

APLICACIÓN DE UNA TÉCNICA DE ENZIMO-INMUNO ENSAYO PARA LA EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS TOTALES EN ROEDORES SIGMODONTINOS

Sferco María

*ICIVET LITORAL-UNL-CONICET
Facultad de Ciencias Veterinarias UNL
Director/a: Racca Andrea Laura*

Área: Ciencias Biológicas

INTRODUCCIÓN

La salud de animales silvestres es actualmente objeto de creciente interés debido a su alta relevancia para la salud pública, conservación de especies y producción animal. Estudios recientes indican que la inmunocompetencia de los individuos de una población es un factor crucial para explicar las dinámicas de patógenos en sistemas naturales. Es por ello que para un mejor entendimiento de la interacción entre las dinámicas de salud del hospedador y las infecciones en poblaciones silvestres es necesario desarrollar herramientas que nos permitan medir con detalle la inmunocompetencia de los hospederos y la aptitud de diferentes compartimentos de su sistema inmune.

Teniendo en cuenta la falta de anticuerpos comerciales que nos permitan detectar anticuerpos de especies silvestres, nos proponemos evaluar la reactividad cruzada de anticuerpos disponibles en el mercado.

OBJETIVOS

- Verificar la especificidad de anticuerpos (Ac) comerciales (anti-rata, anti-ratón) para el reconocimiento de Ac de especies roedores silvestres mediante técnica de western blot.
- Aplicar la técnica de ELISA para evaluar anticuerpos totales utilizando el anticuerpo comercial previamente seleccionado.

Título del proyecto: "Influencia de estresores crónicos sobre la relación hospedador-parásito: ¿resistir o tolerar?"

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica Tecnológica

Director/a: Pablo B. Beldomenico

Metodología:

La especificidad de anticuerpos comerciales específicos para inmunoglobulinas de rata y ratón (anti-Igs de rata y anti-Igs de ratón) fue evaluada hacia inmunoglobulinas de diferentes roedores silvestres (*Akodon azarae*, *Oligoryzomys nigripes*, *Oligoryzomys flavescens*, *Calomys venustus*). Estas especies fueron seleccionadas por ser las más abundantes en la zona de muestreo seleccionada: eco-región del Espinal en las provincias de Santa Fe (departamento Las Colonias y Capital). La captura de los individuos tuvo lugar entre junio 2014 y julio 2016, en 4 parcelas de muestreo de 0,5 ha en pastizales naturales ubicadas en:

1. Reserva de la Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja (UNL) (31°22'2.33"S 60°51'39.46"O)
2. Campo A sobre la Ruta Provincial 6 (31°22'5.19"S 60°53'7.12"O)
3. Campo B sobre Ruta Provincial 6 (31°20'45.27"S 60°57'13.09"O)
4. Campo C sobre el arroyo Cululú. (31°22'54.19"S 60°55'6.17"O).

Como primer paso se evaluó mediante técnica de *Western blot* (en condiciones desnaturalizantes de proteínas) la especificidad de los anticuerpos comerciales disponibles: anti-Igs totales de rata y anti-Igs totales de ratón de Abcam, marcado con peroxidasa (conjugado). Brevemente: proteínas séricas (10 mg totales) de cada una de las especies de roedores de vida libre (detallados anteriormente) obtenidas de los muestreos fueron separadas por electroforesis. Para cada especie se utilizó un pool de suero correspondiente a 10 individuos. La corrida se realizó a pH=8,3 durante dos horas. Una vez finalizado este proceso, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrato de celulosa, durante 3 horas a pH=9,2. Como primer paso de la inmunodetección se realizaron 5 lavados con buffer 0,1% Tween-20 en buffer TBS y luego el bloqueo de la membrana con leche descremada al 5% en el mismo buffer durante 4 horas, se volvió a lavar con la misma solución. Posteriormente, se incubó la membrana con la dilución 1/75000 del anticuerpo comercial (anti-rata o anti-ratón). La reacción antígeno-anticuerpo se reveló mediante quimioluminiscencia. Se evaluó la intensidad de cada banda obtenida. La ausencia de banda fue considerada como no reaccionante (ausencia de reactividad cruzada). Como control de la especificidad de los anticuerpos comerciales se evaluaron además sueros de rata (*Rattus norvegicus*) y ratón (*Mus musculus*).

