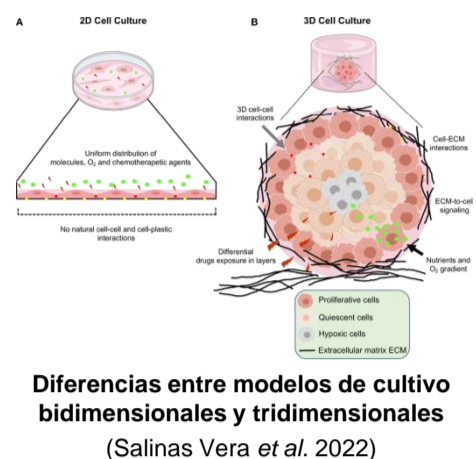
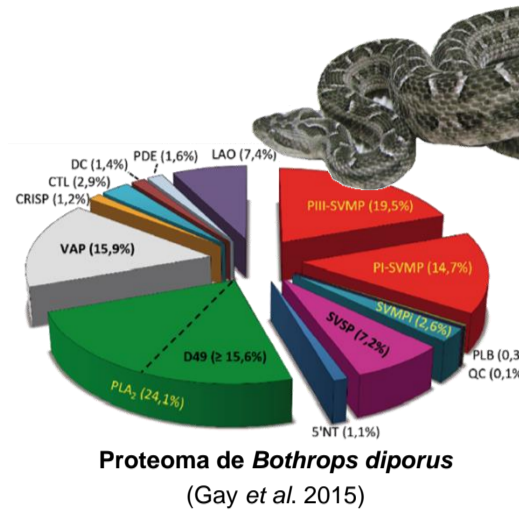


# “Efecto citotóxico del veneno de *Bothrops diporus* (yarára chica) sobre modelos de cultivo celular tridimensional (3D)”

Sosa, Juan M.<sup>1</sup>; Cesario, Angélica M.<sup>1</sup>; Bustillo, Soledad<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigaciones Biológicas y Moleculares (GIByM), IQUIBA-NEA, Universidad Nacional del Nordeste-CONICET. Av. Libertad 5470. Corrientes (CP3400). Argentina



*Bothrops diporus* es considerada en Argentina una especie de interés sanitario, principalmente en el Nordeste Argentino, dado que causa la mayoría de los accidentes ofídicos.

## Introducción

Los cultivos celulares representan el modelo *in vitro* más utilizado en la evaluación de los efectos citotóxicos de los venenos ofídicos. Actualmente se encuentra en auge el uso de modelos tridimensionales dada su capacidad de reproducir de manera más precisa el comportamiento *in vivo*, sobre todo de los tumores sólidos.

## Objetivo

Investigar por primera vez el efecto citotóxico del veneno de *B. diporus* sobre un cultivo tridimensional de esferoides gliales.

## Materiales y Métodos

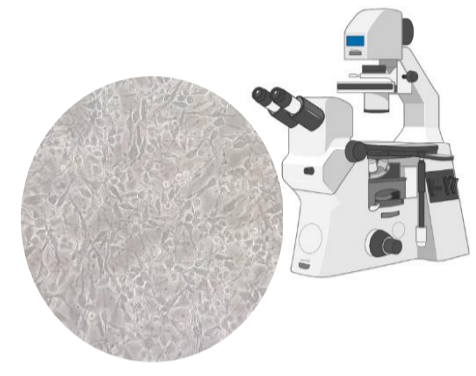
### 1. Veneno de *Bothrops diporus*

Pool de veneno desecado, homogeneizado y conservado a -20°C de *B. diporus* provisto por el Centro de Producción de Suero Antiofídico (CEPSAN) de la Provincia de Corrientes

