



Consejo Directivo
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Pampa

RESOLUCIÓN Nº 050/2020

GENERAL PICO, 07 de Mayo de 2020.-

VISTO:

La evaluación positiva enviada por integrantes del Comité Científico de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, respecto del Proyecto de Investigación: "Toxicidad del veneno de *Bothrops ammodytoides* ("YARARÁ ÑATA") de la provincia de La Pampa y su neutralización por antivenenos de uso terapéutico" y,

CONSIDERANDO:

Que participa en carácter de Directora la Esp. Lic. María de los Ángeles BRUNI, como Asesor el Dr. Adolfo ROODT (Director del Área de Investigación y Desarrollo de Biológicos del A.N.L.I.S. Dr. Carlos Malbrán), en carácter de Investigadora la Dra. Mariángeles CLAUZURE, como Asistentes de Investigación el egresado Nahuel MAREGA y el estudiante Claudio RUIZ, en carácter de Personal de Apoyo el Prof. Ademar Manuel FUNK (Director de Eco Parque de América), todos pertenecientes a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, a excepción del Dr. Adolfo ROODT y del Prof. Ademar Manuel FUNK.

Que tendrá una duración de sesenta (60) meses, a partir del 01 de Enero de 2020 y hasta el 31 de Diciembre de 2024

Que de acuerdo a la presentación el citado proyecto es de Investigación Aplicada.

Que participa en su desarrollo el Departamento de Ciencias Básicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNLPam y el Complejo Ecológico América (Eco Parque América), y el Instituto Nacional de Producción de Biológicos. A.N.L.I.S. Dr. Carlos Malbrán (CABA).

Que el citado proyecto ha sido presentado de acuerdo con las normas vigentes y aprobado por el Comité Científico de la Facultad.

Que el Artículo 5º Anexo I de la Resolución Nº 100/99 y su modificatoria Nº 88/02 del Consejo Superior, estipula que: "Todo Programa y todo Proyecto de Investigación que obtenga dos (2) evaluaciones externas favorables será acreditado mediante resolución del Consejo Directivo de cada Facultad a la que pertenezca".

Que cuenta con dos (2) evaluaciones externas satisfactorias, de acuerdo con lo previsto en la Resolución Nº 100/99 y Nº 88/02 del Consejo Superior de la Universidad Nacional de La Pampa.

Que las evaluaciones fueron realizadas por el Dr. Héctor TARABLA (UNL) y el Dr. Pedro ZEINSTEGER (UNLP).

Que dicho proyecto cuenta con la aprobación del formulario del protocolo Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación bajo la responsabilidad el Consejo Asesor Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Experimentación (CAICUAE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa.



Consejo Directivo
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
Universidad Nacional de La Pampa

Corresponde a Resolución N° 050/2020

//2.-

Que en Sesión Ordinaria del Consejo Directivo del día 07 de Mayo de 2020, puesta la acreditación del Proyecto de Investigación a consideración de los Sres. Consejeros, es aprobada por unanimidad.

POR ELLO:

EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

RESUELVE:

ARTICULO 1º: Acreditar como Proyecto de Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, el proyecto denominado: "Toxicidad del veneno de *Bothrops ammodytoides* ("YARARÁ ÑATA") de la provincia de La Pampa y su neutralización por antivenenos de uso terapéutico", dirigido por la Esp. Lic. María de los Ángeles BRUNI, contando con la participación en carácter de Asesor del Dr. Adolfo ROODT (Director del Área de Investigación y Desarrollo de Biológicos del A.N.L.I.S. Dr. Carlos Malbrán), en carácter de Investigadora la Dra. Mariángeles CLAUZURE, en carácter de Asistentes de Investigación el egresado Nahuel MAREGA y el estudiante Claudio RUIZ, en carácter de Personal de Apoyo el Prof. Ademar Manuel FUNK (Director de Eco Parque de América), todos pertenecientes a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, a excepción del Dr. Adolfo ROODT y del Prof. Ademar Manuel FUNK, el cual tiene trece (13) folios y que se adjunta como Anexo I de la presente Resolución.

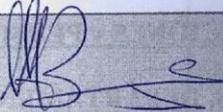
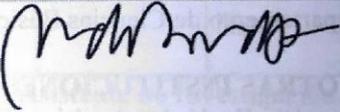
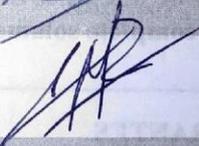
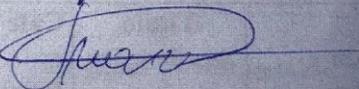
ARTICULO 2º: El Proyecto de Investigación tendrá una duración de sesenta (60) meses, a partir del 01 de Enero de 2020 y hasta el 31 de Diciembre de 2024.

ARTICULO 3º: Justificar los gastos que se produzcan de pasajes, viáticos, combustibles, aparatos, material de laboratorio, etc., del citado proyecto.

ARTÍCULO 4º: Regístrese, comuníquese, tomen conocimiento los interesados, Secretaría de Investigación, Posgrado y Extensión. Cumplido, archívese.

