

a) Título del Proyecto

NUEVAS FORMULACIONES DE INMUNOBIOLOGICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA INTOXICACIÓN OFÍDICA

b) Investigador Responsable

Dra. Laura C. Leiva (Prof. Titular de Excl, Directora del Laboratorio de Investigación en Proteínas – LabInPro- 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) Objetivos

Objetivo General: Preparar nuevas formulaciones de inmunoterápicos a partir de mezclas de antitoxinas específicas que incluyan antitrombina crotálica, antimetaloproteasa y antifosfolipasa botrópicas a ser usadas en el tratamiento de las intoxicaciones provocadas por especies del género *Bothrops*.

Objetivos específicos:

- Aislar fosfolipasa A₂ (PLA₂) y metaloproteasa hemorrágica (MPH) del veneno de *Bothrops alternatus* (yará grande), y trombina (TLEc) 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
- Ensayar la capacidad neutralizante de IgG anti trombina (anti-TLEc) obtenida del veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Cascabel) en la reacción cruzada con el veneno de *Bothrops alternatus* (yará grande) y de *Bothrops diporus* (yará chica)
- Ensayar la capacidad neutralizante de la toxicidad de venenos de *Bothrops* (*alternatus* y *diporus*) del nordeste argentino de un inmunoterápico preparado a partir de mezclas de inmunoglobulinas específicas que comprenden anti-trombina crotálica (anti-TLEc), anti-fosfolipasa (anti-PLA₂b) y anti-metaloproteasa (anti-MPHb) botrópicas.

g) Originalidad e importancia del Proyecto

La investigación terapéutica actual en el área de antivenenos busca nuevas formulaciones tendientes a reducir la carga proteica de los antivenenos que conlleven a disminuir el riesgo de aparición de reacciones adversas. Por ello, es de interés producir un antiveneno neutralizante constituido solo por antitoxinas específicas contra los componentes letales de los venenos botrópicos, prescindiendo de anticuerpos anti-elementos no letales del veneno, naturalmente presentes en los sueros convencionales y evitando consecuentes complicaciones.

En el presente proyecto se pretende incorporar a las formulaciones actualmente en estudio (mezclas de anti-PLA₂b y anti-MPHb) anti-trombina de origen crotálico (anti-TLEc) a los efectos de ajustar las dosis efectivas de neutralización de las actividades específicas de los venenos bothróticos con las antitoxinas bothróticas y crotálica, para luego ensayar la neutralización de la actividad letal de venenos bothróticos del nordeste argentino (*B. alternatus* y *B. diporus*) con mezcla IgG anti-TLEc, IgG anti- PLA₂b e IgG anti-MPHb. De comprobarse ausencia de secuelas en los animales sobrevivientes, resultaría un inmunobiológico de versátil aplicación en la terapia antiofídica con potencial producción regional.

Así, los resultados emergentes de este proyecto integrador, sustentan la productividad y desarrollo del conocimiento regional por tratarse de nuevas formulaciones de sueros inmunoterápicos,

e) Metodología Aplicada

En una *primera etapa*, la metodología propuesta consiste en aislar mediante cromatografía líquida en columna (tamiz molecular e intercambio iónico) las toxinas objeto de estudio.

A partir de tales toxinas, en una *segunda etapa*, se han de producir anticuerpos específicos en conejos (anti-MPH, anti-PLA₂ b, anti-TLEc). Las mismas son empleadas 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 y el testeo del nivel de anticuerpos anti-toxina inoculada, en el suero de conejos se lleva a cabo

por método de ELISA. Desde el suero de los animales productores se purifican los anticuerpos anti-TLEc, anti-MPHb y anti-PLA₂b, (por cromatografía de afinidad) y se los cuantifica nuevamente por test de ELISA.

En una *tercera etapa*, contando con las toxinas y las anti-toxinas correspondientes, se evaluará la capacidad neutralizante de cada antitoxina (anti-TLEc, anti-MPHb y anti-PLA₂b) sobre los venenos de *B. alternatus* y *B. diporus*, para ello se pre-incuba al veneno con cada anti-toxina para luego someter a test bioquímicos (ensayo de coagulación, hemólisis radial indirecta, actividad caseinolítica, etc) apropiados para medir la actividad residual del veneno.

En una última etapa se llevarán a cabo ensayos de neutralización de la actividad letal de los venenos de *B. alternatus* y de *B. diporus*, en ratones, con mezcla IgG anti-TLEc, IgG anti-PLA₂b e IgG anti-MPHb y evaluación de secuelas (ensayos bioquímicos e histológicos).

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 **LabInPro 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 test de análisis bioquímicos, mientras que en el Laboratorio de Toxicología de la Fac de Ciencias Veterinarias se llevan a cabo los ensayos en animales de experimentación: conejos, para la producción de antitoxinas, y ratones, para los ensayos biológicos de letalidad, dado que cuentan con bioterio.

f) Plan de Trabajo

El plan de trabajo se resume en las siguientes actividades previstas:

- A- Revisión del material bibliográfico
- B- Aislamiento de TLE crotálica (TLEc) Control de pureza.
- C- Aislamiento de MPH botrópica (MPHb) Control de pureza.
- D- Aislamiento PLA₂ botrópica (PLA₂b) . Control de pureza.
- E- Producción de anticuerpos específicos en conejos (anti-MPH , anti-PLA₂b, anti-PLA₂c)
- F- Testeo del nivel de anticuerpos anti-toxina inoculada en suero de conejos.
- G- Purificación, detección y cuantificación de anticuerpos anti-TLEc, anti-MPHb y anti-PLA₂b a partir de suero de conejos.
- H- Evaluación de la actividad neutralizante de cada antitoxina (anti-TLEc, anti-MPHb y anti-PLA₂b) sobre el veneno de *B. alternatus* .
- I- Evaluación de la actividad neutralizante de cada antitoxina (anti-TLEc, anti-MPHb y anti-PLA₂b) sobre el veneno de *B. diporus*
- J- Ensayo de neutralización de la actividad letal de veneno de *B. alternatus* con mezcla IgG anti-TLEc, IgG anti-PLA₂b e IgG anti-MPHb. Evaluación de Secuelas
- K- Ensayo de neutralización de la actividad letal de veneno de *B. diporus* con mezcla IgG anti-TLEc, IgG anti-PLA₂b e IgG anti-MPHb. Evaluación de Secuelas
- L- Análisis e interpretación de resultados obtenidos y difusión de resultados
- M- Elaboración de informe. Redacción de trabajos para su presentación en Reuniones Científicas y publicación en revista de la especialidad.

g) Resultados obtenidos y esperados

El presente proyecto es continuación de una serie de proyectos concatenados, que a lo largo de doce 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). Se demostró la

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. "Neurotoxicological effects of a thrombin-like enzyme isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom (preliminary study)". TOXICON, 2007 50:144-52.

³ Garcia Denegri ME, Acosta O, Huancahuire-Vega S, Martins-de-Souza D, Marangoni S, Maruñak SL, Teibler GP, Leiva LC, Ponce-Soto LA. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA₂ Ba SplI RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. TOXICON, 2010, 56(1): 64-74.

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.

capacidad neutralizante a través de reacciones cruzadas entre veneno crotalico y botrópico ⁵ como así también la capacidad de neutralizar completamente con un dada antitoxina la actividad del veneno exhibida por la toxina y a la vez demostrar interacciones entre toxinas, del tipo sinérgicas ⁶.

Los resultados de este proyecto han de ser/son originales, esperando lograr una formulación constituida con la menor cantidad de anticuerpos necesarios para neutralizar los efectos deletéreos que causan las toxinas responsables de la cuadro fisiopatológico desencadenado por la mordedura del ofidio. Estos resultados sentarán base científica para evaluar la capacidad neutralizante de estos sueros específicos considerando su potencial uso en el tratamiento de la intoxicación ofídica tanto de *B alternatus* (yará grande) como en *B diporus* (yará chica).

h) Fecha de inicio y finalización del proyecto

Fecha de inicio: enero 2010.

Fecha de finalización: diciembre 2013

i) Justificación de la compra del bien dentro del proyecto

El equipo solicitado consiste básicamente en un espectrofotómetro que permite la medición de absorbancias en un amplio rango de longitudes de onda, desde el ultravioleta lejano (200nm) hasta el infrarrojo cercano (900nm), con la ventaja adicional que lee el contenido de pequeños pocillos ubicados en placas, denominados microplacas, esta lectura simultánea de, e.g., 96 ó 384 soluciones de muy reducido volumen (menos de 100 ul) le da un carácter expeditivo al proceso de medición, con gran reproducibilidad. La gran versatilidad de uso de este equipo permite, además de las determinaciones corrientes de absorbancia en el rango UV/visible, efectuar análisis de ácidos nucleicos: concentración de RNA, de DNA de una cadena (SS), de DNA de doble cadena y pureza de DNA, análisis de proteínas y cinética enzimática. Por otro lado, por su diseño adaptado a la lectura en placas, permite la realización de test del tipo enzimoimmunoensayo (ELISA), lo que lo vuelve un equipo apto para múltiples aplicaciones en mediciones bioquímicas.

En el caso particular del presente proyecto, el análisis del contenido proteico de los eluidos colectados en fracciones en cada separación cromatográfica **en un equipo como el que se solicita su compra** se ha de ver sensiblemente facilitado, por la posibilidad que ofrece de leer simultáneamente a 280 nm 96 e incluso 384 muestras, según el tipo de placa, con un empleo de volumen de muestra inferior a los 100 ul. A la vez, la cuantificación de anticuerpos en numerosas instancias del proyecto mediante test de ELISA permitirá la obtención de resultados reproducibles y fidedignos al trabajar con un equipo que permite seleccionar longitudes de onda con un ancho de banda de tan solo 2 nm, y no con filtros, como se viene trabajando hasta ahora, en una lectora de microplacas convencional.

Cabe destacar que no hay en la UNNE un equipo de estas características, razón por la cual el 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 de la UNNE) en su conjunto.

⁵ Rodríguez Juan P., Gay Claudia C., Fusco Luciano S., Gauna María C., Acosta Ofelia C. and Leiva Laura C. Cross-neutralization of the coagulant activity of *Crotalus durissus terrificus* venom from the Northeast of Argentina by Bivalent Bothropic antivenom. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 18:1, 116-123, 2012

⁶ Bustillo Soledad; Claudia C Gay; María E García Denegri; Luis A Ponce-Soto; Elisa Bal de Kier Joffé; Ofelia Acosta; Laura C Leiva. Synergism between baltergin metalloproteinase and Ba SPII RP4 PLA2 from *Bothrops alternatus* venom on skeletal muscle (C2C12) cells. *TOXICON* 59 (2012) 338–343.