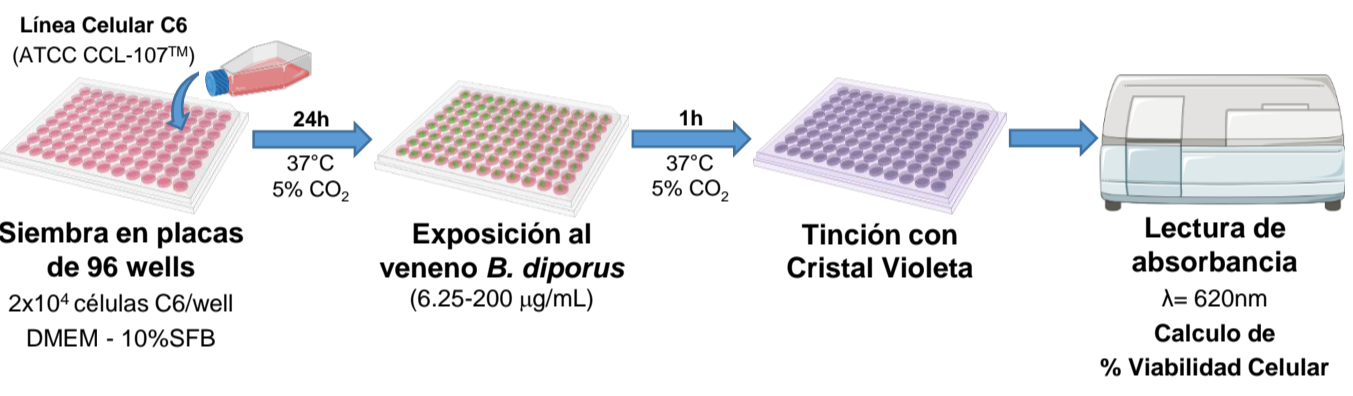


### 2. Línea Celular

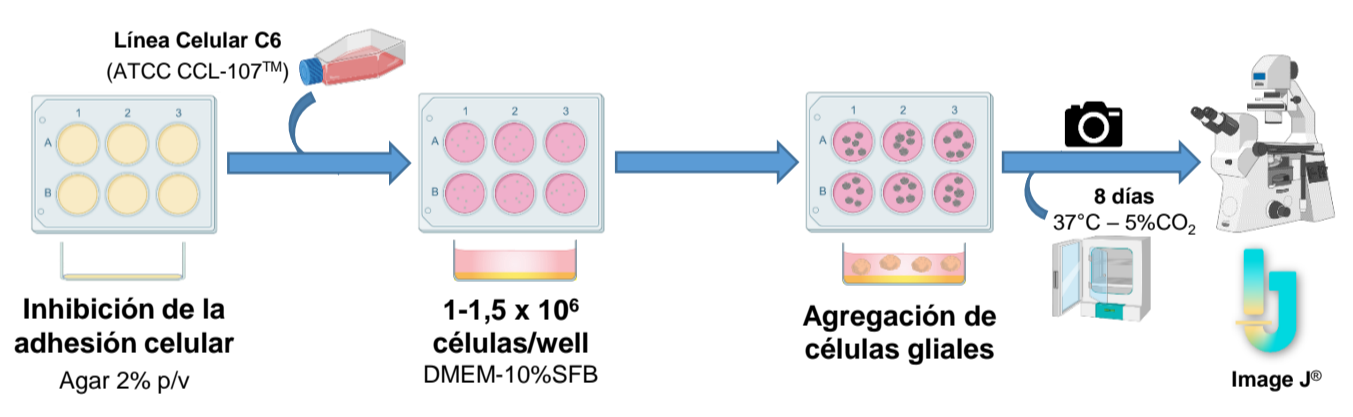
Línea celular C6 (ATCC CCL-107™). Glioma maligno murino. Medio DMEM® + 10%SFB – 5%CO<sub>2</sub>