Presidente
Consejo Directivo
Facultad de Ciencias Veterinarias
UNLPam

ANEXO I

INTEGRANTES	FIRMA
Bruni, María de los Angeles	
De Roodt, Adolfo	
Clauzure, Mariángeles	
Ruiz, Claudio	
Marega, Nahuel	
Adelmar Funk	

Esp. M.V. María Carolina Miguel

Secretaria de Investigación, Posgrado y Extensión

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional de La Pampa

Por medio de la presente me dirijo a Ud. a efectos de comunicarle que tengo el agrado de formar parte del proyecto de investigación "TOXICIDAD DEL VENENO DE *Bothrops ammodytoides* ("YARARÁ ÑATA") DE LA PROVINCIA DE LA PAMPA Y SU NEUTRALIZACION POR ANTIVENENOS DE USO TERAPEUTICO" dirigido por la Esp. María de los Ángeles Bruni.

Sin otro particular hago propicia la oportunidad para saludarle muy atte.



Prof. Adelmor Funk



Número de Proyecto:

Año:

(No llenar)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA
Facultad de Ciencias Veterinarias

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

1.1. TÍTULO del PROYECTO: Toxicidad del veneno de *Bothrops ammodytoides* ("YARARÁ ÑATA") de la provincia de La Pampa y su neutralización por antivenenos de uso terapéutico.

1.2. TIPO de INVESTIGACIÓN: Aplicada

1.3. CAMPO de APLICACIÓN PRINCIPAL: (Ver Códigos en Planilla Adjunta)

1.4. CAMPOS de APLICACIÓN POSIBLES: (Ver Códigos en Planilla Adjunta)

1.5 ÁREA DE CONOCIMIENTO: Médicas y de la Salud

1.6 SUBÁREA DE CONOCIMIENTO: Medicina Básica. Ciencias de la Salud

2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO

2.1. AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS: Departamento de Ciencias Básicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNLPam

2.2. OTRAS INSTITUCIONES: El Complejo Ecológico América (Eco parque América), y el Instituto Nacional de producción de Biológicos. A.N.L.I.S. Dr. Carlos Malbrán (CABA)

2.3. EQUIPO de TRABAJO**2.3.1. INTEGRANTES**

Apellido y Nombre	CUIL	Título Académico	Categ. Invest	Responsabilidad (1)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo Hs x semana
Bruni, María de los Ángeles	27/20885120-4	Lic. en Ciencias Biológicas	III	D	Biología General	JTP Ex	10 hs
De Roodt,, Adolfo	20/14008191-5	Dr. en Inmunología	I	A	Área de Inv. y Desarrollo de Biológicos del A.N.L.I.S. Dr. Carlos Malbrán	Director	5hs

Clazure, Mariángeles	27/30782086-8	Dra. En Biología	-	I	Biología General-Conicet	Ay 1° S	5hs
Marega, Nahuel	20/37825116-9	Egresado	-	AI	FCV UNLPam		5hs
Ruiz, Claudio	20/32887313-4	Estudiante	-	AI	FCV UNLPam		5hs
Funk, Adelmar Manuel	20/14612147-1	Profesor en Biología		Personal de Apoyo	Director de Eco Parque América		3hs

D: Director, CD: Co-Director, A: Asesor, I: Investigador, AI: Asistente de Investigación.

2.3.1. BECARIOS:

Apellido y Nombre	Organismo que Financia	Tipo de Beca	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

2.3.2. TESISISTAS:

Apellido y Nombre	Título Académico al que Aspira	Título Proyecto de Tesis	Organismo	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem

2.3.3. PERSONAL de APOYO:

Apellido y Nombre	Categoría (Adm., Lab., Campo, etc.)	Tiempo de Dedicac. Hs. /Sem.
Prof. Funk, Adelmar	Director de Eco Parque América	3hs

2.3.4. INVESTIGADORES en PLAN de TESIS:

Apellido y Nombre	Función	Título Proyecto de Tesis	Tiempo de Dedicac. Hs. /Sem.

3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO: (de 1 a 5 años con una sola prorrogas)

3.1. FECHA de INICIO: 01/01/2020

FINALIZACIÓN: 31/12/2024

4. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)

“Yarará ñata” (*Bothrops ammodytoides*) pertenece a la familia viperidae. Son inoculadoras de veneno, endémica de Argentina, abundante en la provincia de La Pampa y causante de la mayoría de los accidentes en animales de la zona. Existen pocos estudios sobre las características bioquímicas e inmunológicas los venenos de *B. ammodytoides* y hasta la fecha no se conocen datos sobre estas serpientes pampeanas. Resultados anteriores indican que el veneno de *B. ammodytoides* tiene algunas particularidades como: actividad proteolítica, hemorrágica y presencia de fosfolipasas ácidas (fosfolipasa A₂ aspartato-49 o D-49) no halladas con frecuencia en venenos de otras *Bothrops* de Argentina. Este trabajo tiene como objetivo investigar las actividades tóxicas del veneno de *B. ammodytoides*. Por otro lado, se pretende estudiar las características inmunológicas de estos venenos y evaluar la capacidad neutralizante de antivenenos de uso terapéutico frente a la actividad de estos.

