

Area: CA - Cs. Agropecuarias

Título del Trabajo: OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLIPASA A2 DEL VENENO DE BOTHROPS DIPORUS EN CONEJOS Y NEUTRALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFOLIPASA IN VITRO

Autores: VALADA, YESICA - LEIVA, LAURA C. - MARUÑAK, SILVANA L.

E-mail de Contacto: smarunak@yahoo.com.ar

Tipo de Beca: UNNE Pregrado **Resolución N°:** 1012/12 **Período:** 01/03/2013 - 01/03/2014

Proyecto Acreditado: NUEVAS FORMULACIONES DE INMUNOBIOLOGICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA INTOXICACION OFIDICA. Proyecto financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica- UNNE PI N° B 013- 2009. Período 1/1/2010 -31/12/2013. Res. N° 1080/09- C.S.

Lugar de Trabajo: Facultad de Cs. Veterinarias

Palabras Claves: yarára chica, suero específico, hemólisis

Resumen:

La investigación en la producción de antivenenos, tradicionalmente obtenidos en mamíferos tras vacunaciones con veneno entero, busca nuevas formulaciones tendientes a reducir la carga proteica de los sueros con el objeto de disminuir la aparición de reacciones adversas en el paciente intoxicado. Es factible inducir la producción de anticuerpos neutralizantes de toxinas de los venenos a partir de inoculaciones en conejos con una toxina dada y obtener anticuerpos IgG monovalentes contra la proteína aislada. El objetivo del trabajo es la obtención de los anticuerpos IgG anti-fosfolipasa a partir del suero de conejo, inoculado con fosfolipasa A₂ (PLA₂) aislada del veneno de *Bothrops diporus* (yarára chica) para luego constatar su capacidad de neutralización de la actividad fosfolipasa *in vitro* del veneno entero. Las inmunoglobulinas (del tipo IgG) generadas en el animal mediante un plan de inmunización con PLA₂ botrópica, fueron aisladas del suero hiperinmune de conejos mediante cromatografía de afinidad, con empleo de columna Hitrap Protein G HP instalada en un sistema ÄKTA prime plus (GE), eluyéndolas con buffer de glicina- HCl 0.1M; pH: 2.5 y su homogeneidad se controló por SDS-PAGE. La presencia de IgG anti-PLA₂ en el pool concentrado se testeó por el Método de Outcherlony enfrentando a la enzima y a veneno entero correspondiente. Se ensayó la capacidad neutralizante de las antitoxinas obtenidas mediante hemólisis indirecta (descrito por Gutiérrez y colaboradores), determinándose la dosis de anticuerpos (ug) que neutraliza en un 100% la formación de un halo de hemólisis que la toxina, presente en 1 ug de veneno, genera en una placa de agarosa con glóbulos rojos y una fuente de fosfatidil colina como sustrato de la enzima (Dosis Efectiva 100, DE₁₀₀) luego de su incubación durante 20 h a 37° C. Para ello se preincubaron durante 30 minutos distintas mezclas de antígeno/anticuerpo, enfrentando el pool de IgG anti-PLA₂ purificadas (10,76 mg/ml) con diferentes diluciones de veneno de *B. diporus* en PBS (1 a 0,015 mg/ml) en partes iguales, las cuales se sembraron en placas de agar sangre-yema de huevo, para posterior lectura del halo hemolítico al término de su incubación en estufa termostaticada a 37°C. La inmunización de conejos con la toxina (PLA₂) produjo un suero rico en IgGs que, luego de la separación cromatográfica, mostró una banda única de 150 kDa en condiciones no reductoras, y dos bandas homogéneas de 50 y 25 kDa en presencia de b-mercaptoetanol, mediante SDS-PAGE. La capacidad de reconocer específicamente a la toxina (PLA₂) se comprobó en placa de agar, formándose una única banda de inmunoprecipitación tanto frente al veneno entero como a la enzima. Las IgG anti-PLA₂ así obtenidas fueron capaces de neutralizar por completo la actividad hemolítica indirecta inducida por el veneno entero mediante ensayo *in vitro*, obteniéndose un valor para la DE₁₀₀ del pool de antitoxinas de 347 ug de IgG/ug de veneno de *Bothrops diporus*. Estos resultados arrojan evidencia preliminar sobre la factibilidad de elaborar nuevas formulaciones de inmunoterápicos a partir de estos anticuerpos específicos, dirigidos contra una de las toxinas más deletéreas del veneno. Se requiere entonces extender los estudios hacia ensayos *in vivo* evaluando la actividad neutralizante de la letalidad, la miotoxicidad otras actividades biológicas que exhibe el veneno entero botrópico.