

Laminitis equina in vitro inducida por veneno entero y Fosfolipasa A₂ de serpiente *Bothrops alternatus* de Argentina

Teibler, G.P.¹; Maruñak, L.S.¹; Bogado, E.F.¹; Pollitt, C.²

¹Facultad Cs. Veterinarias, UNNE, Corrientes, Argentina. ²School of Vet. Sci., Australian Eq. Lam. Res. Unit. Queensland Univ. Gatton Campus, Australia.
E-mail: pteibler@vet.unne.edu.ar

Resumen

Teibler, G.P.; Maruñak, L.S.; Bogado, E.F.; Pollitt, C.: Laminitis equina in vitro inducida por veneno entero y Fosfolipasa A₂ de serpiente *Bothrops alternatus* de Argentina. Rev. Vet. 33: 2, 146-151, 2022. *Bothrops alternatus* (yará grande, víbora de la cruz) es una serpiente perteneciente a la familia Viperidae, y se encuentra ampliamente distribuida en Argentina. En el nordeste de nuestro país, esta serpiente ocasiona el mayor número de accidentes. Existen reportes de envenenamiento en equinos, siendo sus signos y síntomas más importantes: inflamación y hemorragia, dermo y mionecrosis en el área de inoculación del veneno. Por otro lado, la acción sistémica consiste en incoagulabilidad sanguínea, hemorragia y lesiones de órganos que pueden comprometer la salud del animal. Una secuela, debida a la intoxicación por esta serpiente, es la laminitis, que afecta la capacidad de trabajo del equino, independientemente del sitio de inoculación del veneno, debido a la acción sistémica del mismo. Esta patología produce dolor, claudicación, que luego puede progresar con deformación del casco. Se efectuó un estudio in vitro, tomando como modelo experimental muestras (explantes) de pie equino. Estas fueron incubadas con veneno entero y con Fosfolipasa A₂ (PLA₂) del mismo veneno con el objeto de reproducir laminitis a los efectos de corroborar datos clínicos reportados en accidentes por yará grande como así también proponer una metodología de estudio de laminitis en explantes de pie equino. La laminitis inducida por el veneno entero se caracterizó por la separación de la unión dermo-epidérmica, desprendimiento de membrana basal y citotoxicidad y consecuentemente desprendimiento de unión dermo-epidérmica, permaneciendo las células basales epidérmicas con alteraciones en forma y tamaño de los núcleos, entre otras anormalidades. En contraste, las muestras incubadas con PLA₂, las células basales epidérmicas mostraron anomalías citoplasmáticas y nucleares, pero con separación leve de la unión dermoepidérmica y presente solo en algunas áreas de las LES.

Palabras clave: veneno de serpiente, membrana basal, unión dermo-epidérmica.

Abstract

Teibler, G.P.; Maruñak, L.S.; Bogado, E.F.; Pollitt, C.: Equine laminitis in vitro induced by whole snake poison and Fosfolipasa A₂ of *Bothrops alternatus* from Argentina. Rev. Vet. 33: 2, 146-151, 2022. *Bothrops alternatus* (yará grande, víbora de la cruz) is a snake belonging to the Viperidae family and is widely distributed in Argentina. In the northeast, this snake group for the majority of the snakebite accidents. There are reports about envenomation in horses with clinical signs including swelling, hemorrhage, dermo and myonecrosis at the bite sight in addition to

systemic effects such as impaired blood coagulation, hemorrhage and damage to vital organs. An additional consequence in the horse is laminitis which reduces the work capacity of the survivor on a long-term basis. This occurs independent of the site where the venom was injected. laminitis induces pain and claudication, and it can evolve to deform the hoof. This study uses explants from freshly slaughtered horses as an in-vitro assay from the limbs of normal horses in order to demonstrate the ability of Bothrops snake venom to cause laminitis. Explants were incubated with whole venom and phospholipases A2 (PLA₂). The objective was to reproduce laminitis *in vitro* to corroborate the clinical data reported in snake venom accidents. Equine laminitis induced by whole venom was characterized by damage to the lamellar dermo-epidermal junction, loosening of the lamellar basement membrane and cytotoxic effects. Epidermal basal cells showed changes in the shape and size of their nuclei and other abnormalities.

Key words: snake poison, basal membrane, dermo-epidermal union.