Para ello se realizarán pruebas bioquímicas, inmunológicas y toxicológicas. Los resultados contribuirán a ampliar el conocimiento del veneno de *Bothrops ammodytoides* pampeanos para poder contar con referencias locales y realizar estudios comparativos con venenos de ejemplares de otras zonas de la Argentina. Además, el proyecto aportará datos para evaluar la utilidad de los antivenenos botrópicos utilizados en el país.

4.1 Palabras claves: (de 4 a 6): *Bothrops ammodytoides*/La Pampa (Arg)/toxicidad/veneno/antivenenos/neutralización

4.2 Abstract en Inglés: (Máximo 200 palabras) Res. N° 097-CS-12.

Bothrops ammodytoides ("yarára ñata") is a snake of the viperidae family, poison inoculants, endemic to Argentina and abundant in La Pampa province. Although the venom of *B. ammodytoides* is not used as an immunogen to produce antivenoms, the sera produced and used in Argentina neutralize its toxic activities. So far, there are no known data on the differential neutralization of the pampas poison and the effectiveness of antivenoms for therapeutic use on it, though. Previous results indicate that the venom of *B. ammodytoides* has some peculiarities such as: proteolytic, hemorrhagic activity and the presence of acid phospholipases (phospholipase A2 aspartate-49 or D-49), not frequent in the venoms of other *Bothrops* from Argentina. The objective of this work is to evaluate the toxic activities of the pampas *B. ammodytoides* venom and its neutralization by antivenoms for therapeutic use. For this purpose, biochemical (SDS PAGE), immunological (immunoprecipitation) and toxicological tests (lethal potency, plasma procoagulant activity, haemorrhagic activity, indirect and radial hemolysis, phospholipasic A2 determination) will be performed. The results will contribute to the better knowledge of the venom of *Bothrops ammodytoides* and its neutralizing capacity against other antivenoms and will provide data to evaluate the usefulness of the botropic antivenoms used in the country.

4.3. Key words: (de 4 a 6): *Bothrops ammodytoides* / La Pampa / toxicity / poison / antivenoms / neutralization

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

5.1. INTRODUCCIÓN, MANEJO DE FUENTES BIBLIOGRÁFICAS y DESCRIPCIÓN de la SITUACIÓN ACTUAL del PROBLEMA

Bothrops ammodytoides ("yarára ñata") es una serpiente que pertenece a la familia Viperidae, Subfamilia Viperinae. Es una especie endémica de Argentina y la serpiente venenosa más austral del mundo. En la Pampa los especímenes miden entre 55 y 75 cm y no superan los 300 g en peso (Bruni, 2017, resultados sin publicar). Su superficie tiene aspecto rugoso por la presencia de escamas fuertemente aquilladas (Giambelluca, 2015), su cabeza es marcadamente triangular con foseta loreal y pupila elíptica.

En La Pampa estas serpientes habitan principalmente en la región central y oriental donde predominan los climas semiáridos, subhúmedos a secos; donde la vegetación natural predominante es el bosque abierto caducifolio con pastizales bajos sammófilos (Ministerio de la Producción, 2004). Cabe mencionar que *B. ammodytoides* no figura en el listado de especies amenazadas (Ministerio de la Producción, 2012; Giraud, 2012).

Los especímenes de yarára ñata no son agresivos. Su tamaño, coloración y dibujos de la piel le proporcionan un excelente camuflaje para los lugares donde vive, lo cual incrementa la probabilidad de encuentros no deseados con el hombre y eventualmente la ocurrencia de mordeduras (de Roodt, 2016). También son posibles los accidentes con animales domésticos en pequeñas y grandes especies.

Si bien en La Pampa la notificación oficial de accidentes en personas es escasa, se subnotificaron varios casos de accidentes tanto en humanos como en animales domésticos (Bruni, 2011; Bruni, 2018). En particular, se han notificado casos en caninos acompañantes de cazadores en el puesto caminero de Ingeniero Foster (Departamento Rancul) durante el inicio de la época de caza (mes de mayo), momento del año en el que todavía no se registran bajas temperaturas y los ejemplares siguen activos.

De acuerdo con la bibliografía, las mordeduras por *Bothrops* en caninos ocurren principalmente en la zona del rostro (especialmente el hocico) y los miembros anteriores, y con menor frecuencia en otras regiones corporales (de Roodt, 1994; de Roodt, 1995; de Roodt, 2010; Villalobos, 2008). Las principales manifestaciones locales son edema, hemorragias y necrosis. Entre las manifestaciones sistémicas se pueden encontrar signos de coagulopatía (desfibrinación, coagulación vascular diseminada y trombocitopenia), con hematuria, rhabdomiólisis y falla renal (de Roodt, 1994 a y b; de Roodt, 1995; de Roodt, 2010; Villalobos, 2008).

Si bien no se utiliza el veneno de *B. ammodytoides* como inmunógeno para la producción de antivenenos, los sueros producidos con otras especies y utilizados en Argentina neutralizan sus actividades tóxicas. (de Roodt, 1998; de Roodt, 2000; de Roodt, 2016). Por eso mismo, no se controla regularmente su capacidad neutralizante. Aunque existe un amplio conocimiento general sobre los venenos botrópicos, el veneno de yarará ñata no ha sido estudiado en profundidad como ocurre con el de otras especies. Presenta las características generales de los venenos botrópicos (de Roodt, 2000), pero también posee algunas particularidades como: alta actividad proteolítica, una importante actividad hemorrágica (de Roodt, 2000), escasa o nula presencia de componentes con actividad trombina similar (de Roodt, 2002) y presencia de fosfolipasas ácidas (fosfolipasa A2 aspartato-49 o D-49) (Clement y col., 2012); propiedades tóxicas no muy frecuentes en los venenos de otras especies de *Bothrops* de Argentina (de Roodt, 2016).

Dada la escasez de datos acerca de las características de los venenos de las serpientes venenosas en La Pampa, es de interés estudiar las actividades tóxicas de ellos; particularmente el veneno de *Bothrops ammodytoides*, que además de ser una especie endémica de la Argentina es abundante en dicha provincia.

El presente trabajo tiene como objetivo determinar las actividades tóxicas del veneno de *B. ammodytoides* de la Provincia de La Pampa y la capacidad neutralizante de antivenenos de uso terapéutico sobre el mismo.

5.2. RESULTADOS ALCANZADOS POR el(los) INTEGRANTE(S) del PROYECTO DENTRO del ÁREA de CONOCIMIENTO del MISMO: (Publicados, enviados o aceptados para publicar, o inéditos)

Bruni, M.; García Cachau, M.; Hernández, J.; Guerrero, C.; Moreno, M.; Martínó, J.; Mardones, L.; García, R.; Ruiz, C.; Lucero, F. Accidentes por animales ponzoñosos en el norte de la provincia de La Pampa, Argentina. Estudio epidemiológico. Revista Ciencias Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPam. 2018. Vol 20. N° 1 pág. 71-81. ISSN: 1515-1883.

Bruni M.; García Cachau M.; Hernández J.; Guerrero C; Moreno M, Martínó J; Mardones L; García R; Ruiz C, Lucero FI. Accidentes por animales ponzoñosos en el norte de la Provincia de La Pampa, Argentina. Estudio epidemiológico X Jornada de Ciencia y técnica. III Jornada interinstitucional. Facultad de Ciencias Veterinarias. - FCV. UDEP. UNLPam. 2017.

Bruni, M.; García Cachau, M. Descripción epidemiológica de accidentes por animales ponzoñosos en La Pampa. VII Jornadas de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNLPam. 2011.

5.3. TRABAJOS de INVESTIGACIÓN de los INTEGRANTES del EQUIPO, EN ESTA U OTRA INSTITUCIÓN, RELACIONADOS al PROYECTO:

Accidentes por animales ponzoñosos en el norte de la provincia de La Pampa, Argentina. Estudio epidemiológico. FCV. UNLPam. Inicio 01/01/16 finalización: 31/12/17. Resol. 192/15. CD.

6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

6.1. PROBLEMA CIENTÍFICO, OBJETIVOS, HIPÓTESIS y RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

PROBLEMA CIENTIFICO

Si bien *B. ammodytoides* es una especie endémica de la Argentina, abundante en la provincia de La Pampa y ocasiona la mayoría de los accidentes botrópicos en esta región, hasta el momento no se conoce el perfil bioquímico de su veneno ni tampoco el poder neutralizante de los sueros antiofídicos sobre las actividades tóxicas del mismo.

OBJETIVO GENERAL

-Investigar las actividades tóxicas del veneno de *B. ammodytoides* de La Pampa.
-Estudiar las características inmunológicas de estos venenos frente a antivenenos de uso terapéutico para evaluar la capacidad neutralizante de los mismos.

HIPÓTESIS

Las actividades tóxicas del veneno de *Bothrops ammodytoides* de la Provincia de La Pampa son similares a las de otras especies de *Bothrops* de Argentina.

Los diferentes antivenenos de uso humano y veterinario neutralizan las actividades tóxicas del veneno de *Bothrops ammodytoides* de la provincia de La Pampa.

RESULTADOS ESPERADOS

Se espera reconocer los componentes tóxicos del veneno de *B. ammodytoides* pampeana y conocer si los sueros botrópicos de uso comercial neutralizan su actividad. Esto permitirá ampliar el conocimiento del veneno de *Bothrops ammodytoides* y su capacidad neutralizante frente a otros antivenenos. Aportará datos para evaluar la utilidad de los antivenenos botrópicos utilizados en el país.

