



a) Título del Proyecto

USO DE CULTIVO CELULAR PARA EVALUAR ACTIVIDAD NEUTRALIZANTE DE ANTITOXINAS OBTENIDAS EN CONEJOS

b) Investigador Responsable

Dra. Laura C. Loiva (Prof. Titular de Excl, Directora del Laboratorio de Investigación en Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la UNNE, institución que solicita el trámite de exención impositiva ante ROECYT).

Por tratarse de un proyecto interdisciplinario que vincula la Bioquímica con la Toxicología Veterinaria, también interviene en la dirección del Proyecto la Dra. Ofelia Acosta, docente-investigadora de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE.

c) Lugar de ejecución del Proyecto

Las actividades correspondientes al aislamiento y purificación de proteínas (toxinas, provenientes del veneno ofídico y antitoxinas, anticuerpos extraídos de suero de conejos inmunizados) se llevan a cabo en el **Laboratorio de Investigación en Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la UNNE, y son las que requieren del uso del equipo a importar**. También se llevan a cabo en este laboratorio otros tests de análisis bioquímicos, mientras que en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Veterinarias se llevan a cabo los ensayos en animales de experimentación: conejos, para la producción de antitoxinas.

d) Objetivos

Objetivo General: **obtener las toxinas** (principalmente responsables de la intoxicación) de venenos de yarará grande y de cascabel, con alto grado de pureza, **generar anticuerpos en conejos** a partir de las mismas, y **evaluar la capacidad neutralizante** de tales anti-toxinas en **cultivos celulares**

Objetivos específicos:

- Aislar fosfolipasa A₂ (PLA₂) y metaloproteasa hemorrágica (MPH) del veneno de *Bothrops alternatus* (yarará grande), y PLA₂ del veneno de *Crotalus durissus terrificus* (cascabel), con alto grado de pureza
- Obtener anticuerpos anti-PLA₂ y anti-MPH botrópica, y anti-PLA₂ crotálica en conejos
- Evaluar la citotoxicidad de los antígenos purificados en cultivos celulares (línea C2C12 - mioblastos murinos)
- Evaluar la capacidad neutralizante de la acción citotóxica de los sueros específicos preparados en cultivos celulares (línea: C2C12 - mioblastos murinos)

e) Metodología Aplicada

En una *primera etapa*, la metodología propuesta consiste en **aislar mediante cromatografía en columna las toxinas objeto de estudio** (en esta instancia se emplea el equipo a importar). El uso de columnas de separación de proteínas en un equipo de cromatografía líquida de alta performance permite una pureza apropiada para los ensayos subsecuentes, la cual se controlará por electroforesis en geles (PAGE).

En una *segunda etapa* las toxinas purificadas (PLA₂ botrópica y crotálica, y MPH botrópica) de veneno Botrópico (*Bothrops alternatus*, yarará grande) y crotálico (*Crotalus durissus terrificus*, cascabel) se emplearán en los siguientes estudios:

- para evaluar la citotoxicidad de las mismas en cultivos de líneas celulares. Se empleará la línea C2C12 (mioblasto murino) por ser las células musculares blanco de acción de estas toxinas. La metodología consta de una puesta a proliferación de las células en estufa gaseada para luego incubarlas en presencia de la toxina. La citotoxicidad se detecta por determinación del porcentaje de letalidad inducido por cada toxina, por conteo de células muertas.
- como antígenos, preparándose los inóculos correspondientes, con dosis sub-letales, para generar en conejos anti-toxinas, a través de un plan de inoculación progresivo y luego de mantenimiento que sostiene en el tiempo elevados títulos de anticuerpos. Así, del suero del conejo, rico en anticuerpos generados en respuesta a la estimulación antigénica, se purifican las antitoxinas. Por medio de precipitación salina seguida de **separación cromatográfica en columna por procedimientos similares a los empleados en la purificación de las toxinas** (en esta instancia también se emplea el equipo a importar).

En una *tercera etapa*, contando con las toxinas y las anti-toxinas correspondientes, con alto grado de pureza, se evaluará la capacidad de neutralizante de la citotoxicidad de cada anti-toxina sobre su toxina específica, en la línea celular usada como modelo experimental. El procedimiento es semejante al mencionado precedentemente, con la variante que se pre-incuba la toxina con su anti-toxina para luego exponer el cultivo celular a este complejo antígeno- anticuerpo.

En una *cuarta instancia* se evaluará la capacidad de neutralizar la acción citotóxica del veneno entero por parte de estos sueros específicos, a fin de determinar si la sola antitoxina producida es capaz de neutralizar la acción del veneno, para el caso de cascabel, y la mezcla de sólo dos antitoxinas, para el caso de yarará. El



procedimiento es semejante al mencionado precedentemente, con la variante que se pre-incuba el veneno con la/s anti-toxina/s especie/específica, para luego exponer el cultivo celular a este complejo antígeno- anticuerpo.

f) Resultados obtenidos y esperados

Si bien es un proyecto recién iniciado, es continuación de una serie de proyectos concatenados, que a lo largo de nueve años este Grupo Interdisciplinario de Investigación Bioquímico-Veterinario viene desarrollando, con numerosas publicaciones en la temática de las toxinas ofídicas. Ha llevado a cabo la purificación de toxinas de venenos ofídicos de la región^(e.g. 1,2,3) como así también la producción de anticuerpos anti toxinas^(e.g. 4).

Los resultados esperados para este proyecto consisten en obtener las tres enzimas (fosfolipasas de yarará y cascabel, y metaloproteasa de yarará) con alto grado de pureza y rendimiento. A partir de las mismas se han de preparar, en conejos, sueros (antitoxinas) de alto grado de pureza, especificidad y título elevado. Esto permitirá avanzar hacia el objetivo principal del proyecto, en el cual se espera lograr la neutralización de la citotoxicidad que el veneno de cascabel desencadena en las células empleadas en el modelo experimental, por parte de los anticuerpos anti-PLA2 crotalica, y que la mezcla de antitoxinas anti MPHb y anti-PLA2b sea capaz de neutralizar la citotoxicidad del veneno botrópico.

Estos resultados sentarán base científica para evaluar la capacidad neutralizante de estos sueros específicos previo a su ensayo convencional en animales, considerando el potencial uso de estos sueros específicos en el tratamiento de la intoxicación ofídica.

g) Originalidad e importancia del Proyecto

Los sueros antiofídicos están constituidos por gran variedad de inmunoglobulinas (proteínas generadas en equinos) capaces de neutralizar los distintos componentes del veneno. Si bien éste genera una protección inmediata frente a la intoxicación, puede originar una reacción adversa en el paciente tratado. Por ello, es **objeto de este proyecto producir un suero específico sólo contra el/los componente/s letal/es del veneno a fin de evitar el suministro excesivo de proteínas heterólogas** (al provenir de equinos), con sus consecuentes complicaciones.

Por otro lado, el desarrollo de sueros terapéuticos implica el sacrificio de alto número de animales de experimentación (e.g. ratones) durante el proceso de evaluación de su capacidad neutralizante. Esto atenta contra normas de ética que promulgan el uso racional de animales de laboratorio. Así **este proyecto pretende extender el uso de cultivos celulares** hacia estudios de citotoxicidad de toxinas aisladas como así también de la evaluación sistemática de los sueros farmacológicos a desarrollar por este Grupo de Investigación, a los efectos de **evitar el uso exhaustivo de animales**, dejándose la instancia de control de calidad farmacológica en animales sólo en la última etapa del desarrollo del suero específico una vez confirmada la efectividad del mismo a través de tales cultivos *in Vitro*.

Así, los resultados emergentes de este proyecto integrador, sustentan no solo la productividad y desarrollo del conocimiento regional por tratarse de nuevas formulaciones de sueros inmunoterápicos, sino también cumplimentar normas de ética que propenden el uso racional de animales de laboratorio.

h) Fecha de inicio y finalización del proyecto

Fecha de inicio: agosto 2008.

Fecha de finalización: julio 2011

i) Justificación de la compra del bien dentro del proyecto

El equipamiento que actualmente se dispone permite una restringida capacidad en la producción de proteínas de alta pureza, debiendo recurrir en algunos casos a otros centros de Investigación, muy distantes⁵, para alcanzar la pureza deseada, al no haber en la región cromatógrafos de alta resolución que permitan la purificación de proteínas. **La adquisición de este cromatógrafo líquido (AKTA prime plus)** conllevará a una sensible mejora en el rendimiento de purificación como en el tiempo a emplear. A la vez, estos equipos tienen una altísima versatilidad por lo que disponer del mismo ampliará las posibilidades de desarrollo de varias líneas de estudio, generando un alto impacto en los recursos tecnológicos que ha de disponer este Grupo de Investigación, y las instituciones (Facultades e Institutos de Investigación) en su conjunto dado que sería el primer equipo que dispondría la Universidad Nacional del Nordeste para purificar proteínas.

¹ Gay CC, Leiva LC, Maruñak S, Teibler P and O. Acosta de Pérez. "Proteolytic, edematogenic and miotoxic activities of a hemorrhagic metalloprotease isolated from Bothrops alternatus venom". TOXICON, 2005; 46(5), 546-554.

² Ruiz de Torrent RM, Bongiovanni B, Leiva LC, Evangelista AM, Rodríguez JP, Acosta OC, Duffard R. TOXICON, 2007 50:144-52

³ Maruñak S.L., L. Leiva, M.E. Garcia Denegri, P. Teibler, O. Acosta De Pérez. Isolation and biological characterization of a basic phospholipase A2 from Bothrops jararacussu snake venom. BIOCELL, 2007, 31(3): 355-364.

⁴ Rodríguez JP, De Marzi M, Maruñak S, Malchiodi EL, Leiva LC, Acosta OC. "Rabbits IgG antibodies against phospholipase A2 from Crotalus durissus terrificus venom neutralize the lethal activity". MEDICINA. Buenos Aires, 2006.;66(6):512-6.

⁵ Peichoto ME, Teibler P, Mackessy, Leiva LC, Acosta O Camargo G. L., Tanaka - Azevedo, M. "Purification and characterization of patagonfibrase, a metalloproteinase showing a fibrinolytic and hemorrhagic activities, from Philodryas patagoniensis snake venom" *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007, 1770 (5) 810-9.