



*& X CONGRESSO INTERNACIONAL
DE SUINOCULTURA*

Trabalhos
Científicos

PORKEXPO 2022

DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS MONONUCLEARES PORCINAS TRATADAS CON UNA MICOTOXINA, UN ANTIBIÓTICO Y SU COMBINACIÓN

PÉREZ GAUDIO, D.S.¹; PÉREZ, S.¹; MOZO, J.²; MARTÍNEZ, G.¹; DECUNDO, J.¹;
ROMANELLI, A.¹; CAEIRO, V.¹; DIEGUEZ, S.¹; SORACI, A.¹

¹Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN-CONICET), FCV-UNCPBA, Tandil, Bs. As., Argentina; ²Actividad Privada

PALABRAS CLAVE: Apoptosis; fosfomicina; protección

INTRODUCCIÓN

El deoxinivalenol (DON) es una micotoxina presente en el alimento que genera pérdidas productivas al inhibir la síntesis proteica e inducir daño en el ADN y apoptosis (1). Por otro lado, el uso de antibióticos (ATB) en nuestros sistemas productivos es frecuente, quedando los animales expuestos a la interacción de estos compuestos. Entre los utilizados en producción porcina se encuentra la fosfomicina (FOS), la cual ha mostrado tener además efectos extra-ATB. Hemos demostrado que DON induce cambios morfológicos nucleares compatibles con apoptosis (CMNCA) en diversas líneas celulares y que FOS es capaz de prevenirlos (2). Sin embargo, hasta el momento, no se han realizado estudios en células mononucleares ni se ha confirmado que se correspondan verdaderamente con células en estado de apoptosis. Por este motivo, los objetivos de este trabajo fueron determinar el porcentaje de CMNCA inducido por DON en células mononucleares adherentes porcinas, confirmar que los mismos se deben a la apoptosis y evaluar el rol protector de FOS.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de sangre con citrato de sodio, como anticoagulante (1:4) de 4 lechones post-destete, clínicamente sanos. Se centrifugaron 15 min. a 2500 rpm., se obtuvieron las capas blancas y se transfirieron a tubos con CIN_4 para lisar los glóbulos rojos restantes. Se centrifugaron por 7 min. a 3000 rpm y 4°C. Se descartó el sobrenadante y se levantó el pellet con pipeta. Las células se lavaron, se centrifugaron y se sembraron en placas de 6 pocillos conteniendo RPMI y 20% de SFB. A las 24 hs, el medio fue reemplazado, contándose con la capa de células mononucleares, las cuales fueron sembradas en placas de 24 pocillos conteniendo cubreobjetos para adherencia celular. Luego de 24 hs en cultivo se realizaron los siguientes tratamientos por triplicado por un período de 4 hs: a) DON: Estándar puro (SigmaAldrich®), 2,8 µg/mL; b) FOS: Sal disódica (Lab. Bedson S.A.), 150 µg/mL; c) DON+FOS: DON 2,8 µg/mL y FOS 150 µg/mL y d) Control negativo: Células incubadas solo con medio de cultivo. Para cada tratamiento, se utilizaron distintos cubreobjetos con células *i*) fijadas con paraformaldehído al 1% a fin de efectuar la tinción DAPI para determinar CMNCA (Figura 4) y *ii*) fijadas con paraformaldehído al 4% a fin de confirmar apoptosis mediante TUNEL (DeadEnd Colorimetric TUNEL System, Promega). Las células de *i*) fueron observadas bajo microscopio de fluorescencia. Utilizando el macro de apoptosis del software FIJI®, se calculó el porcentaje de células con CMNCA. Las células de *ii*) fueron observadas bajo microscopio óptico y se calculó el índice apoptótico (IAp) mediante la siguiente fórmula $\text{IAp} = \left[\frac{\text{células TUNEL positivas}}{\text{células totales}} \times 100 \right]$. La figura 1A muestra las células teñidas con DAPI (flechas rojas: CMNCA; flechas amarillas: células normales). La figura 1B muestra las células luego de la tinción TUNEL (marrón oscuro: células apoptóticas).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre los %CMNCA y el IAp inducido por DON y el de los demás tratamientos y el control negativo, mientras que no existieron diferencias ($p \geq 0,01$) entre estos últimos tres. Por otro lado, se demostró que los CMNCA se corresponden con células apoptóticas. La figura 2 muestra, para cada tratamiento, los %CMNCA y los IAp determinados en las células mononucleares adherentes porcinas.

