



XXII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas

Orden Poster: CE-019 (ID: 278)

Autor: Matzner Perfumo, Veronica

Título: EVALUACIÓN IN VITRO DE LA MIOGENESIS LUEGO DE LA INTOXICACIÓN CON UNA FOSFOLIPASA A2 AISLADA DEL VENENO DE BOTROPS DIPORUS

Director:

Palabras clave: Bothrops diporus,Fosfolipasa A2,miogénesis,veneno

Área de Beca: Cs. Naturales Y Exactas

Tipo Beca: Beca De Otro Organismo Cyt Desarrollados En La Unne

Periodo: 01/06/2015 al 01/06/2016

Lugar de trabajo: Facultad De Cs. Exactas Y Naturales Y Agrimensura

Proyecto: (13CF02) Evaluación in vitro de la miogenesis luego de la intoxicación con venenos de serpientes de la flia. Viperidae de la región noreste de argentina.

Resumen:

La capacidad regenerativa del tejido muscular está relacionada con la presencia de las células satélite las que permanecen quiescentes en la periferia de las fibras musculares hasta que estas sufren un daño. En ese momento, se activan y dividen generando mioblastos, los cuales proliferan y se fusionan para formar miotubos hasta reconstituir las fibras musculares.

Los mioblastos en cultivo son comparables a las células satélites en la fibra muscular y son capaces de exhibir todas las características de la miogénesis muscular. La mayoría de los accidentes ofídicos en nuestro país son causados por Bothrops diporus (yarárá chica), serpiente de interés en el presente estudio. No se ha investigado previamente el rol de las principales toxinas de este veneno en la regeneración muscular luego de la intoxicación ofídica. Así, el objetivo de este trabajo es el estudio en la inhibición de la regeneración muscular de una fosfolipasa A2 básica (PLA2) aislada del veneno de Bothrops diporus, para así avanzar en el conocimiento y elucidación del mecanismo puesto en juego durante la intoxicación. Para ello, en primer lugar se purificó la enzima mediante dos etapas cromatográficas, una cromatografía de intercambio iónico (Sulfopropil-celulosa, 35 mg de veneno-buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7/NaCl 0.5M) y la segunda una cromatografía de filtración molecular Sephadex® G75 (Tris-HC1 20 mM, pH 7). Los ratones (CF-1) fueron inyectados en el músculo gastrocnemio derecho con 25 µg de la enzima PLA2. Los animales utilizados como control fueron inyectados con buffer fosfato salino (PBS). Luego de diferentes intervalos de tiempo (1, 3, 24 y 168 h), fueron sacrificados, los músculos fueron diseccionados y colocados en un mortero con N2 líquido para su congelación y pulverización a finas partículas. Se preparó un pool con todos los músculos correspondientes al mismo tratamiento. La cuantificación de la cantidad de veneno presente en cada muestra de homogenato fue realizado por ensayo de ELISA. Luego, para evaluar el efecto de los homogenatos en la miogénesis, se adicionaron 25-30 µg de proteína de los homogenatos musculares obtenidos de ratones inyectados con PLA2 disueltos en el medio de cultivo (DMEM-GIBCO) suplementado con solo 1% de SFB y se dejó 24hs a 37°C-5% CO2. Los eventos morfológicos y daños celulares inducidos, se analizaron cualitativamente por microscopía de contraste de fases. Los resultados obtenidos evidenciaron la presencia de la enzima PLA2 en los homogenatos de músculos de ratones tratados, hasta 24h post-inoculación. Se detectó un 30% de PLA2 pasada una hora de la inoculación que luego disminuyó a un 10% y 2% a las 3 h y 24 h respectivamente. No se detectó presencia de la toxina luego de 7 días de realizada la inoculación. En la evaluación de la miogénesis, se comprobó una inhibición completa de la fusión de los mioblastos para formar miotúbulos en los ensayos realizados con homogenatos obtenidos luego de 1 h de la inoculación. Así también, los homogenatos correspondientes a 3 h inhibieron en gran parte la formación de miotúbulos observándose áreas donde predominaron las formas indiferenciadas. No se evidenciaron cambios con los homogenatos correspondientes a las 24 h ni con los de 168 h. Si bien se detectó presencia de PLA2 luego de 24 h, probablemente la baja concentración presente de la toxina, no es suficiente como para evidenciar un efecto in vitro de inhibición de la miogénesis. En conclusión, estos hallazgos sugieren que trazas de la enzima PLA2 presentes en el tejido muscular luego de varias horas de la intoxicación, impedirían una respuesta regenerativa exitosa. Futuros estudios de neutralización pondrán en evidencia si es posible una administración local de antiveneno o anticuerpos específicos para uso terapéutico.