

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**DESARROLLO DE UN ANTIVENENO PREPARADO EN
GALLINAS CONTRA EL VENENO DE LA SERPIENTE *Oxyuranus
scutellatus* Y SU COMPARACIÓN CON UNA FORMULACIÓN
SIMILAR PREPARADA CON INMUNOGLOBULINAS EQUINAS**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado
en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología para optar por el grado y
título de Maestría Académica en Microbiología

DIEGO NAVARRO ARIAS

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2016

Dedicatoria

A esa fuerza superior que de una u otra forma siempre ha sido mi guía y soporte necesario para no claudicar en los momentos de flaqueza y mayor incertidumbre.

A Isa, mi abuela y mami por ser ese trío mágico, silencioso que siempre puso por delante de sus necesidades las de los otros. Gracias por su incansable trabajo y don de servicio y sobre todo por enseñarme el valor de entrega total en cualquier actividad o trabajo que hagas en la vida diaria.

Agradecimientos

A Lore por ser una guía, fuente constante inspiración y una parte fundamental para la culminación de un proyecto que parecía no tener fin.

A Memo por darme la oportunidad de emprender y culminar mi proyecto de maestría. Gracias por su enorme paciencia conmigo y por asumir un riesgo tan grande. Mil gracias por todas sus enseñanzas.

Al instituto Clodomiro Picado y todo su personal por la colaboración brindada para el desarrollo de este proyecto en especial al personal del área de producción y control de calidad del ICP.

Un agradecimiento muy especial a María Herrera, Mariángela Vargas, Alvaro Segura y Mauren Villalta por su paciencia, ayuda y sobre todo, por sus enseñanzas. Sin ellos este proyecto no hubiése sido posible.

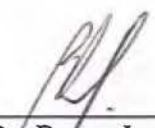
A Jorge Gómez por su invaluable colaboración en el desarrollo de este proyecto.

A mis hermanos Cristian, César y Kevin que de la forma menos convencional me han enseñado mucho de la vida.


A esos compañeros y amigos silenciosos que me han empujado a seguir en especial a Anel, Anayanssi y Oriana.

Este estudio fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (proyecto 741-B3-017). Se agradece la colaboración de Jorge Gómez y del personal administrativo y docente del Instituto Clodomiro Picado.

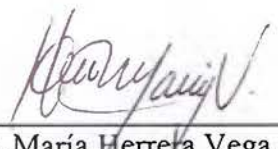
“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología.”



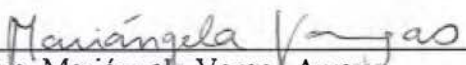
Dr. Bruno Lomonte Vigliotti
**Decana o Representante del Decana
Sistema de Estudios de Posgrado**



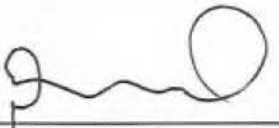
Dr. Guillermo León Montero
Director de Tesis



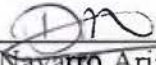
M.Sc. María Herrera Vega
Asesora



Dra. Mariángela Vargas Arroyo
Asesora



Dr. César Rodríguez Sánchez
**Director Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e
Inmunología**



Diego Navarro Arias
Candidato

TABLA DE CONTENIDOS

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Hoja de aprobación.....	iv
Tabla de contenidos.....	v
Resumen.....	ix
Abstract.....	x
Lista de cuadros.....	xi
Lista de figuras.....	xii
Lista de abreviaturas.....	xvi
1. ANTECEDENTES	
1.1. Generalidades del accidente ofídico.....	01
1.2. Accidente ofídico en Papúa Nueva Guinea (PNG).....	02
1.3. Accidente ofídico por <i>Oxyuranus scutellatus</i>	05
1.4. Composición del veneno de <i>O. scutellatus</i>	08
1.4.1. Enzimas activadoras de protrombina.....	09
1.4.2. Fosfolipasas (PLA ₂).....	11
1.4.2.1. PLA ₂ S neurotóxicas de cadena simple.....	12
1.4.2.2. PLA ₂ S neurotóxicas de múltiples cadenas.....	13
1.4.3. Péptidos de bajo peso molecular.....	15
1.4.3.1. Neurotoxinas.....	16
1.4.3.2. Inhibidores enzimáticos.....	17