Los hallazgos concuerdan con nuestros estudios previos en células intestinales CACO-2, dónde al ser expuestas a la misma dosis de DON y a una dosis de 580 µg/mL de FOS cálcica, los %CMNCA fueron significativamente mayores en las células solo tratadas con DON, en comparación con aquellas incubadas con FOS+DON, sin existir diferencias entre las células incubadas con ambos o solo con FOS al ser comparadas con los controles negativos (3). El mecanismo exacto por el cual DON daña el ADN y promueve la toxicidad celular no está aún bien establecido (4), aunque se sabe que puede activar las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), mediante una “respuesta de estrés ribotóxico”, siendo estas cruciales para la transducción de señales en la apoptosis.

CONCLUSIÓN

FOS mostró proteger a las células mononucleares porcinas de la apoptosis inducida por DON. Considerando que las MAPKs emergen como un blanco importante para el diseño de drogas terapéuticas y que FOS podría inhibir la apoptosis de DON al actuar sobre las MAPKs, sería de importancia dilucidar si este es el mecanismo involucrado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SAVARD, C.; GAGNON, C.A. y CHORFI, Y. Deoxynivalenol naturally contaminated feed impairs the immune response induced by PRRSV live attenuated vaccine. **Vaccines**, S0264-410X (15) 00870-1. 2015.
2. PÉREZ, D.S.; MARTÍNEZ, G.; SORACI, A. L.; FERNÁNDEZ PAGGI, M.B.; RICCIO, M.B.; DIEGUEZ, S., et al. Protective effect of fosfomycin in deoxynivalenol-treated cell cultures. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**. 3(7):99-106. 2016.
3. PÉREZ GAUDIO, D.S.; MOZO, J.; MARTÍNEZ, G.; FERNÁNDEZ PAGGI, M.B.; DECUNDO, J.M.; ROMANELLI, A., et al. Fosfomycin protects intestinal cells from nuclear changes suggestive of deoxynivalenol-induced apoptosis. **Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences**. 9(2):209-214. 2020.
4. SINGH, S. y cols. Deoxynivalenol induces cytotoxicity and genotoxicity in animal primary cell culture. **Toxicology Mechanisms and Methods** 25(3):184-191. 2015.

FIGURAS

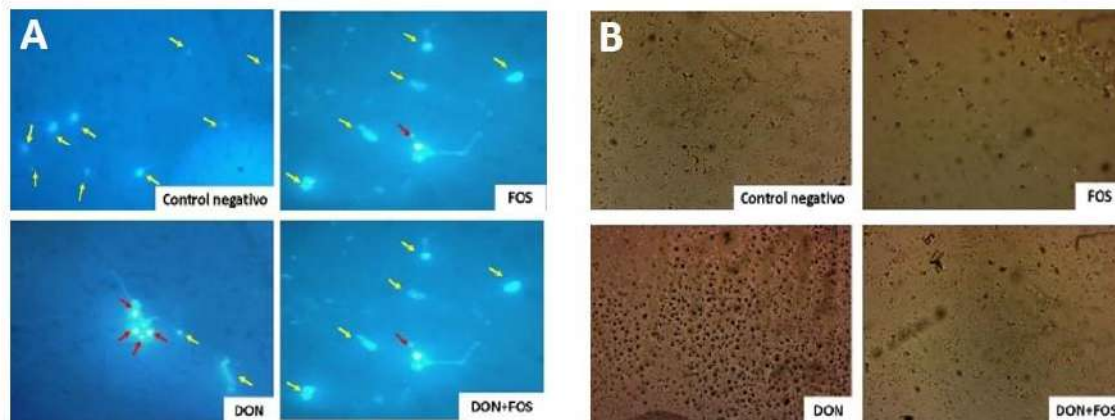


Figura 1. Células mononucleares. A) DAPI; B) TUNEL

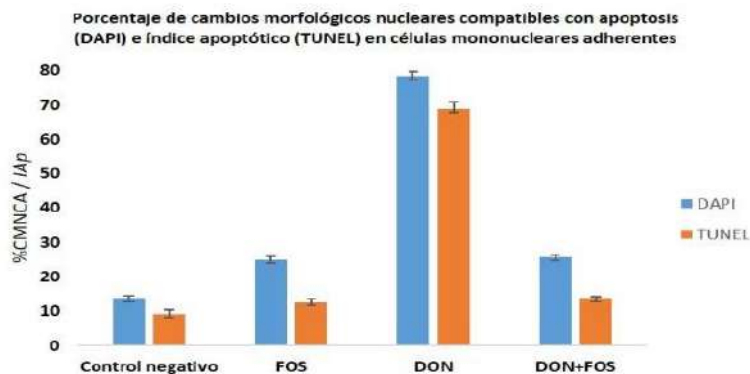


Figura 2. Porcentaje de CMNCA e IAp en células mononucleares.