



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura

## Trabajo Final de Graduación

### *“Evaluación del poder neutralizante de suero anti fosfodiesterasa (PDE) crotálica”*



**Autor:** Maria del Rosario Alonso

**Director:** Luciano Sebastian Fusco

**Co-director:** Claudia Carolina Gay

Laboratorio de Investigación en Proteínas (LabInPro) - FaCENA

**Año: 2019**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional del Nordeste, quien me aceptó y permitió formarme durante el transcurso de la carrera, y a todos los docentes que formaron parte, brindándome sus conocimientos viéndose reflejados en la culminación de mi paso por la Universidad.

A mi Director Luciano Fusco y Co-Directora Carolina Gay, por haberme brindado sus conocimientos, como así también dedicando su tiempo día a día para enseñarme lo que desconocía, teniendo toda la paciencia para guiarme durante el desarrollo de la tesis.

Al Laboratorio LabInPro junto a su personal, por haberme abierto sus puertas y permitido ser parte del equipo, brindándome todas las herramientas necesarias para poder llevar a cabo mi trabajo final.

A quienes recorrieron la carrera junto a mí, mis compañeros de estudio y amigos, siempre me dieron las fuerzas necesarias para seguir adelante.

Para finalizar, agradezco a mi familia, quienes me formaron como persona, permitiéndome llegar hasta la recta final estando siempre presentes, dándome el apoyo incondicional para poder formarme profesionalmente. Sin ellos nada hubiese sido posible.

## INDICE ANALÍTICO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1.1. Importancia de las serpientes en el ecosistema</b>	1
<b>1.2. Ofidismo a nivel mundial y en Argentina</b>	1
1.2.1 Distribución de <i>C. d. terrificus</i>	1
<b>1.3. Principales componentes proteicos del veneno de <i>C. d. terrificus</i></b>	2
1.3.1 Descripción del proteoma de <i>C. d. terrificus</i>	2
1.3.2 Familia de las fosfodiesterasas (PDE)	3
<b>1.4. Accidente ofídico y manifestaciones clínicas del envenenamiento por <i>C. d. terrificus</i></b>	4
<b>1.5 Propuesta del Trabajo Final de Graduación</b>	5
<b>2. OBJETIVOS</b>	6
<b>2.1. Objetivo general</b>	6
<b>2.2. Objetivos específicos</b>	6
<b>3. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES</b>	7
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	8
<b>4.1. Veneno</b>	8
<b>4.2. Aislamiento de la PDE crotálica</b>	8
4.2.1. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	8
<b>4.3. Control de pureza</b>	8
4.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	8
4.3.2. Actividad fosfodiesterasa con el sustrato bis(p-nitrofenil) fosfato	8
4.3.3. Actividad PLA <sub>2</sub>	9
<b>4.4. Obtención de anticuerpos</b>	9
4.4.1. Animales de experimentación	9
4.4.2. Protocolo de inmunización	9
<b>4.5. Evaluación de la respuesta inmune</b>	10
4.5.1. Estimación de los títulos de anticuerpos por enzima inmuno análisis (ELISA)	10
<b>4.6. Purificación de anticuerpos</b>	11
4.6.1. Determinación de la capacidad de los anticuerpos de bloquear la actividad enzimática de la PDE	11
<b>4.7. Anticuerpos anti CDT-PDE para identificación de PDEs en venenos botrópicos</b>	11
<b>5. RESULTADOS</b>	13
<b>5.1. Purificación de la PDE de <i>C. d. terrificus</i></b>	13
<b>5.2. Obtención del antígeno a inmunizar</b>	14
5.2.1. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	14
5.2.2. Actividad fosfodiesterasa con el sustrato bis (p-nitrofenil) fosfato	14
<b>5.3. Obtención y evaluación de los sueros hiper-inmunes</b>	15
5.3.1. Estimación de títulos de anticuerpos por enzima inmuno análisis (ELISA)	15
<b>5.4. Purificación de anticuerpos</b>	15
5.4.1. Ensayos de neutralización	16
<b>5.5. Reacción cruzada entre los anticuerpos anti CDT-PDE y los venenos botrópicos</b>	17
<b>6. DISCUSION</b>	19
<b>7. CONCLUSIONES</b>	21
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	22

## RESUMEN

Los accidentes ofídicos representan un importante problema de salud pública en las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Cada año, más de 2,5 millones de personas son mordidas por serpientes venenosas resultando en alrededor de 120.000 muertes. El nordeste argentino es un área geográfica destacada por la presencia de serpientes, dado el clima subtropical que la caracteriza, y por ende de accidentes ofídicos, afectando principalmente a poblaciones marginales y de bajos recursos. El veneno de *Crotalus durissus terrificus* (*C. d. terrificus*), serpiente conocida como cascabel sudamericana, posee actividades neurotóxicas, miotóxicas y produce un edema discreto. Son diversas las sustancias tóxicas que componen este veneno: fosfolipasas del tipo A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s) (componentes mayoritarios), serinoproteinasas con actividad *thrombin-like* (TLE), ecto-5'-nucleotidasas, metaloproteinasas, glutaminil ciclasas y fosfodiesterasas (PDEs); encontrándose estas últimas en muy baja concentración en el veneno (menos del 2%). La mayoría de los trabajos realizados están centrados en el estudio del efecto neurotóxico o miotóxico, ya sea del veneno entero, o de los componentes responsables de causar estas alteraciones, crotoxina (CTX) o PLA<sub>2</sub>, respectivamente. Menos atención, sin embargo, ha recibido las restantes propiedades farmacológicas de sus componentes y en particular, las producidas por las PDEs. A partir de los antecedentes sobre el tema y el interés en abordar un mejor conocimiento de estas enzimas, se propuso la obtención de anticuerpos contra una enzima PDE purificada del veneno de *C. d. terrificus* y la evaluación de su capacidad neutralizante. Asimismo, utilizar los anticuerpos anti CDT-PDE como herramienta para detectar la presencia de PDEs en venenos botrópicos de importancia sanitaria en el nordeste argentino. Para llevar a cabo esta propuesta, se purificó la enzima PDE del veneno por dos pasos cromatográficos: exclusión molecular (Sephadex G-75) seguida de intercambio iónico (Q-FF, FPLC) y se la nombró CDT-PDE. Se recolectaron las fracciones de interés, se caracterizaron y se usaron como antígenos. Grupos de 5 ratones (BALB/c) se inmunizaron por vía subcutánea los días 0, 15 y 30 con CDT-PDE emulsionada con adyuvante de Freund (completo e incompleto, posteriormente). Las dosis seleccionadas fueron dosis crecientes: 0.3, 0.6 y 1.2 µg respectivamente. Un grupo control de 4 ratones, fue inmunizado reemplazando la proteína ofídica por tampón de fosfatos salino (PBS). Se recogieron muestras de sangre sin anticoagulante de la punta de la cola de los animales los días 14, 29, 41 y 50, al finalizar el plan de inmunización. El suero obtenido fue destinado a realizar ensayos de ELISA con el fin de evaluar la respuesta inmune de los animales, obteniéndose un título de 1/1600. A partir del suero se purificaron los anticuerpos por cromatografía de afinidad (Hi Trap Protein G HP), nombrados anti CDT-PDE. Se realizaron pruebas de neutralización para evaluar la capacidad bloqueante de los anticuerpos de la actividad PDE de la enzima pura (159 µg), observándose neutralización parcial de la misma (58 %). Adicionalmente, se utilizó el ensayo de Dot-Blot para evaluar la reactividad cruzada del suero anti CDT-PDE con dos venenos botrópicos de importancia sanitaria en la región nordeste de Argentina (*Bothrops alternatus* y *Bothrops diporus*). Los resultados mostraron una reacción cruzada indicando un grado de similitud estructural entre las PDEs de los venenos crotálicos y botrópicos.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Importancia de las serpientes en el ecosistema

Todos los organismos contribuyen, de manera directa o indirecta, en el ecosistema y brindan servicios que mejoran la calidad de vida del ser humano. En particular, las serpientes son esenciales en la cadena trófica debido a que su alimentación está basada en insectos, reptiles, anfibios, huevos y pequeños mamíferos, ayudan a controlar las poblaciones de especies que dañan importantes cultivos para el ser humano y evitan que se conviertan en plaga (Valencia-Aguilar y col., 2013). Las serpientes utilizan su veneno básicamente para la alimentación: ayuda a paralizar, matar y digerir a la presa. No obstante, también es liberado como última opción para la defensa. (Cej y col., 1993). Cuando hay un encuentro entre humanos y serpientes venenosas, algo probable en zonas rurales, entonces se convierte en un problema de salud pública (Gutiérrez y col., 2010).

### 1.2 Ofidismo en Argentina

Los accidentes ofídicos, tanto por su incidencia y severidad, como por las secuelas y potencial mortalidad, representan un grave problema médico, social y económico. (Vera-Sanabria y Ríos-González, 2018). En el mundo existen alrededor de 3500 especies de serpientes, siendo Sudamérica, el segundo continente con mayor cantidad luego de Asia (Uetz, 2000). En Argentina, los principales géneros de importancia médica son: *Bothrops sp* ("yará"), *Micrurus sp* ("Coral") y *Crotalus sp* ("cascabel") (Guiraud, 2001). Siendo este último de especial interés en el presente trabajo.