1.5.	Antivenenos ofídicos.....	17
1.5.1.	Antivenenos formulados con inmunoglobulinas de mamíferos.....	19
1.5.2.	Antivenenos formulados con inmunoglobulinas de aves	
1.5.2.1.	Generalidades de la respuesta por anticuerpos de las aves.....	22
1.5.2.2.	Proceso de ensamblaje de los huevos de aves.....	26
1.5.2.3.	Métodos de purificación de IgY.....	28
2.	HIPÓTESIS.....	31
3.	OBJETIVO GENERAL.....	32
4.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1.	Consideraciones éticas.....	33
5.2.	Veneno de <i>O. scutellatus</i>	33
5.3.	Antiveneno anti-taipán de origen equino (AvDC).....	33
5.4.	Animales de laboratorio.....	34
5.5.	Preparación de un antiveneno anti-taipán formulado con IgY (AvDG)	
5.5.1.	Inmunización de gallinas con veneno de taipán.....	34
5.5.2.	Extracción primaria de los anticuerpos IgY de la yema de huevo.....	35
5.5.3.	Purificación de IgY por precipitación con ácido caprílico/sulfato de amonio.....	36
5.6.	ELISA para la cuantificación de anticuerpos anti-taipán.....	37
5.7.	Caracterización fisicoquímica de los antivenenos.....	38
5.8.	Comparación del perfil de inmunoreactividad	
5.8.1.	Preparación de columnas de inmunoafinidad.....	39
5.8.2.	Cromatografías de inmunoafinidad.....	39

5.8.3. HPLC de las fracciones de veneno obtenidas por cromatografía de inmunoafinidad.....	40
5.9. Determinación de las actividades tóxicas del veneno de <i>O. scutellatus</i>	
5.9.1. Actividad coagulante.....	40
5.9.2. Letalidad.....	41
5.10. Determinación de capacidad neutralizante de los antivenenos anti-taipán	
5.10.1. Neutralización de la actividad coagulante.....	41
5.10.2. Neutralización de la letalidad.....	42
5.11. Determinación de la farmacocinética de los antivenenos anti-taipán	
5.11.1. Administración del antiveneno y recolección de muestras de sangre.....	42
5.11.2. Cálculo de los parámetros farmacocinéticos.....	43
5.12. Determinación de la inmunogenicidad de las inmunoglobulinas anti-taipán.....	43
5.13. Análisis estadístico.....	44
6. RESULTADOS	
6.1. Productividad de inmunoglobulinas anti-taipán.....	46
6.2. Perfil de inmunoreactividad y capacidad neutralizante de inmunoglobulinas anti-taipán.....	50
6.3. Farmacocinética e inmunogenicidad de inmunoglobulinas anti-taipán.....	54
7. DISCUSIÓN	
7.1. Productividad de inmunoglobulinas anti-taipán.....	56
7.2. Perfil de inmunoreactividad y capacidad neutralizante de inmunoglobulinas anti-taipán.....	61
7.3. Farmacocinética e inmunogenicidad de inmunoglobulinas anti-taipán.....	65

8.	CONCLUSIONES.....	67
9.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	69
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	71
ANEXOS		
A.	Acta de la sesión ordinaria N° 124 del CICUA de la Universidad de Costa Rica.....	97
B.	Ejemplo del cálculo de concentración de anticuerpos anti-taipán determinados por ELISA.....	106
C.	Determinación del contenido de monómeros de anticuerpos en el AvDG mediante el perfil de filtración en gel en FPLC.....	108
D.	Determinación de la pureza fisicoquímica del AvDG mediante análisis densitométrico de bandas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	109
E.	Ejemplo del cálculo de la DE50 del antiveneno anti-taipán.....	110
F.	Figuras suplementarias de farmacocinética de los antivenenos anti-taipán.....	111

Resumen

Debido a que la inmunogenicidad de una molécula depende entre otras cosas de la distancia filogenética entre el organismo del cual dicha molécula se deriva y el organismo cuyo sistema inmune quiere estimularse, es posible que los antivenenos producidos en gallinas tengan un perfil de inmunoreactividad menos diverso que el obtenido en caballos y consecuentemente podrían ser menos eficaces.

Con el objetivo de comparar la respuesta por anticuerpos inducida por el veneno de taipán en caballos y gallinas para evaluar si la especie seleccionada como fuente de inmunoglobulinas afecta la efectividad, eficacia y seguridad de los antivenenos formulados con estos anticuerpos, se preparó un antiveneno empleando inmunoglobulinas Y (IgY) purificadas a partir de yemas de huevos de gallinas inmunizadas con el veneno de la serpiente *Oxyuranaus scutellatus* (taipán). Este antiveneno (AvDG) fue comparado con un antiveneno similar formulado con IgG equina (AvDC).

En comparación con el AvDC, el AvDG mostró menor capacidad para reconocer la toxina oscutarina C, y a la sub-unidad α de la taipoxina. Consecuentemente, el AvDG mostró menor capacidad neutralizante de la actividad coagulante *in vitro* y la letalidad del veneno. Por otro lado, el AvDG fue aproximadamente 17 veces más inmunogénico en conejos que el AvDC al ser administrado por vía intravenosa. Además, el AvDG fue aclarado más rápido que el AvDC.

Las diferencias entre ambos antivenenos pueden estar relacionadas con la menor distancia filogenética entre serpientes y gallinas, comparada con la existente entre serpientes y caballos. Sin embargo, esta hipótesis necesita ser estudiada evaluando otros venenos, con el fin de determinar si esto es una tendencia general. De ser este el caso, el uso de gallinas para producir antivenenos no sería tan eficaz como el uso de mamíferos.

De igual forma, el hecho que las gallinas sean filogenéticamente más distantes a los conejos (y humanos) que los caballos, puede estar relacionado con el hallazgo de que la IgY de gallinas sea más inmunogénica en conejos (y probablemente en los humanos) que la IgG equina. Esta diferencia en inmunogenicidad podría tener dos implicaciones a nivel clínico: (a) que la IgY aviar genere una mayor incidencia de reacciones adversas, y (b) que la IgY aviar sea aclarada más rápidamente que la IgG de caballos.

En conjunto, nuestros resultados sugieren fuertemente que el uso de caballos para la producción de un antiveneno contra el veneno de *O. scutellatus* es más eficaz que el uso de inmunoglobulinas IgY obtenidas a partir de huevos de gallinas inmunizadas.

Abstract

Because the immunogenicity of a molecule depends among other things on the phylogenetic distance between the organism from which that molecule is derived and the organism whose immune system wants to be stimulated, it is possible that the antivenoms produced in chickens have a immunoreactivity profile less diverse than obtained in horses and may therefore be less effective.

With the aim to compare the antibody response induced by the venom of *Oxyuranus scutellatus* (taipán) in horses and chickens to evaluate whether the selected source of immunoglobulins affects effectiveness, efficacy and safety of antivenoms formulated with these antibodies, an antivenom was prepared using IgY antibodies purified from egg yolks laid by hens immunized with the venom of taipán. This antivenom (AvDG) was compared with a similar antivenom formulated with equine IgG (AvDC).

Compared with the AvDC, the AvDG showed a reduced ability to recognize the toxin oscurarin C, and the α subunit of taipoxin. Consequently, the AvDG showed lower capability to neutralize the *in vitro* coagulant activity and the lethality of the venom. On the other hand, the AvDG was approximately 17 times more immunogenic in rabbits than the AvDC when administered intravenously. Furthermore, the AvDG was cleared faster than AvDC

The differences between both antivenoms might be related with the closer phylogenetic kinship between snakes and birds, as compared to snakes and horses. This hypothesis needs to be further studied with other venoms to determine whether this is a general trend. If this is the case, the use of chickens for raising antivenoms would not be as effective as the use of mammals.

Likewise, since chickens are phylogenetically more distant to rabbits (and humans) than horses, chicken IgY is more immunogenic to rabbits (and probably to humans) than equine IgG. This difference in immunogenicity is likely to have two implications at a clinical level: (a) that avian IgY generated a higher incidence of adverse reactions, and (b) that avian IgY is cleared at a faster rate than horses IgG.

Overall, our results strongly suggest that the use of horses in the production of an antivenom against the venom of *O. scutellatus* is more convenient than the use of egg yolks of immunized chickens.

Lista de cuadros

Cuadro 1. Caracterización fisicoquímica de los antivenenos anti-taipán.....	49
Cuadro 2. Caracterización farmacológica de los antivenenos anti-taipán.....	53
Cuadro 3. Parámetros farmacocinéticos del AvDG y el AvDC.....	55

Lista de figuras

- Figura 1.** Mapa geográfico de Papúa Nueva Guinea (PNG). En la Provincia Central de PNG (marcada en gris) se encuentra la capital del país, Port Moresby, rodeada por el Distrito Capital Nacional.....03
- Figura 2.** Ejemplar adulto de la taipán Papuana (*O. scutellatus*). Fotografía tomada por David Williams.....06
- Figura 3.** Distribución geográfica de la taipán (*O. scutellatus*) en PNG. Esta serpiente habita la costa sur de PNG, incluyendo la Provincia Central, el Distrito Capital Nacional, la Provincia Occidental y Golfo, donde suele habitar en pastizales y bosques de sabana a una altitud de unos 400 metros sobre el nivel del mar (Campbell, 1967). Imagen adaptada de WHO, 2010.....07
- Figura 4.** Comparación de la estructura molecular de la IgY aviar y de la IgG de mamíferos. Fab: Fragmento de unión a antígeno, Fc: Fragmento cristalizante (constante), V: dominio variable de la cadena liviana (V_L) y la cadena pesada (V_H), C: dominio constante de la cadena liviana (C_L) y la cadena pesada (C_H). Figura adaptada de Warr et al., 1995.....24
- Figura 5.** Cladograma mostrando las relaciones filogenéticas entre diferentes grupos de tetrápodos. Fuente: figura elaborada por Guillermo León Montero a partir de estado de conocimiento actual.....30