INTRODUCCIÓN

Numerosas condiciones clínicas, aparentemente sin relación, se han vinculado a la fisiopatología de la laminitis⁵, todos los cuales en última instancia, dan lugar a una histopatología característica²⁵. Sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado una teoría unificadora que explique la patogenia de la laminitis²³.

Previo a este trabajo hemos demostrado que la intoxicación causada por el veneno de serpientes del género *Bothrops*, de Argentina, causa un fallo celular que culmina con el desprendimiento de la unión dermo-epidérmica en el casco del pie equino².

La intoxicación por *Bothrops* se caracteriza por sus efectos proteolítico, coagulante y hemorrágico con el desarrollo de un importante daño tisular caracterizado por dolor, edema, sangrado, ampollas, mionecrosis y dermonecrosis. La hemorragia que se presenta inicialmente es local, en el sitio de la mordedura y posteriormente a nivel sistémico. Las alteraciones más importantes son alteración en la coagulación, falla renal aguda, insuficiencia respiratoria aguda, shock and sepsis^{6, 8, 30, 28, 12} y laminitis¹.

El veneno es de constitución compleja, entre cuyos componentes las proteínas más relevantes, metaloproteinasas y fosfolipasa A2, fueron aisladas y caracterizadas^{10, 11}. El veneno de *Bothrops alternatus* posee una metaloproteinasas, la que fue aislada y denominada baltergin, de 55 kDa baltergin, con importante actividad hemorrágica a nivel local y sistémico¹². Las metaloproteinasas del veneno de serpiente (SVMPs) juegan un relevante rol en la patogénesis de la intoxicación por *Bothrops*. Son proteinasas dependientes de zinc cuyo principal efecto tóxico se deben a la alteración del sistema hemostático. SVMPs induce la proteólisis de la

lámina basal de micro vasos por la degradación de las principales proteínas de la matriz extracelular^{3, 4}.

Del veneno de serpiente *Bothrops alternatus* del noreste argentino se aisló una proteína ácida con actividad de la Fosfolipasa A2 (PLA₂) con una masa molecular de 14,2 kDa, llamado Ba SPII RP¹⁰.

En el presente estudio, utilizamos este modelo de laminitis *in vitro* para investigar el rol de Fosfolipasa A2 y veneno de serpiente en la patogenia de la laminitis.

El modelo *in vitro* con explantes lamelares es una técnica válida para cribar numerosos factores causantes de laminitis. En el presente estudio, utilizamos este modelo de laminitis *in vitro* para investigar el rol de Fosfolipasa A2 y veneno de serpiente en la patogenia de la laminitis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Venenos

El veneno de las serpientes *Bothrops alternatus* adultas, se extrajo de 10 ejemplares de ambos sexos, cuyas edades oscilaron entre 8 a 10 años de edad. La extracción del veneno se llevó a cabo en el serpentario de la provincia de Corrientes, Argentina. La metodología utilizada fue manual mediante la técnica de masaje y presión sobre la zona de ambas glándulas, mientras sus colmillos eran colocados sobre recipientes de vidrios estériles cubiertas de telas de nylon. Posteriormente el veneno fue desecado y conservado a -20°C hasta el momento de su utilización. Cuando fue necesario, el veneno se diluyó con solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2.

Aislamiento y purificación

La enzima PLA₂ se aisló hasta homogeneidad mediante tres pasos cromatográficos con las modificaciones descritas por Vidal y Stopani 29. Todos los pasos del procedimiento de purificación se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25°C). El perfil de elución se controló a 280 nm y las fracciones activas de PLA₂ se recogieron y utilizaron para explantes de cultivo. Para analizar la pureza de la enzima aislada, se realizó SDS-PAGE en geles en placa de poliacrilamida al 12% siguiendo el método de Laemmli 19. Los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250. Los marcadores de masa molecular estándares fueron albúmina bovina (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa), y α -lactoalbúmina (14,20 kDa). Los experimentos se realizaron de acuerdo con las pautas del Comité de Ética Animal de la Universidad de Queensland.

Obtención de explantes dermo-epidérmico de pie equino

Se trabajó con un total de doce pezuñas de caballos normales, obtenidas de un matadero comercial de la ciudad de Brisbane, Australia. Estos fueron transportados en hielo seco a la sala de disección de la School of Veterinary Science de la University of Queensland, Australia. Se obtuvo de 8 a 10 explantes dermo-epidérmico por cada miembro y cada experiencia fue acompañada de muestras controles. Los explantes median aproximadamente 6 mm por 6 mm y se extendían desde la pared interna de la pezuña a través de la unión laminar, hasta el tejido conectivo dérmico 25, 26.

Incubación de veneno entero y PLA₂ de *B. alternatus* en explantes de pie equino.

Los explantes previamente obtenidas del pie de equinos fueron acondicionadas en recipientes especiales para ser incubadas con medio de cultivo D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), para los controles y conteniendo 100 μ g por ml de veneno entero, igual procedimiento se realizó para la incubación con 100 μ g / ml de PLA₂; en todas las muestras se agregó gentamicina 0.1 mg/ml. Las incubaciones se realizaron en estufa a 37°C, 5% de dióxido de carbono, 95% de humedad, por 48 hs.

Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 2,5% en tampón de cacodilato de sodio 0,067 M,

pH 7,4, durante 4 horas y se almacenaron en tampón a 4°C. El tejido se fijó posteriormente en tetróxido de osmio al 1% en tampón cacodilato durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, en bloque en acetato de uranilo acuoso al 5% ya que este procedimiento tiende a extraer glucógeno. El tejido se deshidrató a través de una serie de alcoholes, se aclaró en óxido de propileno y se embebió en una mezcla de Epon-Araldita. Los bloques se cortaron con un cuchillo de diamante (Diatome) en un ultramicrotomo Reichert-Jung, se tiñeron con citrato de plomo 27 y se observaron en un microscopio electrónico Zeiss EM.

RESULTADOS

Cultivo de explantes controles

La ultraestructura de explantes de unión dermo-epidérmicas del pie de equinos controles, fueron estudiadas a través de la Microscopía Electrónica de Trasmisión, con el objeto de obtener una mejor comprensión de la fisiopatología de la laminitis producida por componentes de venenos de serpientes. En la unión dermo-epidérmica se observó la membrana basal (MB), caracterizada por la coloración oscura de la lámina densa cercana al contorno de las células basales epidérmicas. Entre la lámina densa de la MB y el plasmalema de las células basales se encuentra la lámina lucida coloreada levemente. Las puntas de las láminas epidérmicas secundarias (LES) se caracterizan por ser redondeada y los núcleos ovalados, de las células epidérmicas basales, presentan su eje longitudinal en ángulo recto al eje longitudinal de la LES (Figura 1A). En cada plasmalema de las células basales se observó los hemidesmosomas, como placas intracitoplasmáticas (Figura 1B).

Cultivo de explantes con veneno entero y PLA₂ de *Bothrops alternatus*

En los tejidos dermo-epidérmico de explantes de pie equino incubado con 100 μ g de veneno entero de *B. alternatus* se observó el desprendimiento de la membrana basal de las láminas epidérmicas secundarias, presentándose como dos cordones bien delimitados de color oscuro (Figura 2 A) y en contacto entre sí en algunas zonas.

Entre cada cordón de MB se observó, en algunas áreas, tejido dérmico con sus vasos sanguíneos correspondientes. Al separarse, la MB del tejido laminar epidérmico, permaneció unido al tejido dérmico, presentándose con forma ondulada (Figura 2 B).

En los explantes incubados con 100 μ g de PLA₂ de veneno de *B. alternatus*, las células basales epidérmicas presentaron alteraciones citoplasmáticas

claramente evidenciadas por aumento de tamaño celular, con aspecto de células tumefactas, en algunas de ellas se observó vacuolas intracitoplasmáticas, ausencia de núcleos o restos nucleares (Figura 3 A y B). La membrana basal no se encontraba unida a las células basales epidérmicas y los núcleos de las células basales se encontraban alargadas y terminaban en forma aguda (Figura 3B).

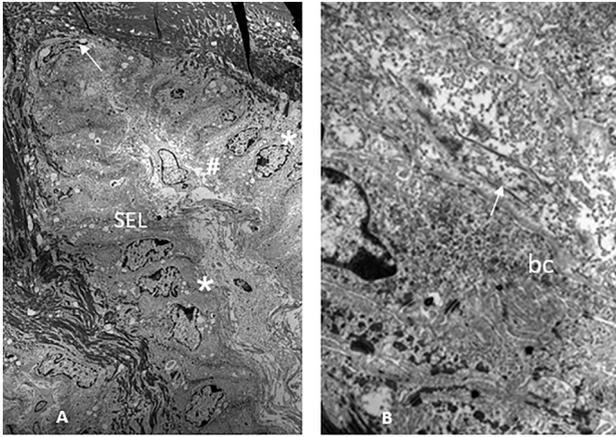


Figura 1 (A-B): microscopia electrónica de transmisión (MET) de láminas epidérmicas secundarias (LES) de pie equino control. A) Las LES están constituidas por células epidérmicas basales (*) y células parabasales. Se observa el extremo redondeado de las LES (flecha). B) Se observa la lámina densa (flecha) paralela a las células basales epidérmicas (bc). (TEM-Ax500-B) x100.