#### 1.2.1 Distribución de *Crotalus durissus terrificus*

*Crotalus* es un género de la subfamilia Crotalinae dentro de la familia de los vipéridos (Scrocchi, 2006). Dichas serpientes, llamadas popularmente cascabel, ocasionan accidentes poco frecuentes pero la mortalidad asociada con sus mordeduras puede ser del 72% en casos no tratados (Cabana y col., 1996). Comprende unas 38 especies (de las cuales 24 son propias de México) que se adaptan a una gran variedad de hábitats. *Crotalus durissus* es la especie de cascabel más ampliamente distribuida desde México hasta Sudamérica (Furtado y col., 2003). Solo una decena de subespecies de *Crotalus durissus* llegan a Sudamérica, con amplia distribución en Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Brasil (Gutiérrez, 1995). En Argentina, solo se encuentra la subespecie *C. d. terrificus* en las provincias del centro-norte del país (Figura 1.1), éstas son, Catamarca, Córdoba, Corrientes, Chaco, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Rioja, Mendoza, Misiones, Salta, San Juan, San Luis, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán (Álvarez y col., 2002).



Figura 1.1 Distribución geográfica de la subespecie *Crotalus durissus terrificus* en Argentina. Extraído de Céspedes-Vargas y col., 2011.

### 1.3 Principales componentes proteicos del veneno de *C. d. terrificus*

#### 1.3.1. Descripción del proteoma de *C. d. terrificus*

Los venenos de serpientes son una secreción de base acuosa producidas en glándulas especializadas, formados por una compleja fuente de proteínas (más del 90% del peso seco), componentes orgánicos de baja masa molecular y componentes inorgánicos (Gutiérrez y col., 1984). El veneno de *C. d. terrificus* sudamericana está compuesto principalmente de toxinas de siete familias de proteínas (Figura 1.2): fosfolipasas del tipo A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) componente más abundante y serino proteinasas, ecto-5'-nucleotidasas, metaloproteiniasas, factores de crecimiento nervioso (NGFs), glutaminil ciclasa(GC) y fosfodiesterasa(PDE) (Georgieva y col., 2010).

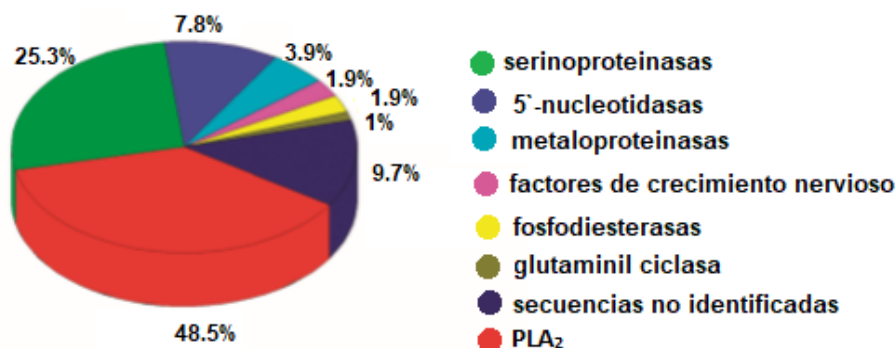


Figura 1.2 Representación esquemática de los componentes proteicos del veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Resultados observados del análisis proteómico del veneno (Georgieva y col., 2010).

Los componentes que se encuentran en mayor proporción fueron los más estudiados por ser los principales responsables de las manifestaciones clínicas producidas durante la intoxicación crotálica. Entre ellos:

- Crotoxina (CTX)

El complejo CTX es el principal componente responsable de la elevada letalidad de este veneno, una proteína heterodimérica aislada por primera vez en 1938 (Slotta y col., 1938). Posee una subunidad ácida crotapotin (CTP) que no presenta actividad enzimática y comprende tres cadenas polipeptídicas unidas entre sí por siete puentes disulfuro. Ésta se encuentra unida a la subunidad básica, con actividad fosfolipásica A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y está compuesta por una sola cadena polipeptídica (Hendon y col., 1971). Como tal, CTX no es una proteína única, se presenta en múltiples isoformas (de 5 a 10 en el veneno de un espécimen de *C. d. terrificus*) las cuales difieren entre sí en sutiles diferencias en sus secuencias aminoácidas y propiedades biológicas (Faure y col., 1993). A la CTX crotálica se le atribuyen una variedad de efectos neurotóxicos que llevan a parálisis respiratoria y la consecuente muerte del intoxicado (Hawgood y col., 1977).

- Serinoproteinasas

Serinoproteinasas con actividad similar a la trombina (*thrombin-like*), causan alternaciones en la coagulación produciendo alargamiento del tiempo de protrombina (Passero y col., 2007). Estudios previos demostraron que la inyección intravenosa en ratones de una serinoproteinasa aislada de este veneno provocó el denominado síndrome giroxina, es decir, episodios temporarios de hiperextensión y rotaciones rápidas alternadas con períodos de postración, hipoactividad y pérdida de reflejos, motivo por el cual a las *thrombin-like* de veneno de cascabel se las denomina giroxina (Alexander y col., 1988; Ruiz de Torrent y col., 2007).

Entre otros componentes minoritarios del veneno, se encuentran las enzimas de la familia de las fosfodiesterasas (PDEs). Debido a que en el presente trabajo se estudió una enzima PDE, a continuación se dedica un apartado con el fin de ampliar la información de dicha familia de proteínas.

### 1.3.2 Familia PDE

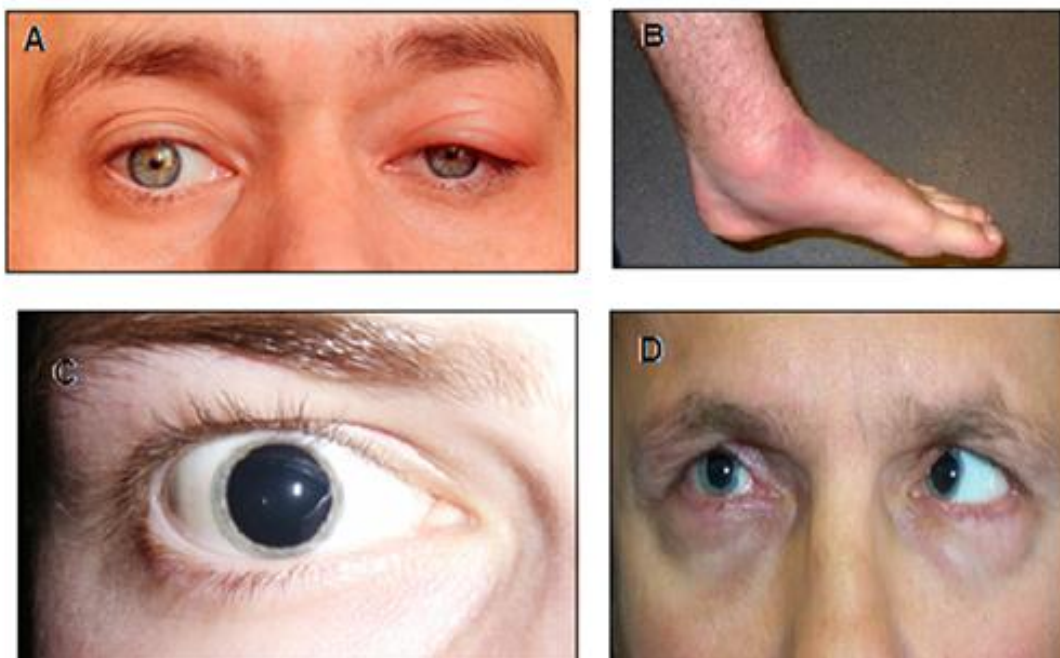
Las PDEs son enzimas que hidrolizan los enlaces fosfodiéster. Uno de los primeros informes de PDE asociadas con venenos de serpientes fue en 1932 cuando Uzawa identificó la actividad fosfodiéster en veneno de *Trimeresurus flavoviridis* (Uzawa, 1932). Posteriormente, la actividad de fosfodiéster se ha encontrado en muchos venenos de serpientes, aunque en general hay una mayor actividad asociada con los venenos de Viperidae (Uzawa, 1932). Las PDEs y otras nucleasas fueron utilizadas posteriormente como herramientas en el campo de la biología molecular para estudiar ácidos nucleicos y otras moléculas. A pesar del interés biotecnológico en el uso de nucleasas y PDEs no hay en la bibliografía muchos trabajos sobre estos componentes menos abundantes del veneno, en comparación con los estudios sobre aquellos que juegan un rol clave en la fisiopatología de la intoxicación ofídica (Fox, 2013). Ejemplos de PDEs caracterizadas bioquímicamente, es la aislada de los venenos de *Daboia russelli russelli* (Mitra y col., 2014) *Crotalus ruber ruber*, *Trimeresurus stejnegeri* (Peng y col., 2013) y *B. alternatus* (Valério y col., 2002). En general los estudios detallan que las PDEs son enzimas con pl básicos y masas moleculares que varían entre 98 kDa y 140 kDa (Fox, 2013).

Ensayos bioquímicos realizados con CDT-PDE, de interés de esta tesina, describieron una mayor actividad enzimática sobre el AMP cuando fue utilizado como sustrato en comparación con ADP o ATP. También se determinó su rápida acción sobre ADN siendo degradado en 30`` de exposición (Fusco y col., 2016). Ensayos adicionales muestran que la enzima inoculada (i.p) en ratones (BALB/c) modifica el comportamiento solo en los primeros 5 min de exposición (datos no publicados).

#### 1.4 Accidente ofídico y manifestaciones clínicas del veneno *C. d. terrificus*

Se denomina accidente ofídico al cuadro clínico provocado por la mordedura de serpientes que poseen e inoculan sustancias tóxicas, las cuales lesionan los tejidos y provocan alteraciones fisiopatológicas en la víctima (Croce, 2007). Las manifestaciones clínicas de las mordeduras por serpientes venenosas, así como la gravedad de la intoxicación son muy variables, dependiendo de varios factores como: género, especie, talla, edad, localización, profundidad, número de mordeduras y cantidad de veneno inoculado (Tay-Zavala y col., 2014).

El veneno de *C. d. terrificus* es una mezcla compleja de toxinas biológicamente activas, estas inmovilizan a la presa y, en conjunto, son responsables de los efectos sistémicos del veneno (Figura 1.3), caracterizados por un síndrome neurotóxico, miotóxico y con disturbios en la coagulación (Santoro y col., 1999; Rangel-Santos y col., 2004). El síndrome neurotóxico aparece en los primeros 30 min a 1h y se caracteriza por presentar ptosis palpebral, oftalmoplejía, midriasis, vómitos, sialorrea y ataxia con progreso a parálisis general, seguida de sedación moderada y fallo respiratorio que conduce a la muerte de la víctima del accidente crotálico (Cardoso y col., 2003). La miotoxicidad sistémica, rabdomiólisis, causa un daño muscular sistémico provocando mialgia generalizada (Azevedo-Marques y col., 1985). Los disturbios en la coagulación, si bien no constituyen el efecto central del veneno, agravan el cuadro general de intoxicación de la víctima. Se produce un consumo de fibrinógeno que conduce primeramente a un estado de hipercoagulabilidad del plasma y posteriormente a incoagulabilidad causada por la reducción en un 60% del fibrinógeno plasmático (Marunak y col., 2004).





**Figura 1.3. Síntomas de accidentes crotálicos.** A. Ptosis palpebral. B. Edema discreto sin hemorragia. C. Midriasis. D. Oftalmoplejía. Adaptado de: Martino y col., 1979.

### 1.5 Propuesta del Trabajo Final de Graduación

Si bien sigue siendo discutido el rol de las PDEs en la intoxicación crotálica, hasta el presente se postula que éstas junto a nucleasas generan adenosina, como producto de degradación enzimática. La adenosina es considerada una toxina sistémica que, entre otros efectos, genera hipotensión e inmovilización de la presa (Mackessy, 1985). Estudios recientes del grupo LabInPro permitieron demostrar que la fracción fosfodiesterasa del veneno crotálico de nuestra región está formado por dos isofórmulas de la enzima. Hasta el presente no solo se describieron los sustratos específicos de la enzima (ADP, AMP, ATP y ADN), las condiciones óptimas de pH y temperatura de reacción sino también, el efecto que CDT-PDE produce en el comportamiento de animales (ratones) inoculados (Fusco y col., 2016). Esta última evidencia abona la teoría que postula que estas enzimas podrían tener un rol preponderante en los primeros minutos de la intoxicación inmovilizando a la presa (datos no publicados). En el presente trabajo, con el objetivo de ampliar la caracterización de la CDT-PDE buscamos evaluar la capacidad neutralizante de anticuerpos anti CDT-PDE obtenidos en ratones. Adicionalmente, se utilizarán los anticuerpos anti CDT-PDE como herramienta para detectar la presencia de PDE en venenos botrópicos y así, contribuir al conocimiento de esta enzima tan poco estudiada.

## OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Obtener anticuerpos contra una enzima PDE purificada del veneno de *C. d. terrificus* y evaluar la capacidad neutralizante de los mismos. Utilizar los anticuerpos anti CDT-PDE como herramientas para detectar la presencia de PDEs en venenos botrópicos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Purificar la PDE del veneno de *C. d. terrificus* y caracterizar su actividad enzimática.
- Producir anticuerpos anti CDT-PDE por inmunización de ratones.
- Purificar los anticuerpos anti CDT-PDE por cromatografía de afinidad.
- Evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti CDT-PDE de la actividad enzimática de la PDE crotálica.
- Estudiar la presencia de PDEs en venenos botrópicos (*Bothrops alternatus* y *Bothrops diporus*) utilizando los anticuerpos anti CDT-PDE.

### **HIPÓTESIS**

Los anticuerpos anti CDT-PDE, al unirse y bloquear a la PDE crotálica, son útiles como herramienta para estudiar la presencia de PDEs en venenos botrópicos.

### **PREDICCIONES**

- 1- La enzima PDE es inmunogénicamente adecuada para producir anticuerpos en ratones.
- 2- Los anticuerpos anti CDT-PDE podrán reconocer y bloquear al antígeno PDE purificado del veneno de *C. d. terrificus*.
- 3- Los anticuerpos anti CDT-PDE, por reacción cruzada, reconocerán las PDEs presentes en venenos botrópicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Veneno de *Crotalus durissus terrificus*

El veneno se obtuvo a partir de especímenes adultos de *C.d. terrificus* proporcionado por el serpentario CEP SAN, Corrientes. El mismo, desecado, se mantuvo en freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser utilizado.

### 4.2. Aislamiento de la PDE crotálica

El veneno de *C. d. terrificus* (15mg) se disolvió en 350  $\mu\text{l}$  de tampón de Tris (20 mM, pH 8) y se centrifugó 5 min a 0.5 g. Trescientos cuarenta y cinco  $\mu\text{l}$  del sobrenadante se cargaron en una columna de Sephadex G-75 (Sigma; 100 x 1 cm) a presión atmosférica. Se monitoreó la elución de proteínas mediante la medida de absorbancia del eluido a 280nm en espectrofotómetro UV-visible CamSpec M 330. Se recolectaron fracciones de 700  $\mu\text{l}$ , y se ensayaron actividad PDE y hemolítica. Las fracciones con actividad PDE se concentraron en tubos con membrana filtrante (AMICON Millipore), se juntó en un pool y se sometió a un segundo paso de separación por cromatografía de intercambio iónico (Q-FF, 1ml en FPLC) en las mismas condiciones de tampón. Las fracciones de elución fueron concentradas y las proteínas cuantificadas por (método de Bradford).

#### 4.2.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Este método se basa en la unión de un colorante, Comassie Blue a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre.

Brevemente, a 5  $\mu\text{l}$  de muestra se adicionaron 250  $\mu\text{l}$  de reactivo de Bradford y luego de 2 minutos se midió la absorbancia a 595 nm (Bradford, 1976). Se utilizó albúmina sérica bovina (ASB) como patrón (concentraciones ensayadas: 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,20; 0,24 mg/ml) y las absorbancias fueron medidas por duplicado. Los valores resultantes fueron graficados en función de la concentración del testigo.

### 4.3 Control de pureza

#### 4.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS – PAGE)

La electroforesis en gel es una técnica que permite la separación de una mezcla de proteínas de acuerdo a su masa molecular. Las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturaliza y recubre a la proteína con cargas netas negativas), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas.

Las muestras de proteínas se separaron mediante electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida 12.5%. Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie R250 o con  $\text{AgNO}_3$  según procedimiento descrito por Laemmli, 1970.

#### 4.3.2 Actividad fosfodiesterasa con el sustrato bis (p-nitrofenil) fosfato

La actividad PDE, expresado en mUA, se define como el cambio de absorbancia ( $\Delta\text{abs}$ ) producido durante la reacción por minuto (min).

Para medir la actividad PDE se llevó a cabo una reacción colorimétrica con el sustrato específico para la enzima, bis (p-nitrofenil) fosfato (N3002, Sigma-Aldrich).

A un volumen de 0,1 ml de bis (p-nitrofenil) fosfato (1 mM) se agregó 25 µl de solución de MgSO<sub>4</sub> (30 mM), 75 µl de tampón glicina pH 8.9 (100 mM) y 50 µl de la muestra a ensayar (Babkina y Vasilenko, 1964). Luego se incubó a 37 °C durante 30 min y se registran los cambios de absorbancia a 400 nm cada 5 minutos iniciando en el tiempo 0.

#### **4.3.3 Actividad PLA<sub>2</sub>**

Para ello se aplicó el método sugerido por Gutiérrez y col. (1988). En placas plásticas, se depositaron 25 ml de agar al 1% (previamente fundido y enfriado a 50 °C) pH 7.2 conteniendo: 0,3 ml de solución 1:3 de yema de huevo en solución fisiológica, 0,3 ml de paquete de glóbulos rojos, 0,25 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,01 M y 0,5 mg de azida sódica. Se dejó solidificar y se confeccionaron 4 pares de orificios con un sacabocados de 3 mm de diámetro. En cada uno de los pares de orificios se sembraron 10 µl de las fracciones de elución obtenidas de la purificación realizada anteriormente. Posteriormente las placas fueron incubadas en cámara húmeda durante 20 h a 37 °C, midiéndose luego los diámetros de los halos de hemólisis.

#### **4.4 Obtención de Anticuerpos**

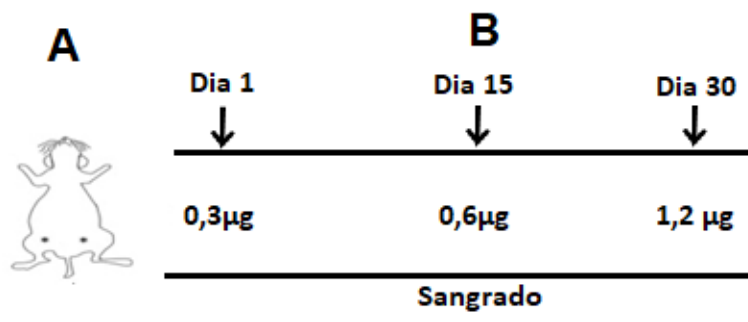
##### **4.4.1 Animales de experimentación**

Se utilizaron ratones albinos hembras de la cepa BALB/c suministrados por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional del Nordeste (Corrientes, Argentina). Los animales se mantuvieron a temperatura de 23 ± 2 °C y humedad relativa de 35 - 65 %, con 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Los experimentos se llevaron a cabo con el aval del Comité de Ética de la FaCENA UNNE (Nº. Resol. 1518/19).

##### **4.4.2 Protocolo de inmunización**

El veneno se emulsificó con adyuvante Freund (completo en la primer inoculación e incompleto en las inoculaciones de refuerzo). Se inoculó en un grupo de 5 ratones (BALB/c) por vía subcutánea (s.c.), en un periodo de 50 días como se detalla en la Figura 4.1. Un grupo control (4 ratones) fue tratado reemplazando las proteínas ofídicas con tampón de fosfatos salino (PBS) bajo el mismo protocolo de inmunización. Las vacunas se aplicaron en 2 puntos de inoculación en la zona inguinal. La dosis inicial fue de 0,3 µg, seguida de una segunda dosis de 0,6 µg y la última dosis fue de 1,2 µg.



**Figura 4.1. Protocolo de inmunización.** A. Puntos de inoculación en ratones. B. Plan de inmunización.

Se realizaron sangrados parciales de la punta de la cola de los ratones en días 14, 29 y 41 en el cual se tomaron muestras de sangre de 50 µl según la técnica descrita por Dürschlag y colaboradores (1996). Las muestras fueron destinadas a los ensayos de ELISA. En el día 50, al finalizar los planes de inmunización, los animales fueron anestesiados y se tomaron muestras de sangre sin anticoagulantes. El suero obtenido fue destinado a realizar ensayos de ELISA con el fin de evaluar la respuesta inmune de los animales. También se llevaron a cabo pruebas de neutralización para comprobar la capacidad neutralizante/bloqueante de los sueros. Para dichas pruebas se purificaron del suero los anticuerpos (fracción IgGs) por cromatografía de afinidad, como se describe en el punto 4.6.

#### 4.5 Evaluación de la respuesta inmune

##### 4.5.1 Estimación de los títulos de anticuerpos por enzima inmuno análisis (ELISA)

En este ensayo se realizaron determinaciones del título de IgG de los sueros hiperinmunes obtenidos de los animales, en distintas etapas del plan de inmunización, a través de la técnica de ELISA.

Brevemente, el veneno se colocó en policubetas para ELISA (100 µl; de una solución de veneno 100 µg/ml) disuelto en PBS 1x incubado 1 h a 37°C. Las placas fueron luego lavadas 3 veces con PBS1x conteniendo 0, 5% de tween 20 y los sitios no ligados fueron bloqueados con PBS1x/caseína (2 %) por 1 h a 37 °C. Se agregó a la policubeta sensibilizada con el antígeno 100 µl de diluciones seriadas del suero( 1/100-1/100.000) y se incubó 1 h a 37°C. Luego de tres lavados con PBS1x/tween, para retirar el exceso de anticuerpos no unidos, se incubó 1 h a 37°C con 100µl de anticuerpo anti-mouse conjugado a peroxidasa (Sigma,codigo A9044 1:10000 en PBS). Finalmente luego de la incubación se adicionó 100 µl ( 1mg/ml) de solución sustrato de peroxidasa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/OPD), se dejó reaccionar por 5 min y se detuvo la reacción con 30 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N. La absorbancia de la solución resultante se midió a 490 nm en la lectora de microplacas (Margni, 1995).

#### **4.6 Purificación de anticuerpos**

La purificación de anticuerpos anti CDT-PDE se realizó a partir de suero hiperinmune de ratones mediante cromatografía de afinidad, empleando una columna Hi Trap Protein G HP 1ml. Esta cromatografía se basa en la unión específica y reversible de los anticuerpos presentes en el suero (a través de la región constante de las IgGs) a la proteína G recombinante ligada a una matriz de sefarosa (fase estacionaria). Los anticuerpos ligados a la columna son separados de los demás componentes del suero por disminución del pH en el buffer de elución.

La columna se lavó 5 veces con agua bidestilada filtrada y se equilibró la matriz con buffer de unión (buffer de fosfato 20 mM, pH7). Se disolvieron 250 µl de suero con 2740 µl de buffer de unión y se cargó en la columna. Luego se lavó con 20 ml de buffer de unión, para eluir los componentes del suero que no interaccionan con la resina. Posteriormente se utilizó el buffer de elución (Glicina- HCl 0,1 M, pH 2.5) para eluir las IgGs, recolectando fracciones de 1 ml en 50 µl de buffer de neutralización (Tris-HCl 1M pH 9). Por último se lavó la columna con agua bidestilada filtrada y se colocó etanol al 20% para conservarla.

##### **4.6.1 Determinación de la capacidad de los anticuerpos de bloquear la actividad enzimática de la PDE**

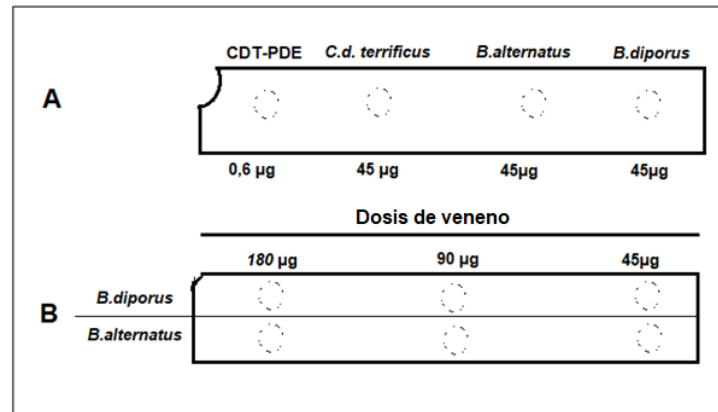
Estos ensayos permitieron medir la capacidad de los anticuerpos de inhibir la actividad enzimática de la PDE. La enzima PDE previamente purificada (0,369µg) disuelta en PBS se preincubó con diferentes cantidades de anticuerpos (128 µg, 148 µg y 159 µg) por un tiempo de 30 minutos a 37°C para favorecer la unión antígeno-anticuerpo.

Posteriormente la solución se centrifugó 5 minutos a 0.056 g y se determinó la actividad PDE como se describió en el punto 4.3.2. Soluciones de PDE en PBS1x se utilizaron como control positivo.

#### **4.7 Anticuerpos anti CDT-PDE para identificación de PDE en venenos botrópicos**

Se investigó la presencia de PDEs en dos venenos de importancia sanitaria en la región, *Bothrops diporus* y *Bothrops alternatus*. Se ensayó la actividad enzimática (detallado en el punto 4.3.2) utilizando soluciones de los venenos de 1mg/ml y el ensayo de Dot Blot, utilizando como antígeno el veneno de *C. d. terrificus*. Para el ensayo Dot Blot, se empleó membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Se sembraron diferentes cantidades de muestras de antígeno (0,6 a 135 µg) en cada punto de la membrana (como se esquematiza en la figura 4.2). El bloqueo de la membrana se realizó con TBS/ leche descremada 1% m/v (solución salina tamponada con Tris) durante 1 hora a 37°C con agitación. A continuación se retiró la solución de bloqueo para luego incubar la membrana con 10 µl de suero anti-PDE diluido en TBS/ leche descremada 3% m/v durante 24 horas. Se lavó tres veces durante 5 minutos con TBS-TWEEN 20 al 0,1% (v/v) y se incubó con el anticuerpo secundario (conjugado anti IgG de ratón, Sigma, código A9044 especificar marca) diluido 1/5000 en leche descremada 1% m/v durante 1 hora a 37°C en agitación lenta. Posteriormente se lavó 3 veces la membrana con tampón de lavado durante 10 min, primero con TBS-TWEEN y posteriormente sólo

con TBS. Se reveló con 4-cloro- $\alpha$ -naftol (0.03% en metanol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 20 minutos y se detuvo la reacción de revelado con abundante agua.



