

LIBRO DE
RESÚMENES



UNR

XXI Jornadas de Divulgación Técnico- Científicas 2021

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS-UNR

ISBN 978-987-702-552-1

Libro de Resúmenes de las XXI Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas 2021 /Andrea Boaglio... [et al.] ; compilación de Vanesa Barichello ; editado por Andrea Boaglio. - 1a ed. - Rosario: UNR Editora, 2022.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-702-552-1

1. Veterinaria. I. Boaglio, Andrea, ed. II. Barichello, Vanesa, comp.
CDD 636.089

ISBN 978-987-702-552-1



Contenido y corrección: a cargo de autores y revisores
Diagramación y edición: Andrea Boaglio
Diseño y realización de tapas: Marcela Stella y Sofía Dalmagro

ÁREAS TEMÁTICAS

1. Anatomía y Fisiología Animal
2. Bioseguridad
3. Clínica, Patología y Terapéutica en Animales
4. Ecología, Flora y Fauna Silvestre
5. Economía
6. Educación
7. Epidemiología y Salud pública
8. Extensión
9. Mejoramiento Genético y Biotecnología Animal
10. Producción Animal
11. Reproducción Animal
12. Otras áreas vinculadas a la actividad veterinaria

EFFECTO PROTECTOR DE LA FOSFOMICINA SOBRE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS NUCLEARES COMPATIBLES CON APOPTOSIS INDUCIDOS POR DEOXINIVALENOL EN CÉLULAS MONONUCLEARES ADHERENTES PORCINAS

Pérez Gaudio, Denisa¹, Pérez, Sandra², Mozo, Joaquín³, Martínez, Guadalupe¹, Decundo, Julieta¹, Romanelli, Agustina¹, Dieguez, Susana¹, Soraci, Alejandro¹

¹ Lab. de Toxicología, Depto. de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), CONICET-UNCPBA, Tandil, Bs. As., Argentina. ² Lab. de Virología, Depto. SAMP, Facultad de Ciencias Veterinarias, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), CONICET-UNCPBA, Tandil, Bs. As., Argentina. ³ Actividad privada, Tandil, Bs. As., Argentina. denisa@vet.unicen.edu.ar

El destete es considerado un período crítico para el lechón debido a que los animales pasan de estar con sus madres consumiendo calostro y leche, a ser separados de las mismas y enfrentarse a nuevos y múltiples factores estresantes. Sumado a esto, además están expuestos a la presencia de componentes anti-nutricionales en la dieta, tales como las micotoxinas. Las mismas son sustancias tóxicas resultantes del metabolismo secundario de diferentes cepas de hongos filamentosos, principalmente del género *Fusarium* (patógenos de diversos cultivos cuyos granos son utilizados como alimento en producción porcina). Una micotoxina de importancia que causa pérdidas productivas en dicha especie es el deoxinivalenol (DON). El mecanismo por el cual DON ejerce su acción tóxica es la inhibición de la síntesis proteica, sumado a una actividad citotóxica en tejidos de rápido crecimiento (principalmente, tracto intestinal y células sanguíneas e inmunes), induciéndoles daño en el ADN y apoptosis¹. Por otro lado, algo muy frecuente en producción animal es encontrar en el alimento la presencia de micotoxinas en conjunto con antibióticos que favorecen el rendimiento y, tras ser ingeridos, el animal queda expuesto a la posible interacción de ambos compuestos. Aunque el uso de aditivos que favorezcan el rendimiento está prohibido en muchos países, en Argentina esto aún no es posible debido a las características de algunos sistemas de producción y a los problemas de higiene y/o manejo en las granjas. Entre los antimicrobianos utilizados en producción porcina se encuentra la fosfomicina (FOS), un antibiótico de amplio espectro que actúa interfiriendo la síntesis de la pared celular bacteriana. Además, posee otras propiedades extra-antimicrobianas que la vuelven una molécula interesante para su estudio, tales como la promoción de la fagocitosis y un efecto inmunomodulador. Por otro lado, en trabajos previos hemos demostrado la penetración de FOS en cultivos de células de origen respiratorio humano y en varios tipos de células porcinas (células fagocíticas, células blancas sanguíneas, células y explantes intestinales) con y sin tratar con DON. Además, hemos determinado en cultivos celulares que una dosis de DON de 2,8 µg/mL resulta tóxica y que un tiempo de incubación de 4 hs, es el punto muestral más temprano en el cual se ha observado desprendimiento celular. Asimismo, hemos encontrado que DON induce cambios morfológicos nucleares compatibles con apoptosis (CMNCA) en cultivos celulares de origen humano (HEp-2; CACO-2), bovino (MDBK y BT) y murino (BHK) y que FOS es capaz de prevenir dichos cambios en todas las líneas celulares ensayadas². Hasta el momento, no existen estudios sobre el efecto protector de FOS sobre los CMNCA inducidos por DON en células mononucleares adherentes porcinas. Considerando lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo fue determinar el porcentaje de CMNCA inducidos por DON en células mononucleares adherentes porcinas y evaluar el rol protector de la FOS sobre el daño generado. Para la realización de este estudio se emplearon cuatro lechones post-destete, clínicamente sanos, de 4-5 semanas de edad, no tratados previamente con antimicrobianos. Se tomaron muestras de sangre (8 mL) con citrato de sodio pH 6,5, como anticoagulante (1:4). Para obtener la capa blanca, las muestras fueron centrifugadas 15 min. a 2500 rpm. Mediante pipeta Pasteur se obtuvo la capa blanca de cada tubo, las cuales fueron transferidas a tubos con 10 mL de cloruro de amonio (CINH₄). Se centrifugaron durante 7 min. a 3000 rpm y 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se levantó el pellet con pipeta. Se realizó un lavado con PBS y se efectuó una nueva centrifugación, por 10 min. a 1000 rpm. Las capas blancas se resuspendieron en medio RPMI y se tomó una alícuota para coloración vital con trypan blue y recuento celular. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos conteniendo RPMI y 20% de SFB. A las 24 hs, el medio fue eliminado y reemplazado, contándose con la capa de células mononucleares adherentes. La pureza de la población celular fue evaluada mediante análisis de la morfología celular luego de la tinción con Giemsa. Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos conteniendo cubreobjetos para la adherencia celular. Luego de 24 hs, las monocapas fueron tratadas de la siguiente manera: a) **DON**: Se utilizó un estándar puro de DON (SigmaAldrich ®) y a partir de una solución madre preparada en metanol se obtuvo mediante evaporación una dosis de 2,8µg/mL; b) **FOS**: Se utilizó la sal disódica de FOS (polvo estéril, pureza

98,90%, Lab. Bedson S.A.), a una concentración de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$; c) **DON+FOS**: DON 2,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y FOS 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y d) **Control negativo**: Células incubadas solo con medio de cultivo. Los ensayos se realizaron por triplicado. Luego de la incubación (4 hs), el medio fue removido, las células fueron lavadas con PBS, fijadas con paraformaldehído al 1 % y teñidas con DAPI (tinción que se utiliza para evaluar los CMNCA tales como condensación de la cromatina y fragmentación nuclear). Luego fueron observadas bajo microscopio de fluorescencia y mediante cámara acoplada al mismo se registraron 6 campos visuales para cada uno de los tratamientos y para el control negativo. Utilizando el macro de apoptosis del software FIJI®, se determinó, para cada uno, la cantidad total de células por imagen y el número de células con CMNCA, a fin de calcular finalmente el porcentaje de células con morfología nuclear alterada. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA/Test de Tukey. La figura 1 muestra los porcentajes promedio de células cuyos núcleos presentaron CMNCA.

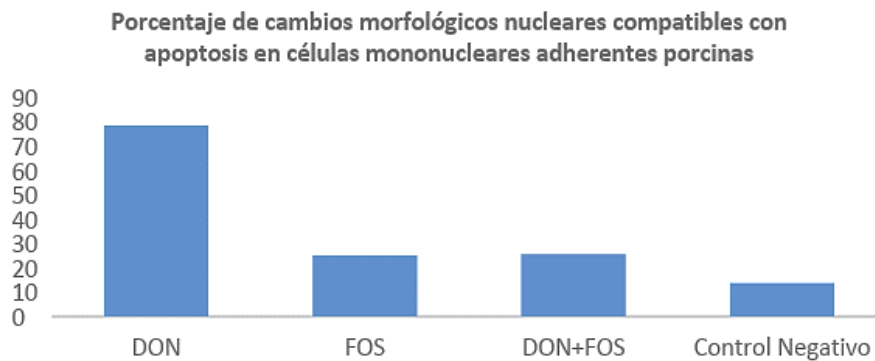


Figura 1. Porcentaje de CMNCA obtenido para los tres tratamientos ensayados y para el control negativo en las células mononucleares adherentes porcinas.

Existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre el porcentaje de CMNCA inducido por DON y el de los demás tratamientos y el control negativo, mientras que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre estos últimos tres. Por lo tanto, FOS mostró proteger a las células mononucleares de los CMNCA inducidos por la micotoxina. Similares resultados hallamos en estudios realizados en células intestinales, donde al ser expuestas a la misma dosis de la micotoxina y a una dosis de 580 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la sal cálcica de FOS, los porcentajes de CMNCA fueron significativamente mayores en las células solo tratadas con la micotoxina, en comparación con aquellas incubadas con FOS en conjunto con DON y no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las células incubadas con DON+FOS o solo FOS al ser comparadas con los controles negativos³. Por otro lado, el mecanismo exacto por el cual DON daña el ADN y promueve la toxicidad celular no está aún bien establecido⁴. Debido a que los ribosomas son el blanco molecular principal de los tricotecnos, incluido DON, la inhibición translacional sería el mecanismo obvio de toxicidad. DON puede activar rápidamente a las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), mediante una "respuesta de estrés ribotóxico", siendo estas cruciales para la transducción de señales en la respuesta inmunitaria y la modulación del crecimiento, la diferenciación y la apoptosis. Considerando que estas quinasas emergen como un blanco importante para el diseño de drogas terapéuticas y que FOS podría inhibir la apoptosis inducida por DON al actuar sobre las MAPKs, sería de importancia dilucidar si esto es lo que realmente está ocurriendo. Resulta entonces imprescindible la realización de más estudios tendientes a determinar el mecanismo protector de FOS sobre los cambios nucleares.

Bibliografía

1. Savard C., Gagnon C.A., Chorfi Y. (2015) Deoxynivalenol naturally contaminated feed impairs the immune response induced by PRRSV live attenuated vaccine. *Vacc* S0264-410X (15) 00870-1.
2. Pérez Gaudio D.S., Martínez G., Fernández Paggi, M.B.; Riccio M.B; Decundo J.M., Dieguez S., Soraci A.L., Tapia M.O. (2016). Protective effect of fosfomycin in deoxynivalenol-treated cell cultures. *Eur J of Biom and Pharm Sci.* 3(7):99-106.
3. Pérez Gaudio D.S., Mozo J., Martínez G., Fernández Paggi M.B., Decundo J.M., Romanelli A., Dieguez S.N., Soraci A.L. (2020). *J of Rep in Pharm Sci.* 9(2):209-214.
4. Singh S., Banerjee S., Chattopadhyay P., Borthakur S.K., Veer V. (2015). Deoxynivalenol induces cytotoxicity and genotoxicity in animal primary cell culture. *Toxic Mech and Meth* 25(3):184-191.

LIBRO DE
RESÚMENES

FACULTAD
DE CIENCIAS
VETERINARIAS-UNR

XXI Jornadas
de Divulgación
Técnico-Científicas
2021



FACULTAD DE
CIENCIAS VETERINARIAS
UNR



Universidad
Nacional
de Rosario

*Bv. Ovidio Lagos y Ruta 33
Casilda - Santa Fe - Argentina
tel. +54 03464-422050
Web <https://fveter.unr.edu.ar/>*