

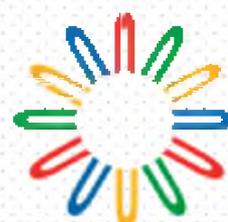
XXVII JORNADAS DE JOVENS PESQUISADORES

A ciência e a tecnologia na produção de inovação e transformação social

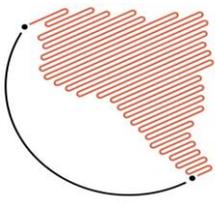
23 A 25 DE OUTUBRO DE 2019

UFSCar | Brasil | 2019

ISBN: 978-85-94099-11-2



Asociación de Universidades
GRUPO MONTEVIDEO



25- Atención Primaria de la Salud

Análisis comparativo de alteraciones histológicas en ganglios linfáticos producidas por acción de venenos de serpientes del NEA

Autor: Mariani, Josefina; jomariani6@gmail.com

Co-autor(es): Leiva, Laura; laurakeiva2014@yahoo.com.ar;

Teibler, Pamela; pteibler@gmail.com

Orientador: Echeverria, Silvina; silviecheverria@yahoo.com.ar

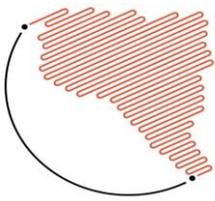
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura

Universidad Nacional del Nordeste

Resumen

En este trabajo de investigación se realizó un estudio histológico comparativo de los efectos de los venenos de *Bothrops diporus* (*vBd*) y *Crotalus durissus terrificus* (*vCdt*), obtenidos de especímenes de la región, sobre ganglios linfáticos. El análisis se basó en estudios previos con veneno de *Bothrops alternatus* (*vBa*) y se compararon los cambios observados con los ya descritos, buscando completar el estudio de los venenos de las serpientes con mayor importancia sanitaria de la región por ser responsables del mayor número de accidentes ofídicos. Se trabajó con ratones albinos machos de la cepa CF-1, que fueron inoculados con dosis subletales (200 µg/ml de *vBd* y 2 µg/ml de *vCdt*). Se extrajeron los ganglios inguinales a 4 tiempos de exposición (24, 48, 72,96 h) y se realizó la técnica histológica clásica - Hematoxilina y Eosina (*HE*), con posterior observación al microscopio óptico.

Los cambios observados siguieron un comportamiento dosis y tiempo de exposición dependiente. El veneno botropico se caracterizó por un aumento en el tamaño de los senos, tanto medulares como subcapculares, asociados a la acción edematizante de los mismos. Al comparar el *vBd* y el *vBa*, en el primero se observó un efecto más pronunciado pero a tiempos más tardíos. Esto se acompañó con la presencia de hematíes en todo el órgano para ambos casos. En cuanto al veneno crotalicos, no presento cambios en el tamaño en los senos, sin embargo se observó una mayor extensión de los mismos y a tiempos más tempranos lo cual podría asociarse a una mayor actividad inmunogenica. No se observó presencia de hematíes. Al analizar las HEVs se puede observar una activación en la migración linfocitaria hacia el ganglio, caracterizada por un aumento de celularidad en dichas estructuras. En todos los casos, en la zona cortical del ganglio, se detectó la aparición de folículos secundarios típicos. Estos cambios proliferativos indican el inicio de la



respuesta adaptativa, inducida por los venenos. Los cambios observados en cada caso presentaron un máximo que luego mostraba una tendencia a evolucionar hacia el estado basal.

Palabras clave: Yará grande y chica, Cascabel, Ganglio Linfático.

Introducción

Los accidentes ofídicos deben considerarse una emergencia médica y, en nuestro país, la mayoría son notificados por las provincias del Nordeste y Noroeste, durante la temporada de verano. Se ha identificado a *Bothrops*, como responsable del 96,6% de las mordeduras y se reportan cifras significativamente inferiores para *Crotalus* (2,8%) (Hass, A.I. *et al.*, 2014)

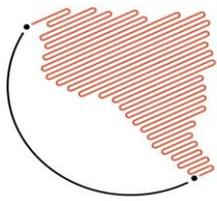
Los venenos de serpientes son una rica y compleja fuente de proteínas, componentes orgánicos de baja masa molecular y componentes inorgánicos, y cada género exhibe propiedades biológicas muy diferentes, produciendo manifestaciones tóxicas características propias debido a que su composición varía cuantitativa y cualitativamente. (Bieber, 1979).

El veneno botrópico tiene efecto *hemorrágico*, tanto local como sistémico. Se puede observar *edema e inflamación* en el sitio de inoculación de este veneno, de acuerdo a la gravedad puede aparecer también necrosis de tejido llegando a gangrena, junto con un abanico de síntomas sistémicos menos específicos (Navarrete Zamora *et al.*, 2010). Entre los componentes tóxicos asociados al envenenamiento se

incluyen enzimas tales como metaloproteinasas (hemorragia y relacionados con inflamación) (Acosta, O., 1999), fosfolipasas (miotoxicidad), serinoproteinasas (alteración en hemostasia) y L-aminoácido oxidasas, entre otras.

Por otro lado, en el veneno crotálico se describe como principal efecto la neurotoxicidad, causada por su componente mayoritario, el complejo Crotoxina (Zambelli *et al.*, 2008). Otro efecto de este veneno es la *miotoxicidad sistémica*, presentando rabiomólisis, a diferencia del envenenamiento *botrópico* donde el daño muscular es local (Gutiérrez *et al.*, 2008). Además, provoca alteraciones en la coagulación que pueden llevar a la incoagulabilidad y otras manifestaciones generales, relacionadas la presencia de serinoproteasas y otras proteínas tóxicas.

Numerosos trabajos describen los efectos fisiopatológicos ocasionados por dichos venenos sobre los órganos diana. Sin embargo pocos estudios remiten a los efectos sobre ganglios linfáticos, a pesar de ser el escenario principal donde se desarrolla la respuesta inmune. Los venenos más estudiados en el NEA corresponden a las especies *Bothrops alternatus* (B.a.),



Bothrops diporus (*B.d.*) y *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.t.*), conocidas como yarará grande, yarará chica y cascabel, respectivamente. Habiendo estudios previos del efecto del veneno de *B.a.* (*vBa*) (Echeverría *et al.*, 2015) es interés comparar los cambios que inducen los venenos de *B.d.* (*vBd*) y de *C.d.t.* (*vCdt*).

En el presente trabajo se analizaron, a nivel histológico, los efectos inducidos por los venenos de *B.d.* y *C.d.t.*, a diferentes tiempos de exposición sobre ganglios linfáticos inguinales de ratón. Adicionalmente se incluyó la comparación con aquellos que provoca el *vBa*.

Objetivos

Objetivo General

- Evaluar y comparar el impacto de las toxinas de veneno crudo de *B.d.*, *B.a.* y *C.d.t.* sobre ganglios linfáticos de ratón.

Objetivos Específicos

- Examinar los cambios morfológicos en ganglios linfáticos de ratón provocados por *vBd* y *vCdt* usando la técnica histopatológica clásica.
- Comparar los resultados obtenidos con los cambios descritos por acción de las toxinas de *vBa*.

Materiales y métodos

VENENOS: Se utilizaron pool de venenos de *B. diporus* y *C. durissus terrificus* cedidos por el serpentario de la provincia de Corrientes (Corrientes, Argentina). Estos

fueron desecado y conservadas a -20°C hasta el momento de la inoculación.

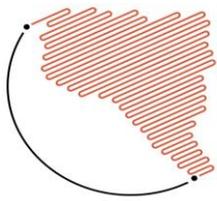
INOCULACION: Se ensayó el experimento - en ratones albinos machos de la cepa CF-1 de 18-20 gramos de peso corporal. A cada individuo se le inocular por vía subcutánea 0,05mL del veneno en la almohadilla plantar derecha, se trabajó con dos concentraciones distintas: 200 $\mu\text{g/ml}$ de *vBd* y 25 $\mu\text{g/ml}$ de *vCdt*. Se utilizó una población de ratones $n=16$ dividiendolos en dos grupos de $n=8$, uno para cada veneno. Cada inoculación se estudió a cuatro tiempos de exposición: 24hr, 48 h, 72 h y 96 h.

En el caso de los individuos de "control" ($n=8$, dos para cada tiempo de exposición), se inocular 0,05mL de Buffer Fosfato a un $\text{pH}= 1,2$, estudiándose a los mismos tiempos de exposición que los venenos.

Todos los procedimientos realizados se llevaron a cabo respeto las normas de cuidado animal y siguiendo los estándares éticos recomendados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE.

SACRIFICIO, DISECCION Y ANALISIS

HISTOLOGICO: Una vez transcurrido el tiempo necesario de exposición se procedió al sacrificio del animal en cada caso mediante la dislocación cervical por considerarse el método más rápido y por lo tanto que causa menor estrés y sufrimiento para el mismo.



Se procedió con la disección de cada individuo, inmediatamente después de la muerte, y posterior extracción del ganglio inguinal ubicado en la pierna derecha para ser fijadas en solución de formaldehído al 10%.

Se realizó la técnica histológica clásica, posterior obtención de los cortes mediante un micrótopo Rotatorio tipo Spencer manual. Los mismos fueron fijados en portaobjetos y luego se procedió a la tinción con la técnica de *HE* (Hematoxilina & Eosina).

Las imágenes fueron capturadas por una cámara digital Leica ICC50 conectada a un microscopio Leica DM500. En el análisis de las imágenes se empleó el sistema Leica Application Suite, versión 3.4.0.

Para la descripción de los resultados observados en cuanto a la alteración en senos medulares se clasifico en cinco niveles, siendo el de menor efecto cuando se encuentra comprometido menos del 10% del órgano y se le asigna la referencia +/-, luego entre 10-25%, 25-50%, 50-75% y siendo el máximo con un compromiso superior al 75% del órgano, con las referencias +, ++, +++ y +++, respectivamente.

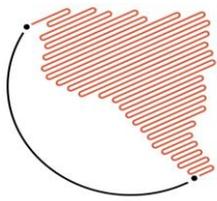
Para el análisis de la circulación celular en las *HEV*, se calculó el área de la luz de las vénulas, luego se contó el número de células inmunes observadas en la luz y se las expreso por células en unidad de área (cel/cm²).

Resultados y Discusión

En el presente trabajo las dosis de veneno utilizadas fueron subletales, razón por la cual todos los ratones sobrevivieron hasta el momento del sacrificio. Esta elección se basó en experiencia previa de este grupo de investigación, tratándose de dosis que producen la estimulación del sistema inmune suficiente para su análisis, sin ocasionar alteraciones significativas en el estado de salud general de los individuos.

En la histopatología de ganglios linfáticos tratados con los venenos se observaron ciertos cambios al analizar las distintas regiones del órgano, sin comprometer su estructura general. Estas manifestaciones presentaron máximos de acción a diferentes tiempos según el veneno inoculado, en concordancia con las diferencias estudiadas en la composición/efecto de cada uno de ellos mencionadas anteriormente.

En la región medular se pudo observar un aumento en el área ocupada por los senos en el parénquima del ganglio en el transcurso del tiempo (Fig. 1). Se registró un máximo de este efecto a las 72 h para *vBd* y a las 48 h *vCdt*, disminuyendo en las 24 h posteriores, en ambos casos (tabla 1). En los ganglios de ratones tratados con *vBa* se observa un aumento más temprano, ya a partir de las 48 h, que mantuvo sus dimensiones hasta concluir el estudio, lo cual se correlaciona con el efecto edematizante de los venenos botropicos. Esto se acompañó por una dilatación



observada en los senos subcapsulares inducida por vBd, en coincidencia con Ba (Echeverría, *et al.* 2015) lo cual se podría relacionar a la función de drenaje de la inflamación en el área de inoculación, (Fig.3 B).

vénulas observadas de los ganglios bajo efecto del vCdt presentaron un aumento en la celularidad progresivo en los tiempos determinados, manteniendo esa tendencia hasta el último tiempo de observación (Tabla 1). Estos resultados no concuerdan

Texp	CAPSULA				SENOS MEDUALRES				HEV (cel/cm ²)			
	B.d.	B.a.	C.d.t.	control	B.d.	B.a.	C.d.t.	control	B.d.	B.a.	C.d.t.	control
24hr	+	+++	+/-	-	-	++	+	-	6	3	3	3
48 hr	+	++	+/-	-	++	+++	+++	-	4	3	3	3
72 hr	+++	+	+/-	-	++++	+++	++	-	4	6	4	3
96 hr	+/-	+	+/-	-	+++	+++	+	-	4	6	6	3
Referencia	A	b	a	a	a	b	a	a	a	b	a	a

a: Este trabajo

b: Echeverria *et al* 2015.