Una vez comprobado la interacción de los anticuerpos comerciales con inmunoglobulinas de las especies de roedores de vida libre seleccionadas se procedió a la evaluación de una técnica de enzimo-inmuno ensayo (EIA) directa para la detección de anticuerpos totales. Brevemente: placas de 96 pocillos fueron sensibilizadas con diferentes diluciones de suero seriadas al medio de cada una de las especies mencionadas. Además se evaluaron muestras séricas de *Mus musculus* (tanto ratón de laboratorio como silvestre) y *Rattus norvegicus* (en este caso proveniente de animales inmunizados con albúmina sérica bovina y de animales que no han tenido contacto con ningún inmunógeno –no inmunizadas-). Luego del bloqueo (leche descremada al 5%) y de los lavados correspondientes con PBS Tween al 0,1%, se agregó la dilución correspondiente a cada conjugado: anti-inmunoglobulinas totales de rata o anti-inmunoglobulinas totales de ratón marcado con peroxidasa. Se probaron diferentes diluciones: 1/1000-1/10000-1/20000. El revelado se realizó utilizando una solución que contenga el cromógeno de la reacción (TMB). La reacción enzimática se detuvo con ácido clorhídrico y la lectura se realizó a 450 nm en un lector de ELISA. Cada determinación se realizó por duplicado y por cada ensayo se realizó un blanco de muestra y un blanco de

conjugado. Las concentraciones y diluciones de trabajo fueron determinadas experimentalmente.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

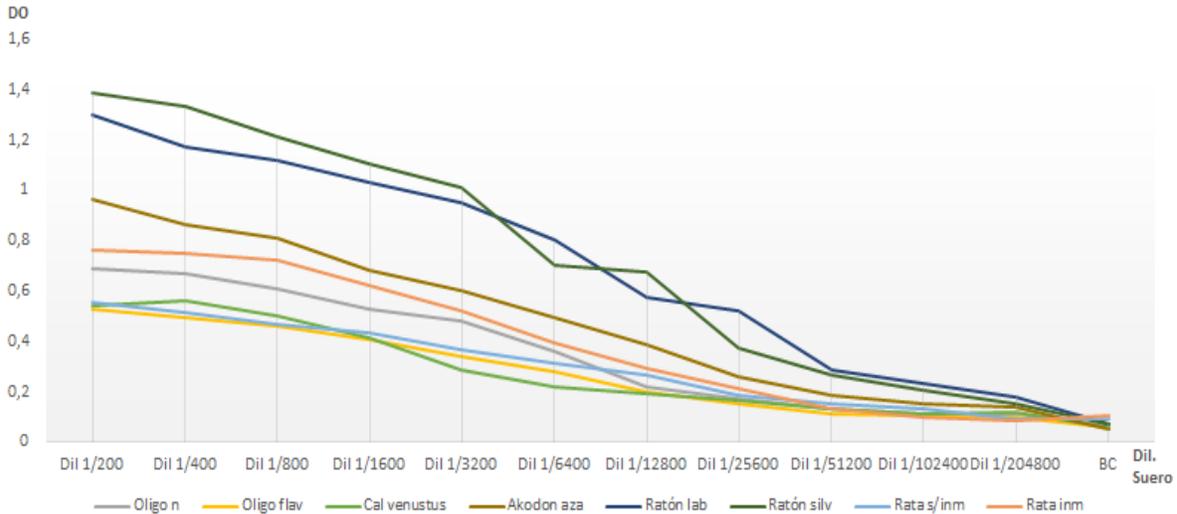


Gráfico 1: Gráfico de líneas que muestra la relación entre las densidades ópticas (DO) vs la dilución de suero de cada una de las especies, utilizando **anti-IgG totales de ratón** marcado con peroxidasa (Abcam) en una dilución 1/10.000.

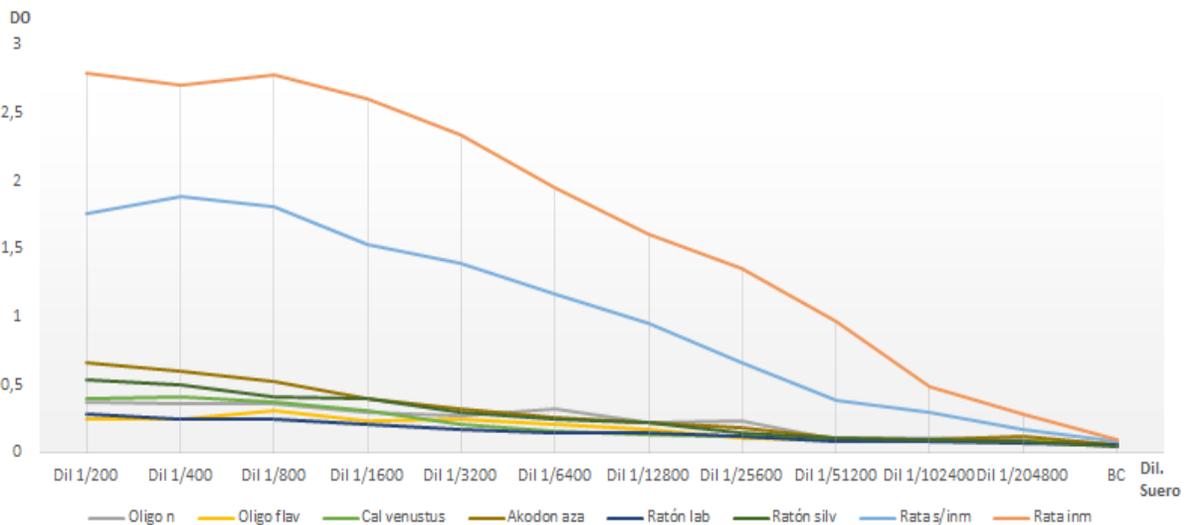


Gráfico 2: Gráfico de líneas que muestra la relación entre las densidades ópticas (DO) vs la dilución de suero de cada una de las especies, utilizando **anti-IgG totales de rata** marcado con peroxidasa (Abcam) en una dilución 1/10.000.

En primera instancia se pudo comprobar mediante ensayos de Western blot (en condiciones desnaturizantes de proteínas) que ambos anticuerpos comerciales (Abcam) anti-

Igs totales de rata y anti-Igs totales de ratón marcado con peroxidasa interaccionaron con las muestras séricas de roedores de vida libre, dando como resultado bandas de revelado de diferentes intensidades. Se observaron bandas únicas correspondientes a cadenas livianas (25kDa) y pesadas (aproximadamente 150kDa) de los anticuerpos.

Posteriormente se puso a punto el EIA directo según se describe en el punto de Metodología utilizando diferentes diluciones de las muestras de suero. La dilución óptica de conjugado a utilizar fue 1/10.000 y la lectura de densidades ópticas fue a los 15 minutos del corte de la reacción enzimática. Mediante este ensayo se pudo verificar que ambos anticuerpos comerciales son de utilidad para la evaluación de los niveles de anticuerpos en especies seleccionadas de roedores silvestres, aunque con diferencia en su sensibilidad. Las muestras de especies de vida libre evaluadas con anti-Igs totales de ratón presentaron mayor sensibilidad que las evaluadas con anti Igs totales de rata. Esta mayor sensibilidad se presentó en el rango de diluciones correspondientes entre 1/200 y 1/1600. A partir de estos resultados queda por evaluar Ac totales y Ac naturales de muestras individuales de los roedores silvestres y su aplicación a los estudios eco-epidemiológicos.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Abolins, S.R., Pocock, M.J.O., Hafalla, J.C.R., Riley, E.M., Viney, M.E.** (2011). Measures of immune function of wild mice, *Mus musculus*. *Mol. Ecol.* 20, 881–892.
- Beldomenico, PM.** (2006). Medicina y animales silvestres: desafío para las ciencias veterinarias en el siglo xxi. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias* 5: 7-20.
- Beldomenico, PM y Begon, M.** (2010). Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles?. *Trends in Ecology & Evolution* 25: 21 – 27.
- Demas GE, et al.** (2011). Beyond phytohaemagglutinin: assessing vertebrate immune function across ecological contexts. *J Anim Ecol.* 80:710-30.
- French, S.S., Denardo, D.F., Moore, M.C.** (2007). Trade-offs between the reproductive and immune systems: facultative responses to resources or obligate responses to reproduction?. *Am. Nat.* 170: 79–89.
- Graham, A.L., Shuker, D.M., Pollitt, L.C., Auld, S.K.J.R., Wilson, A.J., Little, T.J.** (2011). Fitness consequences of immune responses: strengthening the empirical framework for ecoimmunology. *Funct. Ecol.* 25: 5–17.
- Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL & Daszak P** (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451: 990-993.
- Lee, K.A.** (2006). Linking immune defenses and life history at the levels of the individual and the species. *Integr. Comp. Biol.* 46: 1000–1015,
- Lochmiller, R.L., Deerenberg, C.** (2000). Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity?. *Oikos* 88: 87–9.
- Martin, L.B., Weil, Z.M., Nelson, R.J.** (2007). Immune defense and reproductive pace of life in *Peromyscus* mice. *Ecology* 88: 2516–2528.
- Ochsenbein, A.F., Zinkernagel, R.M.** (2000). Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol. Today* 21: 624–630.
- Panda, S., Ding, J.L.** (2015). Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *J. Immunol.* 194: 13–20.
- Sandmeier, F.C., Tracy, C.R., Dupré, S., Hunter, K.** (2012). A trade-off between natural and acquired antibody production in a reptile: implications for long-term resistance to disease. *Biol. Open* 1–5.