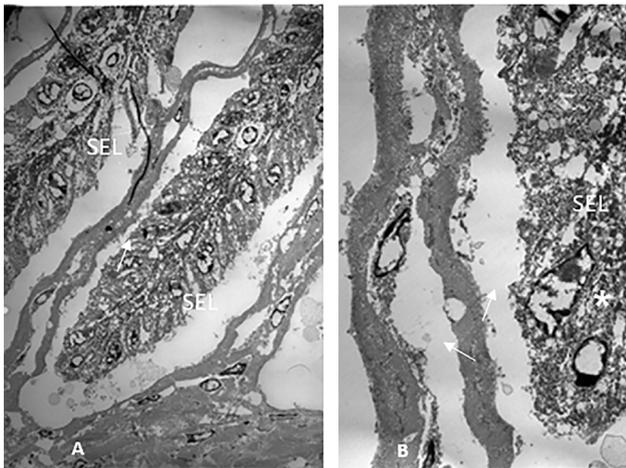


Figura 2 (A-B): explantes de láminas dermo-epidérmicas incubadas con 100 µg de veneno de *Bothrops alternatus*. Ultraestructura de la zona donde se encuentra la membrana basal (MB). A) Se observa 2 LES con separación de la MB, las cuales se muestran como 2 hebras bien definidas y oscuras (flecha). B) Se observa cambio en la forma de los núcleos de las células basales de las LES, presentándose ovalados, redondos o deformados (*). (MET- A) x1200 – B) x1500).

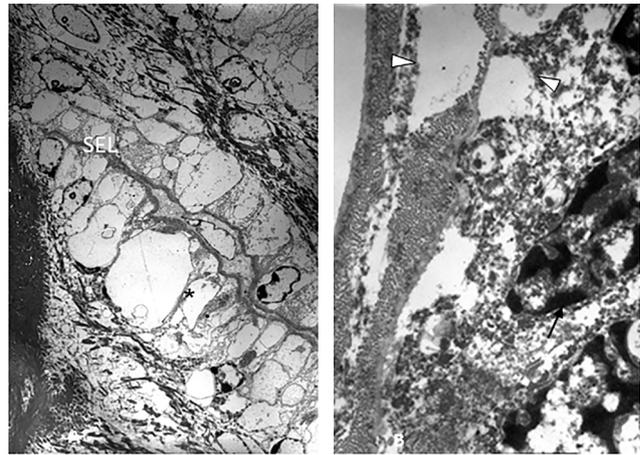


Figure 3 (A-B): Microscopia Electrónica de Transmisión (MET). Sección de laminillas epidérmicas secundarias (LES) de pezuña equina incubadas con 100 µg de PLA₆ de veneno de *Bothrops alternatus* A) Se observa células epidérmicas basales de mayor tamaño que el control y en algunas se evidenció ausencia de núcleos y orgánulos citoplasmáticos (*). B) La BM no estaba unida a las células basales epidérmicas y los núcleos de las células basales se encontraban alargados y terminaban en forma aguzada (flecha). (MET - A) X 2000, B) X 2500).

DISCUSIÓN

Microscopía electrónica de transmisión

Las células basales epidérmicas de las muestras de control se alinearon correctamente con núcleos ovalados en posición central. Sin embargo, las muestras incubadas con 100 µg de veneno de *B. alternatus*, mostraron células afectadas en su estructura con degeneración celular y gotitas lipídicas sueltas en el citoplasma. Los núcleos se encontraban deformados y mal posicionados de las células basales y parabasales. En contraste, las muestras incubadas con PLA₆, las células basales epidérmicas mostraron anomalías citoplasmáticas y nucleares pero con separación leve de la unión dermoepidérmica y presente solo en algunas áreas de las LES.

Del mismo modo, la microscopía electrónica de transmisión nos permitió observar que las láminas dérmicas al separarse de la epidermis producen roturas proporcionando una clara evidencia de desprendimiento de la membrana basal. Sin embargo, las placas de unión entre las células basales epidérmicas (desmosomas) y las células parabasales no mostraron anomalías en nuestras condiciones experimentales.

Por otro lado, los hemidesmosomas que constituyen la placa de unión de las células basales a las MB se rompieron y en algunas secciones se

superpusieron, evidencia clara de desprendimiento de la membrana basal. Sin embargo, en algunas secciones el BM permaneció intacto con la lámina lúcida, la lámina densa y la capa reticular aún distinguibles.

Estudios *in vivo* de otros autores mostraron lesiones similares a las mostradas en laminitis inducida por sobredosis de oligofructosa, se redujo el número de hemidesmosomas y aumentó la distancia entre la membrana basal densa y los hemidesmosomas²⁴. French & Pollitt⁹ informaron lesiones de hemidesmosoma similares en el modelo de inducción de oligofructosa. Además, los estudios *in vitro* muestran que la falta de glucosa reduce el número de hemidesmosomas y provoca la desintegración del citoesqueleto de células basales. Sin embargo, los filamentos de anclaje del plasmalema que conectan las células basales con el BM no se vieron afectados⁹.

Acción de PLA₂ de *B. alternatus* en explantes de pie equino

Las fosfolipasas son un grupo diverso y ubicuo de enzimas descritas por primera vez en 1967,¹⁷. Se demostró que inducen cambios en la composición de la membrana celular, activan cascadas inflamatorias y alteran las vías de señalización celular. Las PLA₂ son constituyentes comunes de los venenos de serpiente *Bothrops* y este tipo de enzima se aisló de *B. asper*^{13, 20, 21, 16, 22} de *B. nummifer*¹⁴ *B. jararacussu* de Brasil^{15,7} *B. moojeni*²¹ *B. alternatus* de Argentina¹⁰. Estas enzimas bothrópicas, incluida la que se utiliza aquí, no son capaces de degradar la membrana de los eritrocitos, aunque pueden hidrolizar los fosfolípidos de la membrana del músculo, induciendo su ruptura y posterior rabiomólisis. Este comportamiento diferente de un mismo tipo de enzima, puede explicarse por la posibilidad de que la PLA₂ aislada no acceda al sitio de hidrólisis de su sustrato en la membrana plasmática del epitelio basal, sino que provoque cambios en la organización de la membrana lipídica que inducen una alteración de la permeabilidad, como lo demuestra el aumento de la fragilidad osmótica en los eritrocitos¹⁸. Por tanto, las células de los explantes expuestos a la fosfolipasa A2 están tumefactas, pero no necróticas. Los efectos de PLA₂ del veneno de *B. alternatus* se pueden interpretar como un efecto sobre la permeabilidad de la membrana con un influjo de medio de cultivo que aumenta el tamaño del citoplasma y deforma el núcleo.

CONCLUSIÓN

El presente trabajo estudia el efecto del envenenamiento por serpientes utilizando el modelo *in vitro* de laboratorio. Se utilizó un protocolo de explantes de pezuñas para estudiar la enfermedad de

laminitis en el laboratorio *in vitro* por envenenamiento de serpientes, incluso en ausencia de vasculatura y suministro de sangre.

Asimismo, este modelo reprodujo los cambios patológicos en la anatomía de los cascos como los descritos para el pie de laminitis equina de diferente etiología sin tener que inducir el sufrimiento del animal.

Este estudio demostró que el veneno crudo y PLA₂ indujeron laminitis de explantes de pezuñas con algunas diferencias histopatológicas creadas por las diferentes etiologías. Los resultados aquí obtenidos resaltan la importancia de considerar la complicada patología asociada a la laminitis equina tras el envenenamiento por *B. alternatus*.

Esta nueva información podría promover estudios que involucren nuevas terapias específicas para el tratamiento de esta condición discapacitante.

Este trabajo fue financiado por la Secretaría General de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina (Proyecto N° 17BO17).