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS

MATERIALES Y MÉTODOS

Serpientes y veneno

Se trabajará con pooles de venenos de 11 serpientes de la especie *Bothrops ammodytoides* provenientes de diferentes zonas de La Pampa. Para ello serán alojadas temporariamente en el serpentario del Complejo Ecológico de América que se encuentra en la Ciudad de América, cabecera del Partido de Rivadavia, ubicada al noroeste de la Provincia de Buenos Aires a 90 km de General Pico (La Pampa). El serpentario cuenta con 7 cubiles de 2 m³ a temperatura de entre 25-27 °C. Las serpientes se alimentarán cada quince días con ratones provistos por el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, de 20 g de peso aproximadamente y tendrán disposición de agua bebible *ad libitum*.

Se extraerá veneno una vez al mes por ordeño manual de especímenes adultos sanos hasta obtener 30 mg de muestra. Cada extracción será secada al vacío e inmediatamente conservada, individualmente, en freezer a -18 °C. Las personas que manipulen las serpientes serán únicamente aquellas autorizadas y entrenadas para hacerlo. Las medidas de bioseguridad son las que se siguen según reglamentaciones de la OMS. (OMS. "Guidelines for the production control and regulation of snake antivenom immunoglobulins". 7. Preparation and storage of snake venom., 2016).

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE):

La separación de proteínas se realizará mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Sodio Dodecil Sulfato bajo condiciones reductoras (SDS-PAGE). Se utilizará una cuba de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra cell (BioRad). Alícuotas de 30-50 µg de venenos serán desnaturalizadas durante 5 min a 100 °C en presencia de una solución amortiguadora ("sample buffer") (Tris 50 mM, DTT 10 mM, SDS 2 % p/v, azul de bromofenol 0,1 % p/v, glicerol 10 % v/v, pH 6,8). Las muestras se separarán en geles preparados al 4-12,5 % en solución amortiguadora Tris-glicina (Tris 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0,1 % p/v, pH 8,8). La electroforesis se iniciará a 80 V hasta que la muestra entre en el gel de separación. Luego, el voltaje se aumentará a 100 V hasta finalizar la corrida. Para la estimación de los pesos moleculares de las proteínas del veneno se utilizarán marcadores de peso molecular comerciales (Mark-VII, o SigmaMarker Wide Range). Los geles se teñirán con Azul de Coomasie (Sigma).

Estudios toxicológicos**Potencia letal**

Se determinará potencia letal del veneno (dosis letal 50, DL₅₀) de acuerdo con las sugerencias de la OMS para venenos de serpientes (Theakston, 1983; OMS. "Guidelines for the production control and regulation of snake antivenom immunoglobulins, 2016). A partir de una solución madre 1 mg/ml de los venenos obtenidos, se inocularán por vía intraperitoneal grupos de 5 ratones cepa CF-1 de 20 g de peso (18-22) con diferentes concentraciones (10-200 µg/animal) de veneno diluidos en un volumen final de 0,5 ml de NaCl 0,15 M.

Se determinará el porcentaje de sobrevivientes a las 48 horas posteriores a la inoculación. Se calculará por regresión no lineal en una curva dosis -porcentaje de mortalidad, mediante el Software Prism versión 7 (Graph Pad Software, Inc. San Diego, California, USA). La DL₅₀ se define como la dosis de veneno que produzca la muerte del 50 % de los ratones dentro de un período de 48 h.

Actividad Hemorrágica

Se determinará de acuerdo con la técnica descrita por Theakston y Reid (Theakston, 1983). A partir de una solución madre de 4 mg/ml, se inyectarán 3 ratas Wistar de 250 g de peso por vía intradérmica (i.d.) en diferentes puntos con distintas dosis (1-400 µg/ul) de veneno diluidos en un volumen final de inoculación de 100 µl en solución de NaCl 0.15 M, previa sedación con acetilpromacina-ketamina (50mg/kg peso) por la vía intramuscular. A las 24 horas los animales serán eutanasiados con CO₂ y se medirán los diámetros mayores perpendiculares de las áreas hemorrágicas en la cara dérmica con un calibre de Vernier. La dosis mínima hemorrágica (DMH) se definirá como la dosis de veneno que produce un área hemorrágica de 1 cm de diámetro hemorrágico promedio.

Actividad procoagulante en plasma

Se determinará enfrentando 0,2 ml de plasma normal equino con diferentes concentraciones de veneno partiendo de una solución madre de 2 µg/ul diluidos en un volumen final de 50 µl de NaCl 0.15 M (Theakston, 1983; OMS. "Guidelines for the production control and regulation of snake antivenom immunoglobulins, 2016). La dosis mínima procoagulante en plasma (DMP-P) se definirá como la dosis de veneno que produce un coágulo evidente de plasma en 60 segundos, expresada en microgramos.

Hemólisis indirecta en medio líquido

Se determinará de acuerdo con la técnica descrita por Al-Abdullah y col. (Al-Abdullah, 1991) con algunas modificaciones. Muestras conteniendo 0,3 ml de eritrocitos "pelleteados" y 0,3 ml de yema de huevo en 10 ml de CaCl₂ 1 mM - NaCl 0,15 M y tamponada con buffer de fosfatos (PBS) 0,01 M a pH 7,4 se incubarán por 30 minutos a 37 °C con diferentes concentraciones de veneno a partir de una solución madre de 1 µg/ul. Se realizarán

controles positivos con Tritón X-100 y agua destilada y controles negativos con PBS pH 7,4. Se incubarán y la reacción se frenará con 100 µl de EDTA 100 mM. La lectura de la absorbancia se realizará a partir de alícuotas de 100 µl tomadas del sobrenadante, diluidas 1:10 en PBS pH 7,4. Se utilizará un espectrofotómetro (MARCA, MODELO EQUIPO) a una longitud de onda de 550 nm. Se analizará la curva dosis de veneno-hemólisis y se determinará la dosis de veneno expresada en microgramos que produce el 50% de hemólisis respecto a los controles positivos (DH50: Dosis Hemolítica 50%).

Hemólisis radial

Se realizará con las técnicas utilizadas convencionalmente (Dias Da Silva, 1989): en placas de Petri se colocará una mezcla conteniendo 0,5 ml de glóbulos rojos humanos "pelleteados" más 0,5 ml de yema de huevo en un volumen final de 12 ml de agarosa (Ultrapure, SIGMA) al 1% diluída en PBS pH 7,4 conteniendo 100 µl de CaCl₂ 0,1 M. Una vez solidificada la mezcla, se le realizarán orificios de 5 mm de diámetro, los que se rellenarán con diferentes concentraciones de veneno diluidos en 30 µl de PBS pH 7,4. Tras 24 horas de incubación a temperatura ambiente se medirán los halos de hemólisis y se calculará la dosis de veneno que produce un halo de hemólisis promedio de 2,0 cm.

Determinación de la actividad de fosfolipasa A₂

Se realizará con las técnicas utilizadas convencionalmente: en placas de Petri se colocará una mezcla conteniendo 0,5 ml de yema de huevo en un volumen final de 12 ml de agarosa (Ultrapure, SIGMA) al 1% diluída en PBS pH 7,4 conteniendo 100 µl de CaCl₂ 0,1 M. Una vez solidificada la mezcla se le realizarán orificios de 5 mm de diámetro, los que se rellenarán con diferentes concentraciones de veneno diluidos en un volumen final de 50 µl en PBS pH 7,4. Tras 24 horas de incubación a temperatura ambiente se medirán los halos de hidrólisis y se calculará la dosis de veneno que produce un halo de hemólisis de 2,0 cm.

Actividad proteolítica sobre la gelatina

Se colocará en tubos de ensayo 2 ml de una solución de gelatina (Tipo A de piel porcina, de aproximadamente 300 Bloom, Sigma) al 20 % en PBS pH 7,4. Se calentará a 37 °C y se agregarán diferentes concentraciones de venenos diluidos en 50 µl de NaCl 0,15 M. Se incubarán durante 3 horas a 37 °C, se le agregarán 100 µl de EDTA 100 mM y se guardará a 4 °C durante 12 horas, luego a 21 °C y se observará la presencia o ausencia de licuefacción.

Estudios inmunoquímicos

Doble difusión (Inmunoprecipitación)

Doble difusión (Inmunoprecipitación): se realizará en agarosa al 1% (Sigma) en PBS pH 7,4 que se dejará gelificar en placas de Petri o en portaobjetos (Margni 1983; Siles Villaruel, 1974). Se enfrentarán diferentes antivenenos utilizados en la Argentina con soluciones del veneno (1 mg/ml en NaCl 0,15 M). Los ensayos se realizarán con diferentes diluciones de los antivenenos. Tras la siembra, se dejará en incubación en cámara húmeda a temperatura de laboratorio durante 48 horas, tras las cuales se lavará en NaCl 0,15 M con recambios cada 12 hs durante 72 hs y dos lavados finales de 2 hs con agua destilada. Posteriormente, se deshidratarán a temperatura de laboratorio y se colorearán con Fucsina ácida o Negro Amido y se observarán y compararán áreas de difusión.

Métodos estadísticos

Los análisis estadísticos se realizarán utilizando el software Prism 7.0 (Graph Pad, CA).

6.3. CONTRIBUCIÓN al CONOCIMIENTO CIENTÍFICO y/o TECNOLÓGICO y a la RESOLUCIÓN de los PROBLEMAS

Hasta la fecha no se tiene registro de las actividades toxicológicas ni la efectividad de los antivenenos antibotrópicos de uso terapéutico sobre el veneno de ejemplares de *Bothrops ammodytoides* pampeanos, siendo los únicos datos publicados obtenidos a partir de veneno de *Bothrops ammodytoides* de la provincia de Buenos Aires (de Roodt, 2000).

Los resultados contribuirán a mejorar el conocimiento del veneno de esta serpiente y de la capacidad neutralizante de antivenenos sobre este. Esto aportará datos para evaluar la utilidad de los antivenenos botrópicos utilizados en el país.

6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

Año:	1		2		3		4		5	
Semestre:	1º	2º	1º	2º	1º	2º	1	2	1	2
Revisión Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Toma de muestra (extracción de veneno y secado)	X	X								
Puesta a punto de las técnicas			X	X						
Caracterización bioquímica y toxicológica					X	X	X	X		
Testeo de las actividades biológicas en animales de laboratorio					X	X	X			
Pruebas de la capacidad neutralizante de antivenenos							X	X		
Análisis estadístico				X		X		X		X
Presentación de trabajos				X		X		X		X
Informe de avance		X		X		X		X		
Informe final										X

7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO

7.1. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES REQUERIDOS por el PROYECTO YA EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN:

Laboratorios equipados con:
 Heladera y Freezer
 Balanza analítica
 Centrífuga
 Bomba de Vacío
 Desecador

7.2. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES NECESARIOS para el PROYECTO y NO DISPONIBLES en esta FACULTAD

Laboratorio de toxicología
 Bioterio con cepas de ratones CF-1 y ratas WISTAR
 Equipo SDS PAGE
 Cromatógrafo

7.3. JUSTIFICACIÓN de la ADQUISICIÓN o FACTIBILIDAD de ACCESO en CONDICIONES de PRESTAMO o USO de los BIENES NO EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN

7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN

7.5. PRESUPUESTO ESTIMADO para el PROYECTO PRESENTADO (Total y Anual)**Presupuesto estimado anual:**

1er año: \$ 60.000

2do año \$ 50.000

3er año \$ 30.000

4to año \$ 20.000

5to año \$ 20.000

Total del proyecto: \$ 180.000

Bienes de Consumo\$ 130.000

Viajes.....\$ 50.000

Total.....\$180.000

** El Consejo Directivo adjudicará presupuesto a cada Proyecto de acuerdo a su Presupuesto de Ciencia y Técnica anual, tomando en cuenta normas y criterios que el mismo determine.***8.1. BIBLIOGRAFÍA**

Bjarnasson, J.B. & J.W. Fox. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. Pharmac. Ther.. 62: 325-37. 1994.

Bruni, M.; García Cachau, M. Descripción epidemiológica de accidentes por animales ponzoñosos en La Pampa. VII Jornadas de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNLPam. 2011.

Bruni M.; García Cachau M.; Hernández J.; Guerrero C; Moreno M, Martinó J; Mardones L; García R; Ruiz C, Lucero FI. Accidentes por animales ponzoñosos en el norte de la Provincia de La Pampa, Argentina. Estudio epidemiológico X Jornada de Ciencia y técnica. III Jornada interinstitucional. Facultad de Ciencias Veterinarias. - FCV. UDEP. UNLPam. 2017.

Bruni, M.; García Cachau, M.; Hernández, J.; Guerrero, C.; Moreno, M.; Martinó, J.; Mardones, L.; García, R.; Ruiz, C.; Lucero, F. Accidentes por animales ponzoñosos en el norte de la provincia de La Pampa, Argentina. Estudio epidemiológico. Revista Ciencias Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPam. Vol 20. N° 1 pág. 71-81. ISSN: 1515-1883. 2018.

Cabrera, Mario. Reptiles del Centro de la Argentina. UNC. Córdoba. ISBN: 978-987-707-019-4. Pp 184. 2015.

Clement H., Costa de Oliveira V., Zamudio F.Z., Lago N.R., Valdez-Cruz N.A, Bérnard Valle M., Hajos S.E., Alagón A., Possani L.D, de Roodt A.R. Isolation, amino acid sequence and biological characterization of an “aspartic-49” phospholipase A2 from Bothrops (Rhinocerophis) ammodytoides venom. Toxicon. 60:1314–1323. 2012.

Costa, S. Mordedura de yará (Bothrops spp.) en caninos: información, prevención y tratamiento. Tesina de Grado. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Pcia de Bs. As. 46 pp. 2014.

Chippaux JP., Williams V., White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. Toxicon. 29, 1279-1303. 1991.

de Roodt A.R. Bothrops ammodytoides (yará ñata), la serpiente venenosa autóctona de Argentina. Acta Toxicol Argent.; 24 (1): 68:72. 2016.

de Roodt A.R., Lanari L.C., Costa de Oliveira V., Laskowicz R.D., Stock R.P. Neutralization of *Bothrops alternatus* regional venom pools and individual venoms by antivenom: a systematic comparison. *Toxicon.*, 57: 1073 – 1080. 17. 2011.

de Roodt A.R., Lanari L.C., Laskowicz R.D., Botassi S., Rocco D.M., Costa de Oliveira V., Regner P.I. Comparación de caracteres corporales y del veneno de *Bhotrops alternatus* entre poblaciones de las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos, Argentina. *Cuadernos de Herpetología*, 26(1): 5-12. 2012.

de Roodt A.R. Estudio Inmunobiológico del Veneno de Serpientes de Importancia Sanitaria de la Argentina. PhD tesis. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. 313 pp. 2002.

de Roodt A.R., Dolab J.A., Gould E., Carfagnini J.C., Dokmetjian J.Ch., Gould J., Troiano J.C., Amoroso M., Fernández T., Segre L., Hajos S.E., Vidal J.C. Some Toxic and enzymatic activities of *Bothrops ammodytoides* ("yarárá ñata") venom. *Toxicon.*; 38:49-61. 2000.

de Roodt A.R., Dolab J.A., Galarce P.P., Litwin S., Dokmetjian C., Segre L., Vidal J.C. A study on the venom yield of snake species from Argentina. *Toxicon*; 36(12):1949-1957. 1998

de Roodt A.R., Dolab J.A., Segre L. Fisiopatología y Diagnóstico del ataque por serpientes venenosas. Una breve actualización. *Revista de Medicina Veterinaria* 77(1): 64- 71, 1996a y1996b.

Estrada Gomez, S.; Quintana Castillo J.C.; Vargas Muñoz, L.D. Accidente ofídico en animales de pastoreo: acercamiento epidemiológico, clínico y de manejo. *Revista de Medicina Veterinaria*. ISSN 0122-9354. Bogotá. Colombia. 27 (149-161). 2014.

Fletcher, J.E. & M.S. Jiang. Lys49 phospholipase A2 lyse cell cultures by two distinct mechanisms. *Toxicon*. 36: 1549-1556. 1998.

Giambelluca, Luis. Serpientes bonaerenses. EDULP. La Plata. ISSN 978-987 1985-67-8. Pp 54. 2015.

Giraud, A.R., Arzamendia V., Bellini G.P., Besca C.A., Calamante C.C., Cardozo G., Chiaraviglio M., Costanzo M.B., Etchepare E. G., Di Cola V., Di Pietro D. O., Kretzschmar S., Palomas S., Nenda S. J., Williams J.D. Categorización del estado de conservación de las serpientes de la República argentina. *Cuad. de Herpetol*;26 (Supl. 1): 303-326. 2012

Gutiérrez, J.M. & B. Lomonte. Efectos Locales en el Envenenamiento Ofídico en América Latina, p. 310-323. In J.L. Costa Cardoso, F.O. de Siqueira Franca, F.H. Wen, C.M. Sant`Ana Málaque & V. Haadad Jr. (eds.). *Animais Peconhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Sarvier, FAPESP, Sao Paulo, Brasil. 2003.

Gutiérrez, J.M. & B. Lomonte. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*. 33: 1405-1424. 1995.

Gutiérrez, J.M. y A. Rucavado.. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82: 841-850. 2000.

Lanari L.C., Rosset S., González M.E., Liria N., de Roodt A.R. A study on the venom of *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron and Duméril, from different regions of Argentina. *Toxicon*, 55(8): 1415-1424. 2010.

Markland, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*. 36: 1749-1800. 1998.

Ministerio de Salud. Guía de prevención, diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de los envenenamientos ofídicos. Ministerio de Salud, Buenos Aires. 2014.

Ministerio de la Producción. Categorización de la fauna silvestre de la provincia de La Pampa, Dirección de Recursos Naturales. Ministerio de la Producción. Gobierno de La Pampa. 2012.

Ministerio de la Producción. Inventario integrado de los Recursos Naturales de La Pampa, Dirección de Recursos Naturales. Ministerio de la Producción. Gobierno de La Pampa. 2004.

Ministerio de Salud. Dirección de Epidemiología y salud pública de La Pampa. 2005.

Oliveira, V.C.; Lanari, L.C; Baudou, F.G; Manzanelli, V.M; Laskowicz, R.D.; de Roodt, A. Variaciones del veneno de *Bothrops diporus* de diferentes regiones de Argentina. R.XII Congreso Argentino de Herpetología. San Salvador de Jujuy. Libro de Resúmenes. 2009.

Rodríguez Acosta, A., W. Uzcategui, R. Azuaje, I. Aguilar & M.E. Giron. Análisis clínico y epidemiológico de los accidentes por mordeduras de serpientes del género *Bothrops* en Venezuela. *Rev Cubana Med Trop*. 52: 90-94. 2002.

Rocco, D.; Reati, G.; de Oliveira V. C.; Lanari, L.; Laskowicz, R.; de Roodt, A. Caracterización tóxica del veneno de *Bothrops (Rinocerophis) alternatus* de diferentes regiones de la provincia de Córdoba (Argentina). *Revista Facultad de Ciencias Médicas*. 70 (1):7-13. 2013.

Theakston, R.D.; Reid, HA. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. *Bull World Health Organ*. 61(6): 949-956. 1983.

Villalobos Salazar J. El envenenamiento ofídico en animales en el continente americano. *Serpientes, venenos, patología y tratamiento*. Litografía San Rafael, San José, Costa Rica. Pp 236. 2008.

World Health Organization. WHO Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. Expert Comitee on Biological Standardization. Geneva, 17-21 October 201.