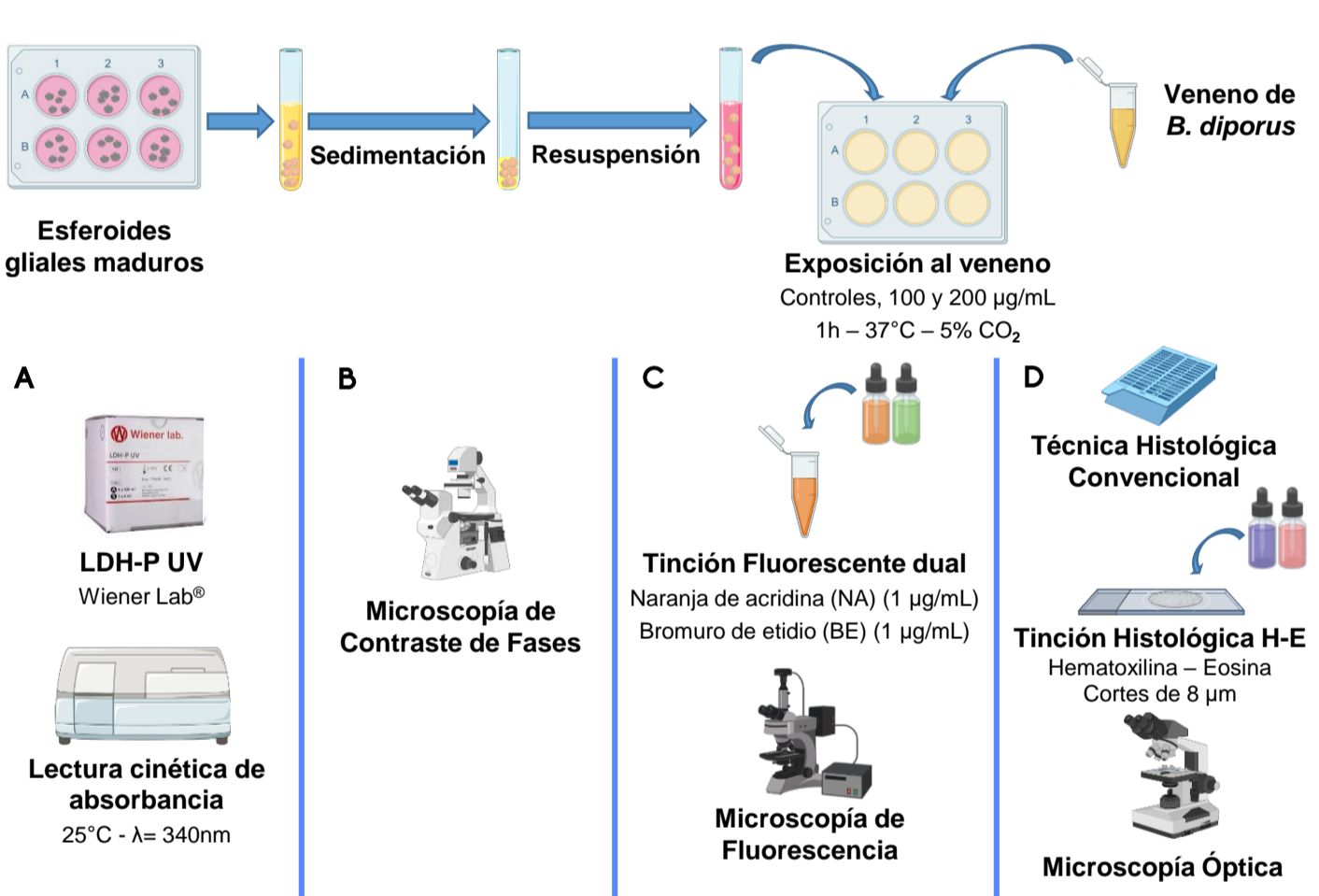
### 3. Citotoxicidad en Cultivo Bidimensional



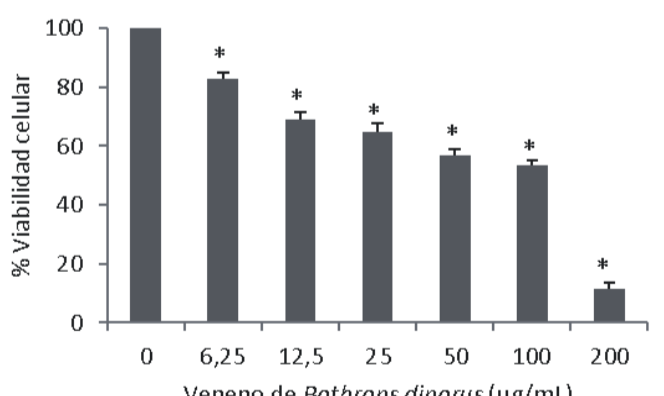
### 4. Formación de Esferoides. Cultivo Tridimensional



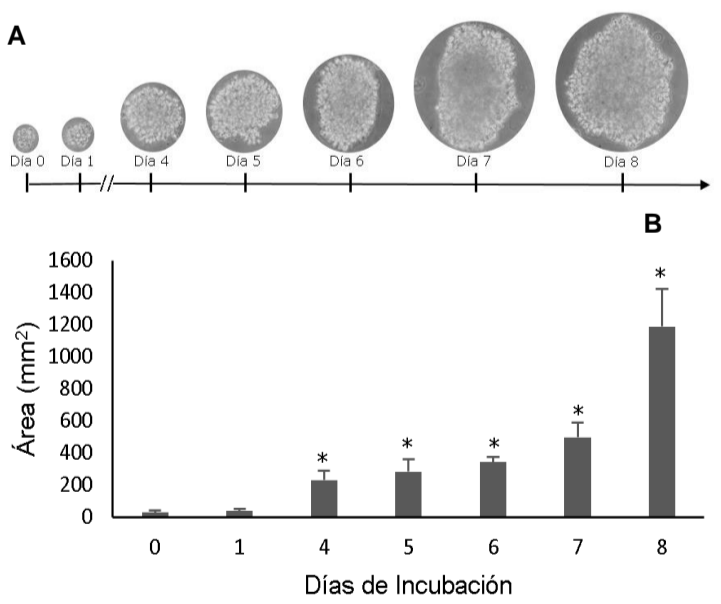
### 5. Efecto Citotóxico del Veneno de *B. diporus* sobre Cultivo Tridimensional



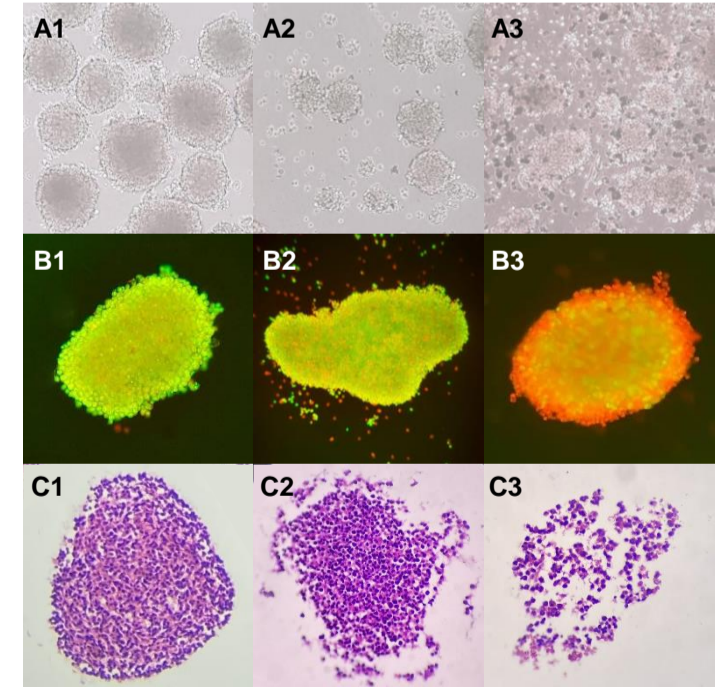
## Resultados



**Figura 1.** Citotoxicidad del veneno de *B. diporus* sobre células de la línea C6 en 2D. Las barras de error representan el promedio del área ±DS. \*p<0.05 vs control.



**Figura 2.** A: Cinética de crecimiento de los esferoides. B: Determinación del área promedio de los esferoides en función del tiempo de incubación. Las barras de error representan el promedio del área ±DS. \*p<0.05 vs tiempo 0.



**Figura 3.** Cambios morfológicos inducidos por el veneno de *B. diporus*. A: Microscopía de contraste de fases. B: Tinción fluorescente dual. C: Tinción histológica H-E. 1: Control. 2: 100 µg/mL. 3: 200 µg/mL.

**Tabla 1.** Mediciones de la actividad enzimática de Lactato deshidrogenasa (LDH)

	Control	100 µg/mL	200 µg/mL
LDH (U/L)	12.4 ± 0.2	15 ± 0.3	36.7 ± 0.4

## Discusión

Sobre el cultivo bidimensional el veneno de *B. diporus* demostró un efecto citotóxico dosis-dependiente disminuyendo marcadamente la viabilidad celular (~90%) a la mayor concentración ensayada (200 µg/mL) (Fig. 1). De la curva de citotoxicidad se seleccionaron las concentraciones a ensayar sobre los cultivos tridimensionales (100 y 200 µg/mL). La formación de esferoides demostró una cinética de crecimiento proporcional al tiempo de incubación, observándose una relación exponencial a partir del día 6 (Fig. 2, A). Luego de la exposición al veneno, la actividad enzimática de LDH mostró un aumento significativo a 200 µg/mL (Tabla 1). La observación por microscopía de contraste de fases y la tinción histológica con H-E de los esferoides expuestos al veneno evidenciaron cambios morfológicos como pérdida de la adhesión intercelular, disminución del tamaño y apariencia desorganizada (Fig. 3). Cambios en la eosinofilia, indicativo de necrosis, se presentaron con 200 g/mL con tinción H-E (Fig. 3, C3). La tinción dual fluorescente confirmó este efecto observándose una mayor proporción de células teñidas de naranja (BE) en los esferoides, indicando ruptura de membrana (Fig. 3, B2 y B3). A la mayor concentración se presentó necrosis individual y focal externa, como así también exacerbación del centro necrótico (Fig. 3, B3).

## Conclusión

El veneno de *B. diporus* demostró tener un efecto citotóxico dosis dependiente sobre los cultivos celulares 3D de células gliales, aunque el mismo fue menor en comparación al cultivo bidimensional. Probablemente esto se daba a que los modelos celulares 3D son más representativos de las interacciones celulares y tisulares *in vivo*.