



Resúmenes

de los trabajos presentados
por los
Estudiantes
del Postgrado
en Ciencias Fisiológicas

EVALUAR LOS EFECTOS TÓXICOS DEL VENENO DE SERPIENTE CUAIMA (*LACHESIS MUTA*) EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR DEL MODELO PEZ CEBRA (*DANIO RERIO*)

Yurisbeth Zanotty¹, Marco Álvarez³, Alexis Rodríguez-Acosta¹.

¹Laboratorio de Inmunoquímica y Ultraestructura, Instituto Anatómico. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. zanotty85@hotmail.com.

²Sección de Microscopia, Instituto Anatómico José Izquierdo, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

Resumen

El accidente ofídico, es considerado un problema de Salud Pública, en las zonas tropicales y subtropicales del mundo. La variabilidad en la composición de los venenos de serpientes, arroja diferencias en el desarrollo de la fisiopatología presentada en casos de envenenamiento. La cardiotoxicidad inducida por los venenos, ha sido un tema de gran preocupación médica, ya que la mayoría de los pacientes envenenados por la familia Viperidae, posiblemente, pueden desarrollar daños cardíacos. Esta aprehensión, ha estimulado la búsqueda de modelos experimentales de alta eficiencia, que permitan la obtención de señales de toxicidad sistémica emitidos por el animal experimental, sometido a la acción de agentes tóxicos tales como venenos de serpiente. En este trabajo, nos interesa poner a prueba las proteínas de peso molecular bajo, del veneno de serpiente *Lachesis muta* (*Lm*), y exponer sus fracciones en larvas de pez cebra de 5 días post fertilización para evaluar los efectos ocasionados. Con esta finalidad, se cuantifica la tasa cardíaca, ritmicidad, circulación, morfología, y también, se determinan las tasas y disfunciones de ritmo auriculo-ventriculares, trombosis y edema, en el modelo de pez cebra (*Danio rerio*), bajo la acción de la toxina del veneno de serpiente de cuaima (*Lmm*). Para establecer usos farmacológicos, hemos tratado a los peces cebra con veneno crudo y fracciones de bajo peso molecular (por debajo de 30 kDa) de *Lm*, utilizadas como sustancias cardioactivas y /o cardiotoxicas, identificando los ritmos cardíacos y frecuencias auriculares y ventriculares (AV) anormales, bloqueos o fallas en la ritmicidad, de etiología variable, presencia de edema, trombosis y muerte. Bajo el espectro de su capacidad potencial, para evaluar en modelos cardíacos, tanto *in vitro* como *in vivo* y la capacidad de demostrar los efectos en la cardioactividad o toxicidad de las sustancias, se espera que esta metodología tenga múltiples aplicaciones en el área de la cardio-farmacología, y proyecte incontables beneficios y avances en el campo de la biología emergente de accidente ofídico. Nos gustaría proponer, que el pez cebra (*Danio rerio*) será un sistema animal modelo, útil para el estudio de la cardiotoxicidad, producida por la acción del veneno *Lm*. Resaltando, además, que el empleo de este sistema *in vivo* e *in Vitro* y la sustitución de los animales con embriones de pez cebra, confiere numerosas ventajas con relación a otros modelos experimentales utilizados. Es coherente, con el enfoque bioético la práctica con estos animales de experimentación por motivos: científicos, biológicos, reducción de costos de mantenimiento, alimentación, seguridad al utilizarlos y reproducción. Hemos demostrado que pueden usarse de manera útil para el estudio de toxicidad asociada al veneno de serpientes.

Palabras clave: accidente ofídico; *Lachesis muta*; cardiotoxicidad; pez cebra (*Danio rerio*); veneno de serpiente.

EVALUACIÓN DE OVOCITOS DE *RHINELLA MARINA* COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE ACUAPORINAS: ACUAPORINA 1 DE HUMANOS (hAQP1) Y ACUAGLICEROPORINAS DE *TRYPANOSOMA BRUCEI* (TbAQPs)

(Evaluation of *Rhinella marina* oocytes as heterologous expression system of aquaporin: human aquaporin 1 (hAQP1) and aquaglyceroporins of *Trypanosomabrucei* (TbAQPs))

ROJAS V¹, ORTIZ Y¹, MARSICCOBETRE S², RODRÍGUEZ S¹, ARAQUE V¹, RODRÍGUEZ-ACOSTA A¹, FIGARELLA K¹, UZCÁTEGUI NL¹.

Laboratorio de Ultraestructura e Inmunoquímica, Instituto Anatómico, Universidad Central de Venezuela⁽¹⁾. Unidad de Polimorfismos Genéticos, Fundación Instituto de Estudios Avanzados -IDEA⁽²⁾. E-mail: vania2319@gmail.com

Resumen

Introducción: Los sistemas de expresión heteróloga son indispensables para el estudio de acuaporinas; por excelencia se utilizan ovocitos de *Xenopus laevis*. Para evitar el uso de especies foráneas en nuestro país, se planteó evaluar ovocitos de *Rhinella marina* (sapo de caña) como sistema alternativo para la expresión de acuaporinas empleando como modelos la acuaporina 1 de humanos (hAQP1) y las acuagliceroporinas de *Trypanosomabrucei* (TbAQPs) previamente caracterizadas. **Materiales y métodos:** Ovocitos de hembras adultas de *Rhinella marina* fueron extraídos quirúrgicamente y defoliculados por tratamiento con colagenasa. Se inyectaron diferentes cantidades de ARN de las acuaporinas y se mantuvieron a 18 °C en medio ND96. Ensayos de permeabilidad al agua se realizaron mediante choques hiposmóticos. El hinchamiento de los ovocitos fue monitoreado usando una cámara digital acoplada a una lupa estereoscópica. Los cambios de volumen se registraron con la aplicación OvoCam. Los resultados se analizaron con Graph-Pad y compararon con los reportados en *Xenopus laevis*. **Resultados:** La permeabilidad al agua (pf) fue igual entre los días dos y tres post-inyección de ARNc-hAQP1 y ARNc-TbAQPs en ovocitos de *Rhinella marina*. El valor de pf calculado para cada acuaporina fue $210,0 \pm 38,3 \mu\text{m}^{-1}$ (hAQP1); $122,1 \pm 25,6 \mu\text{m}^{-1}$ (TbAQP1); $182,8 \pm 30,0 \mu\text{m}^{-1}$ (TbAQP2) y $90,0 \pm 29,5 \mu\text{m}^{-1}$ (TbAQP3), en tanto que para los ovocitos controles fue $19,5 \pm 5,8 \mu\text{m}^{-1}$, similar a los reportados en ovocitos de *Xenopus laevis*. **Conclusiones:** Los ovocitos de *Rhinella marina* son un sistema de expresión heteróloga comparable con los de *Xenopus laevis* para la caracterización de acuaporina.

Palabras clave: Ovocitos, Acuaporinas, Permeabilidad al agua.

SATISFACCIÓN ESTUDIANTIL CON EL USO DE UN KIT DE ENSEÑANZA PARA LA DETERMINACIÓN DE UN POLIMORFISMO GENÉTICO

(STUDENT SATISFACTION WITH THE USE OF A TEACHING KIT FOR DETERMINING GENETIC POLYMORPHISM)

C. D. González-Luna, E. Azuaje, M. Ortiz, P. Loreto, M. Correa, V. Miguel, K. Díaz, S. Villasmil, M. Flores, I. Landaeta, G. Vilchez, D. Velásquez, J. Zambrano, C. García. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Medicina. Escuela Luis Razetti. Instituto de Medicina Experimental. Cátedra de Bioquímica. Caracas, Venezuela. eaab78@gmail.com

Resumen

En la Cátedra de Bioquímica de la Escuela Luis Razetti se elaboró un kit de enseñanza para la determinación de polimorfismos genéticos del gen que codifica a la enzima lipoproteína lipasa humana, utilizando técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), digestión enzimática de productos de PCR con endonucleasas de restricción y electroforesis en geles de agarosa, para la determinación de Polimorfismos según la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP). El presente estudio se realizó con el fin de examinar la satisfacción de los estudiantes al utilizar el kit de enseñanza en las clases prácticas de genética, como parte del contenido programático de la Cátedra de Bioquímica. Se estudiaron 206 sujetos, todos estudiantes de la Cátedra en el período 2011-2012. Se elaboró un instrumento de opinión que contempla distintos aspectos de la práctica y del instructivo del kit, cuyos resultados mostraron que 93,2% de los sujetos se encontraron satisfechos con el cumplimiento de la asignación práctica, 95,6% con la claridad de las instrucciones, 94,2% con la claridad de la redacción del protocolo experimental y 92,7% con la utilidad del kit para el aprendizaje de la asignatura. Estos resultados demostraron una amplia satisfacción con el uso y utilidad del kit de enseñanza entre la población estudiantil.

Palabras clave: Kit de enseñanza, satisfacción estudiantil, enseñanza de genética.

ESTUDIO MOLECULAR DEL EFECTO APOPTOGÉNICO DE UN COMPUESTO KAURENOIDE SOBRE LA LÍNEA TUMORAL PC3

(Molecular study of the apoptogenic effect of a kaurenoid compound on the tumor-derived cell line PC3)

A. Gámez & I. Galindo Castro

Laboratorio de Genómica y Proteómica, Fundación IDEA.

*Postgrado en Ciencias Fisiológicas, Instituto de Medicina Experimental. UCV.
adrianapostgradocf@gmail.com*

Resumen

La célula eucariota posee un control estricto sobre la proliferación celular, donde las condiciones del entorno celular influyen particularmente. La disponibilidad de nutrientes, un elemento clave para dicha regulación, está altamente regulada por la ruta PI3K-Akt-mTOR. En esta ruta destacan algunos actores como PI3K, Akt, mTOR, PTEN y TSC, donde los 3 primeros presentan características claramente protooncogénicas y las 2 últimas oncosupresoras. La desregulación de algunas de estas proteínas puede conllevar, entre otras patologías, a la generación del cáncer. En este contexto, muchos estudios farmacológicos están orientados a encontrar agentes antitumorales con capacidad citotóxica y apoptogénica. Estudios recientes se han enfocado en utilizar compuestos naturales y sus derivados como posibles agentes apoptogénicos. Con base en esto, nos propusimos: evaluar el efecto de un compuesto kaurenoid (KSC-21) sobre la inducción de la apoptosis celular mediante los cambios de expresión de proteínas asociadas a la ruta PI3K-Akt-mTOR en la línea tumoral de origen prostático PC3. Método: las células se pusieron en contacto con el compuesto KSC-21 (CI50 3,60 μ M) durante 12, 24, 48 y 72h, para luego evaluar la expresión de las caspasas efectoras 3/7, y otras proteínas claves de la ruta por inmunodetección. Resultados: la exposición de las células al compuesto KSC-21 induce la expresión de caspasa 3/7, y un cambio en la expresión de Akt y de PTEN al compararlos con las células control (solamente expuestas al DMSO). Conclusión: Se logró mostrar en experimentos preliminares la posible inducción de la apoptosis por el compuesto KSC-21.

Palabras clave: Apoptosis, célula tumoral, receptores tipo tirosina quinasa (RTQ), Fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), proteína quinasa B (Akt), proteína blanco de rapamicina (mTOR), proteína homóloga de tensina delecionada en el cromosoma 10 (PTEN) y complejo de esclerosis tuberosa (TSC).

EL EFECTO DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF- α) Y LA INTERLEUCINA-6 SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE OSTEÓBLASTOS DE RATA SPRAGUE-DAWLEY

(The effect of the tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-6 on the proliferation of osteoblast from Sprague-Dawley rats)

Alfonzo-González M, Placeres-Uray FA.

Facultad de Medicina, Sección de Biomembranas, Instituto de Medicina Experimental (IME), Universidad Central de Venezuela, Sabana Grande, Caracas, Venezuela.

Correo: marceloalfonzo@hotmail.com

Resumen

La osteólisis peri-implante es un problema post-cirugías traumatológicas causando en el paciente un proceso inflamatorio crónico que conduce a la pérdida de la prótesis y la incapacidad del paciente. En este proceso inflamatorio crónico asociado a la osteólisis peri-implante se han identificado varios mediadores como lo son el TNF- α y la IL-6. Además, el TNF- α y la IL-6 estimulan el reclutamiento y activación de los macrófagos responsables de la iniciación y prolongación de la resorción ósea, conduciendo al aflojamiento de la prótesis o implante. Para estudiar el efecto del TNF- α y la IL-6 fueron evaluados sobre cultivos de osteoblastos aislados de calvarias de ratas neonatales Sprague-Dawley. La viabilidad celular se evaluó con la tinción de azul de tripano, así como la proliferación celular se determinó mediante el método MTS-PMS. Para la identificación específica de los osteoblastos se utilizó un marcador celular como es la fosfatasa alcalina/mg de proteínas celulares. Adicionalmente se procedió a la evaluación cualitativa del proceso de osificación, mediante técnica de tinción con rojo de alizarina y la evaluación cuantitativa del proceso de osificación, utilizando la técnica de la determinación espectrofotométrica de hidroxapatita. El TNF- α y la IL-6 fueron capaces de producir una inhibición en la actividad de la fosfatasa alcalina y de la proliferación celular, teniendo como consecuencia una disminución en el proceso de osificación y mineralización de los osteoblastos en cultivo. Un resultado novedoso es que en la presencia del TNF- α se observó un efecto bifásico, a bajas concentraciones produce una estimulación de la actividad de fosfatasa alcalina y la proliferación celular mientras que a altas concentraciones más de 10 ng/ml se observó una inhibición. Estos resultados permiten entender el papel del TNF- α y la IL-6 en los mecanismos fisiopatológicos asociados a la osteólisis peri-implante. Este trabajo fue financiado por CDCH-UCV # PI-09-7726.2009/2 (ILB)..

Palabras clave: TNF- α , IL-6, Osteoblastos.

ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR TEMPRANA DE ALFAVIRUS POTENCIALMENTE EPIDÉMICOS

(Strategies for early molecular detection of potentially epidemic alphaviruses)

JC Zambrano¹, AJ Auguste², y SC Weaver²

¹*Instituto Naional de Higiene Rafael Rangel Caracas-Venezuela, Universidad Central de Venezuela, Escuela de Medicina Luis Razetti, Cátedra de Bioquímica.*

²*Universidad de Texas Medical Branch Dpto. de Patología, Galveston, Texas 775.*

Resumen

Introducción: El género *Alfavirus* incluye virus causantes de encefalitis: Encefalitis Equina del Este, EEE, Encefalitis Equina Venezolana, EEV y del viejo mundo: Chikungunya, Mayaro, Sindbis, todos potencialmente epidémicos. **Objetivo:** Diseñar protocolos de PCR anidada y PCR Multiplex para identificación de alfavirus. **Metodología:** PCR anidada: Se alinearon 20 secuencias completas de cepas de EEV, incluyendo 17 epizooticas aisladas en Venezuela (1969 a 2001), una Panameña de 1991, Las cepas Trinidad Donkey y vacunal (TC-83), como referencias epizooticas, usando SE-AL (v 2.0 para iOS). Se seleccionó una secuencia de 200 pb de E2 conteniendo mutaciones no silentes, una a tres presentes en las cepas epizooticas y todas ausentes en las enzoóticas. Se diseñaron primers usando programas libres y evaluándolos con Mac Vector. Para identificar cepas epizooticas, se incluyó una o más mutaciones en los extremos 3' de los pares de primers internos de una PCR anidada, con los primers externos flanqueando la región de 200 pb. PCR Multiplex: Las secuencias anteriores se alinearon con cepas de alfavirus aisladas (EEE, Mayaro) o amenazas para Venezuela, (Chikungunya), seleccionándose una región cercana a la descrita previamente (Seymour R, 2013) para amplificación de los alfavirus anteriores por PCR Multiplex (Pisano y col., 2013). Los primers se evaluaron usando cepas del banco del Laboratorio Nacional de Galveston. **Resultados y conclusiones:** No fue posible la diferenciación de cepas epizooticas de enzoóticas por PCR anidada. El uso de primers obtenidos para PCR multiplex funcionaron por separado y en ciertas combinaciones para la amplificación de alfavirus, potencialmente epidémicos.

Palabras clave: Alfavirus, PCR anidada, PCR Multiplex, Encefalitis Equina, Chikungunya.