Tabla 1. Alteraciones observadas en ganglios inguinales tras la inoculación de 0,05 ml de veneno.

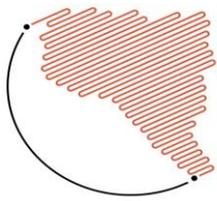
Además, se evidencia una acción más pronunciada por parte del veneno de Bd a pesar de expresarse a tiempos más tardíos.

El vCdt no indujo dilatación de los senos, así como tampoco presento diferencias significativas en el área de senos subcapsulares, coincidiendo con el insignificante edema en el sitio de inoculación, sin embargo se observó un aumento en la extensión del área respecto al control. Esto refleja el aumento en la actividad de circulación y filtración de linfa en el ganglio ante la presencia de las toxinas.

En la zona de la paracorteza se analizó la circulación celular a través de las vénulas del endotelio alto (HEV) (Fig. 3 A). Los ganglios tratados con vBd presentaron una celularidad máxima a las 24 h, que disminuyo a otro día y se mantuvo constante hasta las 96 h a diferencia de Ba que describió un aumento más tardío. Las

totalmente con estudios de *Zambelli et al.* (2008) que empleo enzimas aisladas del veneno, donde se describe un máximo a la hora, seguido de una disminución de la celularidad. Sin embargo, el aumento observado se correlaciona con la demanda esperada de células del sistema inmune por parte del ganglio reactivo, como así también la disminución posterior, se puede adjudicar a una resolución del proceso inmune.

En todos los casos, en la zona cortical del ganglio, se detectó la aparición de folículos secundarios típicos, con formación centros germinales y reubicación de las células en los folículos. Estos cambios proliferativos indican el inicio de la respuesta adaptativa, inducida por los venenos. (Fig.2 A y B). En lo ganglios tratados con venenos botropicos se observó la presencia de hematíes tanto a nivel de los senos subcapsulares como de los senos medulares, lo que se puede relacionar a su efecto hemorrágico, por la



presença de las metaloproteínas basal, lo que indicaría que no se (ausentes en el veneno crotálico). compromete la integridad tisular del órgano,

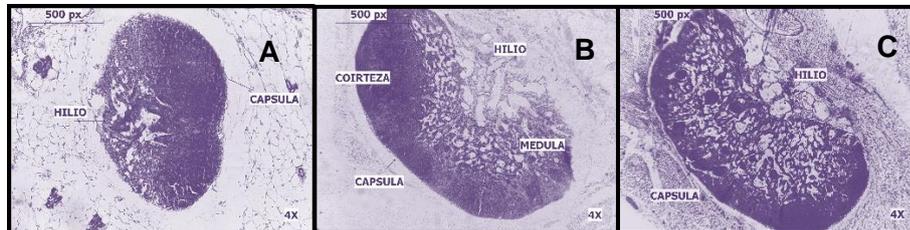


Fig.1 – 72 h exposição.
Senos medulares. (A) B.d.
++. (B) B.a. +++. (C) C.d.t.
++++

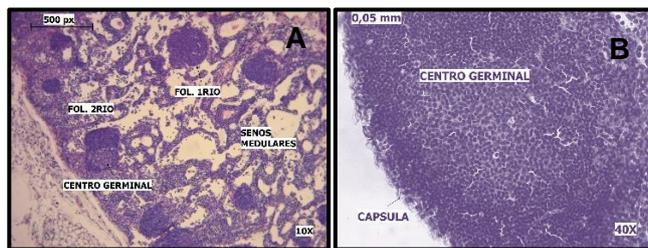


Fig 2. (A) B.d. 72 hr de exp.
Folículos 1 rios y 2 rios. (B)
v.C.d.t. 96 hr Folículo 2 rio

