



XXVIII Comunicaciones Científicas y Tecnológicas

Orden Poster: CM-041 (ID: 2719)

Autor: Lopez, Gisela Lumila

Título: Perfil inmunológico (IgG) de animales inmunizados con la formulación veneno/EDTA-CpG-ODN/Coa-ASC16 para la producción de suero antiofídico

Director: Leiva, Laura Cristina Ana

Co-Director: Fusco, Luciano Sebastian

Palabras clave: Inmunología, adyuvantes, veneno

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:

Los sueros antiofídicos o antivenenos continúan siendo el tratamiento de elección en las intoxicaciones provocadas por mordeduras de serpientes. Sin embargo, la producción de estos sueros implica la inmunización de animales con venenos de serpientes junto con adyuvantes, lo que puede causar daños locales en el sitio de inoculación y afectar la salud y el bienestar de los animales productores. Con el fin de reducir el efecto adverso de las inmunizaciones, en un trabajo previo, se utilizó EDTA-Na₂ para bloquear las metaloproteinasas (SVMPs) típicamente hemorrágicas del veneno de *B.alternatus* y posteriormente se utilizó como inmunógeno. Los resultados mostraron una adecuada respuesta inmune y reducción del daño local en el animal productor. Por otro lado, la inmunización requiere de estimulantes del sistema inmune, como el adyuvante de Freund, ampliamente usado para la producción de sueros antiofídicos. Sin embargo, este adyuvante produce un considerable daño local, por ello la mejora en la producción de inmunobiológicos también se centra en la búsqueda de adyuvantes alternativos. En este sentido, un nuevo adyuvante en estudio (adyuvante CpG-ODN/Coa-ASC16) resultó de interés ya que demostró producir menos daño orgánico en el animal productor. A partir de estos antecedentes y con el objetivo de diseñar nuevas formulaciones (inmunógeno y adyuvante) de bajo impacto orgánico, en el presente trabajo se evaluó la respuesta inmune (IgG totales, IgG1 e IgG2a) que desencadena el veneno de *B.diporus* tratado con EDTA-Na₂ en combinación con dos tipos de adyuvantes, uno convencional (adyuvante de Freund) y otro alternativo (adyuvante CpG-ODN/Coa-ASC16).

Para esta propuesta, el veneno de *B. diporus* (1,9 mg/mL) se pre-incubó con EDTA-Na₂ (200 mM) y el exceso del agente quelante fue eliminado mediante una cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-25). Asimismo, el veneno sin inhibidor fue sometido al mismo procedimiento cromatográfico. 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 evaluó la capacidad neutralizante del EDTA sobre las SVMPs del pool v.B.d/EDTA mediante un ensayo in vitro, en el cual se utilizó azocaseína como sustrato. Posteriormente ratones CF-1 (n = 5 por grupo) fueron inmunizados por vía subcutánea con las siguientes formulaciones: G1: v.B.d/EDTA + adyuvante de Freund, G2: v.B.d + adyuvante de Freund, G3: v.B.d/EDTA + adyuvante CpG-ODN/Coa-ASC16, G4: v.B.d + adyuvante CpG-ODN/Coa-ASC16. Cada ratón recibió tres inmunizaciones en un período de 45 días, utilizando dosis de 7, 15 y 30 µg (por ratón) respectivamente. El día 45 se realizó el sangrado final (sin anticoagulante) de los grupos G1, G2, G3, G4 y los sueros obtenidos se denominaron suero anti-v.B.d/EDTA-Freund, anti-v.B.d-Freund, anti-v.B.d/EDTA-CpG y anti-v.B.d-CpG respectivamente. Los mismos fueron destinados a realizar ensayos de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para determinar título de IgG total, IgG1 e IgG2a.

Los resultados del ELISA indicaron que tanto la muestra v.B.d/EDTA como la muestra v.B.d formulada con los respectivos adyuvantes (Freund y CpG-ODN/Coa-ASC16) generaron títulos de anticuerpos similares contra el veneno de *B.diporus*. Este resultado deja en evidencia que el agente quelante EDTA-Na₂ no parece afectar la inmunogenicidad de las proteínas, así como el efecto inmunoestimulador de los adyuvantes evaluados. Por otra parte, los animales inmunizados con las diferentes formulaciones (v.B.d/EDTA + adyuvante de Freund, v.B.d + adyuvante de Freund, v.B.d/EDTA + adyuvante CpG-ODN/Coa-ASC16, v.B.d + adyuvante CpG-ODN/Coa-ASC16) presentaron un perfil inmunológico que se caracterizó por la presencia significativa de IgG1 en relación a la IgG2a. Este hallazgo sugiere que el adyuvante alternativo (CpG-ODN/Coa ASC16) desencadena una respuesta inmune similar (IgG1 > IgG2) al adyuvante convencional (Freund).

La formulación alternativa constituida por veneno de *B. diporus* tratado con EDTA-Na₂ junto con el adyuvante CpG-ODN/Coa-ASC16 resultó ser efectiva como inmunógeno. En conclusión, el bloqueo de las toxinas con agentes quelantes y la inclusión de este adyuvante alternativo, resulta en una atractiva e innovadora formulación dada su propiedad no solo por inducir buena respuesta inmunogénica sino también por reducir el impacto orgánico en el animal productor y de esta manera mejorar su bienestar.