REFERENCIAS

1. Acosta O, Brem JJ. 1997. Secuelas de ofidismo en un equino de trabajo. *Vet Arg XIV*, 137: 474-478.
2. Acosta O et al. 2006. Equine laminitis: bites by *Bothrops sp* cause hoof lamellar pathology in the contralateral as well as in the bitten limb. *Toxicon* 48: 307-312.
3. Bjarnason JB, Fox JW. 1989. Hemorrhagic toxins from snake venoms. *J Toxicol Toxins Rev* 7: 121-209.
4. Bjarnason JB, Fox JW. 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac Ther* 62: 325-372.
5. Baxter GM. 1994. Acute laminitis. *Vet Clin North Am* 3: 627-642.
6. Cardoso JL et al. 1993. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in Sao Paulo, Brazil. *QJM* 86: 5, 315-325.
7. Cintra AC, Sampaio SV, Raghuvir AK, Giglio JR. 2001. Assignment of the disulfide bridges in *Bothrops* toxin, a myonecrotic Lys49 PLA₂ homolog from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Journal of Protein Chemistry* 20: 377-382.
8. Fan HW, Cardoso JL. 1995. Clinical toxicology of snake bites in South America. In: Meier, J., White, J. Eds: *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*, CRC Press, FL, p. 667-688.

9. **French KR, Pollitt CC.** 2004. Equine laminitis: loss of *hemi-desmosomes* in hoof secondary epidermal lamellae correlates to dose in an oligo fructose induction model: an ultra structural study equine. *Vet J* 36: 230-235.
10. **García ME et al.** 2010. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA₂ Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. *Toxicon* 56: 64-74.
11. **Gay CC, Leiva LC, Maruñak S, Teibler P, Acosta O.** 2005. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metallo-proteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon* 46: 546-554.
12. **Gay CC et al.** 2009. Systemic alterations induced by a *Bothrops alternatus* hemorrhagic metallo-proteinase (baltergin) in mice. *Toxicon* 53: 53-59.
13. **Gutiérrez JM, Ownby CL, Odell GV.** 1984. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon* 22: 115-128.
14. **Gutiérrez J, Lomonte B, Cerdas L.** 1986. Isolation and partial characterization of a miotoxin from the venom of the snake *Bothrops nummifer*. *Toxicon* 24: 885-894.
15. **Homsí ML, Queiroz H, Santo NL, Rodríguez SJ, Giglio JR.** 1988. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of *Bothrops* toxin. *Toxicon* 26: 615-627.
16. **Kaiser I, Gutierrez J, Plummer D, Aird S, Odelli G.** 1990. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Arch Biochem Biophys* 278, 319-325.
17. **Kerr WE.** 1967. The history of the introduction of african bees to Brazil. *S Afr Bee J* 39: 3-5.
18. **Ketelhut DF et al.** 2003. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A₂, isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochimie* 85: 983-991.
19. **Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 15: 227, 680-685.
20. **Lomonte B, Gutierrez J.** 1989. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 27: 725-733.
21. **Lomonte B et al.** 1990. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon* 28: 1137-1146.
22. **Mebs A, Samejima Y.** 1986. Isolation and characterization of miotoxic phospholipase A₂ from crotalid venom. *Toxicon* 24: 161-168.
23. **Mungall BA, Kyaww TM, Pollitt CC.** 2001. Evidencia *in vitro* de una patogénesis bacteriana de laminitis equina. *Vet Microbiol Toxicon* 79: 3, 209-223.
24. **Nourian AR, Baldwin GI, Vaneps AW, Pollitt CC.** 2007. Equine laminitis: ultrastructural lesions detected 24-30 hours after induction with oligo-fructose. *Equine Veterinary Journal* 39: 360-364.
25. **Pollitt CC.** 1996. Basement membrane pathology: a feature of acute equine laminitis. *Equine Vet J* 28: 38-46.
26. **Pollitt CC, Pass MA, Pollitt S.** 1998. Batimastat (BB-94) inhibits matrix metalloproteinases of equine laminitis. *Equine Vet J Suppl* 26: 119-124.
27. **Reynolds ES.** 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-212.
28. **Ribeiro LA et al.** 1998. Obitos por serpentes peçonhentas no Estado de Sao Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. *Rev Assoc Med Bras* 44: 312-318.
29. **Vidal JC, Stoppani AO.** 1971. Isolation and purification of two phospholipases a from *Bothrops* venom. *Arch Biochem & Biophys* 145: 543-556.
30. **Warrell DA.** 1995. Clinical toxicology of snakebite in Asia. In: *Meier, J., White, J. (Eds.), Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons.* CRC Press, pp 493-594.