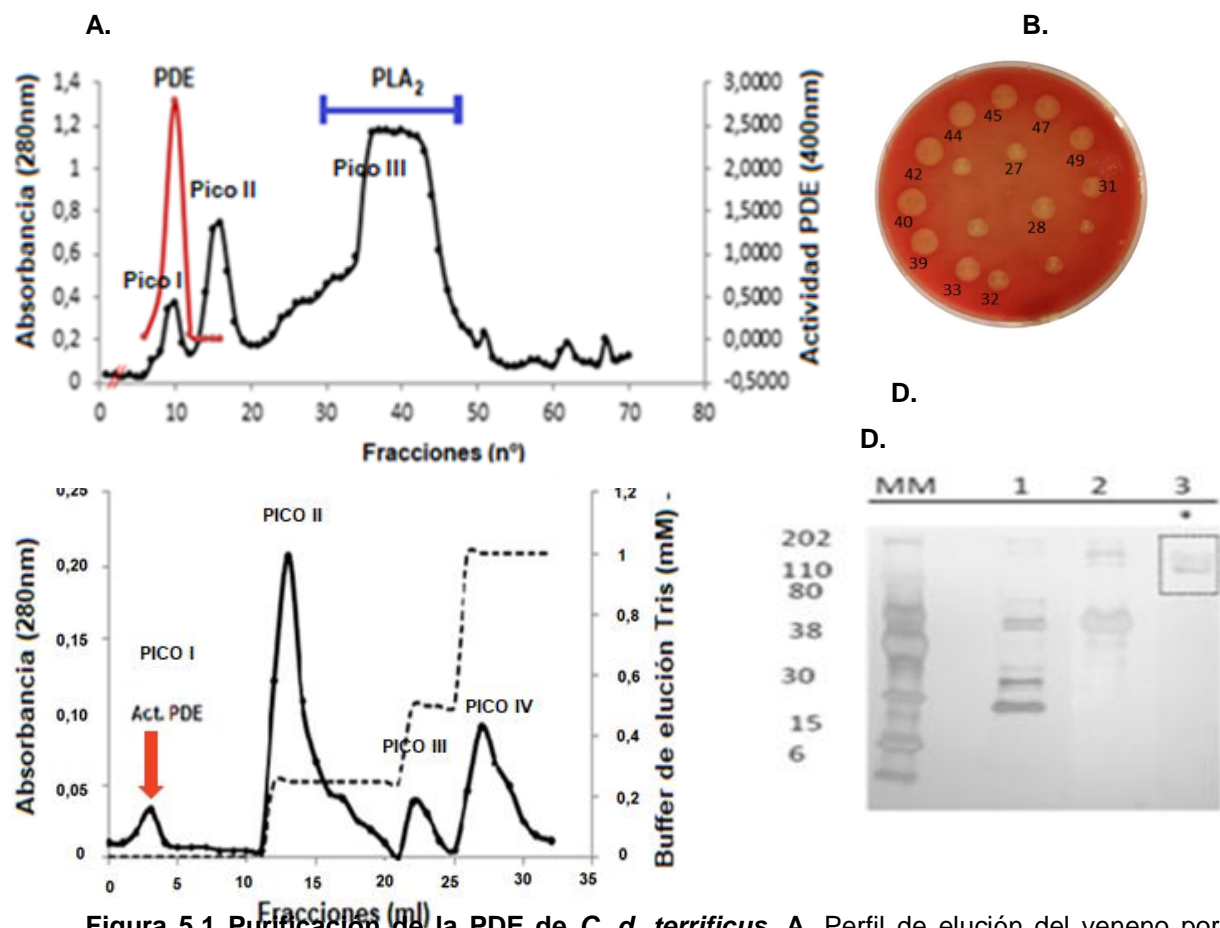
**Figura 4.2. Representación esquemática del ensayo Dot Blot. A.** Utilizando como antígeno venenos de *C. d. terrificus*, *B. diporus* y *B. alternatus* (45 µg). **B.** Utilizando como antígeno venenos de *B.diporus* y *B.alternatus* ( $\geq 45$  µg).



## RESULTADOS

### 5.1 Purificación de la PDE de *C. d. terrificus*

El perfil cromatográfico obtenido del veneno de *C. d. terrificus* resultó en 4 picos que pueden apreciarse en la Figura 5.1-A. Se ensayaron las actividades PDE y hemolítica indirecta a todas las fracciones eluidas. Las proteínas que eluyeron en los picos 3 y 4 presentaron actividad PLA<sub>2</sub> mostrando la aparición de halos de hemólisis en placa de agar-sangre (Fig.5.1-B). Por otro lado, las fracciones de interés que presentaron actividad PDE y ausencia de actividad PLA<sub>2</sub> eluyeron en el pico 1. Las fracciones con actividad enzimática fueron reunidas, concentradas (en tubos concentradores centrífugos) y posteriormente sometidas a un segundo paso cromatográfico de intercambio iónico (Q-FF, en FPLC a pH 8) como se observa en la Figura 5.1-C. La proteína con actividad PDE (denominada CD-PDE) eluyó en el primer pico y presentó una masa molecular cercana a 110 kDa estimada por SDS-PAGE (Fig.5.1-D), la cual fue utilizada para llevar a cabo el protocolo de inmunización.



**Figura 5.1 Purificación de la PDE de *C. d. terrificus*.** **A.** Perfil de elución del veneno por cromatografía de exclusión molecular. La línea roja representa fracciones (7-12) con actividad PDE. La recta azul representa fracciones (38-49) con actividad PLA<sub>2</sub>. **B.** Placa de agar-sangre donde se observan los halos de hemólisis radial indirecta producidos por proteínas con actividad PLA<sub>2</sub> presentes en las fracciones eluidas. **C.** Cromatografía de intercambio iónico de las fracciones con actividad PDE recolectadas y concentradas del paso anterior. **D.** SDS-PAGE al 12% (p/v), bajo condiciones reductoras. MM: marcadores de masa molecular. Calle 1: Veneno entero de *C.d.terrificus*. Calle 2: fracciones 9-11 del primer paso cromatográfico. Calle 3: Fracción 3-4 del primer paso cromatográfico.

segundo paso cromatográfico. El recuadro negro muestra la banda correspondiente a la PDE crotálica.

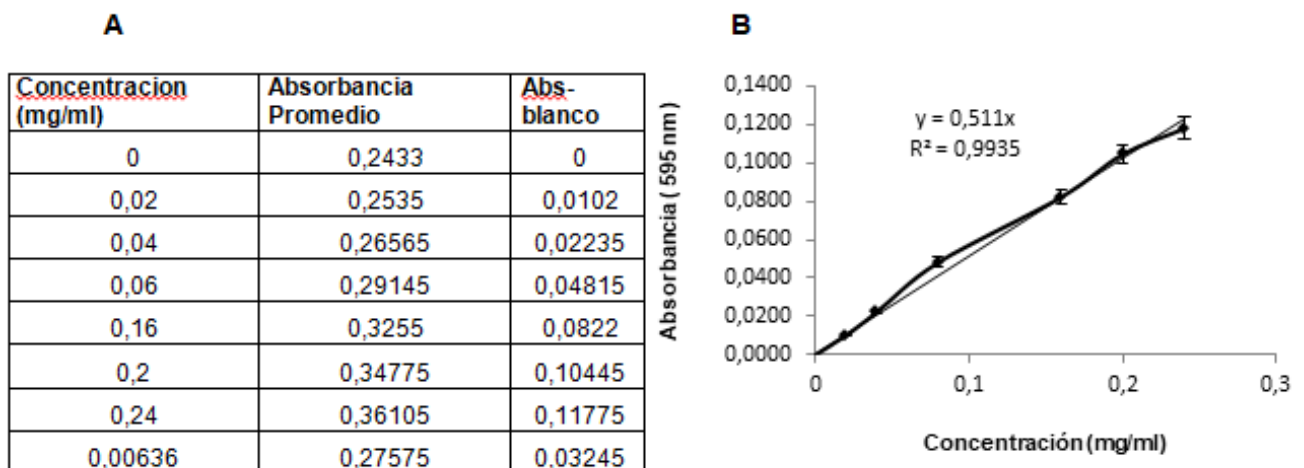
## 5.2 Obtención del antígeno a inmunizar

Previo al protocolo de inmunización se llevó a cabo la cuantificación de proteínas de las fracciones obtenidas de la purificación como así también se midió la actividad PDE de las mismas.

### 5.2.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Se realizó la cuantificación de proteínas correspondientes a la PDE aislada mediante el método de Bradford utilizando ASB (albúmina sérica bovina) como patrón. En la Figura 5.2 Sección A se muestra la tabla de valores obtenidos al ensayar distintas concentraciones de proteína patrón (ASB). Con los datos obtenidos se construyó un gráfico que nos permite determinar el grado de dispersión de los valores estandares ( $R^2 = 0,9935$ ).

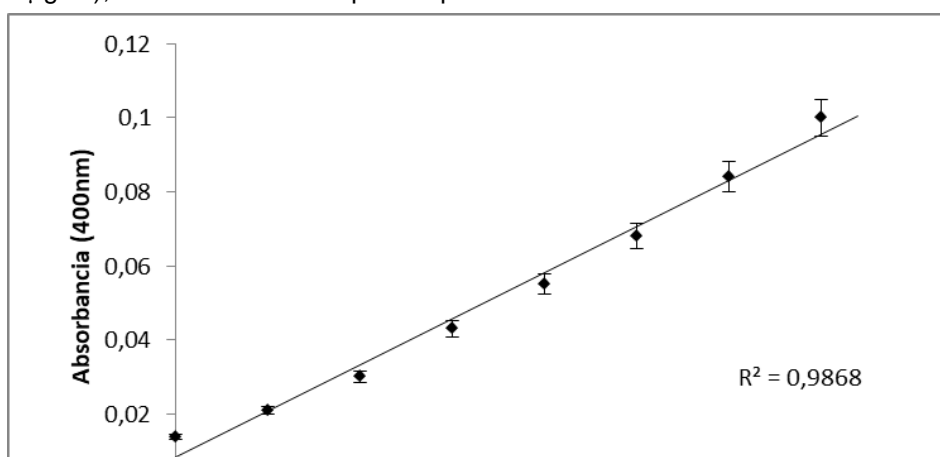
La muestra incognita ensayada con una abosrbancia promedio de 0,275 y  $\pm$  DE 0,003 tiene una concentración de proteínas de 0,06360078 mg/ml.



**Figura 5.2. Cuantificación de proteínas de fracciones de interés. A.** Tabla de valores de concentración proteica, determinadas por el método de Bradford. **B.** Curva de Bradford usando albúmina sérica bovina como testigo. Cada punto representa la media  $\pm$  de 2 determinaciones independientes, indicadas con barras de error ( $R^2 = 0,9935$ ).

### 5.2.2 Actividad PDE con el sustrato bis (p-nitrofenil) fosfato

La actividad fosfodiesterasa fue de 2,36 mUA.min<sup>-1</sup> de la fracción concentrada de enzima (0,00636  $\mu$ g/ml), la cual fue utilizada para el proceso de inmunización.



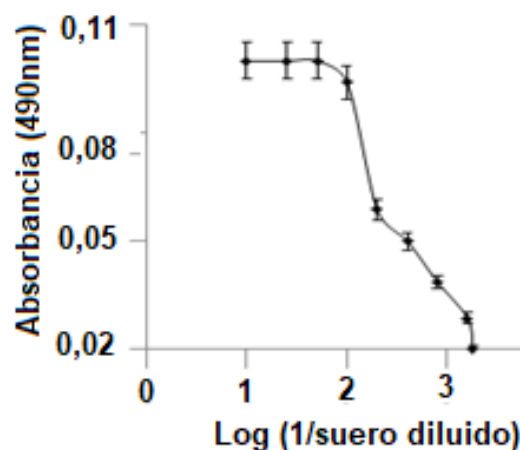
**Figura 5.3 Actividad PDE sobre sustrato (bis (p-nitrofenil) fosfato).** Cada punto representa la media  $\pm$  DE de 2 determinaciones independientes, indicadas con barras de error ( $r = 0,9869$ ).

### 5.3 Obtención y evaluación de los sueros hiper-inmunes

Luego del período de inmunización se realizó el sangrado final de los animales y separación de los respectivos sueros. De manera práctica, los sueros obtenidos de los ratones inmunizados con la enzima PDE se denominaron suero anti-CDT-PDE y, al grupo de ratones inmunizados con solución salina, se lo denominó suero control. Estos sueros hiper-inmunes fueron destinados a ensayos de ELISA para evaluar la respuesta inmune.

#### 5.3.1 Estimación de títulos de anticuerpos por enzima inmuno análisis (ELISA)

El ensayo de ELISA nos permitió confirmar que la enzima de interés es inmunogénica, es decir que los anticuerpos generados son capaces de reconocer al antígeno nativo. Se graficó la absorbancia en función del logaritmo 1/dilución de suero (Fig. 5.4) y se obtuvo un título de 1/1600 para el suero anti CDT-PDE obtenido al final del protocolo de inmunización ( día 50).

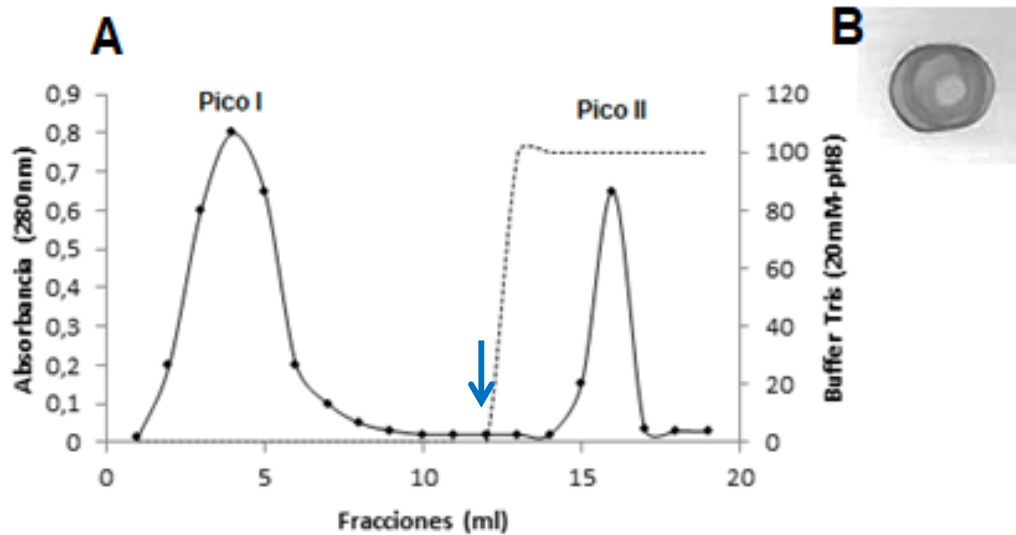


**Figura 5.4. Reactividad de suero anti CDT-PDE con enzima CDT-PDE por ELISA.** El plasma de ratones mostró una respuesta específica a CDT-PDE y los anticuerpos dieron un título de 1/1600. Los puntos representan el valor de absorbancia obtenido de la lectura a 490nm. Cada punto representa un valor medio  $\pm$  DS de dos determinaciones independientes realizadas.

### 5.4 Purificación de anticuerpos

En la figura 5.5.A se puede apreciar el perfil de purificación de los anticuerpos anti-PDE observando dos picos; el pico I representa las proteínas del suero que no interactúan con la columna por no presentar afinidad a la fase estacionaria, por lo que eluyen en las primeras fracciones. El pico II

corresponde a las fracciones de IgGs (denominados anticuerpos anti CDT-PDE) selectivamente unidas a la columna, las cuales se reunieron, concentraron y utilizaron para los ensayos de neutralización. En la figura 5.5. B se observa una imagen de Dot Blot de los anticuerpos anti CDT-PDE purificados enfrentados a la enzima CDT-PDE, como control positivo.

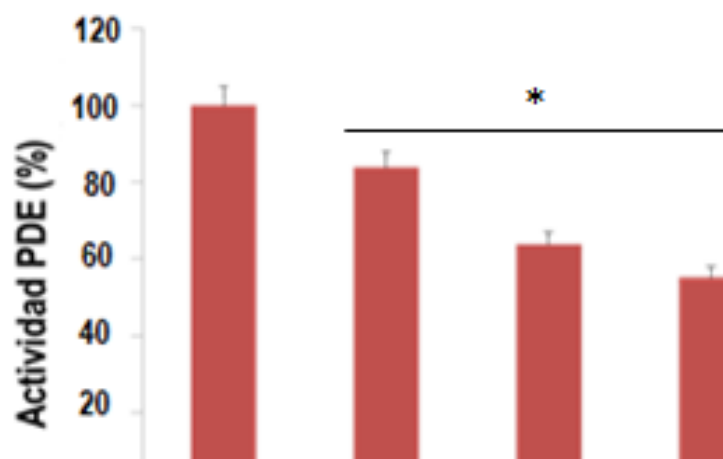


**Figura 5.5. Purificación de anticuerpos anti CDT-PDE** **A.** Perfil de elución en columna Hi Trap Protein G HP 1ml. La flecha azul indica el cambio de buffer y la línea punteada la concentración del buffer de elución. **B.** Dot Blot de los anticuerpos anti CDT-PDE enfrentados a la enzima para verificar el proceso de purificación.

#### 5.4.1 Ensayos de neutralización

Los anticuerpos obtenidos de los animales sometidos a los procesos de inmunización fueron utilizados para ensayar pruebas de neutralización. Los resultados muestran el 100% de actividad enzimática cuando la CDT-PDE es incubada sin la presencia de anticuerpos.

La figura 5.6 muestra el poder bloqueante dosis dependiente de los anticuerpos. Los resultados indican que 159  $\mu$ g de anticuerpos anti CDT-PDE fueron eficientes en la neutralización de la actividad enzimática, ya que la misma se redujo a un 55%. Dosis inferiores de anticuerpos (148 y 128  $\mu$ g) mostraron una menor capacidad neutralizante ya que se observó un aumento de la actividad enzimática residual (63 y 83%, respectivamente).

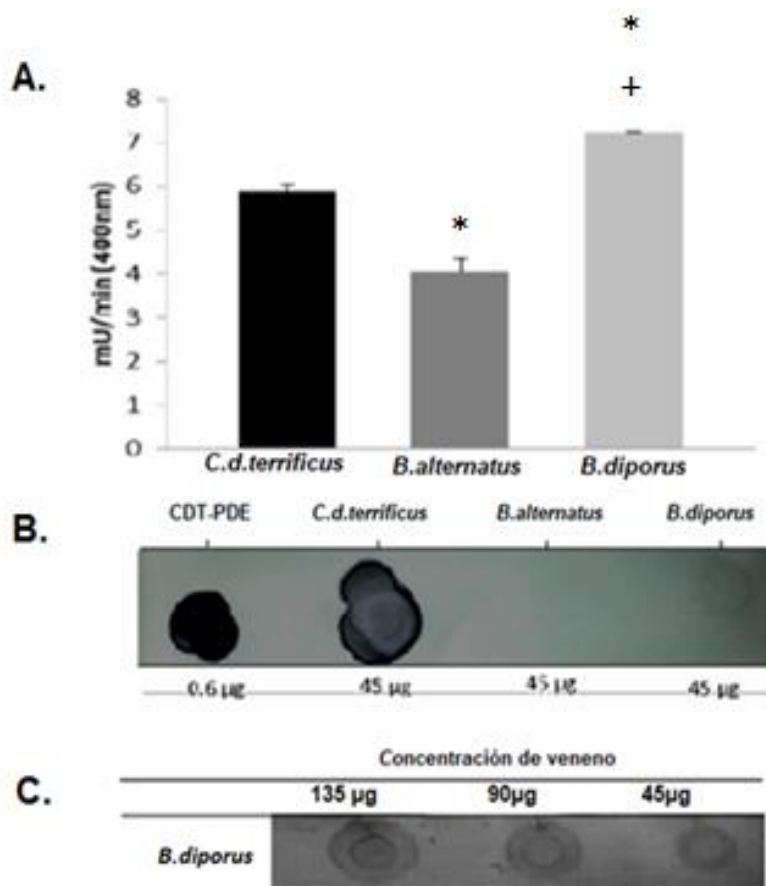


**Figura 5.6. Neutralización de la actividad PDE.** Capacidad de neutralización de la actividad de la enzima CDT-PDE (0,369  $\mu\text{g}$ ) utilizando diferentes cantidades de los anticuerpos anti CDT-PDE (128, 148 y 159  $\mu\text{g}$ ). Cada barra representa la medida de tres muestras  $\pm$  DS. \* $p < 0,05$  con respecto a la actividad enzimática del veneno *C.d.terrificus*

### 5.5 Reacción cruzada entre los anticuerpos anti CDT-PDE y los venenos botrópicos

El propósito de este ensayo fue constatar la presencia de enzima PDE en venenos botrópicos de nuestra región midiendo la actividad de dichos venenos con el sustrato específico bis(p-nitrofenil) fosfato y haciendolos reaccionar con los anticuerpos anti CDT-PDE. Nuestros resultados demuestran la presencia de PDE en los venenos de *B.alternatus* y *B.diporus*, con actividad de 4,08 mUA.min<sup>-1</sup> y 7,24 mUA.min<sup>-1</sup> respectivamente, presentando éste último una mayor actividad enzimática (Figura 5.7.A). Para el veneno crotálico se determinó una actividad de 5,88 mUA.min<sup>-1</sup>.