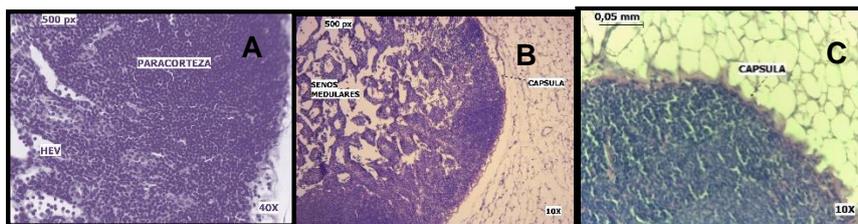


Fig. 3 – (A) v.C.d.t. 96 h de
exposición, HEV. (B) v.B.d. 72 h
de exp. Espacio subcapsular
dilatado. (C) Control.

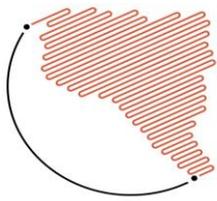
Los efectos observados con los distintos venenos fueron similares y evidentes, mostrando la reactividad del ganglio en una insipiente respuesta inmunitaria, que se orquesta desde el drenaje de la zona de inoculación, con un aumento en la circulación de linfa con los productos antígenicos y su consecuente filtración y reconocimiento en el parénquima del ganglio. El aumento de la celularidad a expensas de las HEV, se correlaciona con la demanda esperada de células de sistema inmune por parte del ganglio reactivo compatible con la presentación antigénica. En todos los casos se observó una tendencia a evolucionar hacia un estado

sino que son efectos temporarios relacionados con la movilización linfocitaria en el inicio de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Esta información reunida generaría un nuevo punto de intervención farmacológica con fines terapéuticos.

Conclusiones

Los efectos observados fueron transitorios, relacionados con el inicio de la respuesta inmune, sin comprometer la integridad del órgano.

Se logró completar el estudio preliminar de los venenos de serpientes considerados de mayor importancia en la región, en cuanto a



su acción sobre un órgano linfoide secundario

Estos resultados permiten abordar un análisis más profundo que podría generar un nuevo punto de intervención farmacológica con fines terapéuticos.

Referencias Bibliográficas

-Acosta, O., 1999. Caracterización Bioquímica y Farmacológica del veneno de *Bothrops alternatus*. Facultad de Ciencias Veterinarias., Universidad de Buenos Aires (UBA). Buenos Aires.

-Bieber, A.L., 1979. Metal and Nonprotein Constituents in Snake Venoms. Lee, C.Y. (Ed.), Springer-Verlag, New York.

-Echeverría, S.M., Teibler, G.P., Maruñak, S.L., Lértora, W.J., Leiva, L.C., 2015. Cambios microscópicos en ganglios linfáticos de ratones inoculados con veneno de *Bothrops alternatus*. Rev vet 26, 113-119.

-Esteso, S.C., 1985. Ofidismo en la República Argentina. Argentina. (ed. ARPON, Córdoba), pp 170.

-Gutierrez, J.M., Ponce-Soto, L.A., Marangoni, S., Lomonte, B., 2008. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A2: comparison between crotoxin, crotoxin B and Lys49 PLA2 homologue. Toxicon 51, 80-92.

-Navarrete Zamora, M.B., Silva Suárez, W.H., Vargas Mas Erasmo, A., 2010. The poisonous snakes of public health importance of Peru REDVET. Rev electrón Vet 11: 1695-7504.

-Haas, A.I., Orduna, T.A., Lloveras, S., De Rodt, A.R., García, S.I., Moreno, I., Penna, A.M., Sagadoiburu, S., 2014. Guía de prevención, diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de los envenenamientos ofídicos. Ministerio de Salud de la Nación Argentina

-Zambelli VO, Sampaio SC, Sudo-Hayashi LS, Greco K, Britto Luiz RG, Alves Adilson S, Zychar BC, Gonc-alves LRC, Spadacci-Morena DD, Otton R, Della-Casa MS, Curi R, Cury Y. 2008. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. Toxicon 51: 1357– 1367.

Financiamiento

Beca de pre-grado Estimulo a las Vocaciones Científicas EVC , del Consejo Interuniversitario Nacional (CIN) a través de la Secretaria General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE)