



UNIVERSIDAD DE ORIENTE

NÚCLEO DE BOLÍVAR

ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD “Dr. Francisco Battistini Casalta”

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS

LABORATORIO DE ALACRANOLOGÍA

**ACTIVIDAD DE ANTICUERPOS POLICLONALES IgY A  
PARTIR DE GALLINAS INMUNIZADAS DIRIGIDOS CONTRA  
EL VENENO DE *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox***

**Asesor:**

Dr. Parrilla-Álvarez, Pedro Eleazar

**Trabajo de grado presentado por:**

Hernández Bascetta, Enrico Alberto

C.I. N° V- 18.476.565

Izaguirre González, Edenys Lourdes

C.I. N° V- 18.477.346

**Como requisito parcial para optar al  
título de Médico Cirujano**

Ciudad Bolívar, Febrero de 2012

## INDICE

DEDICATORIA .....	v
AGRADECIMIENTOS .....	ix
RESUMEN .....	xi
INTRODUCCIÓN .....	1
JUSTIFICACIÓN .....	19
OBJETIVOS .....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos .....	20
METODOLOGÍA .....	22
1.1    Materiales .....	22
1.1.1 Extracción de veneno crudo, inmunización y recolección de huevos.....	22
1.1.2 Purificación de yema.....	22
1.1.3 Cuantificación de proteínas, Microbradford .....	23
1.1.4 Electroforesis .....	23
1.1.5 Ensayo Inmunoenzimático (ELISA).....	24
1.2    Métodos .....	25
1.2.1 Animales de experimentación.....	25
1.2.2 Obtención de los venenos .....	25
1.3 De la inmunización de las gallinas con venenos individuales o mezclados de <i>Tityus caripitensis</i> , <i>Tityus breweri</i> y <i>Bothrops atrox</i> .....	26
1.3.1 Primera Inmunización.....	27
1.3.2 Segunda Inmunización (Primer refuerzo):.....	27
1.3.3 Tercera Inmunización (Segundo refuerzo): .....	27
1.3.4 Cuarta Inmunización (Reto):.....	27
1.4 De la recolección de los huevos pre y postinmunes de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de <i>Tityus caripitensis</i> , <i>Tityus breweri</i> y <i>Bothrops atrox</i> .....	29
1.4.1 Universo.....	29
1.4.2 Muestra .....	29

1.5 De la evaluación de la viabilidad de los huevos de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de <i>Tityus caripitensis</i> , <i>Tityus breweri</i> y <i>Bothrops atrox</i> , según el tiempo desde la postura.....	29
1.5.1 Características morfológicas .....	30
1.5.2 Características físicas.....	30
1.5.3 Facilidad en la purificación de las proteínas de la yema.....	30
1.5.4 Actividad de las IgYs.....	30
1.6 De la purificación de las IgYs presentes en la yema de huevos de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de <i>Tityus caripitensis</i> , <i>Tityus breweri</i> y <i>Bothrops atrox</i> . Para obtención de suero proteico.....	31
1.7 De la demostración en el suero proteico obtenido a partir de la yema de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de <i>Tityus caripitensis</i> , <i>Tityus breweri</i> y <i>Bothrops atrox</i> la presencia de inmunoglobulinas aviares que lo reconocen y precipitan..	32
1.8 De la determinación de la pureza de proteínas obtenidas a partir de la yema de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de <i>Tityus caripitensis</i> , <i>Tityus breweri</i> y <i>Bothrops atrox</i> . .....	33
1.9 De la capacidad de las inmunoglobulinas aviares obtenidas a partir de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de <i>Tityus caripitensis</i> , <i>Tityus breweri</i> y <i>Bothrops atrox</i> para reconocer cruzadamente diferentes antígenos.....	34
1.10 De la determinación de la pureza de proteínas presentes en el suero de huevos de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de <i>Tityus caripitensis</i> , <i>Tityus breweri</i> y <i>Bothrops atrox</i> . .....	35
RESULTADOS.....	36
2.1 De la inmunización de gallinas con venenos individuales o mezclados de <i>Tityus caripitensis</i> , <i>Tityus breweri</i> y <i>Bothrops atrox</i> y sus efectos. ....	36
2.2 De la evaluación de la viabilidad de los huevos de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de <i>Tityus caripitensis</i> , <i>Tityus breweri</i> y <i>Bothrops atrox</i> , según el tiempo desde la postura.....	37
2.2.1 Huevos óptimos para ser purificados (HOP).....	37
2.2.2 Huevos con dificultades en su purificación (HDP).....	38
2.2.3 Huevos no aptos para ser purificados (HnAP).....	38
2.3 De la purificación de las IgYs de la yema de huevos de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de <i>Tityus caripitensis</i> , <i>Tityus breweri</i> y <i>Bothrops atrox</i> . Para obtención de suero proteico. ....	42

2.4 De la demostración de la presencia en el suero proteico obtenido a partir de la yema de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de <i>Tityus caripitensis</i> , <i>Tityus breweri</i> y <i>Bothrops atrox</i> la presencia de inmunoglobulinas aviares que lo reconocen y precipitan.....	43
2.5 De la determinación la concentración de proteínas presentes en el suero de huevos de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con venenos de <i>Tityus caripitensis</i> , <i>Tityus breweri</i> y <i>Bothrops atrox</i> . .....	63
2.6 De la capacidad de las inmunoglobulinas aviares obtenidas a partir de gallinas Isa Brown inmunizadas con veneno de <i>Tityus caripitensis</i> , <i>Tityus breweri</i> y <i>Bothrops atrox</i> para reconocer cruzadamente diferentes antígenos.....	64
2.7 De la determinación de la pureza de proteínas obtenidas a partir de la yema de huevos de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de <i>Tityus caripitensis</i> , <i>Tityus breweri</i> y <i>Bothrops atrox</i> . .....	67
DISCUSION .....	69
CONCLUSIONES .....	81
RECOMENDACIONES.....	83
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
ANEXOS .....	96

## **DEDICATORIA**

A nuestro señor Jesucristo por permanecer siempre a mi lado a lo largo de toda mi vida y por darme las fuerzas para luchar por mis sueños a pesar de todas las vicisitudes y proporcionarme la sabiduría necesaria para lograr el éxito de todas mis metas.

A mis padres Oslenys González, quien no solo me dio la vida sino que me ha enseñado a mirar siempre adelante con valor y optimismo, me ha apoyado en todos los momentos de mi vida y mi carrera y sin cuyo impulso esta meta no hubiese sido alcanzada y Eduardo Izaguirre quien me ha inculcado que la humildad y sencillez son cualidades que hacen de una persona un ser extraordinario.

A mi abuela Ventura, amada, tenaz y bondadosa, quien me ha brindado su comprensión y apoyo incondicional, sin los cuales no hubiese sido posible la culminación de esta investigación.

A mis hermanos Edner José y Johan Edwint, que representan para mí la unidad más importante con la cuenta un ser humano, la familia. Gracias por su amor y comprensión.

A mis tíos, primos y demás familiares, por entenderme, quererme y brindarme su apoyo incondicional en todo momento.

A mi asesor, profesor y padrino de graduación Pedro Parrilla Álvarez, a quien admiro grandemente, respeto profundamente y estimo no solo como profesional de la medicina sino sobre todo por el increíble ser humano que es, por todas las enseñanzas que me ha aportado a lo largo de la carrera y por compartir conmigo su gran capacidad de hacer investigación científica y sembrar en mi la semilla del saber; sin su invaluable asesoramiento, apoyo y dedicación no hubiese sido posible la

realización de este proyecto, espero que la vida me alcance para llegar a ser algún día tan grande como él.

A mis maestros y profesores de la escuela de medicina Juan San Martín, José Moraes Landívar, Aníbal Romero, Mario Rivera y Rodolfo Devera quienes con sus valiosas enseñanzas y excelentes consejos contribuyeron notablemente tanto en mi formación profesional como en hacer de mi un mejor ser humano.

A mis grandes amigos: Anni, Eddel, Javier, Enrico, Ángel, Luisa, Jenny, Santos, Mélida y Marianella con quienes he compartido todo tipo de experiencias enriquecedoras e inolvidables durante toda la carrera, y han pasado a formar parte de mi familia, gracias a su cariño y apoyo fue posible la culminación de esta meta.

Finalmente a todas aquellas personas que llevan en su interior esa insaciable curiosidad intelectual que es símbolo inequívoco y diferencial de la humanidad, esa necesidad de hacer investigación científica y aportar nuevos conocimientos al beneficio de la colectividad.

*Edenys L. Izaguirre G.*

## DEDICATORIA

Sin temor a equivocarme, este trabajo que ameritó un extraordinario esfuerzo, lo dedico a la mayor sutileza que la vida ha creado: Al Amor.

Al amor ágape, amor hacia Dios, amor que permite seguir esa sencilla frase, “amar los unos a los otros como yo los he amado”; frase que nuestro señor Jesucristo dijo; sin eso, la búsqueda del conocimiento, como se ha hecho en esta investigación, sería absurda, pues, el fin último del Profesional de la Salud, es entregar sabiduría en pro del bienestar humano.

Al amor eros, amor terrenal, carnal, fraternal, sírvanse todos los que siguen a continuación:

Mis padres, Migdalia y Alberto, una desde la tierra, otro desde el cielo, cuidándome y guiándome han entregado, todo, y hasta más, por mí, gracias por darme la vida, y gracias por ser la mano que me levante cuando tropiezo en mi camino a la sabiduría.

A mi abuela María, mis abuelos ya en paz con Dios, Enrico, Abilio y Mercedes, a mis tías Carmen, Eddy, Mirla, Nacris, Yaya, Lourdes y Asunción, a mi primo Nardy y a su esposa Irayda, a mi hermana Aisber, a mi hermano Alberto, por ser parte de mi, por guiarme en el sendero justo de la verdad.

A mis formadores y amigos, Dra. Rita Pérez, Dra. Lismar Vera, Dra. Norma Conquista, Dra. Milagros Silva, Dra. Sonia Colmenares, y nuestra decana María Coromoto Casado porque han marcado con su sabiduría mi mente y han cambiado mi forma de ver el mundo.

A mi tutor de tesis, Dr. Pedro Parrilla, por ser mi padre intelectual, hombre tenaz, sabio y trabajador que ha forjado mi educación y es mi modelo a seguir.

A mis profesores, Luis Gutiérrez, Erlinda de Gutiérrez y Zara Basanta, por crear en mi la mejor base para esos grandes cimientos que muchos llaman sueños.

A mis amigos y amigas, Bruce, Anni, Kissy, David, Silvia, Santos, Harlen, Renatto, Ana, Karla, Mayra, José, Jeny, Javier, Eddel, Franco, Luisa, Rosimar, Carlos, Ginette y Edenys, por mostrarme que el mundo no habría sido, es o sería nada sin ustedes.

Al amor de mi vida, por hacerme entender que la palabra amor es insuficiente para definir lo que siento por ti, y que eso que me provocas tiene el fin del universo, el infinito.

Y a ti, sí a ti, que lees esta dedicatoria y que por motivos no razonables, no has sido nombrado o nombrada, te dedico mi tesis por ser mi cercano y porque de una u otra forma, el contacto, poco o mucho que he tenido contigo ha hecho de mí, lo que hoy soy, un individuo que ama profundamente y vive sus sueños al extremo.

***Enrico Alberto Hernández Bascetta***

## AGRADECIMIENTOS

A “DIOS TODOPODEROSO”, por darnos sabiduría e iluminar nuestro sendero en todo momento; para lograr de manera satisfactoria esta investigación, valiosa para nuestra formación eficaz en el transcurso de nuestra carrera.

A nuestros Padres, por su amor, comprensión, dedicación y constancia incondicional.

A nuestra casa de estudio, la Casa más Alta, UDO-Bolívar, por su luz torrencial, apoyo institucional y por dar respuesta a nuestras necesidades de aprendizaje, en la búsqueda de la excelencia académica.

Al Departamento de Ciencias Fisiológicas, Laboratorio de Alacranología y Bioterio de la Escuela de Ciencias de la Salud “Dr. Francisco Battistini Casalta”, por abrirnos sus puertas desde que decidimos iniciar esta travesía y darnos las herramientas incondicionales extremadamente meritorias para nuestra formación integral como Médicos Cirujanos.

A la Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), laboratorio de biociencias, pertenecientes al Programa Red Nacional de Antiveninas, por acogernos desinteresadamente en sus instalaciones y brindarnos la oportunidad de llevar a cabo los procedimientos experimentales indispensables para la realización de este proyecto; y al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), por brindarnos acceso a sus instalaciones y a su invaluable y extraordinariamente dotada Biblioteca “Marcel Roche”, que alberga un sin fin de trabajos de investigación de autores venezolanos y extranjeros.

A las Magister Aurora Álvarez y Yuyibeth Montero y a las Dras: Norayda Zerpa y Caridad Malavé y al Lic. Alberto Parrilla, por ser nuestros asesores de corazón, transmitiéndonos sus invaluable conocimientos y brindarnos su apoyo incondicional y mano amiga, por ser excelentes profesionales dedicados a la investigación en pro de la humanidad, gracias de verdad.

A nuestro Tutor, Dr. Pedro Parrilla, por despertar el interés en nosotros y motivarnos a realizar la investigación, por inculcarnos los valores y principios que fundamentan la ética de un profesional eficiente y por estar pendiente de la culminación con éxito de esta investigación.

A todas las personas y organismos institucionales que de alguna u otra forma contribuyeron a la realización de esta investigación. ¡Muchas Gracias!

UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD  
“DR. FRANCISCO BATTISTINI CASALTA”  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS

**ACTIVIDAD DE ANTICUERPOS POLICLONALES IgY A  
PARTIR DE GALLINAS INMUNIZADAS DIRIGIDOS CONTRA  
EL VENENO DE *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*.**

Edenys L. Izaguirre G; Enrico A. Hernández B.

**RESUMEN**

El uso de anticuerpos para investigación y diagnóstico se realiza desde hace varias décadas en todo el mundo y en los últimos años se han utilizado cada vez con mayor frecuencia anticuerpos purificados a partir de gallinas inmunizadas. Actualmente existen numerosas publicaciones que avalan su efectividad. Hasta ahora, en Venezuela, no se han obtenido IgYs de gallinas inmunizadas simultáneamente con veneno de escorpiones y ofidios, y mucho menos usando venenos de animales del oriente-sur del país. **Métodos:** Se realizó un estudio observacional descriptivo, experimental, evaluativo. Con una muestra de 105 huevos de un universo de 1278 huevos de 5 gallinas inmunizadas en 4 fases, durante 10 meses con el veneno completo de *T. caripitensis*, *T. breweri* y *B. atrox*; donde el primer grupo fue inmunizado solo con el veneno completo de los escorpiones (A1 y A2), el segundo con el veneno de ofidio (B1 y B2) y la quinta gallina (C) con una mezcla de los tres. Se utilizaron los métodos de purificación del PEG-6000, el método de Elisa indirecto, Electroforesis, Multiple Antigen Blot Assay (MABA) y el Microbradford. **Resultados:** La producción de IgY arrojó lecturas de absorbancia a 540µm en el espectrofotómetro que oscilaban entre 0,120 hasta 1,235, reconociendo los antígenos que indujeron su producción e incluso a otros de distinta especie; el día pico de producción de inmunoglobulinas para los huevos A1, A2 y C fue el sexto posterior a la cuarta inmunización (reto), mientras que para los huevos B1 y B2 fue el día 6 del mismo período, obteniéndose una concentración de proteínas mínima fue de 4,71mg/dl y la máxima 9,78mg/dl, ajustándose a los rangos expuestos por otros autores. La capacidad de reconocimiento de las inmunoglobulinas evidenciada por MABA ante antígenos distintos fue exitosa. **Conclusiones:** Se logró la producción de inmunoglobulinas aviares a partir de venenos de *T. caripitensis*, *T. breweri* y *B. atrox*. Existe reactividad cruzada importante entre las inmunoglobulinas aviares del veneno crudo de *B. atrox* y el veneno crudo de *T. caripitensis*, *T. breweri*, *T. quirogae* y *C. durissus*. Este trabajo representa la primera investigación a nivel mundial que relaciona la actividad cruzada de dos especies filogenéticamente distintas, a la familia *Buthidae* con la familia *Viperidae* en el uso de la tecnología IgY como tratamiento para estos envenenamientos. **Palabras Claves:** IgY, reactividad cruzada, MABA, *T. caripitensis*, *T. breweri*, *B. atrox*.

## INTRODUCCIÓN

Las toxinas de los venenos de escorpión y serpientes constituyen una familia de proteínas con un alto grado de diversidad en su secuencia peptídica, pero con un modo de acción similar. La neutralización de los efectos tóxicos del envenenamiento a través de antiveninas es limitado debido a los serotipos expresados por estas proteínas. Se exploró la posibilidad de elevar los anticuerpos de partes de las toxinas que podrían reconocer a varios miembros de una misma familia (Devaux *et al.*, 1996).

Las antiveninas escorpiónicas son anticuerpos que poseen reactividad cruzada contra varias toxinas del veneno de escorpión que pertenecen a diferentes serotipos y neutralizan tanto los efectos farmacológicos como la actividad biológica. El modelo molecular de la toxina indica que la unión a los residuos peptídicos de 1-8 del anticuerpo, probablemente enmascara algún residuo de la N-terminal crítico de los resultados de actividad biológica o se superpone con el epítipo definido previamente mediante la neutralización de anticuerpos monoclonales. Estos hallazgos podrían abrir el camino para nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento médico del envenenamiento (De Lima *et al.*, 1993).

La diversidad estructural y antigénica de las toxinas del veneno de escorpión hace que sea difícil preparar antiveninas para el tratamiento poliespecífico de los envenenamientos. Con la llegada de péptidos inmunógenos sintéticos, ha sido posible manipular la respuesta inmune con el objetivo de generar una respuesta humoral del huésped a determinadas regiones de la proteína. Tales anticuerpos pueden ser de valor en la solución de problemas relacionados con la diversidad antigénica del conjunto de proteínas (Devaux *et al.*, 1996).

Por otro lado, el accidente ofídico representa un importante problema de salud pública en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, estimándose que a nivel mundial, cada año más de 2,5 millones de personas son mordidas por serpientes venenosas, resultando en alrededor de 120000 muertes en las regiones tropicales de Asia, África y América Latina (Pirela *et al.*, 1996).

Las serpientes derivan su nombre del latín *Serpentes* (arrastrarse), pertenecen al Phylum cordados (cuerpo dorsal simétrico), subphylum vertebrados (endoesqueleto y cráneo), clase reptilia (corazón de tres cavidades y respiración pulmonar), orden squemata (escamas), suborden ophidia (serpientes). En Venezuela, las venenosas pertenecen a varios géneros: *Bothrops Bothriechis*, *Bothriopsis*, *Porthidium*, *Crotalus*, *Lachesis* y *Micrurus*. Los seis primeros corresponden a la familia *Viperidae* y el último a la *Elapidae* (Campbell y Lamar, 2004).

El accidente ofídico es causado por la mordedura de serpientes que poseen e inoculan sustancias tóxicas, que lesionan los tejidos y provocan alteraciones fisiopatológicas de la víctima; su frecuencia y gravedad hacen que tenga importancia para la salud pública. Desde finales del siglo XIX se cuenta con los sueros antiofídicos, desarrollados en equinos, como único tratamiento comprobadamente efectivo contra los envenenamientos producidos por serpientes. Los centros de producción de sueros antiofídicos del mundo realizan esquemas de inmunización que difieren en las características del manejo de los animales sometidos a inoculación, las especies de serpientes existentes y la composición del veneno (Montilla *et al.*, 1999).

Por otro lado, se ha demostrado que existen diferencias regionales en las características de los venenos de estos animales, implicando variabilidad bioquímica e inmunogénica de las toxinas, lo cual sugiere la necesidad de producir antivenenos específicos por regiones y/o la producción de anticuerpos con la capacidad de neutralizar simultáneamente venenos de diferentes regiones (De Sousa, 2009).

En Venezuela los animales venenosos tienen una amplia distribución geográfica; y los accidentes provocados por ellos ocurren en áreas de actividad humana, tanto urbanas como rurales. Los encuentros frecuentes pueden desembocar en incidentes de intensidad variable, desde leve hasta grave, pudiendo producir la muerte del individuo afectado. En el periodo comprendido entre 1996 y 2004, se registraron 53792 mordeduras por ofidios (aproximadamente 5976 casos, en promedio, por año) y más de 11500 accidentes ofídicos para el año 2007. La mayor incidencia (n = 7486) se registró en 2004; pudiendo indicar una tendencia al incremento en la incidencia en las mordeduras por ofidios, los años 2003 y 2004 concentraron el 45,8% del periodo (De Sousa, 2009).

El accidente escorpiónico en Venezuela es de interés médico, de carácter endémico y un problema de Salud Pública regionalizado (Arellano-Parra, 1981; González-Sponga, 1984; Borges *et al.*, 2008; De Sousa *et al.*, 2000).

González-Sponga, en 1984, describió cuatro macroregiones endémicas de escorpionismo para el género *Tityus*: Andina (Táchira, Mérida y Trujillo), Centro-occidental (Lara y Falcón), Centro Norte Costera (Aragua, Vargas, Distrito Capital y Miranda) y nororiental (Monagas y Sucre). Para el año 2006 esta distribución fue sometida a evaluación basándose en criterios taxonómicos, clínicos y epidemiológicos, lo que permitió ampliar algunas en su ámbito geográfico e incluir otras. En la actualidad se aceptan siete macroregiones endémicas de escorpionismo debidas al género *Tityus* (Borges y De Sousa, 2006).

Entre los años 1996 y 2000, el estado Mérida encabezó la casuística nacional de muertes por escorpionismo (n=9 casos; lo que representó para ese estado una tasa de mortalidad promedio anual de 2,50 muertes por millón de habitantes), seguido por Sucre (n=7 casos; 1,73 por millón) y Monagas (n=5 casos; 1,72 muertes por millón). Para el mismo período (1996-2000), los estados de las regiones andina y nororiental

aportaron 18 y 12 decesos respectivamente a la casuística de mortalidad nacional, representando entre ambas regiones el 62,2% de todas las muertes por escorpionismo (Borges y De Sousa, 2006).

De acuerdo a los Registros Oficiales de Mortalidad del estado Monagas (tarjetas EPI-13b) depositados en el Sistema Regional de Salud (FUNDASALUD-Monagas), en esta entidad de la región Nororiental, en el periodo 1980–2000, se notificaron 47 decesos debidos a envenenamientos producidos por vertebrados e invertebrados de los cuales 21 (44,7%) correspondían a accidentes por escorpiones. Durante esos 21 años, la mayor tasa de mortalidad debido a escorpionismo, para todo el estado, se registró en 1993 (0,75 muertes por 100000 habitantes). El área centro-norte del estado Monagas, se han identificado a los municipios Bolívar, Caripe, Cedeño y Piar como áreas endémicas y al municipio Acosta como área hiperendémica para escorpionismo. Las tasas de incidencia en Acosta, entre 1987 y 1993, oscilaron entre 13,02 y 23,30 casos por cada 10.000 habitantes (De Sousa *et al.*, 2005).

Actualmente, se ha identificado al municipio Punceres como una nueva área hiperendémica para el estado. Su tasa de incidencia, para 1996, fue de 25 casos por 10.000 habitantes, que no difiere significativamente del municipio Acosta. Estas entidades, que conforman una zona montañosa con su piedemonte (subregión Turimiquire), agruparon la mayor mortalidad por envenenamientos causados por escorpiones (57,2%). En los municipios Punceres y Bolívar, se ha comprobado la existencia de *Tityus caripitensis* (Quiroga *et al.*, 1988; De Sousa *et al.*, 2005; Chippaux y Goyffon., 2008).

Según la Dirección de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, para el año 2005, la incidencia de escorpionismo indica que los estados más afectados fueron: Delta Amacuro, Monagas, Sucre y Mérida con 48,96;

26,63; 22,64 y 19,40 casos por 100000 habitantes respectivamente; tasas superiores a la calculada para Venezuela (9,88 casos por 100000 habitantes). Esta casuística se relaciona con las características toxicológicas del veneno de escorpión.

El uso de anticuerpos para investigación y diagnóstico se realiza desde hace varias décadas en todo el mundo. Normalmente estos anticuerpos se obtienen a partir del suero de mamíferos (roedores, caprinos equinos, etc.) En los últimos años se han utilizado cada vez con mayor frecuencia anticuerpos purificados a partir de gallinas inmunizadas, los cuales presentan diferencias con los anticuerpos producidos por mamíferos tanto en su estructura como características fisicoquímicas, pero además son una alternativa que disminuye el estrés e injuria al huésped y tiene alta productividad y facilidad para su recolección (Alarcón y Hurtado, 2000).

En la actualidad ha adquirido una gran relevancia la llamada “Tecnología IgY” (Schade *et al.*, 2005). Esta consiste en la extracción de las inmunoglobulinas de la yema de huevos de gallinas ponedoras. El principio de esta tecnología descubierta por Klemperer (1893), se fundamenta en la transmisión de las inmunoglobulinas de la gallina vía sanguínea hacia el huevo. Las IgY son producidas como respuesta humoral ante el contacto con un elemento antigénico. Este método aparece como producto de la preocupación acerca del bienestar de los mamíferos que son utilizados comúnmente en la producción de anticuerpos. La producción en mamíferos involucra pasos fundamentales, que generan estrés en el animal y puede causarle hasta la muerte: la inmunización y la colección de las muestras de sangre (Narat, 2003).

Las aves poseen una serie de mecanismos celulares que se encargan de destruir células infectadas y patógenos extracelulares. Este sistema de defensa está constituido por el sistema inmunitario innato y el sistema de defensa adquirido, similar a la respuesta inmune en mamíferos. El sistema inmune de todas las especies aviares está compuesto por órganos primarios (Bolsa de Fabricio y el Timo) y

secundarios (Bazo, Glándula de Harder, Nódulos linfoides, Médula ósea y el Tejido linfoide del tracto alimentario). La médula ósea es donde se originan las células madre de la bolsa de Fabricio y del timo. En la bolsa, las células no diferenciadas se convierten en células B maduras, mientras que en el timo ocurre la diferenciación correspondiente a las células T. En el bazo tiene lugar la proliferación de las células plasmáticas y de las células B de memoria. Se han identificado tres clases de inmunoglobulinas en las aves que son análogas a las inmunoglobulinas de los mamíferos, estas son la IgM, IgA e IgY. La IgY es funcionalmente equivalente a la IgG porque está relacionada con la respuesta inmune secundaria y se transfiere activamente desde la sangre a la yema, en concentraciones de 100 mg de IgY/huevo mediante un proceso donde están involucrados receptores específicos (Morrison *et al.*, 2001).

Esta IgY, demora aproximadamente 5 días en aparecer en el huevo desde el momento en que es activamente transportada desde la circulación sanguínea al ovocito, hasta que es puesto por la gallina. En el caso de las otras inmunoglobulinas; la IgA por su parte predomina en la clara del huevo, secreciones intestinales y en la bilis, mientras que la IgM puede encontrarse en el suero y en la clara del huevo (Rose *et al.*, 1974; Tizar, 1992).

Las gallinas poseen un ovario único localizado en la región lumbar de la cavidad abdominal, el cual contiene cientos de pequeños huevos, algunos de los cuales son seleccionados para sufrir un rápido desarrollo e incrementar su tamaño previo a la ovulación. Cuando la gallina alcanza la madurez sexual, los óvulos más grandes tienen un diámetro de 0,1 cm aproximadamente. Material de la yema se deposita gradualmente en el óvulo hasta que mide 0,6 cm de diámetro aproximadamente. Luego ocurre un rápido crecimiento hasta alcanzar 3,5 cm en un periodo de 6 días. Durante este período ocurre paso importante de inmunoglobulinas hasta el huevo ovariano. Una gallina en completa actividad reproductiva no pone más

de un huevo diario. El óvulo más grande listo para la ovulación, es depositado en el infundíbulo del oviducto 30 minutos después que el huevo previo ha sido puesto. Durante el progreso de la yema a través del oviducto, la clara, la membrana de la cáscara y la cáscara son sucesivamente depositadas sobre la yema ovariana. El huevo estará totalmente formado aproximadamente 24 horas después de la ovulación (Patterson *et al.*, 1962; Woolley y Landon, 1995).

La composición química del huevo, expresado en porcentaje, es como sigue: El huevo entero, que comprende el 100 por ciento contiene un 65,5 por ciento de agua, un 11,8 por ciento de proteínas, un 11 por ciento de grasa y un 11,7 por ciento de cenizas (Goodman y Tuddor, 1967). La clara, que comprende el 58 por ciento del total del huevo, tiene un 88 por ciento de agua, un 11 por ciento de proteínas, un 0,2 por ciento de grasa y un 0,8 por ciento de cenizas (Escamilla, 1971).

Las proteínas del huevo son completas, y contienen todos los aminoácidos indispensables, en proporciones bien equilibradas. La clara densa está formada, principalmente por proteínas como: ovomicina, ovoalbúmina, conalbúmina, ovoglobulina y ovomucoides. También se encuentran algunas vitaminas del Complejo B, en especial Riboflavina, que le da un color levemente verdoso a la clara. La clara fluida está compuesta por proteínas de la misma clase que la clara densa (Ajenjo, 1980).

En la respuesta inmune de la gallina, la vía de entrada del antígeno parece no tener importancia en la generación de anticuerpos. Algunos autores, no encontraron diferencias al comparar la utilización de las vías subcutánea e intramuscular para la producción de anticuerpos contra proteínas citosólicas como la Fructuosa 1,6 bifosfatasa (Gatica *et al.*, 2004). La presencia de anticuerpos en el suero de gallinas inmunizadas y su transferencia a la yema se mantiene en niveles elevados una vez alcanzados, siendo poco probable la necesidad de aplicar retos y sangrado. Las

gallinas son menos susceptibles a las enfermedades que otros animales de laboratorio utilizados para la obtención de inmunoglobulinas (Polson y von Wechmar, 1980). Toda vez que la vida media de las inmunoglobulinas transferidas por gallinas inmunizadas a las crías, disminuye progresivamente según la madurez materna: cuando muy jóvenes 3 días y muy maduras día y medio, al mes de vida solo permanecerá menos del 0,1% de las inmunoglobulinas transferidas por una gallina muy madura (Patterson *et al.*, 1962).

Por otro lado las inmunoglobulinas tipo IgY (anticuerpos de gallinas) ofrecen ventajas, debido a su mayor afinidad y rendimiento, además de que no desencadenan la activación del sistema del complemento en humanos, lo que hace presumir que tras el uso terapéutico de las mismas, disminuyan los efectos inmunológicos colaterales. Estas diferencias estructurales se reflejan en diferentes interacciones bioquímicas y moleculares donde la IgY resulta muy ventajosa (Schade *et al.*, 2005).

El principio de esta tecnología se fundamenta en la transmisión de las inmunoglobulinas desde la gallina, vía sanguínea, hasta el huevo. Se han identificado en las aves tres clases de inmunoglobulinas, que son análogas a las inmunoglobulinas de los mamíferos, estas son la IgM, IgA e IgY. Las IgY son producidas como respuesta humoral ante el contacto con un elemento antigénico (Narat, 2003).

La primera documentación sobre la transferencia pasiva de anticuerpos provenientes de aves fue realizada por Klemperer en 1893, quien 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 (Camenisch *et al.*, 1999).

La inmunoglobulina Y (IgY) es transferida desde el suero sanguíneo de la gallina hacia la yema de huevo a través de procesos activos que tardan

aproximadamente 5 días y que son mediados por receptores. La cantidad de IgY transferida se relaciona con su concentración en el suero sanguíneo de las gallinas y su transferencia no se relaciona con sus especificidades (Mohammed *et al.*, 1998); mientras que sus niveles en la yema son iguales o superiores que los mismos en la sangre de las gallinas (Schade *et al.*, 2005).

La concentración de IgY en la yema fue 1,23 veces mayor que en el suero, lo que indica un proceso activo de transferencia de la IgY desde la sangre hacia los ovocitos (Woolley y Landon, 1995). La concentración de IgY en la yema varía entre los 10 a 20 mg/ml, pudiendo encontrarse entre 100 y 400 mg de IgY por huevo (Chacana *et al.*, 2004; Polson y von Wechmar, 1980). Esta variación depende de la línea genética o raza del ave, por ejemplo en la raza Single Comb White Leghorn es de 2,21 +/- 0,44 mg/ml; mientras que en las SLU-1329 1,95 +/- 0,48 mg/ml; y en las Rhode Island Red 1,68 +/- 0,50 mg/ml (Leslie y Clem., 1969; Narat, 2003). Además, la cantidad total de IgY en el huevo está relacionada con el tamaño del mismo y las variaciones fisiológicas individuales.

Las regiones responsables de la movilización de la IgY corresponden al fragmento Fc y a la región bisagra. En el dominio C $\gamma$ 3, en las posiciones de 429-432, que se ubica una secuencia HEAL (H: Histidina, E: Ácido Glutámico, A: Alanina y L: Leucina). Todas las inmunoglobulinas que son transferidas a la yema poseen esta secuencia, mientras que aquellas que no la tienen no son transferidas, tal es el caso de la IgA (Schade *et al.*, 2005).

Inicialmente se propuso la existencia de dos clases de inmunoglobulinas en la sangre de las aves. Una macroglobulina que se corresponde con la IgG de los mamíferos, y otra con importantes diferencias con la IgG de mamíferos por lo que fue llamada IgY (Leslie y Clem, 1969). Posteriormente se describió la presencia de una tercera inmunoglobulina que se corresponde con la IgA (Leslie y Martin, 1973).

Filogenéticamente la IgY parece precursora de la IgA de los mamíferos (Hadge y Ambrosius, 1984). También se la ha considerado predecesora de la IgG e IgM (Warr *et al.*, 1995). La estructura general de la molécula de IgY es comparable con las inmunoglobulinas de mamíferos (Schade *et al.*, 2005). Las inmunoglobulinas que se encuentran en la yema son casi exclusivamente IgY, mientras que en la clara se encuentran sólo pequeñas cantidades de IgA e IgM. Tanto la IgA como la IgM son transferidas desde las células plasmáticas del oviducto hacia la clara (Rose *et al.*, 1974). La IgY también se encuentra en reptiles y anfibios (Patterson *et al.*, 1962).

La estructura molecular de la IgY es comparable a la de las inmunoglobulinas de los mamíferos, estando constituidas por dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas. La cadena pesada de las IgY contiene un dominio variable y cuatro dominios constantes, a diferencia de la IgG que posee tres dominios constantes. La valencia de la IgY es igual a 2, igual al de la IgG. Mientras que el peso molecular de la IgG es de alrededor de 150000 Daltons, determinado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, el de la IgY es de aproximadamente 180000 Daltons (Polson *et al.*, 1980). La IgY no fija el complemento de los mamíferos (Shimizu *et al.*, 1992; Benson *et al.*, 1961) y su punto isoeléctrico es de alrededor de 1 unidad de pH menor que la IgG, ubicándose dentro del rango de 5,7 a 7,6; en contraste con el de la IgG el cual está entre 6,1 y 8,5 (Polson *et al.*, 1980). Por otra parte, las cadenas livianas poseen un dominio variable y un dominio constante (PM 18000Da). En total, el PM de las inmunoglobulinas Y es de 167250 Daltons.

La región de la bisagra es más flexible en la IgG comparada con la IgY, en la que esta región parece menos desarrollada. La IgY presenta por su parte una porción Fc más larga que la IgG (Warr *et al.*, 1995; Larsson *et al.*, 1992). El poco desarrollo de la región de bisagra de la IgY tiene como consecuencia una reducción de la flexibilidad y movilidad de las regiones Fab, lo que constituye una diferencia importante en la estructura-función entre la IgG y la IgY. La porción Fc de la IgY es

el sitio que presenta la mayor parte de las funciones biológicas efectoras, en forma similar a lo que ocurre con la IgG. El fragmento Fc de la IgY incluye dos cadenas laterales de carbohidratos, a diferencia de la IgG que sólo presenta una (Warr *et al.*, 1995).

Además de una región C adicional, las IgY se diferencian de las IgG por la limitada flexibilidad. Esta es consecuencia del poco desarrollo de la región C<sub>2</sub> que lleva a la ausencia de la región bisagra. Existe homología entre los dominios C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> de la IgY con los dominios C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> de IgG (mamíferos). Otra diferencia entre ambas inmunoglobulinas es que la IgY presenta dos cadenas de polisacáridos en el fragmento Fc mientras que la IgG solo posee una (Chacana *et al.*, 2004).

El hecho de que el fragmento Fc sea más grande, y dado que éste determina la hidrofobicidad de la molécula, hace que la IgY sea más hidrofóbica que la IgG. En cuanto al pH óptimo, se ha demostrado que la IgY es sensible a la desnaturalización a pH ácido, perdiendo rápidamente su actividad al encontrarse en soluciones cuyo pH se encuentre entre 3 y 4 (Schade *et al.*, 2005).

A pesar de que no existen diferencias significativas entre la avidéz y afinidad de la IgY de la gallina y la IgG del conejo, si las hay en la especificidad. La respuesta inmune frente a antígenos de mamíferos esta aumentada en las aves comparada con mamíferos debido a las mayores diferencias filogenéticas (Gassmann *et al.*, 1990), haciéndola muy útil para las pruebas diagnósticas. La mayor hidrofobicidad de la IgYs aprovechada para la adsorción estable a partículas de látex preservando intacta su capacidad aglutinante específica (Carlender, 2002).

Las IgY son más sensibles a la desnaturalización por calor y pH que las IgG. Se ha comprobado que la máxima desnaturalización endotérmica de la IgY se presenta a los 73°C, mientras que para las IgG es de 77°C (Hatta *et al.*, 1993), a pesar

de ello, la IgY es estable a temperaturas que varían entre los 60 °C y 70 °C, y la cocción de los huevos durante 6 minutos en agua hirviendo (100 °C) no disminuye la concentración de IgY (Hatta *et al.*, 1993; Larsson *et al.*, 1992; Losch *et al.*, 1986). Además la IgY resiste al menos tres ciclos sucesivos de congelación y descongelación (Shimizu *et al.*, 1988; Bade y Stegemann, 1984). En términos generales y condiciones normales, las preparaciones de IgY son estables por 10 años a 4 °C, por 6 meses a temperatura ambiente y por un mes a 37°C sin pérdidas en su actividad (Dávalos *et al.*, 2000; Narat, 2003; Raj *et al.*, 2004).

Esta inmunoglobulina también posee características que le confieren otras cualidades tales como: a) no se une al factor reumatoide ni a otros anticuerpos anti-mamíferos naturales, b) no activa el sistema del complemento de mamíferos y c) no se une al receptor Fc de mamíferos. Estas diferencias estructurales se reflejan en diferentes interacciones bioquímicas y moleculares donde la IgY resulta muy ventajosa (Schade *et al.*, 2005).

Desde el punto de vista económico, la producción de anticuerpos policlonales IgY también presenta ventajas favorables. Obtener IgY es más barato que obtener IgG; la cantidad de inmunoglobulinas en medio de litro de suero de mamíferos es igual a la obtenida de una gallina en un mes (Jensenius *et al.*, 1981). En un año una gallina que ponga 250 huevos, producirá aproximadamente 40 gramos de IgY, mientras que de un conejo se obtendrían 1,4 gramos de IgG. Del huevo de gallinas se obtiene aproximadamente 30 veces más inmunoglobulinas que del suero de conejos en un año (Narat, 2003; Hatta *et al.*, 1993; Mine y Kovacs-Nolan, 2002).

El costo de criar una gallina no es muy diferente al de criar un conejo, a pesar de que la producción de anticuerpos 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 apreciable de anticuerpos puede ser producida a partir de una sola gallina

(aproximadamente entre 17 y 42 g de IgY/ave/año), de los cuales del 2 al 18% son específicos (Anderson *et al.*, 1995; Carlender, 2002). Para alcanzar semejante producción de anticuerpos utilizando mamíferos, los costos son muchos más elevados. Además, la obtención de la IgY resulta en un método no invasivo ya que evita el sangramiento del animal, los huevos se pueden coleccionar y almacenar por largo tiempo y purificar retroactivamente con la avidéz y los títulos deseados. La inmensa producción de IgY con costos relativamente bajos, posibilita nuevos campos de aplicación, como por ejemplo la creación de inmunoensayos que permitan detectar bacterias y/o toxinas producidas por éstas.

Sin embargo el interés por esta nueva tecnología solo surgió después de casi 90 años de las descripciones de Klemperer, cuando sobrevino un auge en el uso de aves para la obtención de inmunoglobulinas. Muchas han sido las investigaciones que muestran las ventajas del uso de las IgYs, siendo Polson y colaboradores quienes propusieron inicialmente una metodología relativamente sencilla para obtenerlas a partir de la yema de los huevos (Polson y von Wechmar, 1980; Polson, 1990). Gracias al desarrollo de la industria avícola y la creación de gallinas ponedoras, las cuales llegan a tener una frecuencia de postura diaria durante largos periodos de tiempo, se logró el desarrollo científico y tecnológico para la obtención de inmunoglobulinas aviares.

Desde 1996 es denominada “Tecnología IgY” propuesta por Staak y en la actualidad se emplea internacionalmente como una terminología estándar. En ese mismo año el ECVAM, recomendó el uso de la IgY, en sustitución de la inmunoglobulina G de mamíferos, para minimizar las situaciones dolorosas implicadas en la obtención de anticuerpos en los animales de laboratorio (Chacana *et al.*, 2004; Schade *et al.*, 2005; Mayo *et al.*, 2009). En 1999 la Tecnología IgY fue aprobada por la Oficina Federal del Gobierno Suizo como un método alternativo tendiente a mejorar el bienestar animal. Ello significa que la optimización, la

búsqueda de nuevas alternativas y la disminución del número de animales empleados en un proyecto deben ser indispensables para el desarrollo del mismo.

Las inmunoglobulinas presentes en la yema de huevo de gallinas (IgY) son una alternativa muy interesante como herramientas en multitud de estudios de inmunología, bioquímica, biotecnología, salud humana y animal. En los últimos 20 años se ha reconocido la importancia del uso de las IgY, principalmente por la facilidad para su producción y principalmente debido a la importancia que se le ha dado al manejo ético en el cuidado de animales de experimentación.

Actualmente existen numerosas publicaciones que avalan su efectividad en múltiples campos de la investigación. Algunas de estas aplicaciones son la prevención y tratamiento de la diarrea en humanos y animales, caries, xenotransplantes, síndrome urémico hemolítico, fibrosis quística, enfermedades de los peces y la elaboración de antivenenos (Chacana *et al.*, 2004; Schade *et al.*, 2005).

La IgY proveniente de huevos hiperinmunes previene la gastroenteritis producida por el rotavirus de la diarrea humana en un modelo murino. La IgY ha resultado útil en la prevención de diarrea en porcinos y ratones (Jacoby *et al.*, 2001).

La ingestión oral de IgY de huevos de gallinas inmunizadas con *E. coli* enterotoxigénica, previno la diarrea por esta cepa en conejos (O' Farrelly *et al.*, 1992). Se ha utilizado la tecnología IgY para: la preparación de anticuerpos contra receptor de insulina en conejos (O' Farrelly *et al.*, 1992), la detección de 1,25dihydroxivitamina D (Bauwens *et al.*, 1987), cortisol (Rangel *et al.*, 1999), antígeno de superficie de VHB (HBsAg) (Makvandi y Fiuzi, 2002), virus en vegetales (Vejaratpimol *et al.*, 1999) y antígenos de *Tripanozoma cruzi* (Contreras *et al.*, 2005). La inmunización pasiva con IgY provocó la protección de ratas contra la caries dental (Otake *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 2001). Anticuerpos IgY anti-

glucosiltransferasa de *Streptococcus mutans* asociadas a células, enzima que a partir de sucrosa produce glucano insoluble en agua, factor importante en el desarrollo de caries dental, previnieron la misma en modelos murinos (Horikoshi *et al.*, 1993).

En el campo de la producción de antivenenos en el año 1990, Thalley y Carroll obtuvieron anticuerpos antiofídicos y antiescorpiónicos. Antivenenos polivalentes contra *Cróталus* de Norte y Sur América, desarrollados en gallinas demostraron ser entre 2 y 6,3 veces más potentes que los antivenenos desarrollados en mamíferos (Otake *et al.*, 1991). También se han producido antivenenos contra ofidios (*Cróталus atrox*) y escorpiones (*Leiurus quinques triatus hebraceus*), inmunizado gallinas, obteniéndose IgY con capacidad neutralizante de dosis letales de los venenos en cuestión.

En el año 2006 Parrilla-Álvarez obtuvo anticuerpos policlonales en gallinas inmunizadas (IgY) con veneno de escolopendra (*Scolopendra gigantea*). Tales anticuerpos lograron neutralizar los efectos del veneno de escolopendra en ratones, obteniendo un 100% de supervivencia al compararse con los controles. Puntualizando que los anticuerpos IgY pudieran constituir una alternativa interesante como instrumento terapéutico para tratar el escolopendrismo en seres humanos y animales domésticos. Bajo esta misma línea de producción de antiveneno proveniente de anticuerpos de gallinas, se encuentra el grupo de Paul *et al.*, quienes para 2007 presentaron un estudio que destaca la generación de anticuerpos IgY contra *Echis carinatus*, serpiente perteneciente a la familia *Elapidae*, responsable de casi dos tercios de los accidentes por ofidios en la India. Mediante análisis por Inmunoblot se reveló no sólo la especificidad del anticuerpo (IgY) al reconocimiento del veneno sino también que este es dependiente de la dosis.

En estudios *in vivo* de neutralización en ratones se aplicó 2DL<sub>50</sub> obteniéndose una protección de 100% de supervivencia. Resultados similares fueron presentados

por Almeida *et al* en 2008, al trabajar con varias especies de serpientes africanas, enfrentadas a anticuerpos IgY anti-venenos observándose una neutralización eficaz. El uso de las IgYs no sólo se limita a la producción de antivenenos, sino también como herramienta diagnóstica, tal es el caso de Brunda *et al* en 2006, quienes desarrollaron una metodología aplicada para la detección de venenos de cobra en muestras de sangre y piel, útil en laboratorios forenses y hospitales.

Se ha propuesto la inmunización pasiva con IgY como alternativa al uso de antibióticos para el tratamiento y control de *Helicobacter pylori* (Shin *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Se ha usado un yogurt con IgY para el tratamiento de *Helicobacter pylori* en humanos (Horie *et al.*, 2004). El consumo de huevos hiperinmunes puede modificar benéficamente los niveles de lipoproteínas séricas reduciendo las posibilidades de enfermedad cardiovascular (Karge *et al.*, 1999). Las IgY tienen aplicación potencial en medicina preventiva (por ejemplo, contra infecciones gastrointestinales) lo cual puede incrementar su uso. También se han aplicado en estudios biológicos, como suplemento alimenticio, etc. Tienen un gran campo en la extracción y purificación de compuestos bioactivos o patógenos y en inmunoensayos, gracias a su gran especificidad. Recientemente se han empleado como una herramienta biológica en terapias contra el cáncer y como una herramienta bioquímica para la caracterización de proteínas (Song *et al.*, 1985) e inmunohistoquímica (Schmidt *et al.*, 1993). Además, se han producido IgY contra diferentes tipos de antígenos en múltiples aplicaciones (Narat, 2003), entre ellos el antígeno E7 presente en células cancerígenas.

En el Centro de Biociencias de la Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) se vienen produciendo y caracterizando anticuerpos IgY extraídos de la yema del huevo a partir de sucesivas inmunizaciones con péptidos sintéticos, con la finalidad de desarrollar kits de diagnóstico para detectar la Hormona Tiroestimulante Humana (TSH) en niños recién nacidos, y para la detección de factores neurotróficos.

Al mismo tiempo se ha producido y caracterizado anticuerpos IgY contra péptidos sintéticos de la enterotoxina A de *S. aureus* y anticuerpos IgY en gallinas contra péptidos de *Brucella spp.* evaluando su uso potencial para la detección de este género en alimentos mediante un ensayo inmunoenzimático (*ELISA*) tipo sandwich; de igual forma se han realizado inmunizaciones de gallinas con venenos completos de serpientes y escorpiones con la finalidad de caracterizar las proteínas presentes en dichas muestras y desarrollar antivenenos contra cada una de las especies en estudio (Zerpa *et al.*, 2006; Moreno, 2009).

Resultados obtenidos a la actualidad en los distintos inmunoensayos referidos a la sensibilidad y especificidad de las IgY revelan datos alentadores. Estudios previos de Almeida *et al.*, 1998 han demostrado que las gallinas (*Gallus gallus*) inmunizados con el veneno crudo de *Bothrops spp.* Y *Crótalus durissus terrificus*, producen anticuerpos IgY específicos para estos venenos, que luego pueden ser recuperados de las yemas de huevo y purificado. Encontraron que las IgY resultante estaban dotadas de la capacidad de combinarse con los componentes del veneno utilizado para inmunizar a las gallinas, y neutralizar su actividad tóxica. Estos mismos autores en el 2005, obtuvieron anticuerpos polivalentes IgY anti-*Bitis* y anti-*Naja* como antiveneno. Para inmunizar a las gallinas utilizaron venenos de *B. arietans*, *B. nasicornis*, *B. rhinoceros*, *N. melanoleuca*, y *N. mossambica*. Ellos lograron neutralizar hasta 5 veces el DL50 de los venenos.

En muchos casos esta tecnología ofrece ser prometedora como uso alternativo de las IgG de mamíferos. Las IgY han demostrado ser efectivas en pruebas donde comúnmente se ha utilizado IgG, como son la inmunofluorescencia, técnicas inmunoenzimáticas, inmunoelectroforesis, Western Blot, inmunohistoquímica, ELISA y otros (Narat *et al.*, 2003).

Considerando la ausencia de antiveninas polivalentes dirigidas contra las fracciones de diversas toxinas se ha encaminado una interesante búsqueda por encontrar anticuerpos capaces de presentar reactividad cruzada frente a toxinas de naturaleza variable y de esta manera contar con una poderosa herramienta terapéutica que abarque los envenenamientos más frecuentes.

Hasta ahora, en Venezuela, no se han obtenido IgYs de gallinas inmunizadas simultáneamente con veneno de escorpiones y ofidios, y mucho menos usando venenos de animales del oriente-sur del país, por lo que esa es la intención de la presente investigación.

## JUSTIFICACIÓN

El uso de anticuerpos para identificación diagnóstica y terapéutica se realiza desde hace varias décadas en todo el mundo. Normalmente estos anticuerpos se obtienen a partir del suero de mamíferos. En los últimos años se han utilizado cada vez con mayor frecuencia anticuerpos purificados a partir de huevos de gallinas inmunizadas los cuales presentan diferencias con la de los mamíferos en su estructura y características fisicoquímicas que permiten un mayor manejo y facilidad para su obtención y manejo clínico disminuyendo la llamada enfermedad del suero.

La necesidad de disminuir los efectos alérgicos colaterales a la administración de antiveneno, así como el alto riesgo a la segunda exposición del paciente a un suero heterólogo cuyo origen sea de la misma especie, ha obligado buscar otras alternativas que minimicen estos efectos (Montilla *et al.*, 1999).

En Venezuela la tasa de envenenamiento por escorpiones del género *Tityus* y ofidios del género *Bothrops* ha ido en aumento en los últimos años, por ende se propone crear un antídoto contra el envenenamiento producido por ellos a base de inmunoglobulinas aviares polivalentes a partir de inmunización de gallinas con dosis estandarizadas de veneno puro, y titular su variación en el tiempo posterior a inmunizaciones y refuerzos.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Obtener, purificar, determinar y demostrar la actividad de inmunoglobulinas aviares a partir de yema de huevo de gallinas inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*, desde Diciembre de 2010 a Agosto de 2011 obtenidos en el laboratorio de Alacranología y biotero de la Universidad de Oriente, Núcleo Bolívar.

### Objetivos específicos

1. Inmunizar gallinas con veneno individuales o mezclados de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*.
2. Recolectar los huevos pre y postinmunes de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*.
3. Evaluar la viabilidad de los huevos a través del tiempo y con condiciones establecidas de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*.
4. Purificar la yema de huevos de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*, para obtención de suero proteico.
5. Demostrar en el suero proteico obtenido a partir de la yema de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*, la presencia de inmunoglobulinas aviares que los reconozcan y precipiten.

6. Determinar la concentración y pureza de proteínas presentes en el suero de huevos de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*.
7. Determinar la pureza de proteínas presentes en el suero de huevos de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*.
8. Evaluar la capacidad de las inmunoglobulinas aviares obtenidas a partir de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox* para reconocer cruzadamente diferentes antígenos.

# METODOLOGÍA

## 1.1 Materiales

### 1.1.1 Extracción de veneno crudo, inmunización y recolección de huevos

- a) Jaula Vertical para gallinas suministrada por el IDEA.
- b) Alimento para gallinas tipo Ponarina en polvo.
- c) Contenedores especiales de cartón para recolección de huevos.
- d) Sistema de tubería para agua potable en jaula casero.
- e) Estimulador Eléctrico (SD5. STIMULATOR. GRASS INSTRUMENTS SINCE 1935).
- f) Capilares Heparinizados.
- g) Pipetas volumétricas (HIRSCHMANN TECHCOLOR, EXACTITUD  $\pm 0,05\text{mL}$ ).
- h) Veneno crudo de *Tityus caripitensis* y *Tityus breweri*.
- i) Veneno crudo de *Bothrops atrox*.
- j) Adyuvante Incompleto de Freund 's.
- k) Etanol al 70%.
- l) Inyectadoras tipo tuberculina.
- m) Cava de anime con sistema térmico.

### 1.1.2 Purificación de yema

- a) Agua destilada.
- b) Buffer Fosfato Salino 0,01M, pH 7,6 (PBS).
- c) Polietilenglicol 6000, al 17,5% (Sol. A), al 34% (Sol. B), al 48% (Sol.C).
- d) Separador de yemas.

- e) Balanza.
- f) Beakers 50ml y 250ml.
- g) Cilindros Graduados 50ml y 15mL.
- h) Tubos Falcon 50mL.
- i) Agitador magnético.
- j) Vórtex.
- k) Centrifuga Termo Centra CL3R.
- l) Embudo y gasa estéril.
- m) Tubos Eppendorf 2mL.

### 1.1.3 Cuantificación de proteínas, Microbradford

- a) Inmunoglobulinas aviares.
- b) Veneno crudo de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*.
- c) Agua Mili Q.
- d) Reactivo de Bradford.
- e) Placas de 96 pocillos.
- f) Solución madre IgG 1mg/mL.
- g) Lector de ELISA (Biotek, modelo Synergy™).
- h) Programa KC4.

### 1.1.4 Electroforesis

- a) Gel de Apilamiento al 5%: Agua miliQ, acrilamida al 3%, 1,0 M Tris a pH 6,8, Gel de Poliacrilamida (SDS) al 10%, Persulfato de Amonio (APS al 10%) Tetrametiletildiamina (TEMED).

- b) Gel de Corrida al 10 y al 15%: Agua miliQ, acrilamida al 3%, 1,0 M Tris a pH 8,8, Gel de Poliacrilamida (SDS) al 10%, Persulfato de Amonio (APS al 10%) Tetrametiletilendiamina (TEMED).
- c) Buffer de Laemmli 5X.
- d) Buffer de corrida (LB) 4X.
- e) Solución Colorante Azul Coomasie.
- f) Acrilamida.
- g) Cámara de Electroforesis.
- h) Unidad en forma vertical (Bio-Rad®, Mini-PROTEAN 3 CELL).
- i) Programa Quantity-one 4,2.1 BIO-RAD1D™.
- j) Agitador.
- k) Peine para 10 muestras.

### **1.1.5 Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)**

- a) Veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*.
- b) PBS 0,05% Tween 20.
- c) Anticuerpos IgY diluidos 1:100.
- d) Anticuerpo secundario IgG de conejo anti-IgY conjugado con peroxidasa de rábano diluido 1:20.000 ( $\alpha$ -IgY-HRP. THERMO, Illinois, U.S.A.).
- e) Ortofenilendiamina (OPD).
- f) Solución de buffer citrato fosfato de sodio pH 5.
- g) Eppendorf 2mL.
- h) Falcon 50mL.
- i) Agitador magnético.
- j) Vórtex.
- k) Centrifuga Termo Centra CL3R
- l) Beaker 50mL y 250mL.

- m) Buffer Fosfato Salino (PBS).
- n) Placas desensibilizadas 96 pocillos.
- o) Lector de ELISA (Biotek, modelo Synergy™).

## **1.2 Métodos**

### **1.2.1 Animales de experimentación**

Las gallinas utilizadas fueron gallinas de la especie Isa Brown por ser las disponibles en el Bioterio de la Escuela de Ciencias de la Salud, UDO Bolívar y fueron suministradas por el IDEA.

Los escorpiones *Tityus caripitensis* y *Tityus breweri*, provenientes de los estados Monagas y Bolívar respectivamente fueron obtenidos en el Laboratorio de Alacranología de la Escuela de Ciencias de la Salud, UDO-Bolívar.

### **1.2.2 Obtención de los venenos**

El veneno de los escorpiones se obtuvo mediante estimulación eléctrica del telson del alacrán y recolectado con capilares y colocado en tubos Eppendorf de 1,5 mL. Los ejemplares se colocaron sobre una rejilla metálica y, para garantizar un buen contacto, cada alacrán fue humedecido con agua destilada en la zona que hace contacto con la rejilla. Así mismo fueron fijados con el electrodo estimulador por el espacio intersegmental distal de la cola. Tanto la rejilla como el electrodo fueron conectados a un estimulador eléctrico que proporcionó pulsos cuadrados de 50v p/p a una frecuencia de 50Hz. La estimulación se aplicó de 3 a 5 trenes de pulso durante aproximadamente 15s., con períodos de descanso aproximadamente de 30s.

El veneno de *Bothrops atrox* fue gentilmente donado por Luis Fernando Navarrete, investigador del Instituto de Medicina Tropical de la UCV. El veneno de *B. colombiensis*, *Crotalus durissus cumanensis* y *T. quirogae*, obtenido del Laboratorio de Neurociencias, del área de Biociencias del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA).

### **1.3 De la inmunización de las gallinas con venenos individuales o mezclados de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*.**

Cinco gallinas ponedoras de la raza Isa Brown obtenidas del Bioterio del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) y disponibles en el Bioterio de la Escuela de Ciencias de la Salud de UDO Bolívar, de 25 semanas, ya iniciadas en el período de postura, ubicadas en gallineros verticales individuales de 0,25m<sup>3</sup> aproximadamente, identificadas como (A1, A2, B1, B2 y C); se inmunizaron por vía intramuscular a nivel de la región pectoral y muslos con el veneno completo de *T. caripitensis*, *T. breweri* y *B. atrox* a una concentración de 0,5µg/µl para las gallinas As y Bs; y con 1,7µg/µl para la gallina C, de la siguiente manera:

Primer grupo, grupo A, gallinas A1 y A2: Dos gallinas tipo Isa Brown. Se emulsificaron 300 µL de veneno de escorpión de *Tityus caripitensis* y 300 µL de veneno de escorpión de *Tityus breweri* mezclados y resuspendidos en 1mL de solución salina a una concentración de 0,5µg/mL.

Segundo grupo, grupo B, gallinas B1 y B2: Dos gallinas tipo Isa Brown. Se emulsificaron 600 µL de veneno de serpiente de *Bothrops atrox* resuspendido en 1mL de solución salina a una concentración de 0,5µg/mL.

Tercer grupo, grupo C, gallina C: Una gallina tipo Isa Brown. Se emulsificaron 280µL de veneno de *Tityus caripitensis* y 280 µL de veneno de *Tityus breweri* y 600 de serpiente de *Bothrops atrox* en proporciones iguales resuspendidos en 1mL de solución salina a una concentración de 1,7µg/mL.

#### **1.3.1 Primera Inmunización**

El 12 de diciembre de 2010 (300 µL) vía subcutánea (en pata derecha) por gallina con adyuvante incompleto de Freund.

#### **1.3.2 Segunda Inmunización (Primer refuerzo):**

El 26 de diciembre de 2010 (300 µL) vía subcutánea (en pata izquierda) por gallina con adyuvante incompleto de Freund.

#### **1.3.3 Tercera Inmunización (Segundo refuerzo):**

El 11 de enero de 2011 (300 µL) vía subcutánea (en muslo izquierdo) por gallina con adyuvante incompleto de Freund.

#### **1.3.4 Cuarta Inmunización (Reto):**

El 27 de agosto de 2011 (300 µL) vía subcutánea (en muslo derecho) por gallina con adyuvante incompleto de Freund.

Gallina A1, A2 B1, B2	Nº de Inoculación	Concentración (µg/ mL)	Volumen de Veneno Mezclado (µL)	Adyuvante Incompleto (µL)	Volumen de H <sub>2</sub> O (mL)	Dosis ( µL)
12/12/10	1	0,5	600	200	1	300 µL
26/12/10	2	0,5	600	200	1	300 µL
11/01/11	3	0,5	600	200	1	300 µL
27/08/11	4	0,5	600	200	1	300 µL

**Tabla 1.3.1:** Esquema de inmunización de las gallinas A1, A2, B1, B2.

Gallina C	Nº de Inoculación	Concentración ( µg/mL)	Volumen de Veneno Mezclado (µL)	Adyuvante Incompleto (µL)	Volumen de H <sub>2</sub> O (µL)	Dosis (µL)
12/12/10	1	1,7	1160	200	500	300
26/12/10	2	1,7	1160	200	500	300
11/01/11	3	1,7	1160	200	500	300
27/08/11	4	1,7	1160	200	500	300

**Tabla 1.3.2:** Esquema de inmunización de la gallina C.

Las aves fueron observadas luego de la administración de cada dosis explorando efectos tóxicos de los antígenos utilizados; los huevos se recolectaron diariamente a temperatura ambiente hasta la purificación. Las gallinas recibieron agua y alimento “*ad libitum*” con harina especial para gallinas de marca PROAL<sup>®</sup> y ALCONCA<sup>®</sup>. Además fueron sometidas a periodos de luz y oscuridad de 12 horas cada una y a una temperatura que oscilaba entre 16 y 37°C.

#### **1.4 De la recolección de los huevos pre y postinmunes de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*.**

##### **1.4.1 Universo**

Constituido por la totalidad de los huevos obtenidos de las gallinas durante todo el período experimental.

##### **1.4.2 Muestra**

Del total del universo, y para ser sometidos a procesamiento y evaluación, se seleccionaron los huevos de la siguiente forma: Un huevo por gallina por día, en el periodo de pre-inmunización (cinco días antes de la primera inmunización); un huevo por gallina por cada período entre la 1<sup>ra</sup> y la 2<sup>da</sup> y entre la 2<sup>da</sup> y 3<sup>ra</sup> inmunizaciones; luego un huevo cada 15 días entre la 3<sup>ra</sup> y la 4<sup>ta</sup> inmunizaciones; y por último, un huevo por día durante 5 días después de la 4<sup>ta</sup> inmunización. Todos los huevos fueron mantenidos a temperatura ambiente hasta la extracción de las inmunoglobulinas.

#### **1.5 De la evaluación de la viabilidad de los huevos de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*, según el tiempo desde la postura.**

Para la evaluación de la viabilidad de los huevos se evaluaron las características morfológicas del huevo, físicas, dificultades en la obtención de la yema, y la actividad de las IgYs obtenidas.

### **1.5.1 Características morfológicas**

Para cada huevo seleccionado se observaron las siguientes características: Color de la cáscara, tamaño del huevo, porosidad de la cáscara, pigmentaciones anexas a la cáscara, textura de la cáscara, cámara de aire, presencia de clara, viscosidad de la clara, presencia de yema, color de yema, membrana vitelina.

### **1.5.2 Características físicas**

Las propiedades físicas tomadas en consideración para la evaluación de la viabilidad del huevo fueron: Peso de la yema, olor del huevo con cáscara indemne, olor del huevo posterior a romper la cáscara.

### **1.5.3 Facilidad en la purificación de las proteínas de la yema**

Para que las proteínas de la yema sean purificadas de forma óptima, se requiere un buen estado de los componentes de la misma, que darían de forma indirecta un indicio en la evaluación de la viabilidad.

### **1.5.4 Actividad de las IgYs**

La actividad de las IgYs se evaluó mediante el método de ELISA indirecto el cual permite evaluar la actividad de la proteína, que depende de su cantidad y calidad, haciéndola reaccionar con el antígeno el cual indujo su producción.

### **1.6 De la purificación de las IgYs presentes en la yema de huevos de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*. Para obtención de suero proteico.**

Se utilizó el protocolo de Purificación de IgY con PEG-6000 con modificaciones de Zerpa *et al.*, 2006. Inicialmente se lavaron los huevos con agua y jabón, hasta que quedaron limpios. Luego de romper cuidadosamente la cáscara de cada huevo, la yema fue separada de la clara con la ayuda de un separador de yemas. Se roció la yema con agua destilada para facilitar la separación de la clara. Se determinó el peso de la yema, colocándola en un beaker previamente tarado. Se adicionó gota a gota un volumen de PBS equivalente a 3 veces el peso de la yema, con agitación constante por 5min. Se agregó un volumen de Sol A (17,5%) de PEG-6000 gota a gota con agitación constante por 5min. Se centrifugó a 4000rpm por 20min a 4°C. Se determinó el volumen del sobrenadante, filtrándolo con la ayuda de un embudo y gasa. Se adicionó al sobrenadante resultante un volumen de Sol B (34%) equivalente a la tercera parte del peso de la yema.

Se centrifugó a 4000rpm por 20min a 4°C. Se extrajo la solución de la capa superior con una pipeta Pasteur, teniendo el cuidado de no absorber los lípidos precipitados en una capa blanca. Se adicionó un volumen de sol C (48%) de PEG-6000 gota a gota con agitación constante, teniendo en cuenta que un volumen es equivalente a la tercera parte del volumen del sobrenadante obtenido en la separación con la gasa. Se agitó por 5 minutos aproximadamente. Se centrifugó a 4000rpm por 20min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se disolvió el precipitado resultante en un volumen de PBS. Se realizaron alícuotas pequeñas y se refrigeraron a -20°C.

**1.7 De la demostración en el suero proteico obtenido a partir de la yema de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox* la presencia de inmunoglobulinas aviares que lo reconocen y precipitan.**

La demostración de la presencia de proteínas aviares que reconocen y tienen actividad contra su veneno inductor se realizó mediante el Protocolo del Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) indirecto.

Se sensibilizaron 5 placas de 96 pozos cada una con 100µL del antígeno de *B. atrox*, *T. caripitensis* y *T. breweri* en proporciones iguales a una concentración de 1µg/mL en buffer fosfato salino pH 7,4 Overnight a 4°C. Se agregaron 200µL/pozo de solución de bloqueo, BSA al 1% en PBS +0,05% tween 20, y se dejó durante 2h a 37°C en la estufa. Se adicionó 100 µL/pozo de los anticuerpos primarios (IgYs de los Huevos óptimos para purificar y Huevos con dificultad para purificar A1, A2, B1, B2, C diluidos, control positivo “IgY contra *C. durissus* para las serpientes y contra *T. caripitensis* para los escorpiones con actividad comprobada”, control negativo “IgY de huevos no inmunizados”) 1:100 en solución de bloqueo, incubando por 1<sup>1/2</sup>h a 37°C en la estufa. Se lavó 3 veces con PBS + 0,05% de tween 20, colocando 200µL/pozo y agitar por 10min en cada lavado. Se agregó 100µL/pozo de anti IgY conjugado a peroxidasa de rábano picante (PIERCE o thermo) diluido como indica el fabricante en PBS + 0,05% de tween 20. Se incubó por 1 hora a 37°C en estufa. Se lavó 3 veces con PBS + 0,05% de tween 20 adicionando 200µL/pozo y se agitó por 10min en cada lavado. Se encendió el lector de ELISA. Se agregó 100 µL/pozo de OPD (o-Phenylenediamine) diluido en un rango de 0,75 a 1mg/mL en solución buffer citrato-fosfato de sodio a pH 5+1µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por cada 4mL de solución de OPD-buffer. Se esperó 15 min en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se agitó y se leyó a 540nm.

**1.8 De la determinación de la pureza de proteínas obtenidas a partir de la yema de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*.**

Para la determinación de la concentración de las proteínas se utilizó el método de Microbradford, que es una modificación por el IDEA del método de Bradford original (Bradford, 1976).

Se prepararon las soluciones estándar como indica la tabla 1.8.1. Ya preparados los patrones se diluyeron las soluciones de las muestras de IgY (dilución 1:20). Una vez que se prepararon tanto las soluciones estándar como las muestras problemas, se adicionó en una placa de 96 pocillos (para microtitulaciones) 5 $\mu$ L de cada muestra y 157 $\mu$ L de agua miliQ, en su defecto agua destilada, y luego 40 $\mu$ L del reactivo de Bradford 5X; se cargaron los datos en el programa KC4 y se leyó a 595nm. El método recomienda una vez adicionado el reactivo a las muestras tomar las lecturas entre 5min a un máximo de una hora. Se unificó el tiempo y se estandarizó a los 15 minutos.

Solución Estándar	Concentración (mg/mL)	Volumen Seriado ( $\mu$ L)	Volumen de Agua ( $\mu$ L)
1	1	100*	0
2	0,75	75	25
3	0,5	66,67	33
4	0,25	50	50
5	0,125	50	50

**Tabla 1.8.1** Tabla estándar para Microbradford. \*Este volumen es de la solución IgG madre (1 mg/mL).

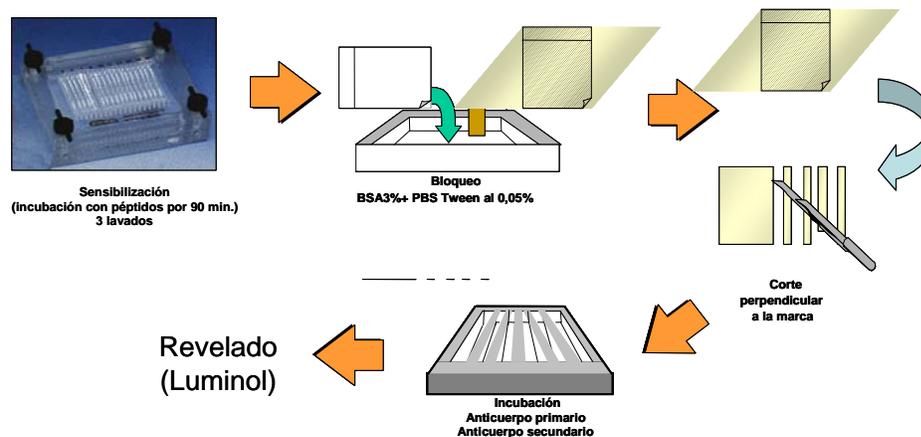
**1.9 De la capacidad de las inmunoglobulinas aviares obtenidas a partir de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox* para reconocer cruzadamente diferentes antígenos.**

Para evaluar la especificidad de los anticuerpos anti-venenos y verificar la capacidad de éstos en el reconocimiento del veneno total, se realizó un ensayo de múltiples antígenos MABA (Multiple Antigen Blot Assay), desarrollado por Noya y Alarcón, 1998. El ensayo consiste en enfrentar las IgYs provenientes de las yemas de los huevos de gallinas inmunizadas con los venenos de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox* contra diferentes venenos en condiciones nativas. Los venenos utilizados fueron: *T. caripitensis*, *B. atrox*, *B. colombiensis*, *C. durissus cumanensis*, *T. breweri* y *T. quirogae*. Se colocó 50µL (5µg/mL) de los venenos en una membrana de nitrocelulosa (9 x 6,5cm).

Luego de la incubación por una hora en la cámara de MABA, se realizaron tres lavados al papel de nitrocelulosa con PBS-Tween al 0,05% v/v, se bloquearon los sitios no cubiertos por el antígeno con una solución de bloqueo durante la noche a 4°C en constante agitación.

Finalizado el bloqueo se cortó el papel de nitrocelulosa en tiras de 2mm c/u, perpendicular a los canales de la cámara, de manera que cada una quedó sensibilizada con todos los antígenos. Cada una de las tiras se incubó por una hora y media a temperatura ambiente y agitación constante con 700µL de IgYs correspondientes a las muestras obtenidas de los huevos los días de mayor producción de anticuerpos específicos y muestras obtenidas de los huevos de gallinas no inmunizadas. Las IgG<sub>(Biotec)</sub> e IgG<sub>(Alacramyn)</sub>, se usaron a una dilución 1/100 en solución de bloqueo.

Concluido el tiempo de incubación se realizaron los lavados para luego colocar el anticuerpo secundario, una anti-IgY y anti-IgG ambos conjugados con peroxidasa (diluido 1/20.000 en solución de lavado) por 1 hora a temperatura ambiente y agitación. Finalmente se lavaron las tiras y se procedió a revelar con el sustrato luminiscente luminol Solución A y B.



**Fig.1.9.1:** Ensayo de múltiples antígenos MABA (Múltiple Antigen Blot Assay), desarrollado por Noya y Alarcón, 1998.

### 1.10 De la determinación de la pureza de proteínas presentes en el suero de huevos de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*.

La pureza de las proteínas obtenidas a partir de la yema de huevo de las gallinas inmunizadas fue determinada mediante electroforesis (BioRad<sup>®</sup>, USA) en gel de Poliacrilamida al 15% en presencia de Sodio Duodesyl Sulfato (SDS) al 1%, según Laemmli (1970). El gel fue fijado y teñido con azul de Coomassie, secado al vacío y escaneado para el procesamiento de las imágenes. El perfil electroforético fue comparado a marcadores de peso molecular de amplio rango.

## RESULTADOS

El número total de huevos colectados en todo el período de estudio fue de 1278, mientras que la muestra seleccionada fue de 105.

### **2.1 De la inmunización de gallinas con venenos individuales o mezclados de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox* y sus efectos.**

La administración de tratamientos de primera inmunización (300 $\mu$ L de veneno) vía subcutánea produjo irritación y flexión de la articulación fémoro-tibial de la pata afectada en las gallinas B1 y B2 y se mantuvieron paradas en una sola pata durante 15 minutos. En la gallina B2 se observó una evacuación inmediata a la administración de la primera dosis. La administración del primer refuerzo vía subcutánea provocó irritación y flexión de la articulación fémoro-tibial de la pata afectada de las gallinas B1 y B2 manteniéndose paradas en una sola pata durante 10 minutos. La administración del segundo refuerzo vía subcutánea no produjo efectos en ninguna de las gallinas. La administración del reto vía subcutánea provocó irritación y flexión de la articulación fémoro-tibial de la pata afectada en las gallinas B1, B2 y C manteniéndose paradas en una sola pata aproximadamente durante 10 minutos la gallina B1 y durante 5 minutos B2 y C, donde estas dos últimas posteriormente adoptaron posición de reposo durante 15 minutos más aproximadamente. No se observó alteración en la frecuencia de alimentación ni de oviposición.

## **2.2 De la evaluación de la viabilidad de los huevos de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*, según el tiempo desde la postura.**

Durante el análisis de los huevos se lograron agrupar en tres categorías claves para su estudio, utilizando las variables de morfología, características físicas, antigüedad, y purificación de la yema, permitiendo así un análisis de la actividad frente a sus antígenos específicos que permitió evaluar su viabilidad. Según la distribución siguiente se observaron características muy similares en cada grupo, utilizando como parámetro básico de separación, por ser el más resaltante, la purificación, quedando: Huevos óptimos para ser purificados (HOP), Huevos con dificultades en su purificación (HDP), y Huevos no aptos para ser purificados (HnAP), para ello, en cada huevo se realizó solución de continuidad de su cáscara y se continuó con los pasos de purificación, aquellos que presentaron algún inconveniente que imposibilitó la adecuada continuación de la purificación fueron clasificados en los grupos HDP y HnAP.

### **2.2.1 Huevos óptimos para ser purificados (HOP)**

Los huevos agrupados en esta categoría fueron colectados entre el once de Junio de 2011 y el tres de Septiembre de 2011. La morfología comparada con sus congéneres no presentaba ningún cambio significativo en visión macroscópica; eran huevos que paseaban por tonos pasteles de color salmón pálido, tamaños equivalentes, no porosos, con ausencia de pigmentaciones a excepción de los de la gallina B1 donde todos presentaban lunares en su vértice, cáscara de textura firme, presencia de clara transparente con viscosidad conservada, presencia de yema amarilla brillante, firme, con peso promedio de todos los huevos de este grupo de 16,98mg, membrana vitelina íntegra, sin defectos. Entre sus características físicas

resaltaron el olor *sui generis* de un huevo, además los pasos de purificación de las IgYs se efectuaron con completa normalidad según el protocolo.

### **2.2.2 Huevos con dificultades en su purificación (HDP)**

Los huevos agrupados en esta categoría fueron colectados entre el veintisiete de Marzo de 2011 y el diez de Junio de 2011. La morfología comparada con sus congéneres presentaban cambios significativos en visión macroscópica; eran huevos que paseaban por tonos pasteles de color salmón pálido, tamaños variables, no porosos, con ausencia de pigmentaciones a excepción de los de la gallina B1 donde todos presentaban lunares en su vértice, cáscara de textura firme, presencia de escasa clara razonablemente firme, presencia de yema amarilla, firme, agrandada y aplanada, con peso promedio de todos los huevos de este grupo de 19,33mg membrana vitelina blanquecina. Entre sus características físicas resaltaron olores propios de un huevo con cáscara indemne, y luego de la solución de continuidad de la misma se evidenció en la mayoría de los huevos olor tipo amoníaco. Los pasos de purificación de las IgYs presentaron dificultad en la separación de las proteínas de la porción lipídica, luego de la adición del Polietilenglicol (PEG-6000) al 17% y 34% solución A y B según el protocolo.

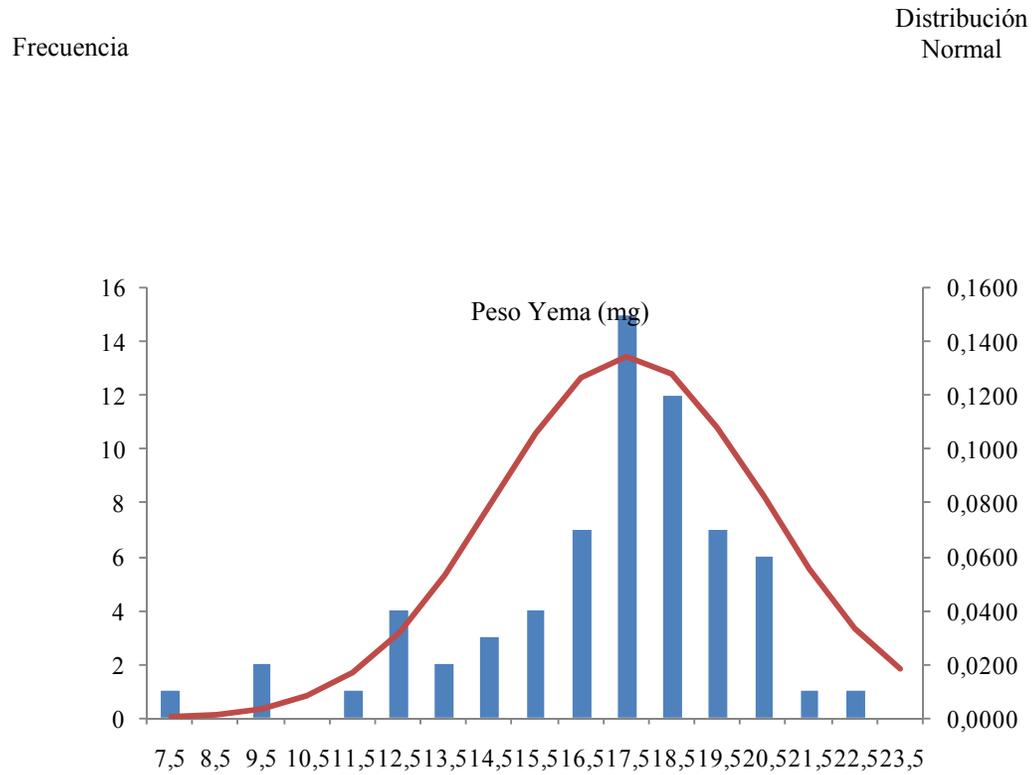
### **2.2.3 Huevos no aptos para ser purificados (HnAP)**

Los huevos agrupados en esta categoría fueron colectados entre el seis de Diciembre de 2010 y el veintiséis de Marzo de 2011. La morfología comparada con sus congéneres presentaban cambios significativos en visión macroscópica; eran huevos que paseaban por tonos pasteles de color mostaza pálido, tamaños muy variables, porosos, con pigmentaciones no evidenciadas en HOP y HDP, cáscara frágil, clara débil o ausente, presencia de yema amarilla mostaza parda, adherida a un

polo del huevo, pétrea, membrana vitelina fusionada o ausente. Huevos mohosos, algunos con pudrición negra. Entre sus características físicas resaltaban olor tipo amoníaco tanto en huevo con cáscara como con solución de continuidad. Sus pasos de purificación presentaron imposibilidad en la separación de proteínas de la porción lipídica, luego de la adición del Polietilenglicol (PEG-6000) al 17%, solución A, según el protocolo y de centrifugado tres veces. Estos huevos no fueron procesados, y por tal motivo no fueron incluidos en el análisis de peso y de actividad frente a sus antígenos.

CARACTERÍSTICAS	HOP	HDP	HnAP
<b>Fecha</b>	11/06/11 al 03/09/11	27/3/11 al 10/06/11	06/12/10 al 26/3/11
<b>Purificación</b>	Sin problemas	Con dificultad	No posible
<i>Color de la Cáscara</i>	Salmón pálido	Salmón pálido	Mostaza pálido
<i>Tamaño del huevo</i>	Equivalentes	Equivalentes	Variables
<i>Porosidad de la Cáscara</i>	NO	NO	SI
<i>Otras pigmentaciones de la Cáscara</i>	NO	NO	SI
<i>Textura de la Cáscara</i>	Dura	Dura	Frágil
<i>Cámara de Aire</i>	SI	SI	NO
<b>Morfología</b> <i>Presencia de la Clara</i>	SI	SI	Escaza
<i>Viscosidad de la Clara</i>	Firme	Razonablemente firme	Fluida
<i>Membrana Vitelina</i>	Cristalina	Blanquecina	Ausente
<i>Tamaño de la Yema</i>	Normal	Agrandada y aplanada	Pequeña
<i>Color de la Yema</i>	Amarilla brillante	Amarilla opaca	Marrón
<i>Peso promedio de la yema</i>	16,98mg	19,33mg	-----
<b>Físicas</b> <i>Olor del huevo indemne</i>	<i>Sui géneris</i>	<i>Sui géneris</i>	Amoniaco
<i>Olor del huevo roto</i>	<i>Sui géneris</i>	Amoniaco	Amoniaco

**Tabla 2.2.1.** Comparativa de las características básicas evaluadas en la muestra para identificar la viabilidad de los huevos según condiciones ambientales establecidas. *HOP*: Huevos óptimos para ser purificados, *HDP*: Huevos con dificultades en su purificación, *HnAP*: Huevos no aptos para ser purificados.



**Fig 2.2.1.** Distribución normal del peso de la yema de muestra de Huevos óptimos para ser purificados (HOP) y Huevos con dificultades en su purificación (HDP). La moda se ubica entre el grupo de 17,5 y 18,5mg, con una desviación estándar de 2,97mg y el promedio de peso fue 17,55mg. La yema más pesada obtuvo 22,85 del huevo B2 del 11/05/11 y la menos pesada obtuvo 7,83 del huevo A1 del 09/08/2011.

**2.3 De la purificación de las IgYs de la yema de huevos de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*. Para obtención de suero proteico.**

A continuación se describen las soluciones aplicadas en el protocolo de purificación ya descrito de los HOP con mayores picos de absorbancia enfrentado a sus antígenos inductores:

Huevo	Peso Yema (mg)	PBS (mL)	Sol A (mL)	Sobrenadante (mL)	Sol B (mL)	PBS (mL)	Volumen (mL)	Sol C (mL)	PBS (mL)
A1 3/9	14,433	43,3	14,4	53	17,7	14,4	15,5	5,2	14,4
A2 3/9	9,790	29,4	9,8	32	11,7	9,8	11,4	3,8	9,8
B1 1/9	18,729	56,2	18,7	75	25	18,7	21	7	18,7
B2 1/9	17,753	53,3	17,7	71	23,7	17,8	21	7	17,8
31 10/7	21,020	63,06	21,0	82	27,3	21,0	23	7,7	21,0
32 11/6	21,326	63,98	21,3	79	26,3	21,3	20	6,7	21,3
C 3/9	18,140	54,42	18,1	66	22	17,2	20	6,7	17,2

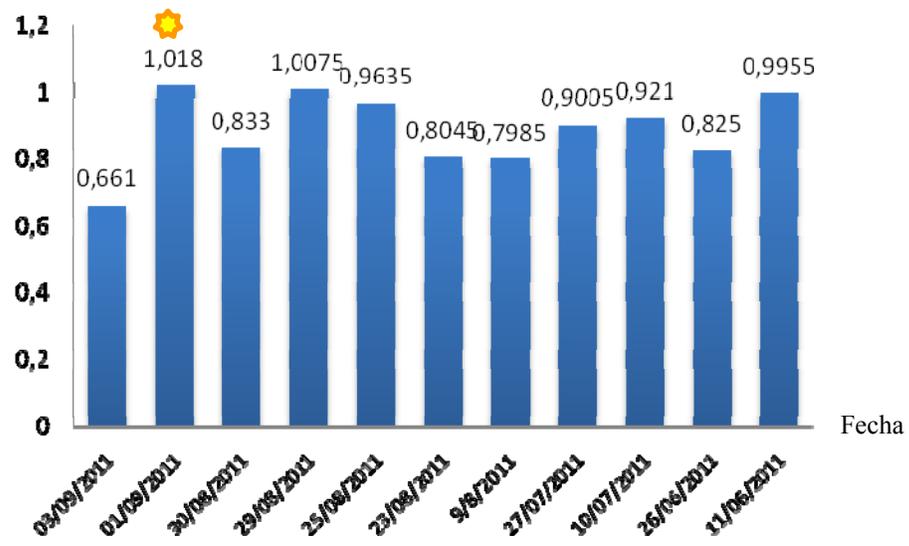
**Tabla 2.3.1.** Purificación de Huevos óptimos para ser purificados, que arrojaron los picos de absorbancia más altos al ELISA indirecto contra sus antígenos inductores, con la cantidad de todos los reactivos agregados. Nótese la variación entre sus pesos.

**2.4 De la demostración de la presencia en el suero proteico obtenido a partir de la yema de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox* la presencia de inmunoglobulinas aviares que lo reconocen y precipitan.**

Mediante el ensayo de ELISA indirecto se determinaron las variaciones según muestra en la producción de anticuerpos IgY contra el veneno crudo de *B. atrox*, *T. caripitensis* y *T. breweri*; esto con la finalidad de identificar el punto más alto de producción (pico) así como la capacidad inmunogénica de cada uno de estos venenos.

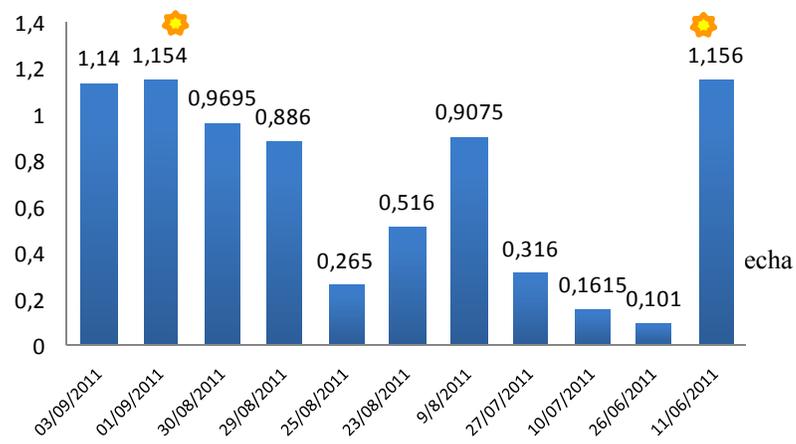
En las figuras 2.4.1.a; 2.4.1.b; 2.4.1.c se observan las cinéticas de producción de anticuerpos de las gallinas B1 y B2, donde se evidenció una respuesta contra el veneno crudo de *B. atrox* en todos los huevos identificados como viables, alcanzando su mayor producción en el día 4 posterior al reto y 209 posterior al segundo refuerzo para B1 y día 4 posterior al reto y 180 posterior al segundo refuerzo para B2, indicando la presencia de dos picos post-inmunización. La gallina B2 mostró una divergencia más acentuada respecto a la absorbancia comparándola con B1 cuyo patrón es más lineal. Para el día 195 posterior a la segunda inmunización se observó en B2 la menor lectura de absorbancia, siendo para B1 el día 6 posterior al reto su menor lectura.

Absorbancia a 540 $\mu$ m

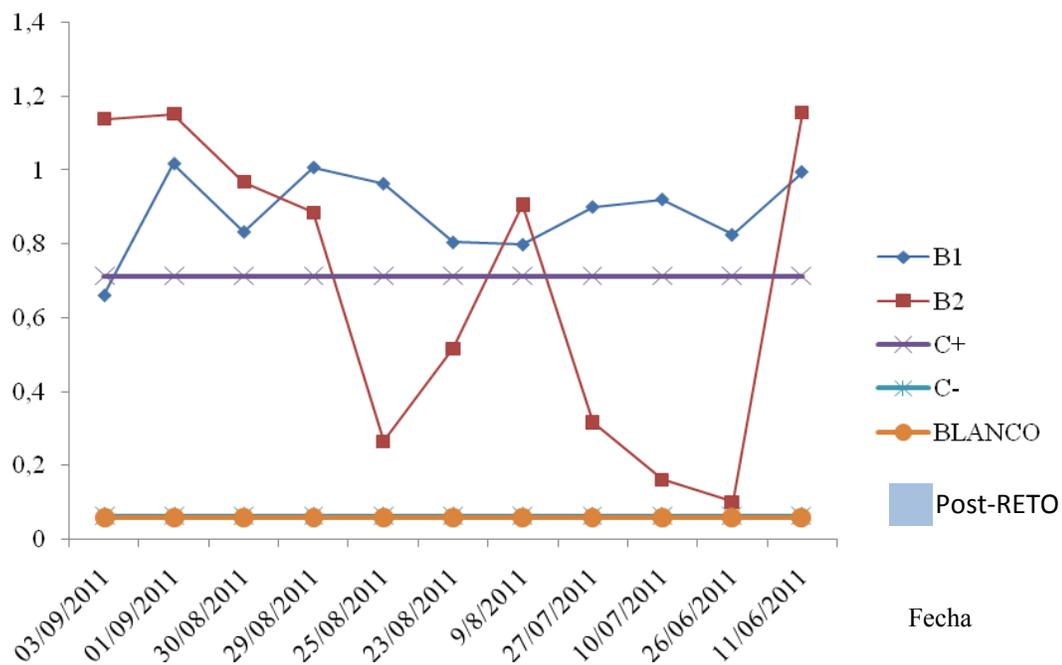


**Fig. 2.4.1.a:** Perfil de la actividad de los anticuerpos IgYs de la gallina B1 de HOPs, contra el veneno completo de *B. atrox* realizado mediante la técnica de ELISA indirecto. El sol indica los días picos de producción.

Absorbancia a  $540\mu\text{m}$



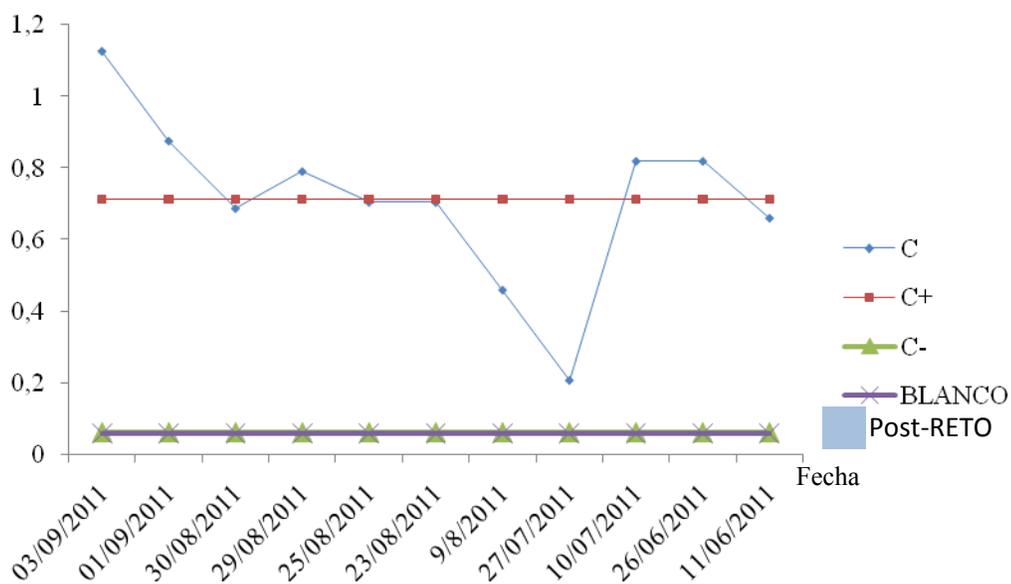
**Fig. 2.4.1.b:** Perfil de la actividad de los anticuerpos IgYs de la gallina B2 con HOPs, contra el veneno completo de *B. atrox* realizado mediante la técnica de ELISA indirecto. El sol indica los días picos de producción.

Absorbancia a 540 $\mu$ m

**Fig. 2.4.1.c:** Perfil de la actividad de los anticuerpos IgYs de las gallinas B1 y B2 con HOPs, contra el veneno completo de *B. atrox* realizado mediante la técnica de ELISA indirecto. Las placas fueron sensibilizadas con 5  $\mu$ g/mL de veneno, el anticuerpo primario se utilizó a una dilución de 1:100 y el secundario 1:20.000 ( $\alpha$ -IgY- HRP Thermo, Illinois, U.S.A). La zona azul indica los días posteriores al Reto. C+ o control positivo (con anticuerpo primario con actividad verificada), C- o control negativo y Blanco, forman un área en la gráfica donde por debajo de control negativo hay ausencia de actividad y sobre esta hay evidencia de actividad de anticuerpos.

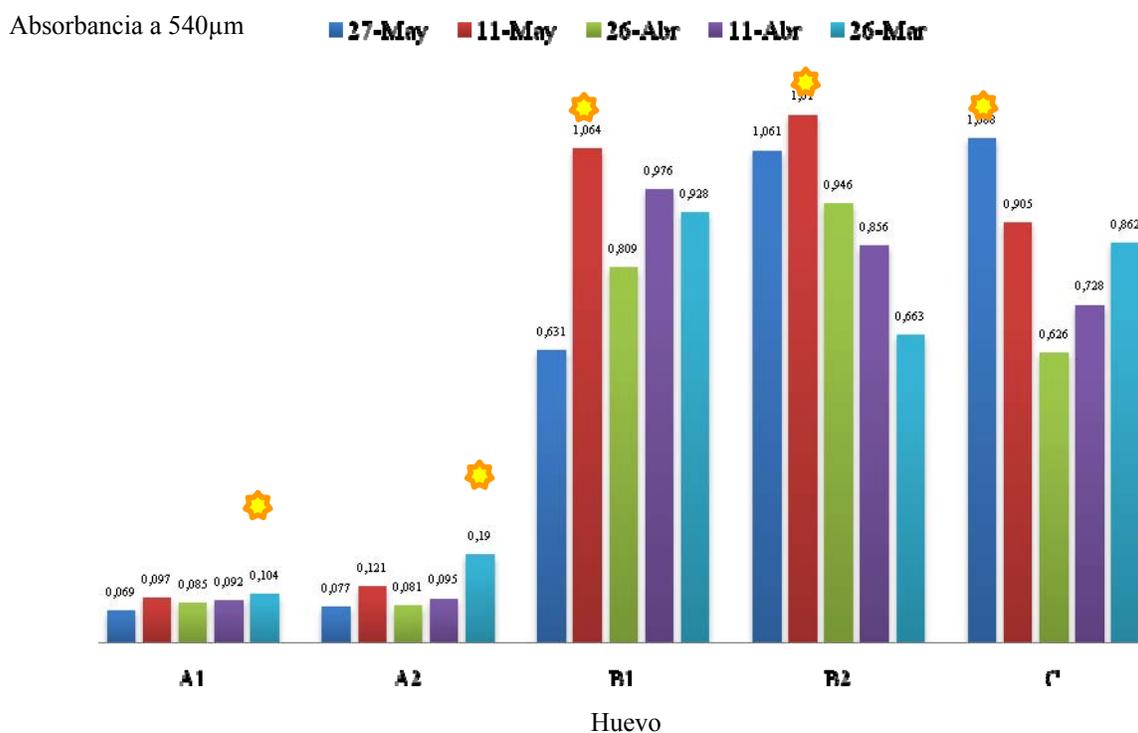
En la figura 2.4.2.a, se observa la cinética de producción de anticuerpos de la gallina C, donde se observó una respuesta contra el veneno crudo de *B. atrox* en todos los huevos identificados como viables, alcanzando su mayor producción en el día 4 posterior al reto, indicando la presencia de un pico post-inmunización. Para el día 226 posterior a la segunda inmunización se observó la menor lectura de absorbancia.

Absorbancia a 540 $\mu$ m



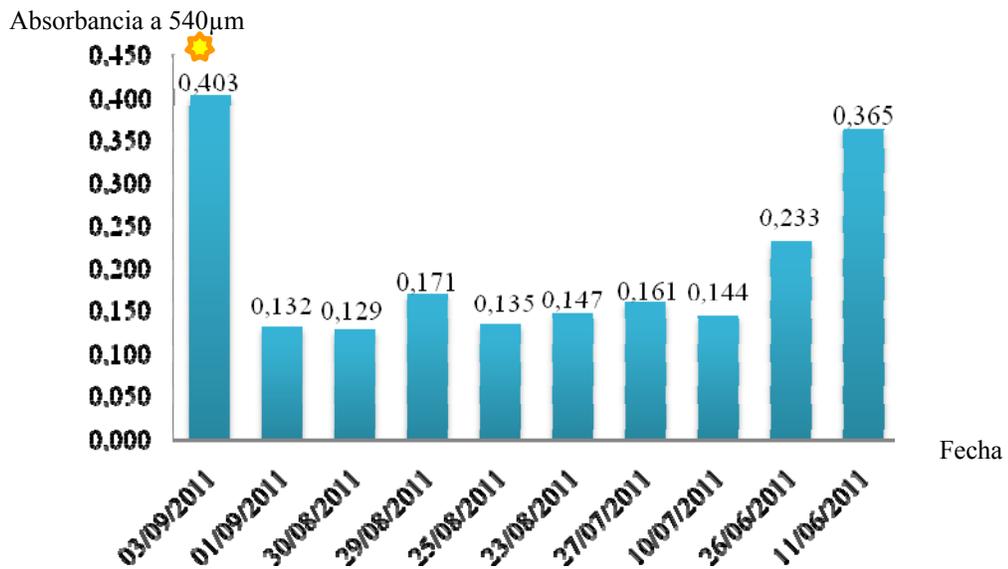
**Fig 2.4.2.a:** Perfil de la actividad de los anticuerpos IgY de la gallina C con HOP, contra el veneno completo de *B. atrox* realizado mediante la técnica de ELISA indirecto. Las placas fueron sensibilizadas con 5  $\mu$ g/mL de veneno, el anticuerpo primario se utilizó a una dilución de 1:100 y el secundario 1:20.000 ( $\alpha$ -IgY- HRP Thermo, Illinois, U.S.A). La zona azul indica los días posteriores al Reto. C+ o control positivo (con anticuerpo primario con actividad verificada), C- o control negativo y Blanco, forman un área en la gráfica donde por debajo de control negativo hay ausencia de actividad y sobre esta hay evidencia de actividad de anticuerpos.

En la figura 2.4.2.a, se observa la cinética de producción de anticuerpos de las gallinas A(s), B(s) y C de HDP, donde se observó una respuesta contra el veneno crudo de *B. atrox* en todos los huevos identificados como viables.



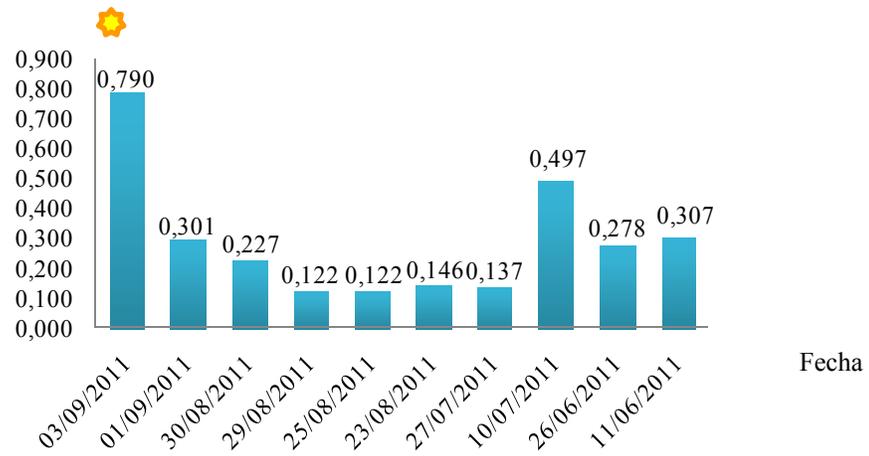
**Fig 2.4.2.b:** Perfil de la actividad de los anticuerpos IgY de las gallinas A(s), B(s) y C de HDP, contra el veneno completo de *B. atrox* realizado mediante la técnica de ELISA indirecto. El sol indica los días picos de producción por huevo.

En las figuras 2.4.3.a; 2.4.3.b; 2.4.3.c, se presentan las cinéticas de producción de anticuerpos de las gallinas A1 y A2, donde se observó una respuesta contra el veneno crudo de *T. caripitensis* en todos los huevos identificados como viables, alcanzando su mayor producción en el día 6 posterior al reto para A1 y día 6 posterior al reto y 209 posterior al segundo refuerzo para A2, indicando la presencia de dos picos post-inmunización.

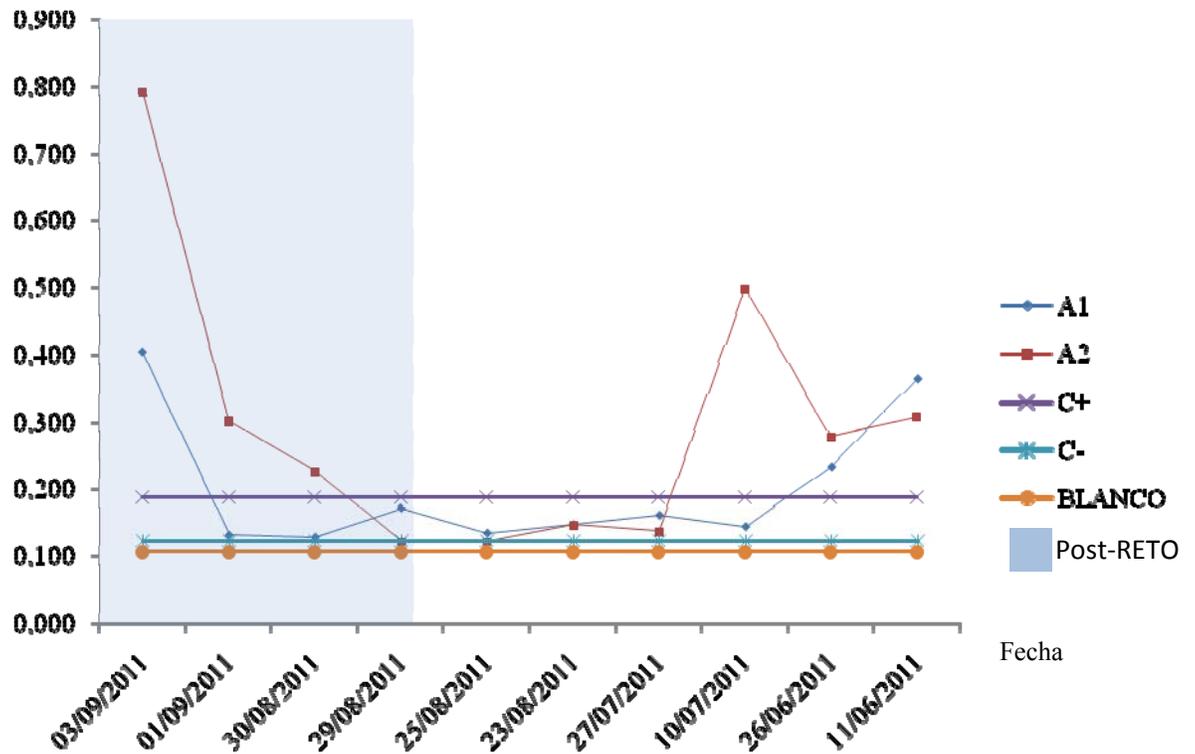


**Fig. 2.4.3.a:** Perfil de la actividad de los anticuerpos IgYs de la gallina A1 con HOPs, contra el veneno completo de *T. caripitensis* realizado mediante la técnica de ELISA indirecto. El sol indica los días picos de producción.

Absorbancia a 540 $\mu$ m

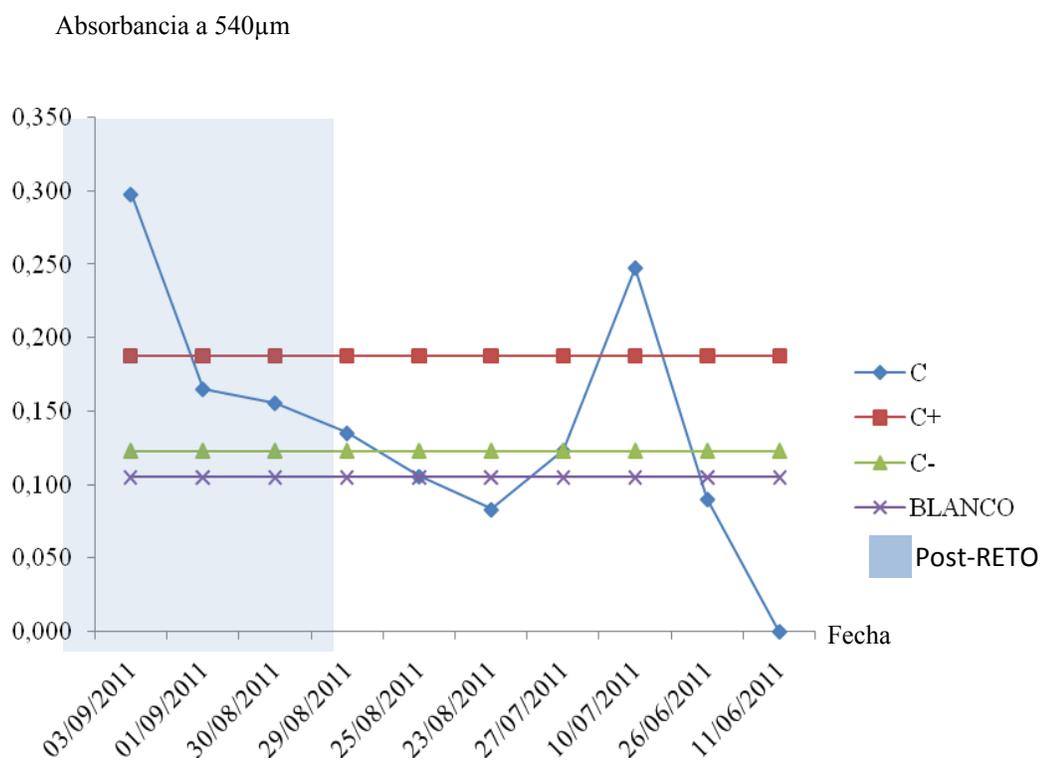


**Fig. 2.4.3.b:** Perfil de la actividad de los anticuerpos IgYs de la gallina A2 con HOPs, contra el veneno completo de *T. caripitensis* realizado mediante la técnica de ELISA indirecto. El sol indica los días picos de producción.

Absorbancia a 540 $\mu$ m

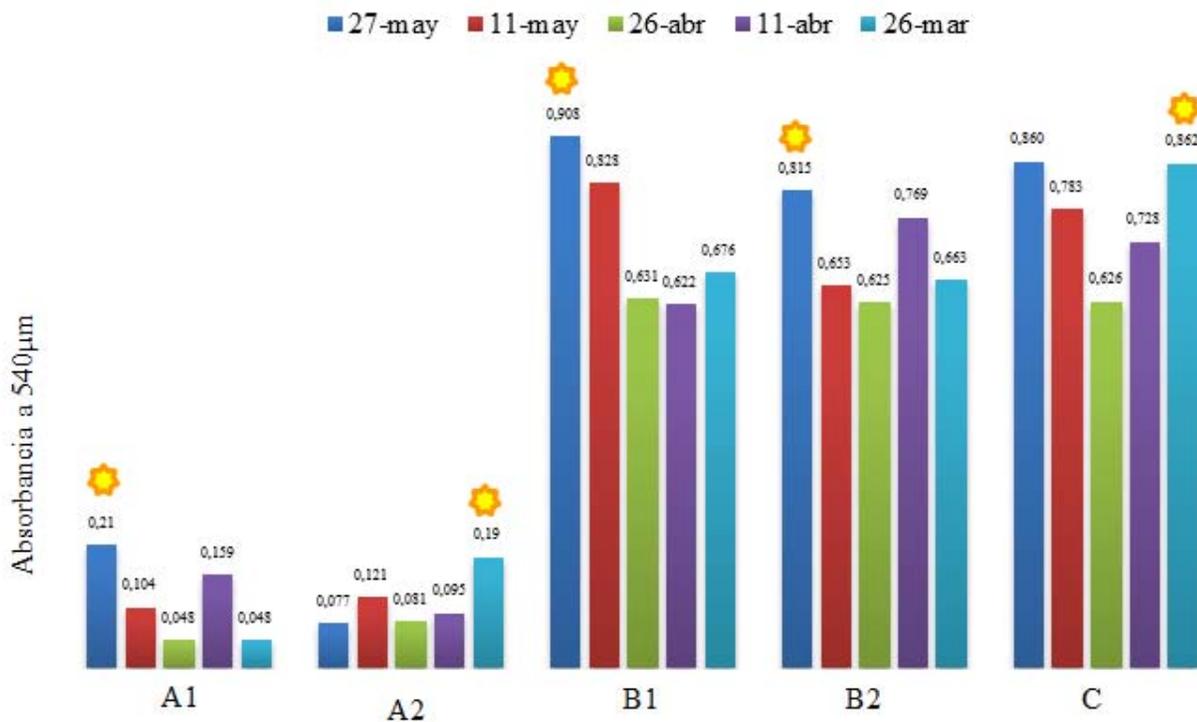
**Fig 2.4.3.c:** Perfil de la actividad de los anticuerpos IgYs de las gallinas A1 y A2 con HOPs, contra el veneno completo de *T. caripitensis* realizado mediante la técnica de ELISA indirecto. Las placas fueron sensibilizadas con 5  $\mu$ g/mL de veneno, el anticuerpo primario se utilizó a una dilución de 1:100 y el secundario 1:20.000 ( $\alpha$ -IgY- HRP Thermo, Illinois, U.S.A). La zona azul indica los días posteriores al Reto. C+ o control positivo (con anticuerpo primario con actividad verificada), C- o control negativo y Blanco, forman un área en la gráfica donde por debajo de control negativo hay ausencia de actividad y sobre esta hay evidencia de actividad de anticuerpos.

En la figura 2.4.4, se refleja la cinética de producción de anticuerpos de la gallina C, donde se observó una respuesta contra el veneno crudo de *T. caripitensis* en todos los huevos identificados como viables, alcanzando su mayor producción en el día 6 posterior al reto indicando la presencia de un pico post-inmunización.



**Fig 2.4.4.a:** Perfil de la actividad de los anticuerpos IgY de la gallina C con HOP, contra el veneno completo de *T. caripitensis* realizado mediante la técnica de ELISA indirecto. Las placas fueron sensibilizadas con 5  $\mu$ g/mL de veneno, el anticuerpo primario se utilizó a una dilución de 1:100 y el secundario 1:20.000 ( $\alpha$ -IgY- HRP Thermo, Illinois, U.S.A). La zona azul indica los días posteriores al Reto. C+ o control positivo (con anticuerpo primario con actividad verificada), C- o control negativo y Blanco, forman un área en la gráfica donde por debajo de control negativo hay ausencia de actividad y sobre esta hay evidencia de actividad de anticuerpos.

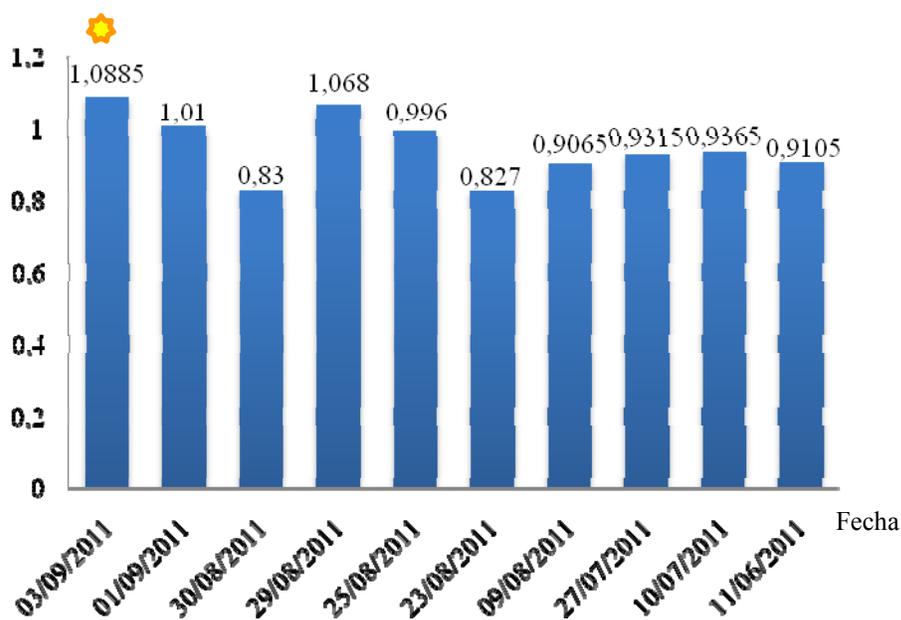
En la figura 2.4.4.b, se representa la cinética de producción de anticuerpos de las gallinas A(s), B(s) y C de HDP, donde se observó una respuesta contra el veneno crudo de *T.caripitensis* en todos los huevos identificados como viables.



**Fig 2.4.4.b:** Perfil de la actividad de los anticuerpos IgY de las gallinas A(s), B(s) y C de HDP, contra el veneno completo de *T. caripitensis* realizado mediante la técnica de ELISA indirecto. El sol indica los días picos de producción por huevo.

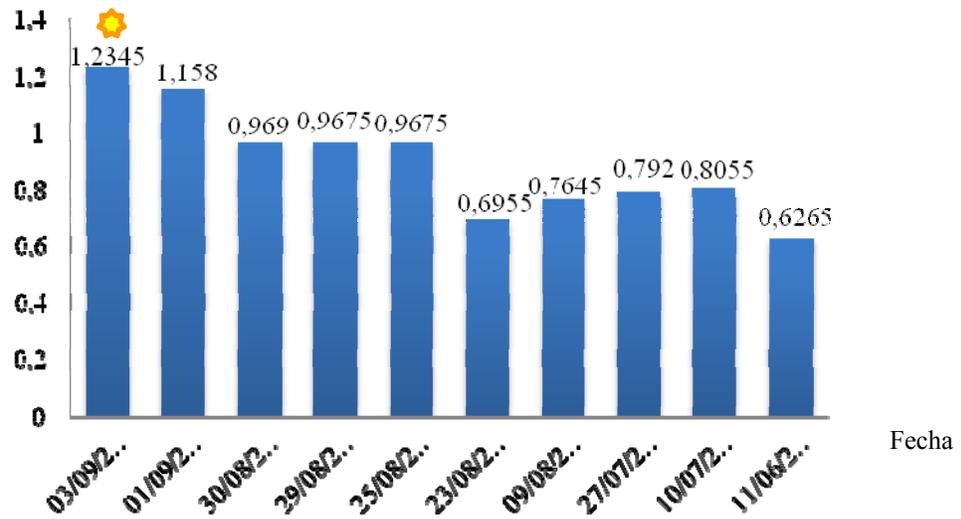
En la figura 2.4.5, se obtuvo la cinética de producción de anticuerpos de las gallinas A1 y A2, donde se observó una respuesta contra el veneno crudo de *T. breweri* en todos los huevos identificados como viables, alcanzando su mayor producción en el día 6 posterior al reto para A1 y día 6 posterior al reto y 209 posterior al segundo refuerzo para A2, indicando la presencia de dos picos post-inmunización.

Absorbancia a 540 $\mu$ m

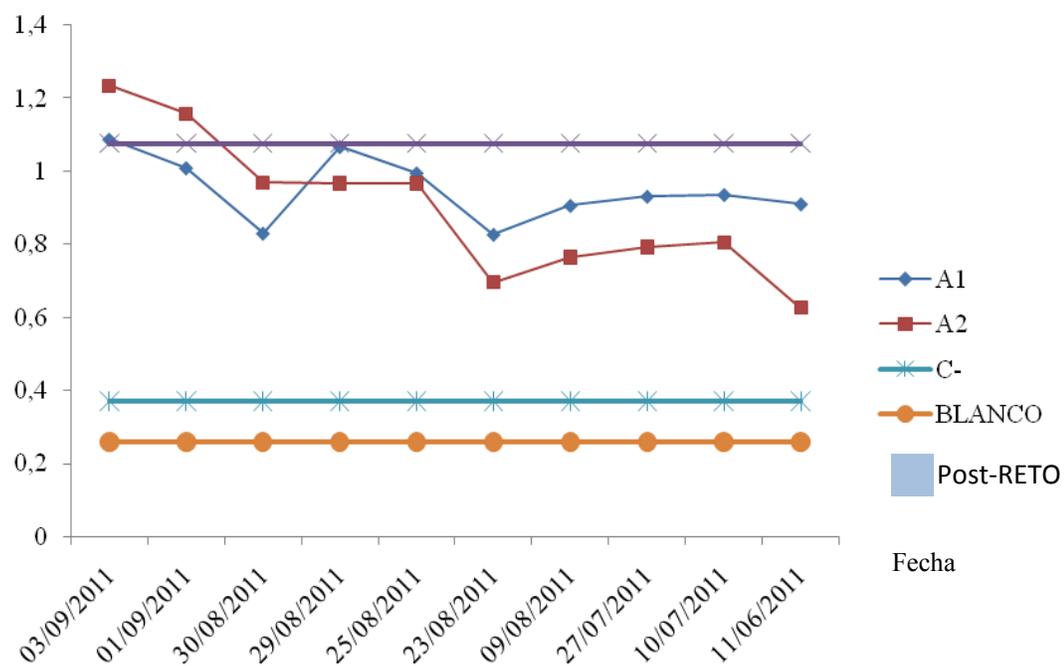


**Fig. 2.4.5.a:** Perfil de la actividad de los anticuerpos IgYs de la gallina A1 con HOPs, contra el veneno completo de *T. breweri* realizado mediante la técnica de ELISA indirecto. El sol indica los días picos de producción.

Absorbancia a 540 $\mu$ m

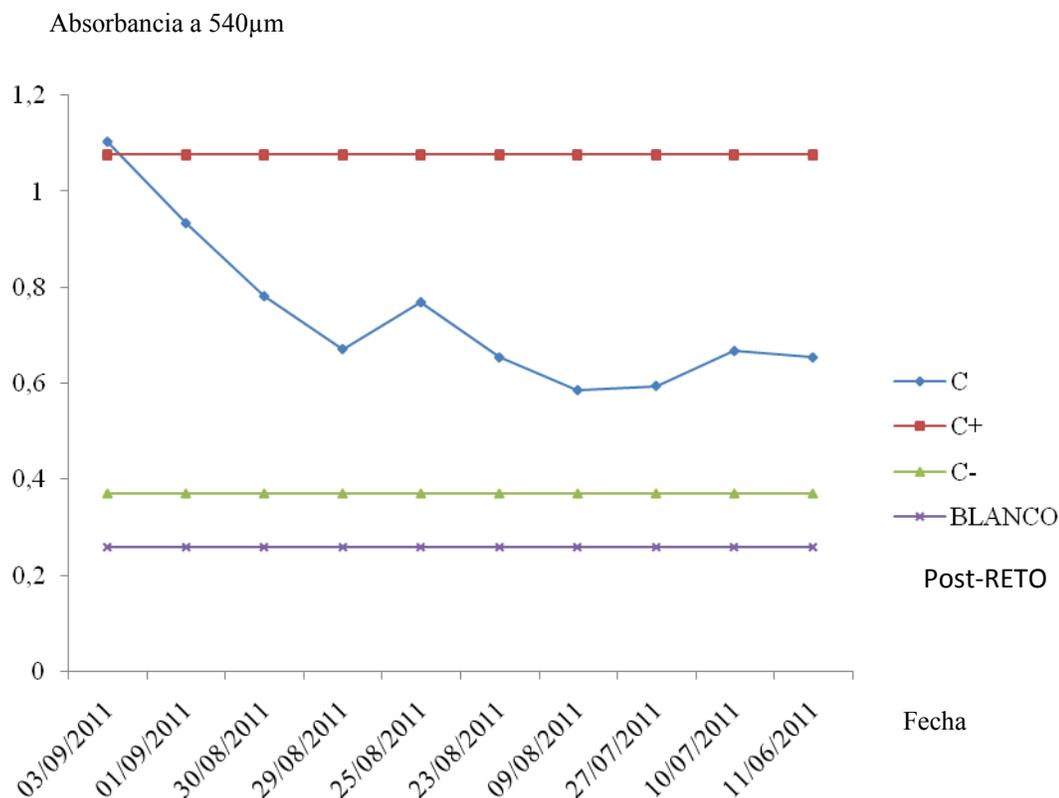


**Fig. 2.4.5.b:** Perfil de la actividad de los anticuerpos IgYs de la gallina A2 con HOPs, contra el veneno completo de *T. breweri* realizado mediante la técnica de ELISA indirecto. El sol indica los días picos de producción.

Absorbancia a 540 $\mu\text{m}$ 

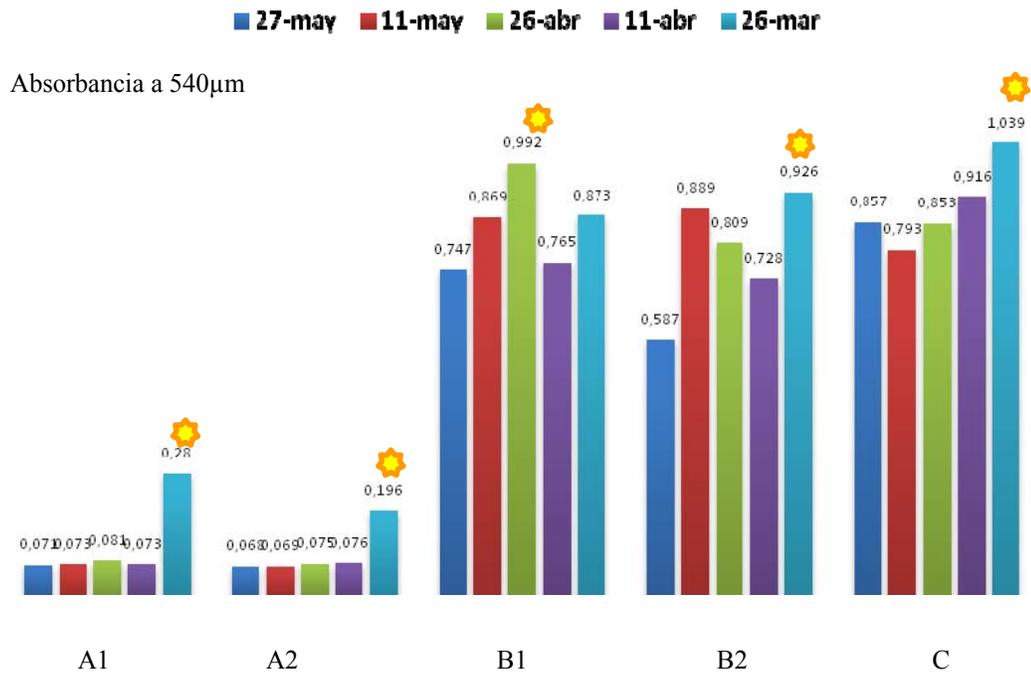
**Fig 2.4.5.c:** Perfil de la actividad de los anticuerpos IgYs de las gallinas A1 y A2 con HOPs, contra el veneno completo de *T. breweri* realizado mediante la técnica de ELISA indirecto. Las placas fueron sensibilizadas con 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de veneno, el anticuerpo primario se utilizó a una dilución de 1:100 y el secundario 1:20.000 ( $\alpha\text{-IgY}$ - HRP Thermo, Illinois, U.S.A). La zona azul indica los días posteriores al Reto. C+ o control positivo (con anticuerpo primario con actividad verificada), C- o control negativo y Blanco, forman un área en la gráfica donde por debajo de control negativo hay ausencia de actividad y sobre esta hay evidencia de actividad de anticuerpos.

En la figura 2.4.6, se evidencia la cinética de producción de anticuerpos de la gallina C, donde se observó una respuesta contra el veneno crudo de *T. breweri* en todos los huevos identificados como viables, alcanzando su mayor producción en el día 6 posterior al reto, indicando la presencia de un pico post-inmunización.



**Fig 2.4.6.a:** Perfil de la actividad de los anticuerpos IgY de la gallina C con HOP, contra el veneno completo de *T. breweri* realizado mediante la técnica de ELISA indirecto. Las placas fueron sensibilizadas con 5  $\mu$ g/mL de veneno, el anticuerpo primario se utilizó a una dilución de 1:100 y el secundario 1:20.000 ( $\alpha$ -IgY- HRP Thermo, Illinois, U.S.A). La zona azul indica los días posteriores al Reto. C+ o control positivo (con anticuerpo primario con actividad verificada), C- o control negativo y Blanco, forman un área en la gráfica donde por debajo de control negativo hay ausencia de actividad y sobre esta hay evidencia de actividad de anticuerpos.

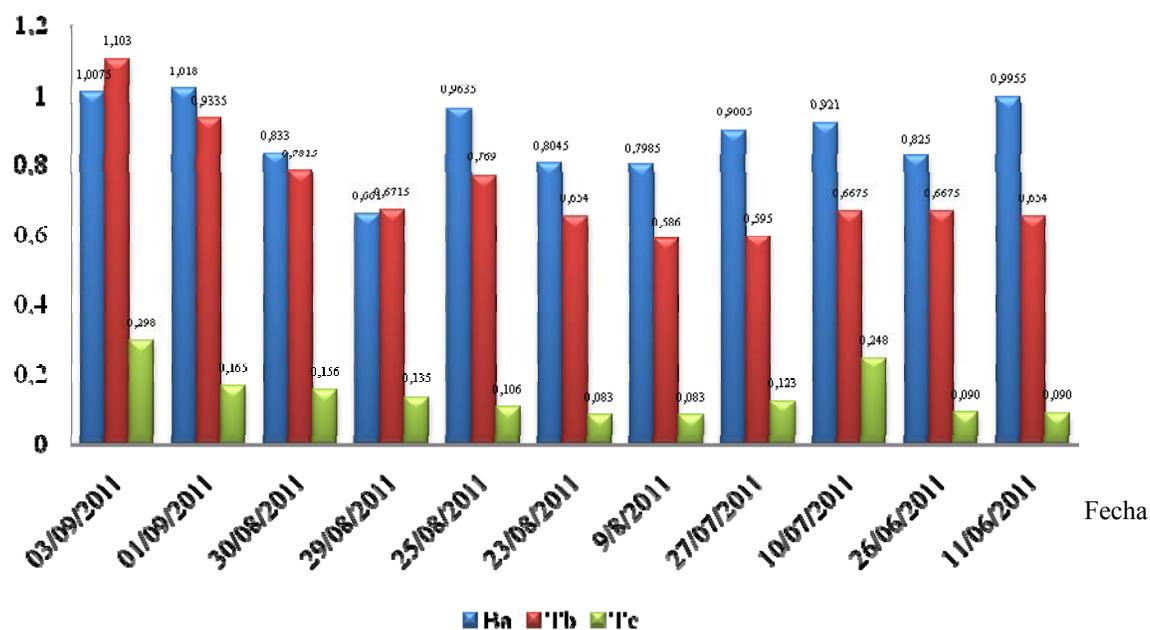
En la figura 2.4.6.b, se muestra la cinética de producción de anticuerpos de las gallinas A(s), B(s) y C de HDP, donde se observó una respuesta contra el veneno crudo de *T. breweri* en todos los huevos identificados como viables.



**Fig 2.4.6.b:** Perfil de la actividad de los anticuerpos IgY de las gallinas A(s), B(s) y C de HDP, contra el veneno completo de *T. breweri* realizado mediante la técnica de ELISA indirecto. El sol indica los días picos de producción por huevo.

En la figura 2.4.7, se presenta la cinética de producción de anticuerpos de la gallina C, donde se observó una respuesta contra el veneno crudo de *T. breweri*, *T. caripitensis* y *B. atrox* en todos los huevos identificados como viables, alcanzando su mayor producción en el día 6 posterior al reto, indicando la presencia de un pico post-inmunización común de los huevos enfrentados al veneno escorpiónico, para el día 6 después del reto y un pico para el huevo enfrentado al veneno de serpiente para el día 4 después del reto, usándose por mayores picos en común el huevo del día 6 después del reto.

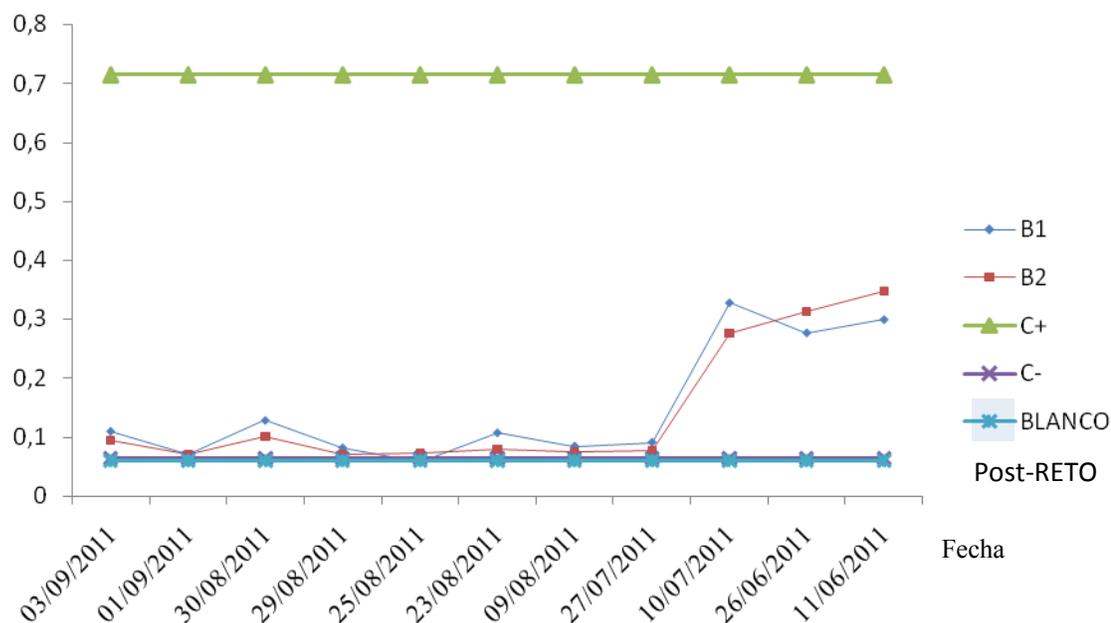
Absorbancia a 540µm



**Fig. 2.4.7:** Perfil de la actividad de los anticuerpos IgYs de la gallina C con HOPs, contra el veneno completo de *B. atrox*, *T. breweri* y *T. caripitensis* realizado mediante la técnica de ELISA indirecto. El sol indica los días picos de producción.

En la figura 2.4.8, se observa la cinética de producción de anticuerpos de las gallinas B1 y B2, donde se observó una respuesta contra el veneno crudo de *T. caripitensis* en todos los huevos identificados como viables, alcanzando su mayor producción en el día 180 posterior al segundo refuerzo para B2 y 209 días para el segundo día posterior al refuerzo para B1, indicando la presencia de un pico post-inmunización por cada huevo.

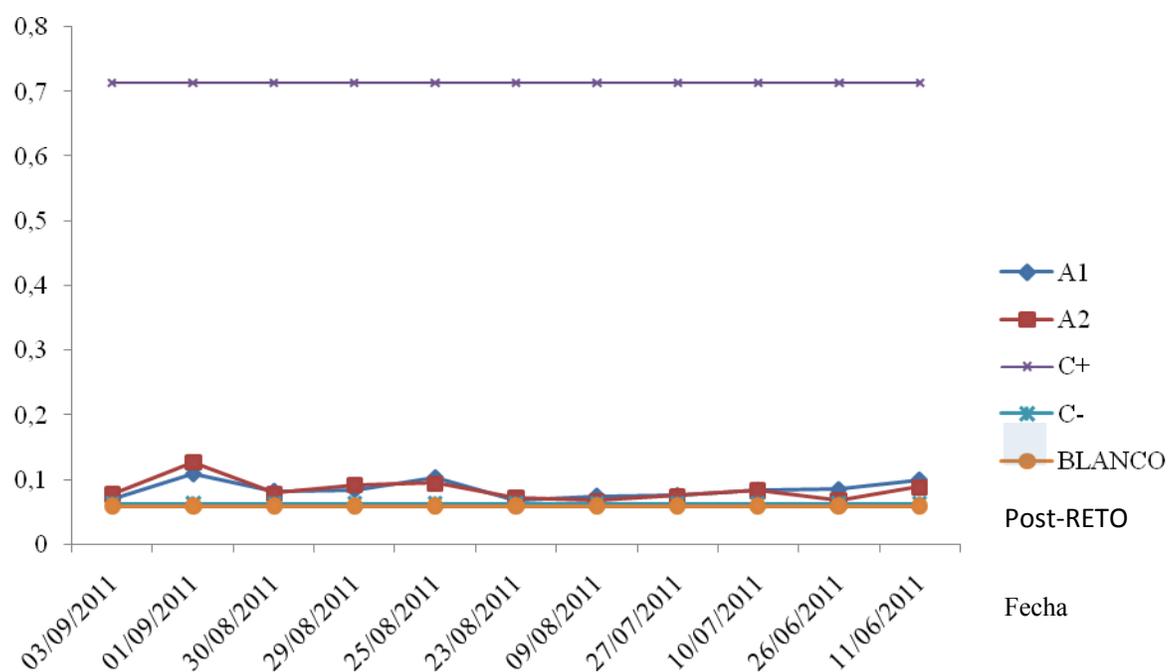
Absorbancia a 540 $\mu$ m



**Fig 2.4.8:** Perfil de la reactividad cruzada de los anticuerpos IgYs de las gallinas B1 y B2 con HOPs, contra el veneno completo de *T. caripitensis* realizado mediante la técnica de ELISA indirecto. Las placas fueron sensibilizadas con 5  $\mu$ g/mL de veneno, el anticuerpo primario se utilizó a una dilución de 1:100 y el secundario 1:20.000 ( $\alpha$ -IgY- HRP Thermo, Illinois, U.S.A). La zona azul indica los días posteriores al Reto. C+ o control positivo (con anticuerpo primario con actividad verificada), C- o control negativo y Blanco, forman un área en la gráfica donde por debajo de control negativo hay ausencia de actividad y sobre esta hay evidencia de actividad de anticuerpos.

En la figura 2.4.9, se muestra la cinética de producción de anticuerpos de las gallinas A1 y A2, donde se observó una respuesta contra el veneno crudo de *B. atrox* en todos los huevos identificados como viables, alcanzando su mayor producción en el día 4 después del reto para ambas gallinas, indicando la presencia de un pico post-inmunización por cada huevo.

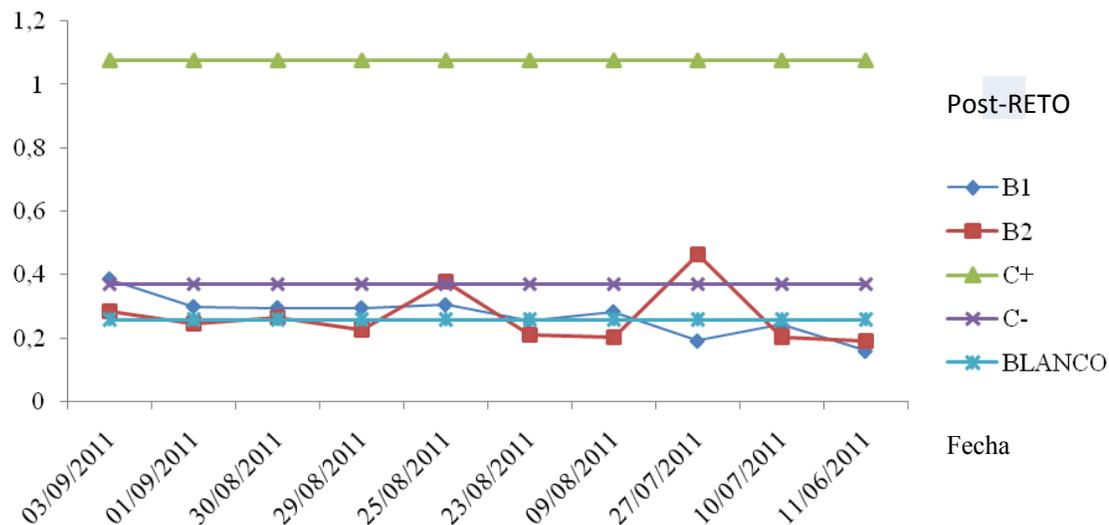
Absorbancia a 540 $\mu$ m



**Fig 2.4.9:** Perfil de la reactividad cruzada de los anticuerpos IgYs de las gallinas A1 y A2 con HOPs, contra el veneno completo de *B. atrox* realizado mediante la técnica de ELISA indirecto. Las placas fueron sensibilizadas con 5 $\mu$ g/mL de veneno, el anticuerpo primario se utilizó a una dilución de 1:100 y el secundario 1:20.000 ( $\alpha$ -IgY- HRP Thermo, Illinois, U.S.A). La zona azul indica los días posteriores al Reto. C+ o control positivo (con anticuerpo primario con actividad verificada), C- o control negativo y Blanco, forman un área en la gráfica donde por debajo de control negativo hay ausencia de actividad y sobre esta hay evidencia de actividad de anticuerpos.

En la figura 2.4.10, se observa la cinética de producción de anticuerpos de las gallinas B1 y B2, donde se observó una respuesta contra el veneno crudo de *T. breweri* en todos los huevos identificados como viables, alcanzando su mayor producción en el día 209 después del segundo refuerzo para B2 y el día 4 posterior al reto para la gallina B1, indicando la presencia de un pico post-inmunización por cada huevo.

Absorbancia a 540 $\mu$ m



**Fig 2.4.10:** Perfil de la reactividad cruzada de los anticuerpos IgYs de las gallinas B1 y B2 con HOPs, contra el veneno completo de *T. breweri* realizado mediante la técnica de ELISA indirecto. Las placas fueron sensibilizadas con 5  $\mu$ g/mL de veneno, el anticuerpo primario se utilizó a una dilución de 1:100 y el secundario 1:20.000 ( $\alpha$ -IgY- HRP Thermo, Illinois, U.S.A). La zona azul indica los días posteriores al Reto. C+ o control positivo (con anticuerpo primario con actividad verificada), C- o control negativo y Blanco, forman un área en la gráfica donde por debajo de control negativo hay ausencia de actividad y sobre esta hay evidencia de actividad de anticuerpos.

VENENO	GALLINA	HOP	FECHA	HDP	FECHA
<i>T.c</i>	A1	<b>0,403</b>	03/09/11	<b>0,210</b>	27/05/11
	A2	<b>0,790</b>	03/09/11	<b>0,190</b>	26/03/11
<i>T.b</i>	A1	<b>1,089</b>	03/09/11	<b>0,280</b>	26/03/11
	A2	<b>1,235</b>	03/09/11	<b>0,196</b>	26/03/11
<i>B.a</i>	B1	<b>1,018</b>	01/09/11	<b>1,064</b>	11/05/11
	B2	<b>1,154</b>	01/09/11	<b>1,080</b>	11/05/11
<i>T.c</i>	C	<b>0,298</b>	03/09/11	<b>0,862</b>	27/05/11
<i>T.b</i>	C	<b>1,103</b>	03/09/11	<b>1,039</b>	27/05/11
<i>B.a</i>	C	<b>1,018</b>	03/09/11	<b>1,088</b>	27/05/11

**Tabla 2.4.11:** Tabla comparativa entre días pico de HOP y HDP en una lectura de absorbancia a 540 $\mu$ m. *T.c*: *Tityus caripitensis*; *T.b*: *Tityus breweri*; *B.a*: *Bothrops atrox*.

## 2.5 De la determinación la concentración de proteínas presentes en el suero de huevos de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con venenos de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*.

Para determinar la concentración de la proteína purificada de las yemas de los huevos (preinmune y días picos de los postinmune), se realizó un ensayo Microbradford tal como se describe en Materiales y Métodos; a los días picos de la inmunización.

A continuación se muestran en la Tabla la concentración promedio de los HOP picos y diluciones de 1/10 y 1/20:

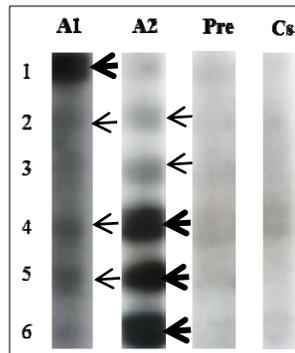
	1/10	1/20	Promedio
Huevo	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)
A1 3/9	4,10	4,24	4,17
A2 3/9	5,82	5,87	5,84
B1 1/9	9,09	10,46	9,78
B2 1/9	6,66	8,53	7,59
C 3/9	7,83	8,26	8,04

**Tabla 2.5.1:** Concentración de proteínas con el método de Microbradford en yemas de huevos purificados que arrojaron mayor absorbancia por ELISA (picos) al ser expuestos a sus antígenos de inmunización.

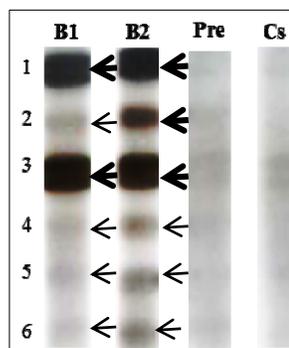
## **2.6 De la capacidad de las inmunoglobulinas aviares obtenidas a partir de gallinas Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox* para reconocer cruzadamente diferentes antígenos.**

Para determinar la especificidad de los anticuerpos desarrollados se realizó el inmunoensayo enzimático de múltiples antígenos (MABA), el cual permite a un anticuerpo enfrentarse a varios antígenos, para determinar su especificidad y reacciones cruzadas además de la inmunogenicidad.

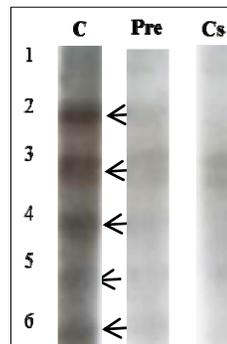
En las Figuras 2.6.1, 2.6.2 y 2.6.3 se puede observar que la reactividad de los anticuerpos IgY fue específica. Los anticuerpos, además de reconocer a cada antígeno con los cuales fueron inmunizados, también presentaron una reactividad cruzada con venenos de otras especies del género *Tityus* y *Bothrops* y el género *Crótalus*.



**Fig.2.6.1:** Reactividad cruzada de los anticuerpos IgY anti- veneno completo mezclado de *T.caripitensis* y *T breweri*, evaluados por MABA. Se sensibilizó el papel de nitrocelulosa con 5 µg/mL de cada uno de los venenos: 1.- *B. colombiensis* 2.- *C. durissus* 3.- *T breweri*. 4.- *T. caripitensis*, 5.- *T quirogae*, 6.- *B. atrox*, los anticuerpos primarios se utilizaron a una dilución 1:100. A1 y A2: IgY (HOPsA1 y A2 picos); Pre: IgY preinmune; Cs: control de sistema. Se señalan con flechas gruesas las bandas de importancia reconocidas por las IgYs y con flechas delgadas se señalan las otras bandas reconocidas.



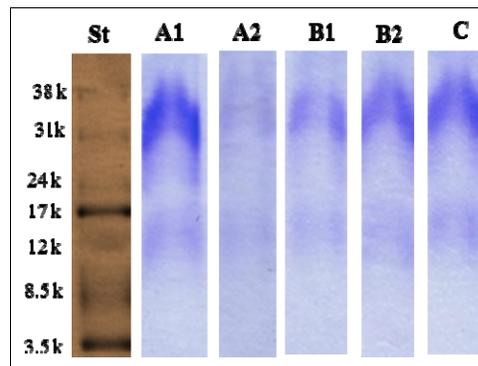
**Fig.2.6.2:** Reactividad cruzada de los anticuerpos IgY anti- veneno completo de *B. atrox*, evaluados por MABA. Se sensibilizó el papel de nitrocelulosa con 5 µg/mL de cada uno de los venenos: 1.- *T. caripitensis*, 2.- *T quirogae*, 3.- *B. atrox*, 4.- *B. colombiensis* 5.- *C. durissus* 6.- *T. breweri*., los anticuerpos primarios se utilizaron a una dilución 1:100. B1 y B2: IgY (HOPsB1 y B2 picos); Pre: IgY preinmune; Cs: control de sistema. Se señalan con flechas gruesas las bandas de importancia reconocidas por las IgYs y con flechas delgadas se señalan las otras bandas reconocidas.



**Fig.2.6.3:** Reactividad cruzada de los anticuerpos IgY anti- veneno completo mezclado de *T.caripitensis*, *T breweri* y *B. atrox*, evaluados por MABA. Se sensibilizó el papel de nitrocelulosa con 5 µg/mL de cada uno de los venenos: 1.- *T. caripitensis*, 2.- *T quirogae*, 3.- *B. atrox*, 4.- *B. colombiensis* 5.- *C. durissus* 6.- *T. breweri.*, los anticuerpos primarios se utilizaron a una dilución 1:100. C: IgY (HOP C pico); Pre: IgY preimmune; Cs: control de sistema. Se señalan con flechas gruesas las bandas de importancia reconocidas por las IgYs y con flechas delgadas se señalan las otras bandas reconocidas.

**2.7 De la determinación de la pureza de proteínas obtenidas a partir de la yema de huevos de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*.**

La preparación de proteínas de yema de huevo sometida a electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones no reducidas mostró una banda muy fuerte y ancha alrededor de los 38.000 Daltons correspondiente a la cadena pesada de IgY, además se observaron dos bandas débiles de 24.000 y 12.000 D respectivamente.



**Fig.3.7.1:** Comparación electroforética de las IgY en HOP picos en un gel de poliacrilamida-bisacrilamida (SDS-PAGE al 10-15%, teñido Azul de Coomassie): (St) Standard Marcador de Bajo Peso Molecular (RPN755E Low-Range Rainbow Molecular Weight Markers) (A1, A2, B1, B2 y C picos HOP) IgY 0,3µg/mL.

HOPs picos	Características principales	Peso Yema (mg)	ELISA indirecto	Microbradford (mg/mL)	MABA #
A1 03/09/11	Ovoide alargado; la cáscara más clara.	14,43	*Excelente Actividad, <i>T.c. T.b.</i>	4,17 $\infty$	<i>B. colombiensis</i> <i>C. durissus</i> <i>T. caripitensis</i> , <i>T. quirogae</i>
A2 03/09/11	Ovoide, con manchas irregulares en polo superior.	9,79	*Excelente Actividad, <i>T.c. T.b.</i>	5,84 $\infty$	<i>T. caripitensis</i> <i>B. atrox</i> <i>T. quirogae</i> <i>T. breweri</i> <i>C. durissus</i> <i>B. colombiensis</i>
B1 01/09/11	Ovoide, manchas redondeadas definidas, marrón oscuro en el ecuador.	18,73	*Excelente Actividad, <i>B.a</i>	9,78	<i>B. atrox</i> <i>T. caripitensis</i> <i>T. quirogae</i> <i>B. colombiensis</i> <i>C. durissus</i> <i>T. breweri</i>
B2 01/09/11	Ovoide; el huevo de mayor tamaño.	17,75	*Excelente Actividad, <i>B.a</i>	7,59	<i>B. atrox</i> <i>T. caripitensis</i> <i>T. quirogae</i> <i>B. colombiensis</i> <i>C. durissus</i> <i>T. breweri</i>

**Tabla 2.7.1:** Comparativa de las características más resaltantes de los huevos picos Óptimos para ser Purificados (HOPs picos). ELISA indirecto, demuestra la actividad de las IgYs frente a un antígeno determinado. Microbradford cuantifica la concentración de proteínas purificadas de la yema. Ensayo inmunocromatográfico de múltiples antígenos (MABA), permite observar la reactividad cruzada de la IgYs contra una variedad de antígenos. *T.c.:* *Tityus caripitensis*, *T.b.:* *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*, \* actividad superior a control positivo,  $\infty$  por debajo de lo normal de concentración de IgY por yema (normal de 6 a 13mg/mL), # dispuestos en orden descendente, de mayor a menor reactividad.

## DISCUSION

El veneno extraído de las diferentes especies del género *Tityus* presentan entre sí una gran diversidad antigénica, la cual está debe estar ampliamente relacionada con cambios en la biogeografía regional. Se han encontrado variaciones en la secuencia en algunos epítopes antigénicos y/o diferencias en la abundancia de los componentes presentes en las toxinas (Borges *et al.*, 2008). Por lo tanto, a la hora de preparar un antiveneno específico contra especies del género *Tityus* debe ser tomada en cuenta tal variabilidad (Borges *et al.*, 2006). En Venezuela, para contrarrestar los efectos de las toxinas del veneno de escorpión se utilizan antivenenos desarrollados en equinos, que han demostrado tener una alta efectividad (BIOTECFAR). Sin embargo, los Médicos tratantes que nos enfrentamos con este tipo de accidentes, procedentes de diferentes áreas endémicas del país, hemos encontrado diversos cuadros clínicos de naturaleza neurotóxica de magnitud y cinética exclusivas de cada especie. Tal variabilidad demanda diferentes medidas terapéuticas que van a depender además, del tiempo que transcurra entre el accidente escorpiónico y la aplicación del antiveneno más aun si hay accidentes de tipo ofídico.

Según lo antes mencionado surge la necesidad de crear una antivenina polivalente útil contra varias especies, convirtiéndose en el sueño de la ciencia médica, y hasta que llegue se estará investigando sobre la reactividad cruzada entre dos animales con veneno de tanta importancia epidemiológica en el país, el escorpión y la serpiente. La producción y purificación de anticuerpos de huevos de gallinas (IgY) es una tecnología cuyo atractivo ha ido en aumento en la comunidad científica y ha demostrado múltiples ventajas en cuanto a su rendimiento, menor costo de producción, ausencia de reacción cruzada con anticuerpos provenientes de mamíferos y sobre todo debido a la distancia filogenética que existe entre aves y mamíferos, se aumenta la probabilidad de que ocurra un mayor reconocimiento hacia secuencias

altamente conservadas (Schade *et al.*, 2005). Adicionalmente, con su utilización se cumple con las tres erres (Rs) de Russel, en cuanto al uso de animales de experimentación (refinamiento, reemplazo y reducción).

**De la viabilidad de los huevos a través del tiempo y con condiciones establecidas de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*.**

Al someter los huevos a temperaturas cálidas, humedad o ambas, es posible la contaminación bacteriana, estas proliferan en su interior y dan lugar a la formación de subproductos que hacen que el huevo sufra procesos de descomposición. Estas condiciones dan como resultado coloraciones y aparición de olores que son característicos de pudrición. (Cozano, 2003).

Una simple inspección de los huevos de la muestra en cuanto a sus características físicas y morfológicas, permitió dividirlos en grupos importantes donde la clave principal era la purificación errática que se obtenía, coincidiendo con otros aspectos resaltantes.

Para determinar el grado de frescura, las pruebas químicas, entre las que destaca la determinación del ácido fosfórico libre de la clara, entre mayor sea la cantidad de este (expresado en mg/Kg), mayor será la edad del huevo. Es importante tomar en cuenta también, que cuanto más viejo es el huevo, forma una mayor cantidad de amoníaco. Al envejecer un huevo, la yema se “rancia”, en estos casos, la determinación de los aminoácidos (lisina) se produce cuando el huevo envejece, puesto que en los huevos que son frescos, esta no está presente; igual sucede con la histidina y arginina, la cual está presente como pequeños residuos en el huevo fresco (Cozano, 2003).

El método de purificación de PEG-6000 con modificaciones de Zerpa *et al*, 2006, permite separar las proteínas de la yema del huevo de los lípidos, a través de una mezcla de ácido polietilenglicólico en tres concentraciones distintas. En condiciones normales, huevos frescos, el procedimiento luego de los centrifugados a 4000rpm permite una separación precisa lipídica de las proteínas desde la primera concentración al 17% del PEG. El proceso de purificación se realizó desde los huevos más nuevos hasta los más, para comprobar su variabilidad según características físicas, morfológicas y de reactividad. El punto corte de fechas para la división de los huevos según su viabilidad se estableció debido a las diferentes características distintivas donde la separación de la capa lipídica resultó la más significativa.

Los huevos desde el tres de Agosto al once de Junio según muestra, no presentaron modificación alguna en cuanto al protocolo de inmunización; los del diez de Junio al veintisiete de Marzo necesitaron un segundo centrifugado en la dilución con polietilenglicol al 34,5% y los restantes necesitaron tres o más centrifugados para su purificación, quedando incluso restos lipídicos macroscópicos. El no empleo de Cloroformo utilizado por Polson en 1990, por dificultad para obtención de dicho reactivo, permitió establecer esta diferencia. El cloroformo hubiese permitido una mejor precipitación y separación proteica y en los HnOP, la separación más fidedigna no habría permitido la clasificación empleada para este fin en esta investigación.

Todos los huevos fueron sometidos a una temperatura ambiente que oscilaba entre 16 a 40°C desde la fecha de su postura hasta la fecha de su purificación, en un ambiente húmedo, protegido de la luz solar y el viento, almacenados en dispositivos porta huevos de cartón.

Respecto a la forma y tamaño de los huevos, hay diferencias en el aspecto del mismo, que se pueden apreciar en la cáscara. Algunos presentan una forma muy redondeada, otros tienen variadas formas esféricas (Cozano, 2003).

También existe una gran variación en el tamaño de los mismos y, naturalmente, su color, especialmente en los huevos de color de las razas pesadas. Hay factores definidos que influyen en la forma, tamaño y textura general; se ha descubierto que el calor extremado tiende a disminuir el tamaño del huevo; posiblemente esté influido en este caso, diferencias en el apetito y cantidad de consumo de alimento, tengan relación. Sin embargo, el factor más importante, por supuesto, lo es la herencia (Cozano, 2003).

Los HOP, tomados como huevos frescos, y modelos para la comparación de tamaño, forma y color de los otros presentaron en sus pares respectivos, entendiéndose, los de la misma gallina, características muy similares que permitían diferenciar por ejemplo los huevos de la gallina A1, con los de la A2, apoyando la transmisión fenotípica. La mayoría de los HnOP presentaban características similares entre ellos, inclusive los de la gallina A con la C lo que se corroboró al ver pérdida de la cámara de aire y petrificación de la yema en los mismos, con aparición de manchas negras en mucha de las cáscaras.

En cuanto al color del huevo, el color moreno o pardo parece estar regulado principalmente por procesos hereditarios. Los piensos con determinadas materias darán cierta variedad de color artificial y más brillantez a la cáscara del huevo (Cozano, 2003).

Adicionalmente, una característica física resaltante fue el aroma que expelía el huevo íntegro o con la cáscara rota. El huevo debe ser conservado a 4° centígrados para ralentizar las reacciones enzimáticas liberarían lisina e histidina, así como

posteriormente amoníaco. En los HOP el aroma fue *suigéneris* en ambos casos; en los HDP el aroma con cáscara integra asemejaba a los anteriores, pero al abrir el cascaron el aroma a amoníaco fluyó, evidenciando una reacción enzimática que fue más lenta de lo que se esperaba durando aproximadamente tres meses en comparación con las cuatro semanas que dice Cozano (2003) que durarían frescos según las exposiciones ambientales a las que fueron expuestos.

En general, todas las alteraciones de orden enzimático se van desarrollando e intensificando conforme envejece el huevo; una forma de contener este, pero no paralizarlo es, cuando se refrigera a temperaturas menores a 8 grados centígrados (Cozano, 2003).

Para la determinación de la calidad interior, es necesario recurrir a pasos distintos, tomando en cuenta, por separado, los distintos factores de calidad, siendo así examinar: cáscara, cámara de aire, estado de la yema y estado de la clara. Los huevos que se reciban en cajas o contenedores con olor extraño, no deberán clasificarse, a menos que haya sido cuidadosamente comprobado en cuanto a su sabor. La temperatura ambiente recomendada para la observación debe estar comprendida entre 7 y 21 grados centígrados; es importante evitar observar huevos cuando en estos se encuentre condensada humedad sobre la cáscara (o huevo “sudado”), para evitar esto, se deben templar los huevos en un lugar con temperatura moderada (Cozano, 2003).

Siendo los huevos expuestos a temperaturas incluso de 37° C durante varios días y con ambiente húmedo fue favorable la duración de los mismos frescos e incluso los envejecidos.

La coagulación proteica también salió a relucir cuando los HnOP presentaron yemas pétreas en la mayoría de sus casos que no permitieron siquiera la primera dilución con PEG.

La frescura del huevo (HOP) como hipótesis inicial daría a relucir una mejor actividad de reconocimiento frente a un huevo envejecido (HDP, HnOP), dando así en la mayoría de los casos, pero claramente en la tabla 2.4.11 se puede observar que el huevo C, que contenía los tres antígenos utilizados dio una mejor reacción al ELISA en los HDPs frente a los HOPs, sobre todo en el caso de enfrentarlo contra el veneno completo de *T. caripitensis*. Según Álvarez (2011) en una investigación en el IDEA, encontró que los picos de producción de *T. caripitensis* se encontraban entre los días 51 y 87 posterior a la inmunización. El pico máximo encontrado para el HDP “C” contra *T. caripitensis* resultó el día 73 posterior al segundo refuerzo y de 6 días para el HOP “C” después del reto, con una diferencia de 14 y 81 días respectivamente al día 87 donde alrededor del cual debería estar el pico máximo. Pese a que los HDPs eran huevos envejecidos mostraron actividad; la cercanía del pico máximo del HDP respecto al HOP con sus respectivos refuerzos explicaría el por qué hay más actividad en el primero; no obstante esto no se observó gran diferencia contra los otros antígenos inoculados en la gallina C debido a que resultaron más inmunógenos y con un pico más próximo. Los picos de los huevos C para todos los antígenos resultaron más elevados que los picos de los otros huevos inmunizados por antígenos por separados. Las macromoléculas del antígeno de *B. atrox* actuarían como un potenciador del sistema inmune de la gallina permitiéndole una mayor producción de anticuerpos aviares que reconocen otros antígenos de otros venenos.

En la purificación de los HnOPs resultaron mezclas donde macroscópicamente se evidenciaban restos lipídicos por lo cual no se le aplicó el método de ELISA.

**De la demostración de la presencia en el suero proteico obtenido a partir de la yema de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox* la presencia de inmunoglobulinas aviares que lo reconocen y precipitan.**

El término inmunogenicidad se refiere a la capacidad que tienen ciertas moléculas de inducir la respuesta inmune adaptativa del hospedador (Mora y Colorado, 2003). La inmunogenicidad depende de múltiples factores los cuales incluyen el sistema inmune del hospedador, la tolerancia del mismo y los mecanismos de regulación celular, entre otros (Regenmortel *et al.*, 2001).

Para evaluar la inmunogenicidad de los venenos de *T. breweri*, *T. caripitensis* y *B. atrox* se utilizó el método de ELISA para enfrentar cada suero proteico purificado contra su antígeno de inoculación y los otros dos utilizados; se enfrentó anticuerpo contra *T. caripitensis* y *T. breweri* (huevos A1 y A2) a dichos venenos crudos pero también a *B. atrox*. De igual forma los anticuerpos contra *B. atrox* (gallinas B1 y B2) se enfrentaron contra todos los venenos; y por último en la gallina inmunizada contra todos los venenos, sus inmunoglobulinas de la yema fueron enfrentadas contra todos por separado. En general, se puede decir que el veneno crudo de todos fue inmunogénico, para las gallinas A1, A2, B1, B2 y C, ya que se produjeron anticuerpos IgY específicos anti veneno crudo de *T. breweri*, *T. caripitensis* y *B. atrox*. Sin embargo hay características particulares para cada gallina en cuanto al tiempo de aparición de la respuesta, siendo para las gallinas A1, A2 y C el día 6 y para las B1 y B2 el día 5 posterior al reto, lo que coincide con lo reportado por Schade *et al.* (2005). También se aprecia un aumento significativo en la respuesta inmune comparada con el segundo refuerzo, donde es a partir de la última dosis (4<sup>a</sup> dosis) cuando se evidencia una mayor respuesta de los anticuerpos IgYs. A partir de

ese momento, se observan diferentes comportamientos dependiendo del animal, pero con una tendencia hacia el establecimiento de una meseta, alrededor de pre - reto.

Este comportamiento ya ha sido reportado e inclusive se indica que las gallinas pueden seguir produciendo anticuerpos específicos durante más de 200 días (Horton *et al.*, 1984). En este estudio se observó un repunte en la producción de anticuerpos luego de cada dosis para cada ave, lo cual es consistente con lo reportado sobre comportamiento de la respuesta inmune adaptativa (Schade *et al.*, 2005).

Las diferencias en la respuesta entre las gallinas pueden ser explicadas por la variación genética natural, evidenciada por otros autores (Paul *et al.*, 2007; Romito *et al.*, 2001; Maya *et al.*, 2002). Aunque no hay reportes acerca de la producción de IgY contra veneno de escorpión, si podemos mencionar un trabajo contra otro género de *Bothrops*, el trabajo realizado por Araujo *et al.* (2010) quienes evaluaron la cinética de anticuerpos IgY contra el veneno de la serpiente *Bothrops jararaca*, y observaron que a partir de la semana cinco, se obtuvieron los mayores títulos de anticuerpos. Almeida *et al.*, 1998 y Paul *et al.*, en 2007, obtuvieron resultados similares empleando también venenos de serpientes y esquemas de inmunización distintos.

Las figuras 2.4.8, 2.4.9 y 2.4.10 muestran la reactividad cruzada de las gallinas A1, A2, B1 y B2 contra venenos de *T. breweri*, *T. caripitensis* y *B. atrox*; donde por ELISA no se encontró una respuesta significativa, a excepción de la figura 2.4.8 donde las inmunoglobulinas aviares contra *B. atrox* reconocen al veneno crudo de *T. caripitensis*, de una forma parcial; este método no es especialmente sensible para determinar reactividad cruzada, más adelante se menciona al MABA como método de determinación en dicho campo.

### **Caracterización de anticuerpos IgY anti- *T. caripitensis*, *T. breweri* y *B. atrox*.**

Para la caracterización de los anticuerpos IgYs se determinó, en primer lugar, la concentración de proteínas promedio obtenida por yema de huevo (IgY), las cuales se encontraron en un rango entre 4,17-9,78 mg/mL por el método Microbradford. En la literatura se reporta que la concentración promedio de estas inmunoglobulinas puede variar entre 50 y 100 mg de IgY por yema (equivalente a 3 mg/mL y 6 mg/mL) y que la cantidad de anticuerpos específicos puede variar entre el 2 y el 10% del total (Thalley y Carrol, 1990; Akita y *et al.*, 1998; Carlender, 2002 y Narat, 2003). Sin embargo, otros autores han llegado a reportar que la concentración promedio de las IgY en las yemas de huevo puede variar entre 10 y 20 mg/mL (Chacana *et al.*, 2004). Parrilla-Álvarez *et al.* (2006) obtuvieron resultados similares utilizando anticuerpos IgY contra el veneno de escolopendra. Hay que resaltar que los valores analizados son solo un estimado de las proteínas totales donde se incluyen las IgYs específicas y no específicas.

Los anticuerpos son capaces de reconocer de forma específica una amplia variedad de antígenos con diferentes afinidades. Dicha afinidad junto con la avidéz, se relaciona íntimamente con la sensibilidad, la cual es un parámetro cuantificable experimentalmente en términos de título de anticuerpos. La afinidad es la concentración del antígeno que se necesita para ocupar los sitios de unión de la mitad de las moléculas de los anticuerpos presentes en una solución de anticuerpos, por su parte la avidéz es la sumatoria global de las afinidades de varios anticuerpos (bivalentes, multivalentes y de diferentes isotipos) fijados a todos los lugares a todos los epítomos disponibles, tomando en consideración aspectos conformacionales y de valencia del anticuerpo (Golsdy y Kuby, 2004; Abbas y Lichtman, 2001; Paavilainen, 2009). Las interacciones antígeno-anticuerpos traen como resultado la formación de inmunocomplejos, y su efectividad depende, en parte, de las concentraciones

adecuadas (zona de equivalencia) de ambos agentes, en caso contrario existe la posibilidad de alteraciones en el reconocimiento.

**De la capacidad de las inmunoglobulinas aviares obtenidas a partir de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox* para reconocer cruzadamente diferentes antígenos.**

Un punto importante en cuanto a la actividad de las IgY lo constituye la especificidad de las mismas. Para evaluar este parámetro se realizó a través del ensayo inmunológico de MABA, el cual permite evaluar el reconocimiento simultáneo frente a diferentes antígenos. Los anticuerpos son capaces de reconocer de forma específica una amplia variedad de antígenos con diferentes afinidades. Todas las características relacionadas con el reconocimiento antigénico refleja la propiedad de las regiones variables del anticuerpo, estos pueden ser considerablemente específicos respecto a los antígenos al distinguir pequeñas diferencias en la estructura química (Abbas y Lichtman, 2001).

Las inmunoglobulinas purificadas sometidas a MABA (Multiple Antigen Blot Assay) presentaron reactividad específica para reconocer los antígenos a los cuales fueron enfrentadas, tal como está establecido en estudios que han precedido esta investigación (Noya y Alarcón, 1997). Adicionalmente los anticuerpos, además de reconocer a cada antígeno con los cuales fueron inmunizados, también presentaron una reactividad cruzada con venenos de otras especies del género *Tityus* y *Bothrops* y el género *Crótalus*.

El comportamiento mostrado por los anticuerpos IgY dirigidos contra el veneno completo de *Bothrops atrox*, demuestran una alta especificidad contra su antígeno (veneno *B. atrox*), de igual manera este reconocimiento se extiende a otro

género de ofidios como es el caso de *Crótalus* y además frente al veneno de distintas especies de escorpiones pertenecientes al género *Tityus* (*T. caripitensis*, *T. breweri* y *T. quirogae*).

La reactividad cruzada que presentaron las IgY dirigidas contra *Bothrops atrox* frente al veneno de *Crótalus* se explica en gran medida por el hecho que ambos géneros pertenecen a la familia *Viperidae* y las diferencias filogenéticas no son tan significativas entre un género y otro; además que ambos venenos comparten características toxicológicas similares en lo referente a la actividad de algunas toxinas particulares (Jiménez-Porras, 1970) sin embargo desde el punto de vista filogenético las inmunoglobulinas dirigidas contra el veneno de *Tityus* no muestran esta misma versatilidad al momento de reconocer antígenos correspondientes al grupo de los ofidios entre ellos *Bothrops* y *Crótalus*, ya que desde el punto de vista evolutivo ambos grupos están muy alejados entre sí; además las distintas fracciones del veneno de *Tityus* poseen un menor peso molecular en comparación con las del veneno de *Bothrops* lo que implicaría una mayor respuesta inmunogénica por parte de las aves, lo cual se traduciría en la producción de inmunoglobulinas con una capacidad de reconocimiento más versátil (Francischetti *et al.*, 2000).

**De la determinación de la pureza de proteínas obtenidas a partir de la yema de huevos de gallinas ponedoras Isa Brown inmunizadas con veneno de *Tityus caripitensis*, *Tityus breweri* y *Bothrops atrox*.**

La preparación purificada de inmunoglobulinas sometida a electroforesis de proteínas en SDS-PAGE bajo condiciones no reducidas, mostró una banda muy fuerte y ancha alrededor de los 38.000 Daltons probablemente correspondiente a la cadena pesada de la IgY nativa (Polson y von Wechmar, 1980; Hatta *et al.*, 1993) además se observaron dos bandas débiles de 24 y 12 kD respectivamente. La primera banda (38.000 D) debe representar a la cadena pesada de la IgY y la segunda banda (24.000 Y 12.000 D) corresponderían a las cadenas livianas, tal y como ha sido informado por

otros autores la cadena pesada está alrededor de 60.000 a 70.000 Daltons, mientras que la liviana aparece de los 20.000 a 30.000 Daltons (Camenish *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 1988; Song *et al.*, 1985; Contreras *et al.*, 2005; Hatta, 1990). En la presente investigación al realizar la corrida electroforética se estableció la comparación de las bandas de IgY con un patrón de peso molecular de bajo rango, por lo cual puede observarse discrepancia entre los pesos moleculares de las cadenas pesadas, ya que el valor máximo del patrón utilizado es hasta los 40.000D aproximadamente, pero se puede evidenciar coincidencia entre los pesos moleculares de las cadenas livianas con el patrón de acuerdo a lo establecido por la literatura.

Este trabajo representa la primera investigación a nivel mundial que relaciona la actividad cruzada de dos especies filogenéticamente distintas, a la familia *Buthidae* con la familia *Viperidae* en el uso de la tecnología IgY como tratamiento para estos envenenamientos.

## CONCLUSIONES

Se logró la producción de inmunoglobulinas aviares a partir de venenos de *T. caripitensis*, *T. breweri* y *B. atrox*.

Las inmunoglobulinas aviares purificadas resultaron en concentraciones dentro del rango esperado según investigaciones anteriores.

Todas las inmunoglobulinas aviares reconocieron a los antígenos que indujeron su producción.

La reactividad de los anticuerpos IgY contra los venenos completos de *T. caripitensis*, *T. breweri*, *T. quirogae* y *C. durissus* fue satisfactoria resultando de una alta sensibilidad y especificidad.

Existe reactividad cruzada importante entre las inmunoglobulinas aviares del veneno crudo de *B. atrox* y el veneno crudo de *T. caripitensis*, *T. breweri*, *T. quirogae* y *C. durissus*.

Las inmunoglobulinas aviares polivalentes contra el veneno crudo de *T. caripitensis*, *T. breweri*, muestran una excelente reactividad cruzada contra el veneno crudo de *T. quirogae* y *B. atrox*.

Las inmunoglobulinas aviares polivalentes contra el veneno crudo de *T. caripitensis*, *T. breweri* y *B. atrox* muestran reactividad cruzada contra el veneno crudo de *T. quirogae* y *C. durissus* pero con menor intensidad respecto a las anteriores.

La viabilidad de los huevos se ve afectada por la temperatura y la humedad. A temperatura ambiente de 26°C en promedio pueden mantenerse frescos durante tres meses, sin embargo la viabilidad de las inmunoglobulinas aviares va aún más allá, pudiendo ser purificables en huevos envejecidos y preservados a dicha temperatura hasta por 6 meses mostrando una actividad variable frente a sus antígenos.

El pico de mayor producción de anticuerpos para las gallinas inmunizadas con el veneno crudo de *T. caripitensis*, *T. breweri* y el veneno crudo mezclado de *T. caripitensis*, *T. breweri* y *B. atrox*, correspondió al día 6 posterior al reto.

El pico de mayor producción de anticuerpos para las gallinas inmunizadas con el veneno crudo de *T. breweri*, correspondió al día 5 posterior al reto.

## RECOMENDACIONES

Tomando en cuenta las múltiples ventajas del uso de la tecnología IgY para ser utilizada como terapéutica eficaz contra el envenenamiento por ofidios y escorpiones en humanos y resaltando la existencia de reactividad cruzada de dichas inmunoglobulinas para reconocer simultáneamente antígenos de los géneros *Bothrops* y *Tityus*, hace pertinente y necesario la realización de estudios más exhaustivos, con el fin de obtener sueros aviares inmunes polivalentes.

En cuanto al proceso de conservación de los huevos es aconsejable almacenarlos desde su postura a los 4°C, con el fin de preservar una mayor viabilidad en el tiempo y una mejor actividad de las IgY.

Para la determinación de la pureza de las IgY, mediante el método de electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida es preferible utilizar un marcador de peso molecular de alto rango que se ajuste al peso molecular estándar de las distintas fracciones ambas cadenas de la IgY, según lo expuesto en la literatura.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A., Lichtman, A., Jordan, S. 2001. "Inmunología celular y molecular". Mc Graw Hill. Edición X. **3**: 43.
- Ajenjo, C. 1980. Enciclopedia de la inspección veterinaria y análisis de los alimentos. España, Espasa-Calpe. p. 965 – 990.
- Akita, M., Li-Chan, C., Nakai, S. 1998. Neutralization of enterotoxogenic *Escherichia coli* heat-labile toxin by chicken egg yolk immunoglobulin Y and its antigen-binding fragments. *Food and agricultural immunology*. **10**:161-172.
- Alarcón, C., Hurtado, H. 2000. Anticuerpos aviares: Alternativa en producción y diagnóstico. *Biomedica*. **20**:338-43.
- Almeida, C.M., Kanashiro, M.M., Rangel, F.B., Mata, M.F., Kipnis, T., Dias da Silva, W. 1998. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. *Vet. Rec.* **143**: 579–584.
- Almeida, C., Da Silva, C. L., Couto, H. P., Mothé, R. C., Da Rocha, D. G., Sentinelli, L. ,*et al.* 2005. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. *Toxicon*.**52**: 293-301.
- Anderson, B.D., Shultz, J.W., Jayne, B.C. 1995. Axial kinematics and muscle activity during terrestrial locomotion of the centipede *Scolopendra heros*. *Exp. Biol.* **198**: 1185-1195.

- Arellano-Parra, M.A. 1981. Escorpionismo en Venezuela. Rev. Soc. Med. Quirúrg. Hosp. Emergencia. **45**: 63-73.
- Bade, H., Stegemann, H. 1984. Rapid method of extraction of antibodies from egg yolk. J. Immunol. Meth. **72**: 421-426.
- Bauwens, R.M., Kint, J.A., Devos, M.P., Van Brussel, K.A., D Lenher, A.P. 1987. Production, purification and characterization of antibodies to 1,25dihydroxyvitamin D raised in chicken egg yolk. Clin.Chim.Acta. **170**: 37-44.
- Benson, H.M., Brumfield, H.P., Pomeroy, B.S. 1961. Requirement of avian CO for fixation of guinea pig complement by avian antibody antigen complexes. J. Immunol. **25** (1): 53-82.
- Borges, A., De Sousa, L. 2006. Escorpionismo en Venezuela: Una aproximación molecular, inmunológica y epidemiológica para su estudio. Rev. Fac. Farmacia **1** (69): 15-27.
- Borges, A., De Sousa, L., Espinoza, J., Santos, R. G., Kalapothakis, E., Valadares, D., *et al.* 2008. Characterization of *Tityus* scorpion venoms using synaptosome binding assays and reactivity towards Venezuelan and Brazilian antivenoms. Toxicon **51** (1): 66-79.
- Brunda, G., Sashidhar, R., Sarin, R. 2006. Uses of egg yolk antibody (IgY) as an immunoanalytical tool in the detection of Indian cobra (*Naja naja naja*) venom in biological samples of forensic origin. Toxicon. **48**: 183-194.

- Camenisch, G., Tini, M., Chilov, D., Kvietikova, I., Srinivas, V., Caro, J., Spielmann, P., Wenger, R.H., Gassmann, M. 1999. General applicability of chicken egg yolk antibodies the performance of IgYimmunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 alfa. *FASEB J.* **13**:81-88.
- Campbell, J., y Lamar, W. 2004. The venomous reptiles of de western hemisphere. 2° ed. Ithaca, New York: CornellUniversity Press. **116**: 80-82.
- Carlender, D. 2002. Avian IgY antibody. Comp. Summ. Uppsala. Disert. Fac. Med. 1119.53pp. ISBN.91-5545227-2.
- Chacana, P., Terzolo, H., Calzado, E., Schade, R. 2004. Tecnología IgY, aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina: biología, propiedades y su aplicación en medicina y veterinaria. *Rev. Med. Vet.* **85** (5): 179-189.
- Chippaux, J.P., Goyffon, M. 2008. Epidemiology of scorpionism: A global appraisal. *Acta Tropica.* **107**: 71-79.
- Contreras, V.T., De Lima, A.R., Navarro, M.C., Arteaga, R.Y., Graterol, D., Cabello, L. *et al.* 2005. Producción y purificación de anticuerpos IgY a partir de gallinas inmunizadas con epimastigotas de *Trypanosomacruzi*. *Rev. Fac. Cien. Salud. UC.* **9** (2): 21-27.
- Cozano, L. 2003. Evaluación sanitaria (físico, químico, bacteriológico) del huevo de gallina de traspatio, en expendios del mercado de la terminal, zona 4 de la ciudad de Guatemala. [En línea] Disponible en: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10\\_0929.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10_0929.pdf).

- Dávalos, L., Ortega, J.L., Bastos, D., Hidalgo, R. 2000. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. *Biomater. Sci. Polym.* **11**: 657-673.
- Devaux, C., Fourquet, P., Granier, C. 1996. A conserved sequence region of scorpion toxins rendered immunogenic induces broadly cross-reactive, neutralizing antibodies. *Eur. J. Biochem.* **242**: 727-735.
- De Lima, M.E., Martin-Eauclaire, M.F., Chavez-Olortegui, C., Diniz, C.R., Granier, C. 1993. *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins display a complex pattern of antigenic reactivity. *Toxicon.* **31**: 223-227.
- De Sousa, J. 2009. Caracterización epidemiológica de los envenenamientos ofídicos y escorpiónicos en Venezuela, con taxonomía de las especies asociadas y bancos de venenos *proyecto 2007000672*: Producción de antivenenos informe técnico primera etapa, subproyecto 3.
- De Sousa, L., Boadas, J., Kiriakos, D., Borges, A., Boadas, J., Marcano, *et al.* 2007. Scorpionism due to *Tityus neoespartanus* (Scorpiones, *Buthidae*) in Margarita Island, Northeastern Venezuela. *Rev. Soc. Bra. Med. Trop.* **40** (6):681-685.
- De Sousa, L., Parrilla-Álvarez, P., Quiroga, M. 2000. An epidemiological review of scorpion stings in Venezuela. The northeastern region. *J. of Venomous Animals Toxins.* **6**: 127-165.
- De Sousa, L., Vásquez, D., Salazar, D., Valecillos, R., Vásquez, D., Rojas, M, *et al.* 2005. Mortalidad en humanos por envenenamientos causados por invertebrados y vertebrados en el estado Monagas, Venezuela. *Inves. Clín.* **46** (3): 241-254.

- Escamilla, L. 1971. Manual práctico de avicultura moderna. México, Continental. p. 230-239
- Francischetti, I., Gombarovits, J., Valenzuela, C., Carlini, A., Guimaraes, J. 2000. Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Comp. Biochem. Physiol.* **127C**: 23-36.
- Gassmann, M., Thommes, P., Weiser, T., Hubscher, U. 1990. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB. J.* **4**:2528-2532.
- Gatica, R., Slebe, J.C., Ulloa, J., Yáñez, A.J. 2004. Comparación de dos vías de inoculación en la producción de anticuerpos contra fructosa 1,6 bifosfatasa en huevos de gallina. *Arch. Med. Vet.* **36** (1): 49-58.
- Golsdy, R., Kuby J. 2004. “Inmunología”. Edición V. Editorial McGraw-Hill. 81-82.
- González-Sponga, M.A. 1984. “Escorpiones de Venezuela”. Cuadernos Lagoven. Lagoven, S. A. Caracas – Venezuela. Pp. 234.
- Goodman, J., Tuddor, D. 1967. Industria avícola, explotación en grande y pequeña escala. México, Centro Regional de Ayuda Técnica. p. 247-258.
- Hadge, D., Ambrosius, H. 1984. Evolution of low molecular weight immunoglobulins- IV. IgY- like immunoglobulins of birds, reptiles and amphibians, precursors of mammalian IgA. *Mol. Immunol.* **21** (8): 699-707.
- Hatta, H., Kim, M., Yamamoto, T. 1990. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, IgY. *Agric. Biol. Chem.* **54** (10): 2531-5.

- Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M., Yamamoto, T. 1993. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosc.Biotech.Biochem.***57**: 450-454.
- Hirokoshi, T., Hiraoka, J., Saito, M. Hamada, S. 1993. IgG antibody from hen egg yolks: Purification by ethanol fractionation. *J. Food. Sci.***58** (4): 739-742
- Horie, K., Horie, N. Abdou, A.M., Yang, J.O., Yun, S.S., Chun, H.N., *et al.* 2004. Suppressive effect of functional drinking yogurt containin specific egg yolk immunoglobulin on *H. pylori* in humans. *J. Dairy Sci.* **87**: 4973-4979.
- Horton, J., Holden, C., Ward, P., MacDonald, D., Sanderson, A. 1984. Exploitation of phylogenetic distance in cell surface immune labeling: studies with Beta2-microglobulin. *J. Invest. Dermatol.***85**: 96-99.
- Jacoby, H.I., Moore, G., Wnorowsky, G. 2001. Inhibition of diarrhea by immune egg: a castor oil mouse model. *J. Nutraceut. Funct.Med. Foods.***3** (2):47-53.
- Jensenius, J.C., Andersen, I., Hau, J., Crone, M., Koch, C. 1981. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J. Immunol. Meth.***46**: 63-68.
- Jiménez-Porras, J.M. 1970. Biochemistry of snake venoms (a review). *Clin.Toxicol.***3**: 389-431.
- Karge, W.H., DeLuca, J.P., Marchitelli, L.J., Champagne, C., Tulley, R., Rood, J., *et al.* 1999. Pilot study on the effect of Hyperimmune egg protein on elevated cholesterol levels and cardiovascular risk factors. *J. Med. Food.* **2** (2): 51-63.

- Klemperer, F. 1893. Uebernatürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisirungstherapie. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. **31**: 356-382.
- Larsson, A., Wejaker, P.E., Forsberg, P.O., Lindahl, T. 1992. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. *J. Immunol. Meth.* **156**: 79-83.
- Lee, K.A., Chang, S.K., Lee, Y.J., Lee, J.H., Koo, N.S. 2002. Acid stability of anti *H. pylori* IgY in aqueous polyol solution. *J. Biochem. Mol. Biol.* **35**: 488-493.
- Leslie, G.G., Clem, L.W. 1969. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. *J. Exp. Med.* **130**: 1337-1352.
- Losch, U., Schraner, I., Wanke, R., Jurgens, L. 1986. The chicken egg, an antibody source. *J. Vet. Med. B.* **33**: 609-619.
- Makvandi, M., Fiuzy, R. 2002. Purification of Anti HbsAg from egg yolks of immunized hens and its application for detection of HBsAg. *Arch. Iranian. Med.* **5** (2);91-93.
- Maya, D., Vasantha, M., Vijayan, A., Umashankar, P., Krishnan, L. 2002. An improved method for isolation of anti-viper venom antibodies from chicken egg yolk. *J. Biochem. Biophys.* **51**: 129-138.
- Mayo, S., Carlsson, H., Zagon, A., Royo, F., Hau, J. 2009. Enhancement of anamnestic immunospecific antibody response in orally immunized chickens. *Journal of Immunological Methods*. **342** (1-2): 58-63.

- Mine, Y., Kovacs-Nolan, J. 2002. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *J. Med. Food.* **5**: 159-169.
- Mohammed, S.M., Morrison, S., Wims, L., Trinh, K.R., Wildeman, A.G., Bonselaar, J., Etches, R.J. 1998. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. *Immunotechnology.* **4**: 115-125.
- Montilla, J., Álvarez, M., Díaz, E., Villavicencio, J. 1999. Hiperinmunización de ovinos contra venenos de *Crotalus durissus cumanensis* del Estado Zulia Venezuela. *Rev. Cientif. FCV-LUZ.* **6**(5): 388-94.
- Mora, O., Colorado, J.A. 2003. Las inmunoglobulinas. Edición I. *Inmunología Actual.* Pp. 99-101.
- Moreno, C. 2009. Obtención, caracterización y uso de IgY contra péptidos de *Brucella* sp. para su detección en alimentos. [Trabajo de Grado] Caracas: Universidad Simón Bolívar. Pp. 113.
- Moreno, L., 2007. “Producción, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales (IgY) en gallinas contra péptidos sintéticos de la hormona Tirotrópina”. [Trabajo Especial de Grado]. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. 75-93. Multigrafo.
- Morrison, S.L., Mohammed, S.M., Wims, L.A., Trinh, R., Etches, R. 2001. Sequences in antibodies molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Mol. Immunol.* **38**:619-625.

- Mota, J., Sevick, C. 1999. Reseña del tratamiento del emponzoñamiento por escorpiones del genero *Tityus* en Venezuela. [En línea] Disponible: <http://cyberpediatria.com/escorpiones.pdf>[Noviembre. 2011].
- Narat, M. 2003. Production of Antibodies in Chickens. *Food Technol. Biotechnol.* **41**(3):259-267.
- Noya, O., Alarcón, B. The multiple antigen blot assay (MABA): a simple immunoenzymatic technique for simultaneous screening of multiple antigens. 1998. *Immunology.* **63**: 53-56.
- O' Farrelly, C., Branton, D., Wanke, C.A. 1992. Oral ingestion of egg yolk immunoglobulin from hens immunized with and enterotoxigenic *E. coli* Strain prevents diarrhea in rabbits challenged with the same strain. *Infect. Immun.* **60** (7):2593-2597.
- Parrilla-Álvarez, P. 2006. Producción de anticuerpos aviares IgY antiescolopendra en gallinas ponedoras. [Trabajo de Ascenso]. Ciudad Bolívar; Universidad de Oriente. Dpto. de Ciencias Fisiológicas. Pp 69.
- Patterson, R., Youngner, J.S., Weigle, W.O., Dixon, F.J. 1962. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *Journal of Immunol.* **89**: 272-278.
- Paavilainen, L., 2009. "Validation of antibody for protein profiling". [Tesis Doctoral] Facultad de Medicina Universidad. Uppsala. Pp. 85.
- Paul, K., Manjula, J., Deepa, E., Selvanayagam, E. Ganesh, K., Ubba, F. Rao, P. 2007. Anti- *Echiscarinatus* venom antibodies from chicken egg yolk: Isolation, purification and neutralization efficacy. *Toxicon.* **50** (7): 893-900.

- Pirela, R., López-Johnston, C., Hernández, J. 2006. Toxinological Characterization of the Whole Venom of the Rattlesnake *Crotalus durissus cumanensis* (Viperidae) from Porshoure, Venezuelan Guajira. *Rev. Científ. FCV-LUZ / XVI.3*: 232 – 238.
- Polson, A., Von Wechmar, M.B., Van Regenmortel, M.H. 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol Commun.* **9**: 475-493.
- Polson, A. 1990. Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. *Immunol Invest.* **19**: 253-258.
- Polson, A., von Wechmar, M. 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks if immunized hens. *Immunol. Comm.* **9(5)**:475-493.
- Quiroga, M. 1988. Descripción de una nueva especie de escorpión del género *Tityus* (Koch 1.936) *Tityus caripitensis spn.* Estudio histológico de la glándula del veneno. [Trabajo de ascenso] Ciudad Bolívar. Universidad de Oriente.
- Raj, G.D., Latha, B., Chandrasekhar, M.S., Thiagarajan, V. 2004. Production, characterization and application of monoclonal antibodies against chicken IgY. *Vet. Arhiv.* **74**: 189-199.
- Rangel, L.E., Peraza, M., Lassala, A., Zarco, L.A. 1999. Desarrollo de un método de radioinmunoanálisis para cortisol, utilizando anticuerpos obtenidos y purificados de la yema de huevos de gallinas inmunizadas. *Vet. Mex.* **30** (4):289-295.

- Regenmortel M, Rijke E, Spielmann H, Steinbusch H, Straughan D. 2001. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. The report and recommendation of ECVAM. ATLA 1997; **24**:925-934.
- Romito, M., Viljoen, J., Du Plessis, H. 2001. "Eliciting Antigen-Specific Egg-Yolk IgY with Naked DNA". *Biotechniques*. **31**: 670-675.
- Rose, M.E., Orland, E., Buttress, N. 1974. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur. J. Immunol.* **4**: 521-523.
- Schade, R., Gutiérrez, E., Sarmiento, R., Chacana, P., Porankiewicz-Asplund, J., Terzolo, H. 2005. Chicken egg yolk antibodies (IgY – technology): A review of progress in production and use in research an human and veterinary medicine. *Atla* **33**: 1-26.
- Shimizu, M., Fitzsimmons, R., Nakai, S. 1988. Anti-E.coli immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J. Food. Sci.* **53**:1360-1366.
- Shimizu, M., Nagashima, H., Sano, K., Hashimoto, K., Ozeki, M., Tsuda, K., Hatta, H. 1992. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosc. Biotech. Biochem.* **56**: 270-274.
- Shin, J.H., Yang, M., Woo, N., Kim, J.T., Myung, N.H., Bang., W.G., *et al.*, 2002. Use of egg yolk derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *H. pylori* infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9** (5): 1061-1066.

- Song, C.S., Yu, J.H., Bi, D.H., Hester, P., Kim, K.H. 1985. Antibodies to the alpha subunit of insulin receptor from eggs of immunized hens. *J. Immunol.* **135**: 3354-9.
- Thalley, B., Carroll, B. 1990. Rattlesnake and scorpion antivenoms from the egg yolk of hens. *Nature biotechnology.* **8** (10): 934-938.
- Tizard, I. 1992. "The phylogeny of the immune system. In: *Veterinary immunology an introduction*". W.B. Saunders Company, Pennsylvania. 465-466.
- Vejaratpimol, R., Channuntapipat, Ch., Pewnim, T., Ito, K., Lizuka, M., Minamiura, N. 1999. Detection and serological relationships of *Cymbidium mosaic potexvirus* isolates. *J. Biosci. Bioeng.* **87** (2):161-168.
- Warr, G.W., Magor, K.E., Higgins, D.A. 1995. IgY: Clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today.* **16**: 392-398.
- Woolley, J.A., Landon, J. 1995. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. *J. Immunol. Meth.* **178**:253-265.
- Zerpa, N., Wide, A., Noda, J., Bermúdez, H., Pabón, R., Noya, O. 2006. "Immunogenicity of synthetic peptides derived from *Plasmodium falciparum* proteins". *Experimental Parasitology.* **113**: 227-234.

## **ANEXOS**

**Figura 1. Diagrama del ensayo de MABA:**

Venenos	PRE	Cs	Post 51 (IgY)		PRE	Cs	Post IgG	Post IgG*
<i>T. caripitensis</i>								
<i>T. breweri</i>								
<i>B. atrox</i>								
<i>T. quirogae</i>								
<i>T. colombiens</i>								

**Soluciones para la electroforesis:**

1. Acrilamida-Bisacrilamida (30%): Almacenar a 4°C en frascos ámbar  
 Acrilamida = 29,2gr  
 Bisacrilamida = 0,8gr  
 H<sub>2</sub>O = csp 100mL
2. Buffer Tris 1,5M (pH 8,8): Ajustar pH com HCl, Almacenar a 4°C  
 Trizma base = 19,4gr  
 H<sub>2</sub>O = csp 100 mL
3. Solución colorante de azul de Coomasie:  
 Azul de Coomasie = 0,25gr  
 Isopropanol = 225mL  
 Ácido acético = 46mL  
 H<sub>2</sub>O = csp 500 mL

4. Buffer Tris (pH 6,8): Ajustar pH con HCl, Almacenar a 4°C

Tris base = 3gr

H<sub>2</sub>O = csp 100 ml

5. APS (10%): refrigerar en pequeñas alícuotas

APS = 2gr

H<sub>2</sub>O = csp 20mL

Loading Buffer (LB) 4X: Conservar refrigerado en alícuotas de 95 µl

Tris HCl (0,5M pH 6,8) = 0,8mL

Azul de bromofenol = 0,2mL

Glicerol = 0,8mL

SDS (10%) = 1,6mL

H<sub>2</sub>O = 4mL

β – mercaptoetanol= 5µL para 95 µL de LB (Añadir AL momento de usar)

6. Laemmli buffer 5X:

Tris Base = 15,1 gr

Glicina = 72 gr

H<sub>2</sub>O = csp 1 L

SDS 10% = Se añade al momento de correr el gel 1,5mL por cada 150mL de buffer

Laemmli

**METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:**

<b>TÍTULO</b>	<b>ACTIVIDAD DE ANTICUERPOS POLICLONALES IgY A PARTIR DE GALLINAS INMUNIZADAS DIRIGIDOS CONTRA EL VENENO DE <i>Tityus caripitensis</i>, <i>Tityus breweri</i> y <i>Bothrops atrox</i></b>
<b>SUBTÍTULO</b>	

**AUTOR (ES):**

<b>APELLIDOS Y NOMBRES</b>	<b>CÓDIGO CVLAC / E MAIL</b>
<b>HernándezB., EnricoA.</b>	<b>CVLAC: 18.476. 565 E MAIL: enricohernandez@hotmail.com</b>
<b>IzaguirreG., Edenys L.</b>	<b>CVLAC: 18. 477. 346 E MAIL: edenysizaguirre@hotmail.com</b>
	<b>CVLAC: E MAIL:</b>
	<b>CVLAC: E MAIL:</b>

**PALÁBRAS O FRASES CLAVES:**

IgY

Reactividad cruzada

MABA

*T.caripitensis*, *T. breweri*, *B. atrox*.

## METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

ÀREA	SUBÀREA
Departamento de Ciencias Fisiológicas	Laboratorio de Alacranología

### RESUMEN (ABSTRACT):

El uso de anticuerpos para investigación y diagnóstico se realiza desde hace varias décadas en todo el mundo y en los últimos años se han utilizado cada vez con mayor frecuencia anticuerpos purificados a partir de gallinas inmunizadas. Actualmente existen numerosas publicaciones que avalan su efectividad. Hasta ahora, en Venezuela, no se han obtenido IgYs de gallinas inmunizadas simultáneamente con veneno de escorpiones y ofidios, y mucho menos usando venenos de animales del oriente-sur del país. **Métodos:** Se realizó un estudio observacional descriptivo, experimental, evaluativo. Con una muestra de 105 huevos de un universo de 1278 huevos de 5 gallinas inmunizadas en 4 fases, durante 10 meses con el veneno completo de *T. caripitensis*, *T. breweri* y *B. atrox*; donde el primer grupo fue inmunizado solo con el veneno completo de los escorpiones (A1 y A2), el segundo con el veneno de ofidio (B1 y B2) y la quinta gallina (C) con una mezcla de los tres. Se utilizaron los métodos de purificación del PEG-6000, el método de Elisa indirecto, Electroforesis, Multiple Antigen Blot Assay (MABA) y el Microbradford. **Resultados:** La producción de IgY arrojó lecturas de absorbancia a 540µm en el espectrofotómetro que oscilaban entre 0,120 hasta 1,235, reconociendo los antígenos que indujeron su producción e incluso a otros de distinta especie; el día pico de producción de inmunoglobulinas para los huevos A1, A2 y C fue el sexto posterior a la cuarta inmunización (reto), mientras que para los huevos B1 y B2 fue el día 6 del mismo período, obteniéndose una concentración de proteínas mínima fue de 4,71mg/dl y la máxima 9,78mg/dl, ajustándose a los rangos expuestos por otros autores. La capacidad de reconocimiento de las inmunoglobulinas evidenciada por MABA ante antígenos distintos fue exitosa. **Conclusiones:** Se logró la producción de inmunoglobulinas aviares a partir de venenos de *T. caripitensis*, *T. breweri* y *B. atrox*. Existe reactividad cruzada importante entre las inmunoglobulinas aviares del veneno crudo de *B. atrox* y el veneno crudo de *T. caripitensis*, *T. breweri*, *T. quirogae* y *C. durissus*. Este trabajo representa la primera investigación a nivel mundial que relaciona la actividad cruzada de dos especies filogenéticamente distintas, a la familia *Buthidae* con la familia *Viperidae* en el uso de la tecnología IgY como tratamiento para estos envenenamientos.

**METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:**

**CONTRIBUIDORES:**

APELLIDOS Y NOMBRES	ROL / CÓDIGO CVLAC / E_MAIL				
	ROL	CA	AS	TU <sub>X</sub>	JU
Parrilla, Pedro	CVLAC:	4.771.295			
	E_MAIL	pparilla@gmail.com			
	E_MAIL				
	E_MAIL				
Gonsálvez, Marisa	ROL	CA	AS	TU	JU <sub>X</sub>
	CVLAC:	4.986.528			
	E_MAIL	marisaudo@hotmail.com			
	E_MAIL				
Quiroga, Mercedes	ROL	CA	AS	TU	JU <sub>X</sub>
	CVLAC:	728.867			
	E_MAIL				
	E_MAIL				
	ROL	CA	AS	TU	JU
	CVLAC:				
	E_MAIL				
	E_MAIL				
	ROL	CA	AS	TU	JU
	CVLAC:				
	E_MAIL				
	E_MAIL				

**FECHA DE DISCUSIÓN Y APROBACIÓN:**

2012	02	27
AÑO	MES	DÍA

LENGUAJE. SPA

**METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:**

**ARCHIVO (S):**

<b>NOMBRE DE ARCHIVO</b>	<b>TIPO MIME</b>
Tesis.actividadanticuerpopoliclnalesIgY.doc	. MS.word

**ALCANCE**

**ESPACIAL:** Departamento de Ciencias Fisiológicas, laboratorio de alacranología, Escuela de Ciencias de la Salud “Dr. Francisco Battistini Casalta”, Cd. Bolívar- Estado Bolívar.

**TEMPORAL:** 10 años

**TÍTULO O GRADO ASOCIADO CON EL TRABAJO:**

Médico Cirujano

**NIVEL ASOCIADO CON EL TRABAJO:**

Pregrado

**ÁREA DE ESTUDIO:**

Departamento de Ciencias Fisiológicas

**INSTITUCIÓN:**

Universidad de Oriente

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CU N° 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano  
**Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ**  
Vicerrector Académico  
Universidad de Oriente  
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda "SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009".

Leído el oficio SIBI - 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR <i>[Signature]</i>
FECHA <u>5/8/09</u> HORA <u>5:20</u>

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

*[Signature]*  
**JUAN A. BOLAÑOS CUNVELO**  
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teletecnología, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YOC/manuja

Apartado Correos 094 / Teléf: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

**METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:**

**DERECHOS**

De acuerdo al artículo 41 del reglamento de trabajos de grado (Vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009)

“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 “

  
AUTOR  
Hernández Enrico

  
AUTOR  
Izaguirre Edenys

  
TUTOR  
Dr. Pedro Parrilla

  
JURADO  
Dra. Marisa Gonsalvez

  
JURADO 728867  
Dra. Mercedes Quiroga

**POR LA SUBCOMISION DE TESIS**