Con el fin de evaluar reacción cruzada de los anticuerpos anti CDT-PDE se realizó el ensayo de Dot-Blot. Los resultados muestran que los anticuerpos presentan la capacidad de reconocer a las enzimas PDE tanto de veneno de *C. d. terrificus* y en menor medida venenos botrópicos ensayados, observandose puntos de reacción (Figura 5.7.B). Para un mejor observación de la reactividad cruzada el ensayo de Dot-Blot se realizó con distintas concentraciones de venenos botrópicos (45 a 135  $\mu\text{g}$ ) y prolongando el tiempo de reacción (20 min). Como se muestra en la figura 5.7.C se confirman los puntos positivos en el Dot-Blot mostrando la reactividad cruzada entre los anticuerpos anti CDT-PDE y las PDE botrópicas.



**Figura 5.7. Detección de PDEs en venenos botrópicos.** **A.** Caracterización de la actividad enzimática de los venenos de *C. d. terrificus*, *B. alternatus* y *B. diporus*. Los datos se representan como la media  $\pm$  la desviación estándar de tres elementos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$  con respecto a actividad enzimática del veneno *C.d.terrificus*. + $p < 0,05$  con respecto al veneno de *C.d.terrificus* y *B. alternatus*. **B.** Análisis Dot-blot con CDT-PDE (0.6  $\mu$ g), *C. d. terrificus* (45  $\mu$ g), *B. alternatus* (45  $\mu$ g) y *B. diporus* (45  $\mu$ g) veneno, (tiempo de reacción de 2 min). **C.** Análisis de transferencia de puntos del veneno de *B. diporus* y *B.alternatus* (45, 90,185  $\mu$ g) (tiempo de reacción de 20 minutos).

## DISCUSIÓN

Las enzimas PDEs son, en general, proteínas de alta masa molecular (> 90 kDa) (Mackessy, 1985). Estudios de proteómica mostraron diferentes implicancias sobre la presencia de CDT-PDE en veneno de *C. d. terrificus*. Por ejemplo, Calvete y col. (2009) evaluaron los componentes del veneno de *Crotalus* en diferentes lugares de América del Sur, pero no detectaron esta enzima en sus estudios. Sin embargo, Georgieva y colaboradores (2010) identificaron dos PDEs del veneno de la misma especie utilizando técnicas proteómicas diferentes.

En este trabajo, aislamos la enzima PDE crotálica para posteriormente producir anticuerpo anti-PDE y evaluar la capacidad neutralizante de los mismos. La purificación de CDT-PDE se llevó a cabo utilizando dos pasos cromatográficos, primero una separación por tamiz molecular (Sephadex-G75) seguida de una separación por intercambio iónico (Q-FF), método empleado en trabajos previos (Fusco LS, y col., 2017). Como lo indican estudios proteómicos de veneno de *C. d. terrificus* de Brasil, menos del 2% de sus componentes corresponden a la familia PDE (Georgieva, 2010). El veneno (pool) de la misma subespecie pero de especímenes provenientes del norte de Argentina contiene un 2.6% de PDEs (Fusco y col., 2019). Esto explica que el rendimiento en la purificación de esta enzima sea bajo.

Para el diseño del protocolo de inmunización se siguieron lineamientos generales previamente descritos (Beghini y col., 2004). La enzima, en dosis creciente, fue inoculada junto al adyuvante de Freund (completo e incompleto, posteriormente). Este adyuvante es uno de los más potentes y recomendados para uso en animales, en particular para la producción de anti toxinas ofídicas según la World Health Organization (WHO). Los intervalos de tiempo entre las inmunizaciones se realizaron cada 15 días y las vías de inmunización utilizadas fueron las comúnmente empleadas por otros autores como Vallecillo y col. (2004) quienes plantearon la necesidad de hacer tres inoculaciones en el lomo y dos inguinales. Sin embargo, como el ratón es un animal de tamaño pequeño y la cantidad de enzima obtenida fue limitada, se realizaron modificaciones del protocolo de inmunización inyectando el veneno en un bajo volumen y sólo en dos sitios de inoculación ( dos puntos inguinales) para favorecer el contacto entre el sistema inmune y el antígeno.

La respuesta inmune en los ratones inoculados con la enzima se analizó tomando muestras de suero cada 15 días y se estudió la reactividad frente a la enzima pura utilizando técnica de ELISA. Theakston y col. (1983) fueron los primeros en describir el uso de esta técnica para la detección de veneno y antivenenos proveniente de animales de experimentación y víctimas humanas. Los títulos obtenidos en este trabajo evidencian una baja respuesta inmune. Esto puede explicarse por haber estado el plan de inmunización limitado por la cantidad de antígeno disponible, el reducido número de puntos de inoculación y el corto período de inmunización (50 días). La baja respuesta inmune no implica que la PDE sea poco inmunogénica, ya que trabajos previos demostraron que una PDE aislada del veneno de *Daboia russelli russelli* presentó alta reactividad inmunogénica frente al suero específico anti *D. r. russelli*.

Hasta el presente la inmunoterapia es el único tratamiento recomendado ante una intoxicación ofídica (WHO, 2010). En el presente trabajo evaluamos la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti CDT-PDE y los resultados demostraron que fueron eficaces en neutralizar parcialmente la actividad de la enzima. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de los anticuerpos anti CDT-PDE en la mezcla de inmunobiológicos.

Son diversos los estudios que demuestran la evidencia de reactividad inmunológica cruzada para venenos de diferentes géneros y especies utilizando antivenenos obtenidos de una especie particular (Berger y Bhatti, 1989). Estos ensayos son una forma de detectar similitudes estructurales entre las toxinas provenientes de venenos de distintas especies y el uso potencial de antivenenos de forma cruzada (Rodríguez, 2012). El ensayo de Dot-Blot mostró que los anticuerpos anti CDT-PDE pudieron reaccionar con la CDT- PDE purificada como así también con aquellas presentes en venenos botrópicos. La intensidad de color obtenido al hacer reaccionar los anticuerpos anti CDT-PDE con el veneno entero de *C. d. terrificus* fue menor en comparación con la reacción del anticuerpo con la enzima pura, ya que la PDE se encuentra en menos del 2% en la mezcla proteica de la secreción (Georgieva y col., 2010).

El ensayo de actividad enzimática con sustrato específico permitió detectar actividad PDE en los venenos botrópicos. El veneno de *B. diporus* presentó una elevada actividad PDE. Estos resultados están en concordancia con los estudios proteómicos de Gay y col. (2016) donde se identifica a la enzima PDE (1,2%) dentro de los componentes del veneno de *B. diporus* del nordeste argentino. Adicionalmente y en concordancia con el trabajo de Valério y col. (2002), se detectó actividad enzimática en el veneno de *B. alternatus* a pesar de que estudios realizados por Ohller y col. (2010) no identificaron PDEs en su proteoma. Si bien en la especie *B. diporus*, la PDE se encuentra en menor proporción que en el veneno de *C. d. terrificus*, se podría pensar que sus isorformas son más activas y presentan mayor actividad enzimática.

Los estudios de reactividad cruzada con los anticuerpos anti CDT- PDE (Dot-Blot) muestran un grado de similitud estructural entre las PDEs de los venenos botrópicos y crotálicos. Sin embargo, la menor intensidad de color de los venenos botrópicos pone en evidencia que las serpientes pertenecen a diferentes géneros.



### **CONCLUSIONES**

En el presente trabajo se concluye que la enzima PDE de *C.d. terrificus* produce una respuesta humoral efectiva en ratones. Si bien la inmunización generó anticuerpos capaces de neutralizar la actividad PDE, se requiere de altas dosis para asegurar el bloqueo completo de la enzima.

Los anticuerpos obtenidos fueron además capaces de identificar a PDEs presentes en venenos botrópicos de importancia sanitaria en el nordeste argentino.

En futuros trabajos podrían emplearse dichos anticuerpos, como herramienta para la detección de PDEs en otros venenos, así como en la purificación de estas enzimas por cromatografía de afinidad (usando los anticuerpos como ligandos de resinas cromatográficas) de manera de mejorar el rendimiento.

**BIBLIOGRAFÍA**

Alexander, G., et al., Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombinlike enzyme. *Toxicon*, 1988. 26(10): p. 953-60. 84.

Álvarez, B.B., et al., Atlas de anfibios y reptiles de las provincias de Corrientes, Chaco y Formosa (Argentina)2002, Corrientes: Editorial Universitaria de la Universidad Nacional del Nordeste. 156.

