Universidad De Oriente
Núcleo Bolívar
Escuela De Ciencias De La Salud
"Dr. Francisco Battistini Casalta"
Departamento De Bioanálisis
Área Toxicología

PRODUCCIÓN DE INMUNOGLOBULINA DERIVADA DE HUEVO DE GALLINA CONTRA EL VENENO DE ESCORPIÓN (*TITYUS CARIPITENSIS*)

Asesor:

Dr. Pedro Parrilla-Álvarez

Trabajo de grado presentado por:

Suarez Elizabeth

C.I. 17657844

Velásquez Yonathan

C.I: 17885918

Como requisito parcial para optar al título de
licenciado en Bioanálisis

Ciudad Bolívar, abril del 2010.

INDICE

INDICE ..... **ii**
AGRADECIMIENTOS ..... **iv**
DEDICATORIA ..... **v**
DEDICATORIA ..... **vii**
RESUMEN ..... **viii**
INTRODUCCIÓN **1**
JUSTIFICACIÓN **10**
OBJETIVOS **11**
Objetivo general 11
Objetivos específicos 11
MATERIALES Y MÉTODOS **12**
Tipo de estudio. 12
Universo y muestra 12
Materiales. 13
Procedimientos 15
Obtención de veneno de escorpión *T. caripitensis* y su purificación parcial. 15
Separación cromatográfica del veneno del escorpión *T. caripitensis*. 17
Inmunización de gallinas ponedoras. 18
Recolección y preservación de los huevos de las gallinas, previa y post inmunización. 19
Purificación de las inmunoglobulinas (IgY) anti TcII y veneno completo del escorpión *Tityus caripitensis*, a partir de la yema de los huevos de las gallinas. 19
Cuantificación de IgY especifica contra TcII y veneno completo de escorpión *Tityus caripitensis* en la yema de huevos 20
Análisis de resultados. 22
RESULTADOS **23**
Grafico 1 25
Tabla 1 26

Grafico 2 27
DISCUSIÓN 28
CONCLUSION 29
RECOMENDACIONES 30
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 31

AGRADECIMIENTOS

Simplemente queremos agradecer a todas las personas que colaboraron en la elaboración de este proyecto, principalmente al Dr. Pedro Parrilla gracias por tratar de confiar en nosotros, ojala algún día mas personas apreciaran la capacidad que usted tiene para querer hacer que la gente se supere y aprecien su trabajo.

A la Lcda. Aminy Hudefe (Ami) y Lcdo. Alberto Parrilla sin ustedes nunca hubiéramos podido terminar este proyecto muchas, muchas gracias.

Al personal del Instituto de Estudios Avanzados: Dra. Caridad Malave y Dra. Noraida Zerpa.

Al personal del laboratorio del Centro Médico Orinoco: Dr. Eduardo Santos y la Licd. Solangel Marin muchas gracias.

Al personal de Genética Médica de la Universidad de Oriente:

A todos muchas gracias.

DEDICATORIA

AUSENCIA Habré de levantar la vasta vida que aún ahora es tu espejo: cada mañana habré de reconstruirla. Desde que te alejaste, cuántos lugares se han tornado vanos y sin sentido, iguales a luces en el día. Tardes que fueron nicho de tu imagen, músicas en que siempre me aguardabas, palabras de aquel tiempo, yo tendré que quebrarlas con mis manos. ¿En qué hondonada esconderé mi alma para que no vea tu ausencia que como un sol terrible, sin ocaso, brilla definitiva y despiadada? Tu ausencia me rodea como la cuerda a la garganta, el mar al que se hunde. JORGE LUIS BORJES.

A mi padre que siempre fue más que un ejemplo a seguir, siempre estarás presente viejo, se que te sentirás orgulloso, siempre lo estuviste y a mi hermana Jose te fuiste antes de tu tiempo, pero ahora mi viejo te está cuidando, se que te reirías de la locura que representa este trabajo te extraño hermanita.

Ahora a los vivos, a mi flaca bella, mi bebe, Laura Suarez, que hasta me acompaño a alimentar a las gallinas, a mi madre Josefina Inzana, indudablemente parte de lo que soy es gracias a ti, a mi Nonna Nicolina Giorgianni eres lo máximo nonnita te adoro y lo sabes, a mis tías Sebastiana y María Insana son un dolor de cabeza que no se puede evitar, pero las amo y le agradezco el esfuerzo que hacen todos los días para darme un mundo relativamente mejor.

Como no puede pasar de una página ahora todos aquellos que son mi familia así no tengamos la misma sangre: Nathy (eres una Suarez Inzana más), Mayru, mi chino, chucho, Eli, Ali, mi padrino Benzón, la esposa, el esposo, yasmi, Ibra (gracias por tratar de hacer feliz a mi bebe), Ramon, Manolo, Thomy, Alexandra, jose manuel, miguel E, viejo Nelson, Sra. Ana María, al final pero no el ultimo a mi chelo gracias

por ser mi compañero de tesis y jamás rendirte mientras nos cubría la locura, te amo hermanito. Y a todos los que me dijeron que hiciera un trabajo de “Parasitología” a todos va está ecuánime dedicatoria.

Elizabeth Suarez Inzana.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis primero que a nadie a ese ángel misericordioso, que me cuida a cualquier lado que vaya, a mi abuela María Adoración Guevara aunque te fuiste de mi lado hace mucho tiempo tus enseñanzas me hacen ser lo que soy ahora, a mi abuelo Roberto Zamora al cual quiero mucho, a mis padres Ana María Zamora y Nelson Moreno por ser mis padres, amigos y apoyo incondicional, por enseñarme que no hay mayor triunfo que el que alcanza una persona con sus propias manos, por darme la confianza necesaria y todas las herramientas a pesar de las dificultades, para que pudiera culminar mi etapa de universitario sin ustedes esto no sería posible.

A mis hermanos las personas que más amo en este mundo, Ailen Moreno, Jhon Velásquez, Yohan Velásquez y Yohannitt Velásquez espero que siempre podamos estar tan unidos como hasta ahora, aunque muchos no lo entiendan a Diana Rodríguez por su ayuda y apoyo a la mitad de mi carrera y comienzo de este proyecto.

A mi segunda familia, la familia Suarez Inzana por hacerme sentir que tenía un hogar lejos de casa y por todo el cariño que tan incondicionalmente me dieron, a mi compañera de tesis Elizabeth Suarez que a pesar de todas las adversidades que se le presentaron nunca abandonó y siempre tuvo esas palabras de motivación en los momentos de desesperación, y a un gran pensador y un muy buen amigo Víctor Suarez donde quieras que estés se que estas orgulloso de nosotros por esta meta alcanzada.

A todos ustedes este triunfo les pertenece tanto como a mi……!!!

Yonathan Velásquez.

RESUMEN

Inmunoglobulina Y derivada del huevo de la gallina contra el veneno de escorpión (*Tityus caripitensis*)

Suarez E.C.; Velasquez Y.A.
Escuela de ciencias de la salud "Dr. Francisco Virgilio Battistini Casalta"

El accidente escorpiónico es considerado en algunos países como un problema de salud pública. En Venezuela, existen áreas donde han ocurrido muertes, sobretodo en niños. En la región oriental, el escorpión *Tityus caripitensis* ha causado accidentes graves y mortales. El tratamiento consiste en la administración de inmunoglobulinas obtenidos de suero de caballos inmunizados. Para contribuir a la resolución del problema médico, el estudio del veneno y la producción de una antivenina específica con el menor maltrato animal es de vital importancia. El veneno se fraccionó por el método de cromatografía de exclusión molecular de baja resolución, obteniéndose 4 picos de elución. La fracción II (TcII) resultó la de mayor tamaño con el 74,41% del veneno total, por lo que fue seleccionada como antígeno, junto al veneno completo, para inducir la producción de anticuerpos (Ac) específicos, a partir de gallinas. Los anticuerpos IgY fueron obtenidos a partir de la yema de huevos mediante el método de Polietilenglicol-Cloroformo y su especificidad medida mediante ELISAs, resultando mejor antígeno el veneno completo. Se demuestra que el uso de aves para la obtención de anticuerpos es una alternativa menos agresiva para los animales de experimentación.

Palabras Claves: Veneno de escorpión *Tityus caripitensis*, Fracción IITc e InmunoglobulinaY,

INTRODUCCIÓN

El origen de la palabra escorpión viene del latín “scorpios” y el nombre de alacrán procede del árabe “Al’akrab”, y se denomina escorpionismo o alacranismo al complejo sintomático ocasionado por las picaduras por escorpiones o alacranes. Los escorpiones son animales muy antiguos y se han encontrado en fósiles que datan del periodo siluriano hace 400 millones de años. A pesar de su longevidad, solo han disminuido de tamaño. Actualmente se conocen más de 1500 especies en todo el mundo, de las cuales solo 25 se han incriminado como causantes de accidentes en humanos. Están clasificados dentro de filo Arthropoda, clase Aracnida y orden Scorpionida (Valderrama *et al*., 1998).

Los escorpiones tienen una amplia distribución geográfica y se encuentran en todos las regiones excepto en la Antártida. Predominan en las zonas tropicales pero también se encuentran en aéreas templadas. Su distribución en América va desde la región sur del oeste de Canadá hasta la Patagonia. Se encuentran en casi todos los ecosistemas terrestres como desiertos, sabanas y bosques tropicales. Son artrópodos solitarios y activos en la noche, viven en lugares oscuros y escondidos bajo piedras, corteza suelta, pueden vivir en lugares muy secos donde pueden sobrevivir durante meses sin agua y más de un año sin alimentación. Algunas especies invaden las habitaciones humanas y son causantes de accidentes por envenenamiento. Los escorpiones son carnívoros y se alimentan exclusivamente de animales vivos, las arañas y otros insectos son sus presas más comunes, localizan a su alimento por las vibraciones del suelo. El canibalismo es un fenómeno frecuente en estos artrópodos, los adultos se comen a los jóvenes y a los recién nacidos, así mismo diversos animales los depredan, sus principales enemigos las aves (gavilanes, gallinas, entre otros.) además de lagartos, macacos, coatíes, sapos y ranas (Lucas y Da Silva, 1992; Botero y Restrepo, 2005).

Los escorpiones peligrosos para el hombre pertenecen a la familia Buthidae donde se incluyen los géneros: *Androctonus, Buthus, Centruroides, Leiurus* y *Tityus*. En Venezuela, el género *Tityus* hasta 2006 (según el último informe sobre descripción de nuevas especies) reúne 52 especies, la mayoría responsables de los accidentes graves de escorpionismo entre los cuales podemos nombrar *Tityus arellanoparrai, T. monaguensis, T. quirogae, T. surorientallis, T.nororientalis, T. caripitensis, T. discrepans, T. falconensis, T. zulianus,* etc. El escorpionismo tiene importancia en algunas regiones del país como los estados Miranda, Zulia, Falcón, Trujillo, Mérida, Monagas, Sucre y Distrito Capital, donde ha sido considerado un problema de salud pública (González-Sponga, 1997; De Sousa *et al*, 1998; Borges *et al*, 2006).

El veneno producido por los escorpiones, es una secreción apocrina, que es expulsada violentamente por el orificio del acúleo o aguijón. Dependiendo de la toxicidad de sus venenos, los escorpiones pueden dividirse en dos grupos; aquellos cuyo veneno produce solamente reacción local y aquellos cuyo veneno interfiere con el funcionamiento normal del individuo y que puede ser letal, ya que existen varios grados de toxicidad hacia mamíferos, insectos o crustáceos. Los venenos de escorpiones son considerados entre los más potentes, por la presencia de neurotoxinas. La letalidad del veneno de escorpión es excedida solo por la de ciertas bacterias y es comparable a la de neurotoxinas de serpientes. (Simard y Watt, 1990).

El veneno se compone básicamente de proteínas y péptidos de bajo peso molecular, que reconocen canales iónicos y modifican la excitabilidad celular. Contiene también aminoácidos libres, sales orgánicas, lípidos y hialuronidasa. Los venenos de escorpiones americanos carecen de enzimas o han demostrado bajos niveles de actividad enzimática. Por otro lado, el veneno del escorpión hindú, *Heterometus scaber,* contiene fosfatasa acida, ribonucleasa, 5'- nucleotidasa, hialuronidasa, acetilcolinesterasa y fosfolipasa (Simard y Watt., 1990; Krifi *et al.*, 2001).

Las neurotoxinas del veneno de escorpión son de tres clases: de cadena corta que contienen de 30 a 40 residuos de aminoácidos; de cadena mediana que contienen entre 60 y 70 residuos de aminoácidos y de cadena larga. Las neurotoxinas de cadena mediana son las más importantes desde el punto de vista médico ya que afectan a los mamíferos. (Krifi *et al.,* 2001).

Las proteínas de estos venenos se separan cromatográficamente por sus diferencias en pesos moleculares. El patrón de elución del veneno de *T. discrepans* presenta cuatro fracciones bien definidas (TdF-I, TdF-II, TdF-III, TdF-IV). Cada una de ellas está formada por alrededor de 20 a 30 toxinas diferentes. La TdF-I contiene la toxina curarizante. La TdF-II contiene las toxinas neurotóxicas por excelencia. TdF-III contiene las toxinas pancreatotóxicas y TdF-IV presenta propiedades cardiotóxicas (D´Suze *et al*., 1995)

Se ha determinado que, para escorpiones americanos, luego de la inyección subcutanea o intramuscular, el veneno aparece en sangre a los cinco minutos, alcanzando su concentración máxima entre 15 y 30 minutos, disminuyendo apreciablemente a las dos horas siguientes para desaparecer casi totalmente 7 a 8 horas después. Los máximos niveles tisulares aparecen en corazón, pulmón y bazo a los 30 minutos de la inyección y la eliminación se hace principalmente por los riñones (Botero y Restrepo, 2005; D´Suze *et al*, 1995)

Son responsables de los efectos generales del veneno sus acciones presinápticas, caracterizadas por la liberación masiva de neurotransmisores tanto a nivel de las terminaciones autonómicas, parasimpáticas y simpáticas, como a nivel de la médula suprarrenal. Los efectos experimentales o sintomatología clínica parecen depender del sistema más afectado, lo que a su vez estaría en relación con el tipo de toxina o especie de alacrán involucrado, la región geográfica, la estación del año, el

órgano o animal en que se estudia la acción del veneno, su estado funcional o el estado fisiológico general del paciente (D'Suze *et al.,* 1997).

Así, a veces predomina francamente la estimulación de las terminaciones parasimpáticas y en otras la del simpático es evidente. Es casi un hecho, aunque no demostrado, que la venina atraviesa la barrera hematocefalica y que muchos de los síntomas graves son de origen central o quizás también por estimulación intensa de los receptores periféricos. Es habitual, observar alteraciones metabólicas por la picadura o por la administración de veneno de *Buthidae (Tityus),* especialmente hiperglucemia e hipercalemia (D'Suze *et al.,* 1997).

El tratamiento específico del envenenamiento escorpiónico se basa en la administración del antiveneno, compuesto por la fracción F (ab')2 (fracción variable) de inmunoglobulinas equinas (IgG), desprovista del fragmento Fc (constante), responsable de las reacciones de hipersensibilidad por activación de la vía clásica del complemento. Este se administra por vía endovenosa, lo más precozmente posible con el fin de neutralizar el veneno. En Venezuela el antídoto para el envenenamiento por estos artrópodos, es el suero antiescorpiónico elaborado por el Centro de Biotecnología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela (Mota *et al*., 1994; Botero y Restrepo, 2005)

Para su producción se utiliza veneno extraído de escorpiones del Género *Tityus*, que es inyectado en equinos los cuales producen los anticuerpos específicos capaces de neutralizar los efectos nocivos de estos venenos. El proceso de elaboración del suero se inicia con la extracción del veneno de los escorpiones. En este proceso se estimula a los ejemplares para que piquen repetidamente un vidrio de reloj recubierto por una membrana plástica, la cual será lavada para disolver la venina del animal (Barona *et al*., 2004; Borges et al., 2006).

Una vez disuelto, el líquido resultante se lleva a un liofilizador, para eliminar el agua de la solución. Al momento de la administración, el veneno liofilizado se resuspende y se inyecta en los caballos, previa determinación de la potencia letal en ratones. Después de 10 a 12 días de inyectar al caballo, se le extrae la sangre, la cual se deja coagular, se centrifuga para separar el sobrenadante, y luego de varios procesos de purificación se obtiene el suero terminado (Borges *et al*., 2006; Barona *et al.,* 2004). El suero antiescorpiónico es una solución de inmunoglobulinas específicas, purificadas por digestión enzimática, concentradas y posteriormente titulado de forma tal que cada mililitro de suero neutraliza un mínimo de 0,2 mg. de veneno de escorpión del género *Tityus* (Mota *et al*., 1994; Botero y Restrepo, 2005)

A partir de las últimas décadas el bienestar de los animales de laboratorio es considerado un tema ético crítico y la utilidad de los anticuerpos (Ac) de huevo comenzó a ser reconocida, particularmente al demostrarse la posibilidad concreta de reemplazar el sangrado de los mamíferos por la simple recolección de huevos de gallina. Este tema fue actualizado con el trabajo de Russell y Burch del año 1959, titulado en inglés "The Principles of Humane Experimental Technique" en español "Los principios de la técnica experimental humana". En este se explican las tres R que se refieren a reemplazar los animales de experimentación por otros métodos que no impliquen su uso, reducir su número cuando sea necesario utilizarlos y refinar las técnicas para aminorar su sufrimiento (Vinardell, 2007).

A pesar que desde finales del siglo XVIII fue descrito el mecanismo de transferencia pasiva de inmunoglobulinas de la madre al hijo por nacer, debieron transcurrir más de 90 años, para que esta información fuera tomada en cuenta. Klemperer en 1893, demostró que ratones tratados parenteralmente con extracto de yema de huevo proveniente de gallinas inmunizadas con toxina tetánica quedaban protegidos contra posteriores dosis letales de la misma toxina administrada por vía parenteral. Probablemente esto se haya debido a la falta de información sobre las

posibilidades y ventajas del uso de los anticuerpos inmunoglobulina Y (IgY). Los trabajos de Polson *et al*., (1980) mostraron las ventajas del uso de IgY y propusieron una metodología relativamente sencilla para obtenerlas a partir de la yema de los huevos. El desarrollo de la industria avícola y la creación de gallinas ponedoras (1 huevo diario) también contribuyó positivamente al desarrollo científico y tecnológico de la obtención de IgYs aviares (Brierley y Hemmings, 1956; Polson y Wechmar, 1980; Chacana *et al*, 2004).

El gran impulso que tomó la avicultura industrial en los últimos años puso en evidencia la facilidad de contar con un animal relativamente pequeño aunque capaz de producir muchos más anticuerpos que un mamífero de laboratorio al no ser necesario su sacrificio para la obtención del suero sanguíneo. Esto se debe al gran avance que se logró con el desarrollo de líneas genéticas de gallinas ponedoras de alta postura capaces de producir más de 300 huevos al año por ave. A partir de 1980 se ha incrementado significativamente el uso de los Ac. IgY, en gran medida gracias a la disponibilidad de reactivos secundarios comerciales para la purificación rápida y simple de IgY, estándares de IgY y anticuerpos específicos anti-IgY marcados con fluoresceína, fosfatasa alcalina ó

peroxidasa. Desde 1996 la producción y el uso de los Ac. IgY se conoce como "tecnología IgY", denominación propuesta por Staak en 1995 y que en la actualidad se emplea internacionalmente como una terminología estándar (Chacana *et al*., 2004).

En ese mismo año el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) recomendó el uso de la IgY en reemplazo de la IgG mamífera para minimizar las situaciones dolorosas implicadas en la obtención de anticuerpos en los animales de laboratorio. En este mismo congreso también se brindó información práctica sobre la crianza de gallinas, la técnica de inmunización de las aves, el uso de diferentes adyuvantes, técnicas de extracción y conservación de la IgY, etc. En 1999

la Tecnología IgY fue aprobada por la Oficina Federal del Gobierno Suizo como un método alternativo tendiente a mejorar el bienestar animal. Actualmente el número de publicaciones sobre esta tecnología se incrementa constantemente, abarcando diferentes aspectos como la crianza y el mantenimiento de las aves, la transferencia de la IgY hacia la yema del huevo, la purificación de la IgY, su aplicación práctica en diversos métodos de diagnóstico e investigación y su empleo en inmunoterapia e inmunoprofilaxis médica y veterinaria, entre otros temas (Chacana *et al*., 2004; Vinardell, 2007).

Se han realizado varios estudios comparando las propiedades de la IgY de las aves con la de las IgG producidas en animales idénticamente inmunizados. En la mayoría de los casos se ha confirmado que la IgY puede ser utilizada de la misma manera que la IgG muchas veces, la IgY presenta ventajas con respecto a la especificidad, reacciones cruzadas ó sensibilidad. Durante la década pasada, se ha incrementado el uso de la IgY en la terapia ó profilaxis de enfermedades mediante el nuevo concepto de alimento funcional ó nutracéutico. Debido que la IgY es parte de la dieta normal no existe peligro de complicaciones alérgicas, y dado el gran incremento de la resistencia de las bacterias a los antibióticos, el uso de la IgY se presenta como una importante alternativa para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Además estos tratamientos resultan muy económicos y para enfermedades gastrointestinales estos Ac actúan *in situ* mediante una administración no traumática como es la vía oral (Xiao-Liang *et al*., 2006).

Probablemente la distancia filogenética sería la razón por la cual se pueden obtener Ac que presentan distinta especificidad, aún cuando aves y mamíferos sean inyectados con los mismos protocolos de inmunización, además de las diferencias propias de los sistemas inmunes de los mamíferos y las aves. Varios autores han informado que, particularmente en el caso de proteínas ó péptidos altamente

conservados, las gallinas dando pueden producir Ac en forma más eficaz que otros mamíferos (Wasif *et al*., 2006; Xiao-Liang *et al*., 2006).

Estructuralmente, la IgY se compone de dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas. Estas últimas contienen un dominio variable y cuatro dominios constantes. El peso molecular de la IgY es de alrededor de 167.250 Daltons. El punto isoeléctrico varía entre 5,7 y 7,6. La IgY se transfiere activamente desde la sangre a la yema, mediante un proceso donde están involucrados receptores específicos. En general, las IgM e IgA se pueden encontrar en la clara del huevo, mientras que la IgY predomina en la yema, con concentraciones de entre 10 y 20 mg/mL. Existen diferentes métodos de precipitación y cromatográficos para la extracción de la IgY a partir de la yema del huevo (Wasif *et al*., 2006; Xiao-Liang *et al*., 2006).

Comparada con la IgG mamífera, la IgY de los pollos presenta varias ventajas: es muy económica, se puede producir en grandes cantidades, se evita el sangrado del animal, no presenta reacciones cruzadas con los factores reumatoideos o los anticuerpos humanos anti-ratón, no activa el sistema de complemento mamífero, no interfieren con las heteroaglutininas humanas en la prueba de Coombs, presentan menor fluorescencia inespecífica en preparaciones inmunofluorescentes, etc. En muchos estudios, se ha demostrado que la IgY de pollo presenta afinidad y sensibilidad similares a las de la IgG mamífera. (Chacana, *et al.,* 2004).

Se han realizado trabajos anteriores en los cuales se involucra la IgY como una nueva solución para el envenamiento por artrópodos como es el caso de la producción de anticuerpos antiescolopendra (*Scolopendra gigantea*) realizado en el 2006 por un grupo de investigadores de la Universidad de Oriente y Universidad Central de Venezuela (Parrilla *et a*l., 2008)

Desde el punto de vista económico, la tecnología IgY también presenta ventajas incomparables. El costo de criar una gallina no es muy diferente al de un conejo, a pesar de que la producción de Ac de una gallina más o menos se corresponde con la de un animal grande, como por ejemplo una oveja o una cabra. De modo que una cantidad formidable de Ac puede ser producida a partir de una sola gallina, esta inmensa producción de Ac con costos relativamente bajos posibilita nuevos campos de aplicación, como por ejemplo la inmunoterapia y la inmunoprofilaxis de infecciones virales y bacterianas, tanto en medicina humana como veterinaria. Para alcanzar semejante producción de Ac utilizando mamíferos, los costos son mucho más elevados. Por lo tanto la intención es obtener anticuerpos derivados de huevos de gallinas contra el veneno de escorpión *Tityus caripitensis.*

.

JUSTIFICACIÓN

Los anticuerpos de yema de huevo son una interesante alternativa al uso de anticuerpos mamíferos. Hacia fines del siglo XVIII, el investigador alemán Klemperer demostró que extractos de yema de huevo obtenidos a partir de gallinas hiperinmunizadas contra la toxina tetánica, eran capaces de proteger a ratones inoculados con dosis letales de la misma toxina. La importancia de la tecnología IgY fue tenida en cuenta durante las últimas décadas, y actualmente se publican constantemente trabajos sobre la IgY, describiendo sus propiedades y aplicaciones en diferentes campos científicos. (Chacana *et al*, 2004; Brierley y Hemmings, 1956; Polson y Wechmar, 1980).

En Venezuela y el mundo siempre han existido los accidentes producidos por envenenamiento escorpiónico e invariablemente se ha necesitado un método eficaz para atender a los afectados el cual ya existe y es muy efectivo. Se trata del uso de suero antiescorpiónico a base de anticuerpos específicos obtenidos de mamíferos sensibilizados. Sin embargo, en la nueva era de la tecnología, se requiere optimizar las técnicas, disminuir los riesgos y también los daños ocasionados al ambiente, se necesitan métodos menos invasivos y dañinos. El uso de la tecnología IgY ofrece tales ventajas. Con la aplicación de estos avances se pueden obtener antiveninas de forma fácil y económica, sin provocar sufrimiento prolongado a los animales de experimentación. No se pretende un cambio inmediato, simplemente se desea contribuir en la búsqueda de soluciones concordantes con el nuevo futuro de la práctica médica.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Producir anticuerpos derivados de huevos de gallinas contra el veneno de escorpión (*Tityus caripitensis*)

Objetivos específicos

- Obtener y purificar parcialmente el veneno del escorpión *Tityus caripitensis*.
- Separar las fracciones cromatográfica del veneno de escorpión *Tityus caripitensis*.
- Inmunizar gallinas ponedoras por inyección subcutánea con la fracción II (TcII) o el veneno completo de escorpión *Tityus caripitensis*.
- Recolectar y preservar los huevos de gallinas, previa y post inmunización.
- Purificar a partir de la yema de los huevos las inmunoglobulinas (IgY) anti TcII y veneno completo de escorpión *Tityus caripitensis*.
- Cuantificar la concentración de IgY especifica en la yema de huevos contra TcII y veneno completo de escorpión *Tityus caripitensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio.

El estudio es de tipo cuantitativo experimental, cuantitativo porque el resultado de la investigación de estudio empírico se expresa como un valor numérico y experimental; este tipo de diseño se caracteriza por ejercer un estricto control sobre el experimento por medio del establecimiento de grupos de comparación a fin de manipular la variable independiente como la equivalencia de los grupos por medio de la asignación aleatoria de las unidades de análisis.

Universo y muestra

La muestra es, no probabilística, cualitativa e intencionada entiéndase por muestra no probabilística cuando la elección de los elementos no depende la probabilidad, sino con causas relacionadas con las características de la investigación que fue el uso de gallinas ponedoras; cualitativa porque la unidad de análisis o contextos, eventos o sucesos sobre la cual se recolectan los datos sin que necesariamente sea representativo; e intencionada porque este tipo de muestra exige un cierto conocimiento del universo, en el caso del estudio es el estado de conciencia del saber que se trabajo con gallinas ponedoras *Hy Line Brown*, porque tienen la capacidad de poner 300 huevos anuales la técnica consiste en que el investigador es el que escoge intencionalmente sus unidades de estudio. (Bijarro 2007).

Por lo tanto la muestra estuvo representada por 6 gallinas que se emplearon en el estudio, utilizándose 2 para control, 2 para ser inmunizadas con veneno completo de escorpión *Tityus caripitensis* y 2 más para ser inmunizadas contra la fracción II del veneno de escorpión *Tityus caripitensis.*

Materiales.

- Escorpiones. (*Tityus caripitensis*)
- Balance analítica (Ohaius)
- Cinta adhesiva de papel.
- Estimulador eléctrico SM6 con rango de 0 a 10 voltios.
- Capilares de vidrio Corning de 50 µl.
- Regla milimétrica
- Tubos eppendorf de 1,5 ml.
- Centrifuga de eppendorf mod. 5415.
- Espectrofotómetro Génesis #6 Thermo Espectronic
- Nevera a - 4^0C.
- Tubo de vidrio de 1,85 cm de longitud y un centímetro de diámetro.
- Fijadores de pared recubiertos con caucho para no dañar el tubo.
- Filtro de organza o tul.
- Buffer de acetato de amonio con un pH de 4,7.
- Gel sephadex de 100 Sigma.
- Gel sephadex del 50 Sigma.
- Veneno de escorpión *Tityus caripitensis*.
- Graficador por cambios isoeléctricos en la elución.
- Muestreador automático para cromatografía de líquido (Alltech® 570 Autosampler).
- Tubos falcón de 50 ml.
- Gallinas *Hy Line Brown*.
- Jaulas con dispensadores de agua y comida para el almacenamiento de las aves.
- Recipiente para el acopio del alimento.
- Taza para medir los 110 gr. comida/día y tratamiento hormonal.

- Ventilador para acondicionar el área de los animales.
- Fuente agua para el uso y mantenimiento de los animales.
- Cartones de huevos para la recolección.
- Nevera para preservación de los huevos.
- Marcadores
- Identificadores de plástico.
- Centrifuga Termo Centra CL3R.
- Embudos
- Gazas.
- Solución reguladora de fosfatos (PBS) pH de 7,2 – 7,4.
    - 75,59gr. de NaCl.
    - 1,23 gr. de K2HPO4.
    - 14,09 gr. de NaHPO4.
    - 2 gr. de KCl.
- Solución de poli etilenglicol PEG-6000.
    - Solución A al 17,5% de PEG-6000.
    - Solución B al 34% de PEG – 6000.
- Pipetas automáticas de 0,5 a 5000 µl de capacidad.
- Placas para ELISA de 96 pozos de 400 µl de capacidad, estériles de moléculas libres sin ningún tipo (de anticuerpo o antígeno) adheridos.
- Frascos de vidrio ámbar.
- Cilindros graduados.
- Antígeno (veneno crudo y fracción II Tc).
- Anticuerpo primario (inmunoglobulina Y a estudiar).
- Pipetas automáticas de 0,5 a 1000 µl de capacidad.
- Pipeta automática de 8 canales con una capacidad máxima de 400 µl.
- Puntillas para pipeta automática.

- Gaza.
- Cámara húmeda.
- OPD (orto-phenylendiamine dihydrochroride).
- Solución buffer citrato – fosfato sódico al un pH 5.
- Incubadora para Laboratorio (estufa de cultivo de microorganismos) marca CRAFT®, con alcance de 5°C arriba de la temperatura ambiente hasta 70°C, así como en ensayos diversos de temperatura (normalmente se opera a 37°C).
- Anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano picante.
- Solución reguladora de fosfatos (PBS) 10X pH de 7,2 – 7,4.
- Tween 20.
- Solución preparada con albumina de suero bovino (BSA) al 3%.
- Lector de placas de ELISA Magallanes Tecan Sunrise Plate Readers.
- pH metro.

Procedimientos

Obtención de veneno de escorpión *T. caripitensis* y su purificación parcial.

Los escorpiones provenientes de la población de El Limón del Municipio Punceres del estado Monagas, mantenidos en el Laboratorio de Alacranología de la Escuela de Ciencias de la Salud UDO Bolívar durante al menos una semana, fueron pesados en una balanza analítica (Ohaius). Se ordeñaron los mayores de 1g, Antes de ordeñar, se utilizó una solución desinfectante para acondicionar el local y la mesa. El veneno se obtuvo mediante estimulación eléctrica, para lo cual, el escorpión fue sujetado por su mesosoma a la superficie de la mesa mediante cinta adhesiva (3M®). Una pinza conectada a uno de los polos de un estimulador eléctrico (Grass, SM6 con rango de 0 a 10 voltios) se colocó en los pedipalpos del artrópodo, mientras que el

otro polo se conectó al telson. Se humedeció con agua destilada el sitio de contacto de los electrodos con el escorpión para facilitar la conducción eléctrica y se administraron entre 3 y 5 trenes de pulsos eléctricos con frecuencia de 6pps, duración de 100ms y 60 voltios. Se dejó reposar al animal alrededor de 60 segundos luego de cada tren de estímulos eléctricos. El veneno se recolectó mediante el uso de capilares de vidrio no heparinizados (Corning), colocados en el extremo distal del aguijón del animal, fue cuantificado en su volúmen y disuelto en aproximadamente 1ml de agua destilada.

Mediante el uso de un agitador (Vortex) se mezcló vigorosamente el veneno con el agua, para luego centrifugarlo (Eppendorff mod. 5415) a 10000rpm, durante 5 minutos. El sobrenadante se separó del precipitado y se cuantificó la concentración de proteínas mediante método espectrofotométrico (Génesis #6, Thermo spectronic), para posteriormente almacenarlo hasta su uso a -20ºC en tubos Eppendorf de 1,5ml.

Separación cromatográfica del veneno del escorpión *T. caripitensis*.

Para tal fin, se usó una columna de vidrio de 1,85cm de longitud y 1cm de diámetro (Fabricación casera), que fue cargada con gel Sephadex G-50, previamente hidratado con Buffer Acetato de Amonio, pH 4,7. El extremo inferior de la columna se cubrió con un trozo de organza triple. Antes de cargar el gel Sephadex G50 se colocó aproximadamente 1cm^3 de gel Sephadex G100. Una vez cargada la columna, se dejó eluir buffer hasta lograr la estabilidad del sistema, garantizando la ausencia de grumos o burbujas de aire en el gel. Un mililitro de una solución de veneno concentrada aproximadamente 10mg/ml con una masa de 5 mg, se colocó en el extremo superior de la columna, evitando generar turbulencia. El eluato fue recogido en tubos de vidrio (10 cm^3 de capacidad) mediante un colector automático para cromatografía líquida (Alltech® 570 Autosampler), a volúmenes iguales por tubo.

La concentración de proteínas en cada tubo fué determinada espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia a 280nm de longitud de onda. Se construyó un cromatograma graficando el número del tubo (volumen acumulado de retención) contra la Absorbancia de cada tubo (concentración de proteínas). Luego se determinó el número de fracciones cromatográficas según los picos de Absorbancia observados, y se procedió a reunir el contenido de los tubos que correspondan a cada fracción. Para ello se usaron tubos de polietileno de 50ml (Falcon). Se midió volumen y absorbancia de cada fracción y se almacenó a-20ºC.
El proceso completo se realizó por triplicado.

Se calculó el rendimiento en base a la siguiente formula.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Veneno Recuperado X 100}}{\text{Veneno Inicial}}$$

Inmunización de gallinas ponedoras.

Se utilizaron gallinas ponedoras *Hy Line Brown*, de alrededor de 18 semanas de edad, las cuales se ubicaron en el Bioterio de la escuela de Ciencias de la Salud UDO Núcleo de Bolívar. Se identificaron con letras del alfabeto e individualizaron en jaulas acondicionadas para proveerles de alimento y agua "*ad libitum*".

Se escogieron al azar pares de gallinas que conformaron grupos control y experimental. El protocolo de inmunización contemplo cuatro administradas cada 15 días, procedimiento total de 45 días, cada dosis se administro fraccionada a partes iguales por dos vías: subcutánea (músculo pectoral) e intramuscular (muslo), alternando al lado izquierdo con el derecho en dosis sucesivas. La dosificación se explica en el cuadro a continuación.

	Día 0	Día 15	Día 30	Día 45
CONTROL Gallinas I y E	300µL AD	300µL AD	300µL AD	300µL AD
VENENO COMPLETO Gallinas A y D	150µLAg+ 150µL ACF	150µLAg+ 150µL AIF	150µLAg+ 150µL AIF	150µLAg+ 150µL AD
FRACCION II Gallinas H y J	150µLAg+ 150µL ACF	150µLAg+ 150µL AIF	150µLAg+ 150µL AIF	150µLAg+ 150µL AD

Ag= Antígeno

AD= Agua Destilada

ACF=Adyuvante Completo de Freund

AIF= Adyuvante incompleto de Freund

Recolección y preservación de los huevos de las gallinas, previa y post inmunización.

Los huevos fueron recolectados diariamente, rotulados y almacenados a 4ºC hasta su procesamiento.

Purificación de las inmunoglobulinas (IgY) anti TcII y veneno completo del escorpión *Tityus caripitensis,* a partir de la yema de los huevos de las gallinas.

Los huevos fueron lavados con agua y jabón, (Isorgan gel). Se rompió la cáscara vertiendo el contenido en un separador de yemas. La yema se lavó con agua destilada y se pesó con balanza analítica. Se punzó con una aguja la membrana externa de la yema y su contenido vertido en un beacker. Se agregó tres volúmenes de PBS (0,01M y pH 7,35) equivalentes al peso inicial de la yema. Se mezcló por agitación constante y vigorosa hasta homogenizar.

Luego se procedió a agregar un volumen de solución A (17,5% de PEG-6000) dispensándolo gota a gota con agitación constante hasta homogenizar. La mezcla ya homogénea se trasvasó a un tubo Falcon de 50mL y se centrifugó a 1000g por 20 minutos a 4^0C. Se filtró la mezcla con la ayuda de un embudo y gasa, y al filtrado se le adicionó un volumen de cloroformo equivalente a la tercera parte del peso inicial de la yema, agitando la mezcla hasta homogenizar (alrededor de 5 minutos), y se centrifugó a 1000 g por 10 minutos a 4^0C.

El sobrenadante se recuperó con una pipeta Pasteur, teniendo el debido cuidado de no absorber los lípidos precipitados en la capa blanca, ni el remanente de cloroformo. Después se adicionó un volumen de solución B (34% de PEG-6000) gota

a gota agitando constantemente, teniendo en cuenta que el volúmen es equivalente a la tercera parte del volumen del sobrenadante obtenido en la separación de grasas.

Se agitó por 5 minutos aproximadamente y se centrifugó por 20 minutos a 4^0C a una velocidad de 1000 g. Se descartó el sobrenadante y se disolvió por agitación el precipitado resultante en un volúmen de PBS correspondiente al peso inicial de la yema. La solución resultante se distribuyó en alícuotas de 2,5mL, y se almacenará a -20^0C.

Cuantificación de IgY especifica contra TcII y veneno completo de escorpión *Tityus caripitensis* en la yema de huevos

Se realizaron Ensayos Inmunoenzimáticos (ELISA) de tipo indirecto según el siguiente esquema:

- Se sensibilizaron dos placas una con el veneno completo de *Tityus caripitensis* y otra con la fracción II Tc. Para ello se adicionaron 100µl de una solución del antígeno, (*Tityus caripitensis* y fracción II Tc) a una concentración de 5 µL/mL en buffer carbonato – bicarbonato a un pH 9,5 o con PBS en una dilución 1:10 de la solución inicial de PBS. Las placas se incubaron durante la noche a 4ºC, en cámara húmeda. Luego de descartar por inversión el exceso de antígeno sensibilizante, se colocó 200µL de una solución de albumina de suero bovino (BSA) al 3% con PBS 1:10 al 0,05% de Tween 20. Las placas se incubaron durante la noche a 4ºC, en cámara húmeda. Una vez descartada por inversión exceso de solución de BSA, se añadió a cada pozo 100µL del anticuerpo previamente purificado (Anticuerpo primario IgY en estudio) diluido 1:100 en solución de bloqueo.
- Se incubó a 37^0C por hora y media; se descartó por inversión el exceso de anticuerpo primario y se lavó 3 veces con 200 µl de la solución de lavado (PBS 1:10

al 0,05% de tween 20). Luego a cada pozo se agregó 100µl de una solución IgG de conejo anti-IgY, marcada con peroxidasa de rábano a una dilución 1:20000 en PBS 1:10 al 0,05% de tween 20. Se incubó por una hora a 37^0C en cámara húmeda.

- Se lavó 3 veces con un intervalo de agitación de 10 minutos, entre agitación. Posteriormente se agregó 100µL por pozo de OPD (orto-phenylendiamine dihydrochroride) diluido en un rango de 0,75 al 1mg/ml en solución buffer citrato – fosfato sódico a un pH 5. Se incubó por un periodo de 20 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente, para después de agitar por 1 minuto fue leído en espectrofotómetro a 440 nm. Las placas de ELISA se llenaron según el siguiente esquema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Cp	Cn	Cs
B	X	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Cp	Cn	Cs
C	X	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Cp	Cn	Cs
D	X	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Cp	Cn	Cs
E	X	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Cp	Cn	Cs
F	X	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Cp	Cn	Cs
G	X	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Cp	Cn	Cs
H	X	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Cp	Cn	Cs

X= Proteínas preinmunes

Y= Proteínas postinmunes

Cp= Control positivo

Cn= Control negativo

Cs= Control sistema

Análisis de resultados.

Los resultados se presentaron en gráficos y para variables numéricas continuas, tales como las diferentes concentraciones de IgY sensible contra el veneno de escorpión *Tityus caripitensis* y su fracción II. El tipo de gráfico más conveniente es la graficación lineal.

RESULTADOS

Se obtuvo el veneno del escorpión *Tityus caripitensis* el cual fue parcialmente purificado por centrifugación separando el sobrenadante que se conservó a 4^0C y descartándose el precipitado ya que este puede contener restos celulares y moco.

Del veneno parcialmente purificado se tomó una solución de 10mg/ml de concentración, que fue separada por cromatografía líquida de exclusión molecular de baja resolución, los eluatos recogidos fueron medidos espectrofotométricamente. Se construyó una gráfica usando el volumen acumulado de retención, expresado en ml versus la absorbancia de cada tubo (concentración de proteínas) en la cual se pueden observar 4 picos, en el cromatograma lo que demuestran que específicamente el veneno en estudio posee 4 fracciones cromatográficas. Siendo la fracción II la más grande, representando el 74,41% del total del veneno (Grafico #1).

El rendimiento total del proceso de separación cromatográfica del veneno fue de 88,08%, se observó un mejor rendimiento en la segunda cromatografía, teniendo un rendimiento de 89,26% (Tabla 1).

Los huevos se recolectaron diariamente, identificados y guardados a 4^0C. Las gallinas en razón de su fisiología sufrieron una fase de desplume, que coincidió con la segunda y tercera dosis del protocolo interrumpiendo la postura diaria el tiempo que duró el desplume.

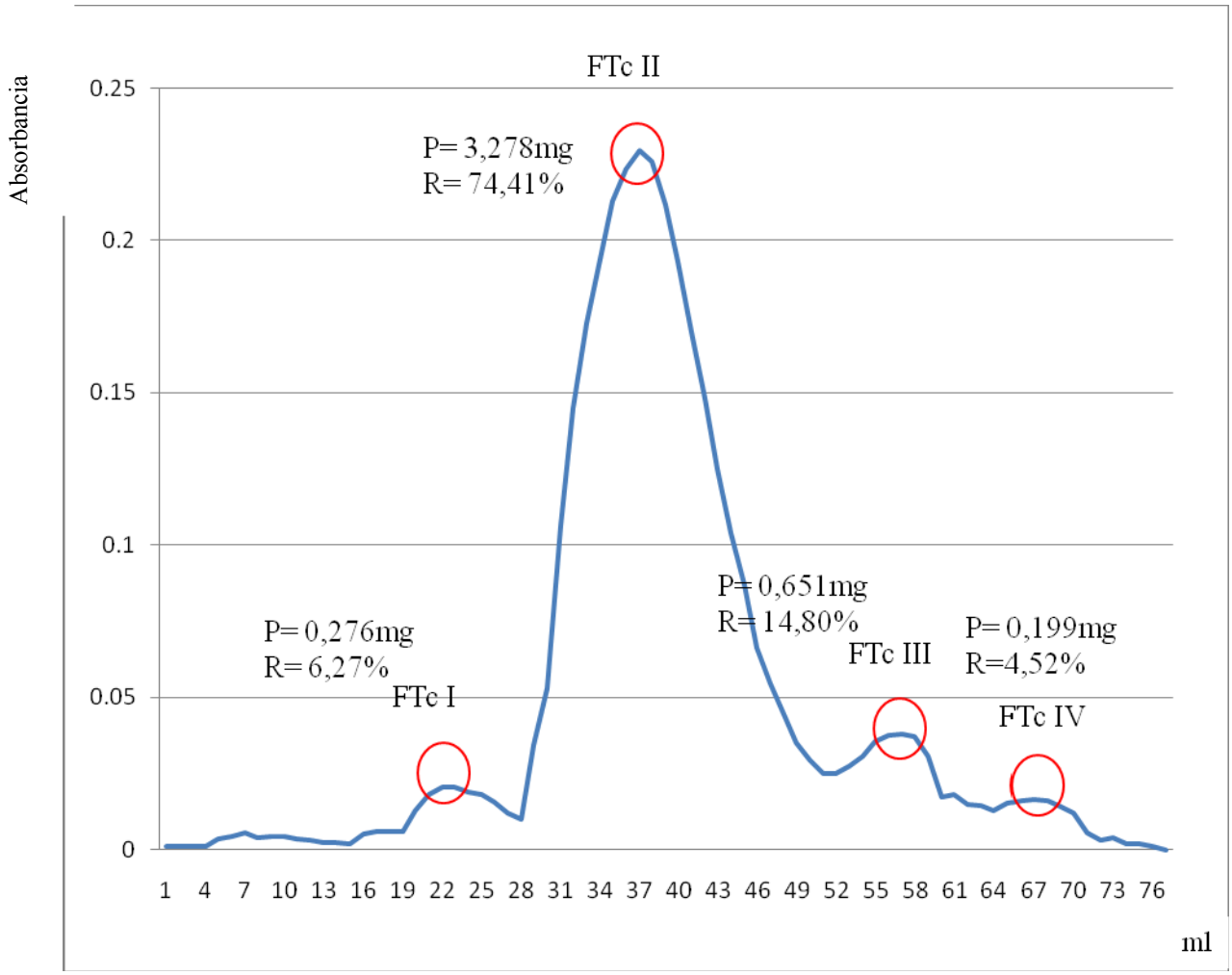
Las inmunoglobulinas obtenidas en la purificación, de hecho, son especificas contra el veneno de escorpión *Tityus caripitensis,* lo que se demostró con el ELISA. De las gallinas inmunizadas contra veneno completo respondieron en forma efectiva

y cuantificable, desafortunadamente dicha respuesta no fue muy alta contra la fracción IITc (Grafico #2).

Se debe agregar que la respuesta no fue la misma en todas las aves ya que aparte de que las aves con fracción IITc en el grafico # 2 gallina H y J, en la H la respuesta fue pobre y en la gallina J se puede ver que no hubo respuesta alguna.

Grafico 1

Cromatograma por exclusión molecular de veneno de escorpión *Tityus caripitensis*



P= peso en mg de la fracción correspondiente.

R= porcentaje del veneno total correspondiente a la fracción.

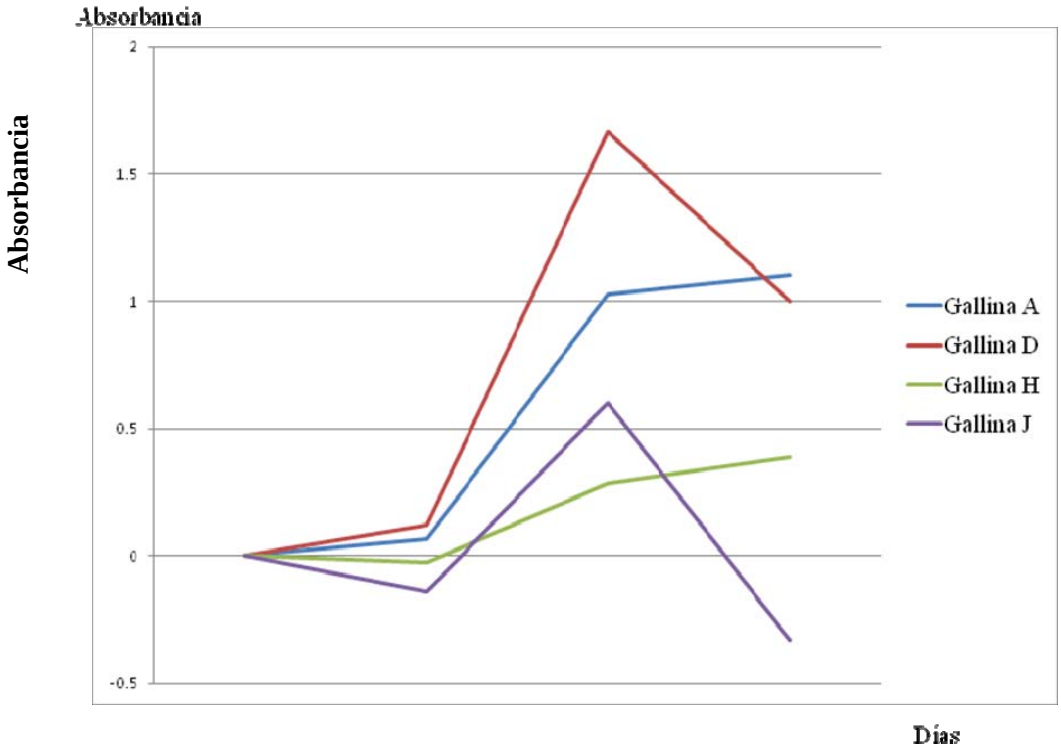
Tabla 1

Rendimiento de la Cromatografía de veneno de escorpión *Tityus caripitensis*.

Cromatografía	Fracciones en peso (mg) y (%)				Total mg y %
	TcI	TcII	TcIII	TcIV	5mg de VC inicial
1era	0,266 6,08	3,287 75,13	0,654 14,95	0,168 3,84	4,375 87,5
2da	0,288 6,45	3,350 75,06	0,625 14,00	0,200 4,48	4,463 89,26
3era	0,275 6,24%	3,198 73,03	0,676 15,45	0,230 5,25	4,379 87,58
Promedio (mg) %	0,276 6,25	3,278 74,41	0,651 14,80	0,199 4,52	4,405 88,08

Grafico 2

Curva de producción de IgY especifica contra veneno de escorpión *Tityus caripitensis* y fracción II del mismo



Gallina A y D: inmunizadas con veneno completo de *Tityus caripitensis.*

Gallina H y J: inmunizadas con fracción II de veneno de *Tityus caripitensis*

DISCUSIÓN

Se evidenció que el veneno de *T. caripitensis* posee cuatro fracciones bien precisadas (grafico 1) al igual que el patrón de elución del veneno de *T. discrepans* (TdF-I, TdF-II, TdF-III, TdF-IV) (D´Suze *et al*., 1997).

Haciendo comparación con diversos autores también se puede observar que en este proyecto se evidenciaron 4 fracciones bien definidas, a diferencia del trabajo de Moanack y Rodney en el 2000 donde solo se evidenció 3 fracciones del veneno de *T. caripitensis,* suponemos que este resultado fue así porque usaron una cantidad de veneno menor que la empleada en este estudio.

El protocolo de inmunización es el mismo que se emplea para mamíferos y dio resultados óptimos en las aves de experimentación, y disminuye potencialmente el sufrimiento animal, obteniendo títulos de ELISA muy similares al control, por lo que otros autores estuvieron de acuerdo en decir que el gran impulso que tomó la avicultura industrial en los últimos años puso en evidencia la facilidad de contar con un animal relativamente pequeño aunque capaz de producir muchos más anticuerpos que un mamífero de laboratorio al no ser necesario su sacrificio para la obtención del suero sanguíneo. Desde 1996 la producción y el uso de los Ac. IgY se conoce como "Tecnología IgY", denominación propuesta por Staak en 1995 y que en la actualidad se emplea internacionalmente como una terminología estándar (Chacana *et al*., 2004).

Investigadores diversos como Wasif *et al*., y Xiao-Liang han realizado trabajos anteriores en los cuales se involucra la IgY, como alternativa a las IgG mamíferas, empleando el mismo protocolo de inmunización, obteniendo resultados igual de satisfactorios (Parrilla *et a*l., 2008).

CONCLUSION

- Se obtuvo purificación parcial de veneno de escorpión *T. caripitensis.*

- Se evidencio que el veneno de escorpión *T. caripitensis* posee cuatro fracciones cromatográficas siendo la de mayor importancia medica la fracción II

- Se logro inmunizar eficazmente a las gallinas *Hy line Brown*, contra el antígeno en estudio TcII y veneno completo de escorpión *Tityus caripitensis*.

- Se obtuvieron inmunoglobulinas Y por método del PEG 6000 provenientes de las yemas de los huevos recolectados durante la inmunización.

- Se alcanzó cuantificar la concentración de IgY especifica anti-TcII y anti-veneno completo del escorpión *Tityus caripitensis* por métodos de ELISA.

RECOMENDACIONES

- Contar con las instalaciones adecuadas para mantener a los animales de experimentación.
- Contar con el personal debidamente entrenado para la cría y cuidado de los animales de experimentación.
- Concientizar que el uso de IgY es menos agresivo que el uso de las IgG mamíferas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Barona, J., Otero, R., Núñez V. 2004. Aspectos toxicológicos e inmunoquímicos del veneno de escorpión *Tityus pachyurus* Pocock de Colombia: Capacidad neutralizante del veneno de antivenenos producidos en latinoamerica. Biomédica **24**(1):42-49.

Bijarro H. F. 2007. Desarrollo estratégico para la investigación científica, Manual práctico de la producción de la riqueza, Edición electrónica gratuita. Texto completo en http://www.eumed.net/libros/2007c/306/index.htm visitado el 25/02/2010

Borges, A, De Sousa, L, Manzanilla, J. 2006. Description of a new *Tityus* species (Scorpiones: Buthidae) from Sierra of Portuguesa, western Venezuela, based on morphological and mitochondrial DNA evidence. Zootaxa. **1107:** 49–68

Borges A., De Sousa, L., Espinoza, L., Santos, R. G., Kalapothakis, E., Valdares, D., Chávez- Olórtegui, C. 2008. Characterization of *Tityus* scorpion venoms using synaptosome binding assays and reactivity towards Venezuela and Braziliam Antivenoms. Toxicon. **35**(12) :1683-1689

Botero, D., Restrepo M. 2005. Accidentes causados por animales venenosos y ponzoñosos. En: Parasitosis Humana. Corporación para investigación bilógica. 4ta Ed. Medellín Colombia.

Brierley, J., y Hemmings, W.A. 1956. The selective transport of antibodies from the yolk to the circulation of the chick. Agricultural research council's unit of embryology, University College of North Wales, Bangor. J. embrioyol, exp. Morph. **4**(1): 34-41

Chacana, P. A., Terzolo, H R., Gutiérrez, E., y Schade, R., 2004 Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina: biología, propiedades y su aplicación en medicina humana y veterinaria. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Rev Med Veterin Buenos Aires Argentina. **85** (5): 179-189.

De Sousa, L., Parrilla-Álvarez, P., Velasquez, R., Perez, O., Ledezma, E., Jorquera, A., y Quiroga, M. 1998. Mortality Caused By Scorpion Stings In Sucre State, Venezuela (Abstract). 6th Panamerican Congress on Animal, Plant and

Microbial Toxins, Isla De Mrgarita, Venezuela. J. Venom. Anim. Toxins **6** (2): 128- 166

D'Suze, G., Sevcik, C., y Ramos, M. 1995 Presence of Curarizing Polypeptides and a Pancreatitis Inducing Fraction Without Muscarinic Effects in the Venom of the Venezuelan Scorpion *Tityus Discrepans* Karsch. Toxicon. **33:** 333-345.

D´Suze, G., Sevcik ,C., Perez, J. F. y Fox, J.W. 1997. Patrón de elusión de *T. discrepans* Laboratorio de Neurofarmacología Celular Centro de Biofísica y Bioquímica Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC Toxicon Vol. **35** (3): 333-345

González – Sponga M.A. 1997. Guía para identificación de escorpiones de Venezuela. Caracas: cuadernos de Lagoven. Vistitado el 25/02/2010 http://venciclopedia.com/index.php?title=Manuel

Krifi MN, Miled K, Abderrazek M, El Ayeb M. 2001 Effects of antivenom *on Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpion venom pharmacokinetics: towards an optimization of antivenom immunotheraphy in a rabbit model. Toxicon; **39**: 1317-1326.

Lucas M., y Da Silva, P. 1992. Escorpiones de interese medico no Brasil. Schvartsman S. plantas venenosas e animals peçonhentos. São Paulo. **1:** 211-214

Moanack, J. y Rodney, M. 2000. Inmunogenicidad y reactividad homóloga y heteróloga de las fracciones cromatográficas del veneno de escorpión *Tityus caripitensis.*trabajo de grado UDO

Mota, J.V., de Nieto, G., Bastardo, M., Rodriguez, J., Duque, L., Freites, L.A.1994. Emponzoñamiento escorpionico: clínica y laboratorio usando antiveninas. Bol. Hosp. Niños (Caracas). **30** (3): 35-40

Parrilla-Alvarez, P., Navarrete, L F., Girón, M. E., Aguilar, I., Rodríguez-Acosta A 2008: Use Of Hen Egg Derived Immunoglobulin Against Scolopendra (*Scolopendra Gigantea*) Venom. Rev Cient, FCV-LUZ / **18**(4): 385-392**.**

Polson, A.; von Wechmar, M. 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks if immunized hens. Immunol. Comm. **9**(5):475-493.

Polson, A., von Wechmar, M.V., Fazakerley, G. 1980. Antibodies to proteins from yolk of immunized hens. Immunol. Comm. **9**(5):495-514.

Simard J.M., Watt D.D. 1990. Venoms and toxins. In: POLIS GA. Ed. *The biology of scorpions.* Stanford: Stanford University Press, 414-444.

Vinardell Martínez-Hidalgo M .P. 2007. Alternativas a la experimentación animal en toxicología: situación actual. Universidad de Barcelona, España Acta bioethca. **13** (1): 41-52.

Valderrama, R, Otero, R, Ángel, R, y García, ME. 1998. Envenenamiento por picadura de escorpiones, Primer Simposio Colombiano de Toxinología: Toxinas y envenenamiento por animales, plantas y microorganismos. Medellín: ecográficas limitada. 211- 214.press 588.

Wasif Malik M., Ayub N. Zia Qureshi I. 2006 Passive immunization using purified IgYs against infectious bursal disease of chickens in Pakistan. Dep of Bio Sciences, Quaid-i-Azam University, Islamabad P.O Pakistan. J of vete Science. **7**(1): 43-46.

Xiao-liang, LI., Jiang-bing S., Wei-huan, F.: 2006. Protection of *Carassius auratus Gibelio* against infection by *Aeromonas hydrophila* using specific immunoglobulins from hen egg yolk. Institute of Preventive Veterinary Medicine and Zhejiang Provincial Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang University, J Zhejiang University China. **7**(11): 922-928

METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

TÍTULO	INMUNOGLOBULINA Y DERIVADA DE HUEVO DE GALLINA CONTRA EL VENENO DE ESCORPION Tityus caripitensis.
SUBTÍTULO	

AUTOR (ES):

APELLIDOS Y NOMBRES	**CÓDIGO CULAC / E MAIL**
Suarez Inzana, Elizabeth Carolina	CVLAC: 17657884 E MAIL: emanson56@hotmail.com
Velazquez Zamora, Yonathan Alexander	CVLAC: 17885918 EMAIL: yalx19@hotmail.com
	CVLAC: E MAIL:
	CVLAC: E MAIL:

PALÁBRAS O FRASES CLAVES:

Veneno de escorpión Tityus caripitensis, fracción IITc e inmunoglobulina Y.

METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

ÀREA	SUBÀREA
Departamento de Ciencias Fisiológicas	Farmacología

RESUMEN (ABSTRACT):

El accidente escorpiónico es considerado en algunos países un problema de salud publica. En Venezuela, existen áreas donde han ocurrido muertes, sobre todo en niños. En la región oriental, el escorpión Tityus caripitensis ha causado accidentes graves y mortales. El tratamiento consiste en la administración de inmunoglobulinas obtenidos de suero de caballos inmunizados. Para contribuir a la resolución del problema medico, el estudio del veneno y la producción de una antivedina específica con el menor maltrato animal es de vital importancia. El veneno se fracciono por el método de cromatografía de exclusión molecular de baja resolución, obteniéndose 4 picos de elución. La fracción II (TcII) resulto la de mayor tamaño con 74,41 % del veneno total por lo que fue seleccionada como antígeno, junto al veneno completo, para inducir la producción de anticuerpos específicos a partir de gallinas. Los anticuerpos IgY fueron obtenidos a partir de las yemas de huevos mediante el método de polietilenglicol-cloroformo y su especificidad medida mediante ELISAs, resultando mejor antígeno el veneno completo. Se demuestra que el uso de aves para la obtención de anticuerpos es una alternativa menos agresiva para los animales de experimentación.

METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

CONTRIBUIDORES:

APELLIDOS Y NOMBRES	**ROL / CÓDIGO CVLAC / E_MAIL**				
Dr. Parrilla, Pedro	ROL	CA	AS	TU X	JU
	CVLAC:	4771295			
	E_MAIL	pparrill@hotmail.com			
	E_MAIL				
Dra. Quiroga, Mercedes	ROL	CA	AS	TU	JU X
	CVLAC:	728867			
	E_MAIL	mquirog@hotmail.com			
	E_MAIL				
Dra. Norka Balliache	ROL	CA	AS	TU	JU X
	CVLAC:	3347894			
	E_MAIL	norkaballiache@hotmail.com			
	E_MAIL				

FECHA DE DISCUSIÓN Y APROBACIÓN:

2010 AÑO	04 MES	21 DÍA

LENGUAJE. SPA

METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

ARCHIVO (S):

NOMBRE DE ARCHIVO	TIPO MIME
TESIS INMUNOGLOBULINA Y DERIVADA DE HUEVO DE GALLINA CONTRA EL VENENO DE ESCORPION Tityus caripitensis.Doc	Aplicatios/ms.Word

ALCANCE

ESPACIAL: Bioterío de la Escuela de Ciencias de la Salud, Ciudad Bolívar, Estado Bolívar. Laboratorio de Biociencia del IDEA, Ciudad de Caracas, Distrito Capital.

TEMPORAL: 5 años.

TÍTULO O GRADO ASOCIADO CON EL TRABAJO:
Lcdo. en Bioanálisis

NIVEL ASOCIADO CON EL TRABAJO:
Pregrado

ÁREA DE ESTUDIO:
Departamento de Ciencias Fisiológicas

INSTITUCIÓN:
Universidad de Oriente

METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

DERECHOS

De acuerdo al articulo 44 del reglamento de trabajos de grado
"Los Trabajos de grado son exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente y solo podrán ser utilizadas a otros fines con el consentimiento del consejo de núcleo respectivo, quien lo participara al Consejo Universitario

ELIZABETH SUAREZ
AUTOR

YONATHAN VELAZQUEZ
AUTOR

PEDRO PARRILLA
ASESOR

MERCEDES QUIROGA
JURADO

NORKA BALLIACHE
JURADO

Sello

POR LA SUBCOMISION DE TESIS