

Desarrollo de un procedimiento para la evaluación *in vitro* de la capacidad de neutralización de anti toxina Shiga de un nuevo biofármaco.

Baravalle ME¹, Marelli B^{1,2}, Silvestrini P¹, Rodríguez FM^{1,2}, Ortega HH^{1,2}.

1. Centro de Medicina Comparada, Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada- ICIVET-Litoral, UNL-CONICET. Esperanza, Santa Fe, Argentina.
2. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral. Esperanza, Santa Fe, Argentina. mebaravalle@fcv.unl.edu.ar

El Centro de Medicina Comparada (CMC) (ICIVET-Litoral) realiza actividades dirigidas a la provisión de animales de laboratorio, el desarrollo de modelos experimentales, asesoramiento y desarrollo de ensayos preclínicos, de investigación y vinculación tecnológica, siguiendo las normas vigentes nacionales e internacionales de calidad.

El proceso de investigación y desarrollo de un medicamento tiene distintas etapas: búsqueda del principio activo, etapa preclínica, etapa clínica, registro, lanzamiento del medicamento al mercado y comercialización del mismo. Los estudios preclínicos tienen como objetivo demostrar que el compuesto es aceptable en cuanto a eficacia y seguridad para ser probados en seres humanos o en animales ¹. Sin bien el CMC tiene una amplia trayectoria en ensayos con animales, a lo largo de los últimos años se han diseñado y llevado a cabo diversos protocolos experimentales que han permitido el desarrollo de una gran cantidad de ensayos *in vitro*. Esto se ha visto favorecido con la incorporación de equipamiento específico y recursos humanos capacitados. En este sentido, dentro del área de Cultivo celulares y Ensayos *in vitro* del CMC, se han llevado a cabo en los últimos años ensayos de evaluación de citotoxicidad de fármacos y dispositivos médicos provenientes de distintas empresas, sobre cultivos *in vitro* de líneas celulares.

A través de los Procedimientos Operativos Estandarizados (POEs) las actividades llevadas a cabo en el CMC se estandarizan y se registran. Dentro de ellos, la “Evaluación de la capacidad de neutralización de anti toxina Shiga, sobre el efecto de las toxinas Shiga en cultivos *in vitro*” consiste en un POE dentro del Área Analítica del CMC que se realiza para un demandante que ha desarrollado un tratamiento para Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), que se encuentra actualmente en etapa de ensayos clínicos para su registro ante ANMAT, FDA y EMA. Este ensayo es llevado a cabo por personal capacitado y entrenado (que incluye graduados y estudiantes de las carreras de Medicina Veterinaria, Biotecnología y Bioquímica) y cuyos datos quedan asentados para el uso exclusivo del comitente y archivados en el CMC.

Las toxinas Shiga son una familia de toxinas (Stx1 y Stx2) cuyos genes son parte del genoma de los profagos lambdoide. Las toxinas son llamadas Shiga por Kiyoshi Shiga, quien fue el primero en describir el origen bacteriano de la diarrea causada por *Shigella dysenteriae*. El origen más común de toxinas Shiga son las bacterias *S. dysenteriae* y el grupo Shigatoxigénico de *Escherichia coli* (STEC) ². Por otro lado, la denominada anti toxina corresponde a una fracción F(ab')₂ de inmunoglobulina equina hiperinmune anti toxina Shiga que se obtiene por procesamiento de sueros de equinos inmunizados con las toxinas. El antisuero equino es capaz de neutralizar la toxina en el torrente sanguíneo de otro ser vivo con el uso de cantidades muy bajas del antisuero terapéutico procesado y purificado.

En relación a lo anteriormente expuesto el objetivo de este trabajo es determinar el título (IC₅₀) de anti toxina capaces de neutralizar el efecto citotóxico de una cantidad constante de toxina Shiga (Stx1/Stx2) sobre un cultivo *in vitro* de células VERO. La finalidad fue que la empresa que ha desarrollado el tratamiento, disponga de un método validado para el análisis de los diferentes lotes del producto farmacéutico destinado al tratamiento del SUH.

VII JORNADA DE DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN

Noviembre 2019. Esperanza, Santa Fe, Argentina.

Área temática: **SALUD ANIMAL**

La línea celular VERO que se utiliza fue aislada a partir de las células epiteliales del riñón de un mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). El método se realiza por triplicado (3 réplicas) y consiste en exponer un cultivo de células VERO a una cantidad constante de Stx1 y Stx2, y evaluar la anti toxina en diluciones seriadas cubriendo el rango desde efecto neutralización mínima hasta neutralización total, para estimar a través de un ajuste matemático, el título de anti toxina capaz de neutralizar el 50% del efecto tóxico máximo. Se define como IC50 a la cantidad de preparación de anticuerpo (en este caso expresado en título) que inhibe el 50% de la capacidad inhibitoria máxima de una sustancia sobre una función biológica específica. Para la determinación de citotoxicidad se utiliza la Tinción con solución de cristal violeta y medición de densidad óptica (DO).

La determinación de la viabilidad celular constituye uno de los métodos moleculares fundamentales para evaluar el grado de toxicidad celular que tiene una sustancia sobre células en cultivos *in vitro*. Este método permite medir la masa celular total mediante lectura de DO y esta DO es directamente proporcional al número de células vivas en el pocillo ³.

Se grafica la DO en función del log10 de la concentración de la anti toxina y se evalúa el ajuste de la curva graficada a la función sigmoidea mediante el ajuste “no lineal” para determinar el valor de título ($\mu\text{g/ml}$) correspondiente al IC50. Por otro lado se determina además el valor de R2, el coeficiente de variación porcentual (CV%), los límites superior (Ls) e inferior (Li) y los grados de libertad (GL). Con estos datos se determina el valor de IC50 promedio ponderado de las 3 réplicas de los ensayos. Finalmente, con los datos registrados y los cálculos realizados se elabora un informe final del protocolo el cual se envía al comitente para su análisis.

La evaluación de la capacidad de neutralización de inmunoglobulina equina hiperinmune anti toxina Shiga, sobre el efecto tóxico de las toxinas Shiga en cultivos de células VERO es una metodología analítica, que ha sido validada en el CMC y aceptada por la autoridad regulatoria (ANMAT) como un indicador de potencia de la anti toxina como parte de su documentación de registro.

Bibliografía

- 1- Escalona Arranz, J.C.; Carrasco Velar, R.; Padrón García, J.A. (2008). Introducción Al Diseño Racional de Fármacos. Editorial Universitaria.
https://www.researchgate.net/publication/235976924_Introduccion_al_diseno_racional_de_farmacos.
- 2- Beutin L. (2006). Emerging enterohaemorrhagic Escherichia coli, causes and effects of the rise of a human pathogen. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 53 (7): 299-305.
- 3- Chiba K, Kawakami K, Tohyama K. (1998). Simultaneous Evaluation of Cell Viability by Neutral Red, MTT and Crystal Violet Staining Assays of the Same Cells. Toxicology *in Vitro* 12: 251-258.