Azevedo-Marques, M.M., et al., Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon*, 1985. 23(4): p. 631-6

Babkina, G. T., & Vasilenko, S. K. (1964). NUCLEASE ACTIVITY OF THE VENOMS OF CENTRAL ASIAN SNAKES. *Biokhimiia* (Moscow, Russia), 29, 268.

B.J. Berger, A.R. Bhatti, Snake venom components and their cross-reactivity: a review, *Biochemistry and Cell Biology* 67(9) (1989) 597-601.

Beghini, D.G., et al., Anti-sera raised in rabbits against crotoxin and phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* venom neutralize the neurotoxicity of the venom and crotoxin. *Toxicon*, 2004. 44(2): p. 141-8.

Bieber, A., Metal and nonprotein constituents in snake venoms, in *Snake venoms*1979, Springer. p. 295-306

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

Cabana, E.Q. and R. Riguera, Nomenclatura y formulación de los compuestos inorgánicos: una guía de estudio y autoevaluación1996: McGraw-Hill Interamericana de España.

Cardoso, J.L.C., et al., Parte I. Ofidismo, in *Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*2003, SARVIER: São Paulo. p. 1-135.

Cei, J.M., 1993. Reptiles del noroeste, nordeste y este de la Argentina: Herpetofauna de las selvas subtropicales, Puna y Pampas

Céspedes-Vargas, J., Barco-Huayta, N. M., & Arnez-Aguilar, M. (2011). Accidente ofídico por serpiente cascabel: A propósito de un caso. *Revista Médico-Científica "Luz y Vida"*, 2(1), 68-71.

Chotwiwatthanakun, C., et al., Production of potent polyvalent antivenom against three elapid venoms using a low dose, low volume, multi-site immunization protocol. *Toxicon*, 2001. 39(10): p. 1487-94

Croce, P., 2007. <http://ofidios.blogspot.com/2008/10/accidente-bothropico.html>. Ofidios venenosos.

Dhananjay, B.L., D'Souza, C.J.M., 2009. An overview on nucleases (DNase, RNase, and phosphodiesterase) in snake venoms. *Biochemistry (Moscow)* 75, 1–6. Du, X.-Y., Clemetson, K.J., 2002. Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon* 40, 659–665.

Dürschlag, M., Würbel, H., Stauffacher, M., Von Holst, D., 1996. Repeated blood collection in the laboratory mouse by tail incision—modification of an old technique. *Physiology & behavior* 60, 1565-1568.

Faure, G., et al., Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action. *Eur J Biochem*, 1993. 214(2): p. 491-6.

Fox, J. W. (2013). A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: l-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. *Toxicon*, 62, 75-82.

Furtado, M.F.D., Santos, M.C., Kamiguti, A.S., 2003. Age-related biological activity of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 9, 186-201.

Fusco LS, F.T., Rapp I, Hyslop S, Leiva LC 2017. Caracterización de la fracción fosfodiesterasa del veneno de *Crotalus durissus terrificus*. In XXIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2017. Edited by UNNE, Resistencia.

Fusco, LS., Neto, E., Aleff, F., Alfonso, J., Siqueira, C., Leiva, L., Pimenta, D., Soares, A., 2019. Snake venomomics of *Crotalus durissus terrificus* from Argentina. 20th World Congress of the International Society on Toxinology.

Gay, C., Sanz, L., Calvete, J., & Pla, D. (2016). Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops diporus*, a medically important pitviper in northeastern Argentina. *Toxins*, 8(1), 9.

Georgieva, D., et al., Snake Venomic of *Crotalus durissus terrificus*-Correlation with Pharmacological Activities. *Journal of proteome research*, 2010. 9(5): p. 2302-2316.

Giraud, A. R. 2001. Diversidad de serpientes de la selva Paranaense y del Chaco Húmedo: Taxonomía, biogeografía y conservación. Monografía 17. Literature of Latin America, Buenos Aires.

Gutiérrez, J. M., & Cerdas, L. (1984). Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. *Revista de Biología Tropical*, 32(2), 213-221.

Gutiérrez, J.M, Avila, C., Rojas, E., Cerdas, L., 1988. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon* 26, 411-413.

Gutiérrez, J., Clinical toxicology of snakebite in Central America. *Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons*, 1995: p. 645-665.

Gutiérrez, J.M., Williams, D., Fan, H.W., Warrell, D.A., 2010. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon* 56, 1223-1235.

Hawgood, B.J. and J.W. Smith, The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the phospholipase A-crotapotin complex isolated from venom of the South American rattlesnake. *Br J Pharmacol*, 1977. 61(4): p. 597-606.

Hendon, R.A. and H.Fraenkel-Conrat, Biological roles of the two components of crotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1971. 68(7): p. 1560-3.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680.

Mackessy, S. P. (1985). Fractionation of red diamond rattlesnake (*Crotalus ruber ruber*) venom: protease, phosphodiesterase, L-amino acid oxidase activities and effects of metal ions and inhibitors on protease activity. *Toxicon*, 23(2), 337-340.

Margni, R.A., 1995. Inmunología e Inmunoquímica. Ed Panamericana Buenos Aires Argentina. Mathews, C.K.V.H., K.E; Ahern, K.G 2003. Bioquímica.

Martino, O., Mathet, H., Masini, R. D., Ibarra Grasso, A., Thompson, R., Gondell, C., & Bosch, J. (1979). Emponzoñamiento humano provocado por venenos de origen animal. Secretaría de Salud de la República Argentina, Buenos Aires, 151-197.

Marunak, S.L., et al., Mice plasma fibrinogen consumption by thrombin-like enzyme present in rattlesnake venom from the north-east region of Argentina. *Medicina (B Aires)*, 2004. 64(6): p. 509-17

Öhler, M., Georgieva, D., Seifert, J., von Bergen, M., Arni, R.K., Genov, N., Betzel, C., 2010. The venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. *Journal of Proteome Research* 9, 2422-2437

Passero, L.F., et al., Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. *Parasitol Res*, 2007. 101(5): p. 1365-71.

Peng, L., Xu, X., Guo, M., Yan, X., Wang, S., Gao, S., & Zhu, S. (2013). Effects of metal ions and disulfide bonds on the activity of phosphodiesterase from *Trimeresurus stejnegeri* venom. *Metallomics*, 5(7), 920-927.

Rangel-Santos, A., et al., A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Toxicon*, 2004. 43(7): p. 801-10.

Rodríguez, J.P., et al., Rabbit IgG antibodies against phospholipase A2 from *Crotalus durissus terrificus* neutralize the lethal activity of the venom. *Medicina (B Aires)*, 2006. 66(6): p. 512-6

Rodríguez, J. P., Gay, C. C., Fusco, L. S., Gauna, M. C., Acosta, O. C., & Leiva, L. C. (2012). Cross-neutralization of the coagulant activity of *Crotalus durissus terrificus* venom from the northeast of Argentina by bivalent bothropic antivenom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 18(1), 116-123.

Ruiz de Torrent, R.M., et al., Neurotoxicological effects of a thrombin-like enzyme isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom (preliminary study). *Toxicon*, 2007. 50(1): p. 144-52. 85

Salcedo P. Guías para manejo de urgencias: Accidente ofídico; 2005. p.1033-44

Santoro, M.L., et al., Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 1999. 122(1): p. 61-73

Scrocchi, G.J., ed. Serpientes del Noroeste Argentino. 2006, Fundación Mario Lillo: Tucumán, Argentina

Slotta, K. H., & Fraenkel-Conrat, H. (1938). Two active proteins from rattlesnake venom. *Nature*, 142(3587), 213.

Tay-Zavala, J., Castillo-Alarcón, L., & Romero-Cabello, R. (2014). Tratamiento de las mordeduras por serpientes ponzoñosas. *Salud Publica de Mexico*, 23(5), 457-472.

Theakston, R. D. G. (1983). The application of immunoassay techniques, including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), to snake venom research. *Toxicon*, 21(3), 341-352.

Uetz, P., 2000. How many reptiles species? *Herpetological Review* 31:13-15.

UZAWA, S. (1932). Über die phosphomonoesterase und die phosphodiesterase. *The Journal of Biochemistry*, 15(1), 19-28

Valério, A. A., Corradini, A. C., Panunto, P. C., Mello, S. M., & Hyslop, S. (2002). Purification and characterization of a phosphodiesterase from *Bothrops alternatus* snake venom. *Journal of protein chemistry*, 21(8), 495-503.

Vallecillo, M. F. S., Gamboa, G. V. U., Palma, S. D., Harman, M. F., Chiodetti, A. L., Morón, G., & Maletto, B. A. (2014). Adjuvant activity of CpG-ODN formulated as a liquid crystal. *Biomaterials*, 35(8), 2529-2542.

Vera-Sanabria, M. B., & Ríos-González, C. M. (2018). CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE OPHIDIC ACCIDENTS OF A REGIONAL HOSPITAL OF PARAGUAY, 2010 TO 2016. *Revista del Instituto de Medicina Tropical*, 13(2), 21-30.

World Health Organization, W., 2010. WHO guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1-34

#### Justificación del trabajo

Si bien es discutido el rol de las PDE en la intoxicación crotálica, hasta el presente se postula que las PDEs junto a otras nucleasas como producto de degradación enzimática generan adenosina. La adenosina es considerada una toxina sistémica que entre otros efectos genera hipotensión e inmovilización de la presa (Mackessy, S. P., 1985). En el presente trabajo nosotros evaluamos la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti CDT-PDE.