



XXVII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas

Orden Poster: CM-018 (ID: 2242)

Autor: Lopez, Gisela Lumila

Título: Evaluación de un antiveneno botrópico producido por un inmunógeno experimental

Director: Leiva, Laura Cristina Ana

Co-Director: Fusco, Luciano Sebastian

Palabras clave: B. diporus, EDTA-Na₂, SVMPs, antiveneno

Área de Beca: Cs. De La Salud

Tipo Beca: Conicet

Periodo: 01/04/2020 al 31/03/2025

Lugar de trabajo: Iquiba Nea - Inst. De Química Básica Y Aplicada Del Nordeste Argentino

Proyecto: (21V001) Producción Experimental de suero antiofídico. Estudio centrado en nuevos adyuvante inmunológicos.

Resumen:

El veneno de *B. diporus* es altamente proteolítico, hemorrágico, miotóxico y coagulante. Los sueros antiofídicos continúan siendo el único tratamiento frente a las intoxicaciones provocadas por mordeduras de serpientes. Los anticuerpos, que componen el mismo, se obtienen de animales inmunizados previamente con las toxinas del veneno. Las secreciones de serpientes botrópicas, típicamente hemorrágicas por la presencia de metaloproteinasas (SVMPs) producen daño local en el sitio de la inyección y sistémico, afectando de esta manera la salud y el bienestar de los animales productores de suero. Con la búsqueda de nuevos inmunobiológicos, de bajo impacto orgánico, en un trabajo previo, se evaluó como inmunógeno el veneno de *B. alternatus* bloqueado en sus SVMPs con EDTA-Na₂, eliminándose el excedente del quelante por cromatografía de exclusión molecular. Los resultados mostraron una adecuada respuesta inmune y reducción del daño local en el animal productor. Este hallazgo generó el interés en realizar un estudio similar sobre el veneno de *B. diporus*. Así, se evaluó el efecto in vitro del EDTA-Na₂ sobre las enzimas del veneno comprobándose que el mismo no solo bloquea a las SVMPs, sino que también a otras enzimas (al menos parcialmente). En el presente trabajo se evaluó la respuesta inmune de animales inoculados con veneno de *B. diporus* bloqueado con el agente quelante EDTA-Na₂. Para esta propuesta, el veneno de *B. diporus* (1,9 mg/mL) se pre-incubó con EDTA-Na₂ (200 mM) eliminando el excedente del agente quelante, mediante exclusión molecular (Sephadex G-25), y por el mismo procedimiento cromatografico fue sometido el veneno sin inhibidor. Las fracciones de interés se recolectaron y reunieron en un pool, denominándolos v.B.d/EDTA y v.B.d respectivamente. Previo a su uso como inmunógenos, se controló la capacidad bloqueante del EDTA sobre las SVMPs presentes en el pool v.B.d/EDTA mediante ensayo con azocaseína como sustrato.

El plan de inmunización consistió en dos protocolos, uno de bajas dosis (7-30 µg /ratón) y otro de altas dosis (14-60 µg/ratón) para cada muestra v.B.d o v.B.d/EDTA. El grupo control recibió solución salina (ss) en el inóculo. La muestra (v.B.d, v.B.d/EDTA ó ss) se emulsionó con adyuvante Freund completo e inoculó en grupos de 5 ratones (BALB-c) por vía subcutánea, repitiendo el proceso (con adyuvante incompleto) cada 15 días, en un lapso de 45 días, con dosis crecientes de v.B.d ó v.B.d/EDTA. Previo a cada inoculación (24 hs) se tomaron muestras de sangre de la punta de la cola de los animales, para análisis por test de ELISA. En el día 45, al finalizar los planes de inmunización, las muestras de sangre se obtuvieron sin anticoagulante. Los sueros de ratones inmunizados con las muestras v.B.d, v.B.d/EDTA y solución salina se denominaron anti-v.B.d, anti-v.B.d/EDTA y anti-ss respectivamente. Los mismos fueron destinados a realizar ensayos de inmunotransferencia (Western Blot), con el fin de evaluar la capacidad en reconocer los componentes del veneno entero y test de ELISA para cuantificar la respuesta inmune de los animales.

Los resultados obtenidos demostraron que el anti-v.B.d/EDTA presenta capacidad similar a la de anti-v.B.d en reconocer las principales proteínas de dicha secreción ofídica. El estudio por enzimoimmuno ensayo (ELISA), mostró que el título de anticuerpos obtenido al finalizar el protocolo de inmunización del anti-v.B.d/EDTA no diferente significativamente ($p > 0,01$) del título que arrojó el anti-v.B.d. Este resultado deja en evidencia que el EDTA-Na₂ no afecta la inmunogenicidad de las proteínas ya que los animales inmunizados con v.B.d/EDTA responden frente al veneno de *B. diporus* de modo similar a los animales inmunizados con veneno sin bloquear.

Futuros estudios podrán completar la potencialidad de este suero murino experimental, ensayando la eficacia y seguridad. Esta línea de investigación sentará las bases para el diseño de protocolos de inmunización en animales de mayor tamaño (equinos) con el fin de una potencial transferencia a entidades productoras de inmunobiológicos.