



XXVIII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas

Orden Poster: CM-036 (ID: 2668)

Autor: Sasovsky, Daniela Jaqueline

Título: Efectos inflamatorios de isoformas de fosfolipasas A2 aisladas del veneno de *Bothrops diporus*

Director: Bustillo, Soledad

Palabras clave: Citoquinas, Fosfolipasas A2, *Bothrops diporus*

Área de Beca: Cs. De La Salud

Tipo Beca: Conicet

Periodo: 01/04/2020 al 01/04/2026

Lugar de trabajo: Iquiba 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:

Bothrops diporus también conocida como "yarára chica" es una serpiente distribuida desde el suroeste de Brasil, a través de Paraguay hasta el centro de Argentina. Además de sus efectos sistémicos, el veneno de esta especie induce un importante daño tisular local caracterizado por mionecrosis, hemorragia, ampollas y edema. El proteoma de este veneno ha demostrado la presencia mayoritaria de fosfolipasas A2 (PLA2s) (24.1% del total de proteínas). Estas toxinas son clave en los efectos inflamatorios inducidos en el envenenamiento botrópico, caracterizados por la activación de células inmunes innatas y células endoteliales y la liberación de varios mediadores inflamatorios que interfieren en la dinámica vascular. Estos mediadores inflamatorios, incluyen citoquinas, quimiocinas, aminas vasoactivas y eicosanoides producidos por componentes plasmáticos o liberados en las proximidades de la lesión por células endoteliales, leucocitos del tejido (mastocitos), macrófagos y leucocitos infiltrados. Si bien se ha demostrado previamente la actividad inflamatoria de otras PLA2s de venenos botrópicos, no se ha evaluado previamente el efecto de estas toxinas aisladas del veneno de yarára chica en la secreción de mediadores inflamatorios. Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue evaluar por primera vez, el perfil de citoquinas secretadas por células mononucleares de sangre periférica (PBMC) incubadas con un pool de isoformas de PLA2s aisladas del veneno de *B. diporus*. La importancia de estos estudios radica en comprender los mecanismos inflamatorios locales desencadenados que podrían conducir al descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas para un tratamiento más eficaz en el envenenamiento por serpientes botrópicas. Se trabajó con un pool de venenos de especímenes adultos de ambos sexos de *B. diporus* proporcionado por el Centro de Producción de Suero Antiofídico (CEPSAN) del Ministerio de Producción de la Provincia de Corrientes. El mismo fue desecado, homogeneizado y conservado en freezer a -20°C . Para el aislamiento de fosfolipasas A2, se disolvieron alícuotas de veneno (1,8–2,0 mg) en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 % (solvente A), se centrifugaron para eliminar los desechos y se separaron mediante RP-HPLC en una columna C18 ($4,6 \times 250$ mm, partículas de 5 μm), utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent 1220 con detección a 215 nm. La elución se realizó utilizando un gradiente de disolvente B (acetronitrilo con TFA al 0,1%) de 0 a 70 % en un caudal de a 1 ml/min. Las fracciones de interés (en la región de elución de las PLA2) se recolectaron, se liofilizaron y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Las concentraciones de proteína se estimaron midiendo la absorbancia a 280 nm. Su masa molecular se determinó por espectrometría de masas (MALDI-TOF MS, Shimadzu). Las Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron de tres donantes sanos. Las PBMC se cultivaron en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % y se incubaron a 37°C con 5% de CO_2 . Para la detección de Citoquinas se utilizó la tecnología IsoPlexis-CodePlex. Brevemente, se pre-incubaron 1×10^6 PBMC con 25 μg de un pool de las isoformas de PLA2 aisladas del veneno de *B. diporus*. Luego de 4, 10 y 24h a 37°C y 5% de CO_2 , se centrifugó y se recolectaron los sobrenadantes para la medición de citoquinas secretadas. Para ello, se seleccionó el panel "Human Adaptive Immune" que evaluó: GM-CSF, Granzyme B, IFN-gamma, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17A, IP-10, MCP-1, MIP-alfa, MIP-beta, Perforin, sCD137, TNF-alfa, TNF-beta. Se sembraron 11 μL de los sobrenadantes en los chips CodePlex y se insertaron en el sistema IsoLight para luego analizar los datos con el software IsoSpeak. Los ensayos se realizaron por duplicado. El perfil de HPLC del veneno de *B. diporus* presentó picos proteicos significativos a los 51–56 min de elución, región cromatográfica donde comúnmente se encuentran las PLA2 de los venenos ofídicos. Se seleccionaron y recolectaron estas fracciones que se denominaron picos 1, 2, 3, 4, y 5. Se terminó por espectrometría de masas, una masa molecular promedio de 13-14 kDa correspondientes a isoformas de PLA2. Utilizando la tecnología de Isoplexis-Codeplex se pudo determinar que las PBMC humanas incubadas con 25 $\mu\text{g/mL}$ de un pool de las isoformas de PLA2 aisladas mostraron principalmente incrementos en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, en comparación al control sin estimular, a los tres tiempos evaluados. Sin embargo, la mayor expresión se evidenció luego de 4h de incubación con una mayor intensidad de señal esencialmente de los mediadores pro-inflamatorios TNF-alfa, TNF-beta, IL-2, IL-7, IL-17, INFgamma, Granzyme B, MIP1-alfa, MIP1-beta, MCP1 y únicamente detectándose una sobreexpresión de IL-13, GM-CSF y de IL-5 como mediadores anti-inflamatorios posiblemente como un mecanismo de contrarregulación. Resultados similares se obtuvieron por ejemplo con una PLA2 aislada del veneno de *Bothrops leucurus* que indujo la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en PBMC sin ninguna variación en los niveles de citoquinas anti-inflamatorias. Como así también, isoformas de PLA2 (Lys-49 y Asp-49) aisladas del veneno de *Bothrops asper* y *Bothrops*

pauloensis, que incrementaron los niveles de citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF-alfa. Estos resultados preliminares, sientan base en el estudio y comprensión de los eventos inflamatorios desencadenados en el accidente ofídico causado por B. diporus para el potencial descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos.