



XXVII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas

Orden Poster: CM-029 (ID: 2288)

Autor: Sasovsky, Daniela Jaqueline

Título: Actividad antimicrobiana de una PLA2 básica aislada del veneno de Bothrops diporus

Director: Bustillo, Soledad

Palabras clave: Bothrops diporus, PLA2, actividad antimicrobiana.

Área de Beca: Cs. De La Salud

Tipo Beca: Conicet

Periodo: 01/04/2020 al 01/04/2025

Lugar de trabajo: Iquia Nea - Inst. De Química Básica Y Aplicada Del Nordeste Argentino

Proyecto: (21F014) Evaluación de potenciales efectos farmacológicos y aplicaciones tecnológicas de compuestos derivados de la biomasa del Nordeste Argentino

Resumen:

La Organización Mundial de la Salud ha enfatizado la necesidad de nuevos medicamentos para combatir la resistencia bacteriana a los antibióticos. Esto ha provocado una búsqueda de nuevos agentes terapéuticos de diversas fuentes naturales, como proteínas y péptidos con potente actividad antimicrobiana de organismos secretores. En nuestro país una de las serpientes venenosas de mayor importancia médica es Bothrops diporus ("yarará chica"). Su veneno ha demostrado tener efecto inhibitorio sobre numerosas cepas gram positivas y negativas, sin embargo, no se ha estudiado previamente esta actividad con las toxinas purificadas. Es por ello que, el objetivo de este trabajo fue estudiar el potencial efecto antimicrobiano de una PLA2 básica aislada del veneno de B. diporus sobre una cepa de Staphylococcus aureus.

Se trabajó con un pool de venenos desecados, homogeneizados y conservado a -20°C. El aislamiento y purificación de la enzima PLA2 se llevó a cabo en dos etapas; una cromatografía de intercambio iónico (Sulfopropil-celulosa), y una cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G75). A cada fracción obtenida se le ensayó la actividad hemolítica indirecta, actividad proteolítica y se estimó el peso molecular de la enzima mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Las bacterias Staphylococcus aureus (ATCC 25923™), se cultivaron y repicaron en medio de agar tripticase de soya (TSA, Britania), en condiciones aeróbicas a 37°C. En el test de microdilución las suspensiones bacterianas se ajustaron al tubo N° 0.5 de la escala Mc Farland (1.5 x10⁸ ufc/mL) y se pre incubaron con igual volumen de la PLA2 en distintas concentraciones (5.5-350 µg/mL finales). Luego de 24 h de incubación a 37°C la turbidez fue determinada a 620 nm. Se realizaron controles de crecimiento utilizando caldo TSA en lugar de la enzima y un control de actividad inhibitoria positiva con antibiótico (Piperacilina-Tazobactam). La actividad antibacteriana fue medida como una inhibición del aumento de la turbidez. Además, de las determinaciones que evidenciaron un efecto inhibitorio significativo, se tomó una alícuota con ansa y se sembró en placas de agar TSA por método de dilución en placa incubando durante 24 h a 37°C.

En cuanto a los resultados obtenidos, la primer etapa cromatográfica de intercambio iónico permitió separar y concentrar las proteínas con carga positiva o básicas del veneno de B. diporus. Esta fracción se separó en una segunda etapa de cromatografía de exclusión molecular logrando resolver diferentes picos proteicos. Todas las fracciones presentaron actividad hemolítica indirecta, seleccionándose el último pico proteico por ser el único con ausencia de actividad proteolítica. Se evaluó la pureza de la enzima por SDS-PAGE, observándose una banda homogénea con un peso molecular de ~14 kDa.

Esta PLA2 básica aislada del veneno de Bothrops diporus evidenció un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano dependiente de la concentración, luego de 24 h de incubación a 37°C. El crecimiento de Staphylococcus aureus disminuyó aproximadamente un 15% con las dosis intermedias de la enzima ensayada (88, 125 y 175 µg/mL) y se pudo comprobar que con las concentraciones más altas (250 y 350 µg/mL) se inhibió el crecimiento bacteriano en un 28% y 43% respectivamente con respecto al control de crecimiento. La dilución en placa de la concentración más alta ensayada y con mayor efecto inhibitorio demostrado por el test de microdilución evidenció el desarrollo de un menor número de colonias con respecto al control.

Estudios previos han reportado coincidentemente que varias PLA2 aisladas del género Bothrops poseen actividad antimicrobiana frente a las cepas de S. aureus. Estos resultados preliminares sientan base en el estudio de la PLA2 aislada de B. diporus como potencial prototipo de antibiótico.