005). A Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops asper* snake venoms induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. *Toxicon.* **45**: 651-660.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **65**: 55-63.
- Neva F.A., Malone M.F. & Myers B.R. (1961). Factors influencing the intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **10**: 140-149.
- Passero L., Tomakane T., Corbett C., Laurenti M. & Toyama H. (2007). Comparative studies of the anti-leishmanial activity of the three *Crotalus durissus* spp. Venoms. *Parasitol. Res.* **101**: 1365-1371.
- Sánchez G., Cuellar D., Zulantay I., Gajardo M., Gonzalez G., *et al.*, (2002). Cytotoxicity and trypanocidal activity of nifurtimox encapsulated in ethylcyanoacrylate nanoparticles. *Biol. Res.* **35**: 39-45.
- Tempone A. G., Andrade J. R. H. F., Spencer P. J., Lourenço C. O., Rogero J. R. & Nascimento N. (2001). *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* **280**: 620-624.

Recibido el 26/09/2008
Aceptado el 24/10/2008