Figura 6. Cinética de la producción de anticuerpos IgY antiveneno en el plasma de gallinas inmunizadas con el veneno de *O. scutellatus*. El título de anticuerpos fue determinado por ELISA como se describió en materiales y métodos (sección 5.5).....46

Figura 7. Cinética de la producción de anticuerpos IgY antiveneno en la yema de huevos gallinas inmunizadas con el veneno de *O. scutellatus*. El título de anticuerpos fue determinado por ELISA como se describió en materiales y métodos (sección 5.5).....47

Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5 % bajo condiciones no reductoras del antiveneno derivado de gallinas (carril 2) y el antiveneno derivado de equinos (carril 3). El carril 1 corresponde al estándar de peso molecular. El análisis densitométrico indica que la pureza fisicoquímica de los antivenenos derivados de gallinas y caballos fue $74.6 \pm 0.5 \%$ y $75.3 \pm 1.1 \%$, respectivamente ($P > 0.05$).....49

Figura 9. Cromatogramas de HPLC de fase reversa del veneno completo de *O. scutellatus* de PNG (A) y las fracciones reconocidas por el AvDC (B) y el AvDG (C). Las fracciones más abundantes del veneno fueron identificadas de acuerdo a Herrera et al. (2012) e incluyen: toxinas de tres dedos como la SNTx-1 (a); los inhibidores tipo Kunitz tales como el inhibidor 1 de proteasas de veneno y el inhibidor de proteasas de serina taicatoxina (b); la PLA₂ OS7 (c), la cadena beta de la taipoxina (d y g), la PLA-6 (e), la PLA₂ OS₁ f, la cadena alfa de la taipoxina (f y g), la cadena gama de la taipoxina (f y h), la oscutarina C (i) y SVMPS como la scutellateasa-1 (j).....51

Figura 10. Cromatogramas de HPLC de fase reversa del veneno completo de *O. scutellatus* de PNG (A) y las fracciones no unidas por el AvDC (B) o el AvDG (C). Las fracciones más abundantes del veneno fueron identificadas de acuerdo a Herrera et al. (2012) e incluyen: toxinas de tres dedos como la SNTx-1 (a); los inhibidores tipo Kunitz como el inhibidor 1 de proteasas de veneno y el inhibidor de proteasas de serina taicatoxina (b); la PLA₂ OS7 (c), la cadena beta de la taipoxina (d y g), la PLA-6 (e), la PLA₂ OS1 f), la cadena alfa de la taipoxina (f y g), la cadena gama de la taipoxina (f y h), la oscutarina C (i) y SVMPs como la scutellateasa-1 (j).....52

Figura 11. Farmacocinética de antivenenos anti-taipán luego de su administración intravenosa en un modelo leporino. La figura representa la concentración de anticuerpos tipo IgY del AvDG (panel A) y anticuerpos tipo IgG del AvDC (panel B) en función del tiempo.....54

Figura 12. Perfil de filtración en gel por FPLC del AvDG.....108

Figura 13. Análisis densitométrico del AvDG. Se muestra el gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7% (A), el densitograma (B) y el cuadro resumen del análisis (C).....109

Figura 14. Concentraciones observadas versus concentraciones predichas de los antivenenos producidos en gallinas (A) y caballos (B), en el suero de conejos.....111

Figura 15. Residuales pesados versus el tiempo para los antivenenos formulados con IgY (A) e IgG equina (B).....112



Lista de abreviaturas

Arg²⁷⁴: Arginina en la posición 274

Arg³²³: Arginina en la posición 323

AUC_∞: Área bajo la curva concentración-tiempo al tiempo = ∞ (del inglés Area Under the concentration-time Curve at t = ∞)

AUMC_∞ : Media del área bajo la curva al tiempo = ∞ (del inglés Area Under the Mean Curve at t = ∞)

AvDC: Antiveneno derivado de caballos

AvDG: Antiveneno derivado de yemas de huevo de gallina

CICUA: Comité Institucional del Cuido y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Costa Rica

CL: Aclaramiento sistémico (del inglés Systemic Clearance)

C_{n máx}: Concentración máxima

CRISPs: Proteínas secretoras ricas en cisteína (del inglés Cysteine-Rich Secretary Proteins)

D: Dosis inicial o bolo intravenoso inicial

Da: Daltons

DCM: Dosis coagulante mínima

DE: Dosis eficaz

DE₅₀: Dosis eficaz media

DL₅₀: Dosis Letal media

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

F(ab')₂ : Fragmentos F(ab')₂ de la IgG obtenidos mediante la digestión con pepsina

Fab : Fragmentos Fab de la IgG obtenidos mediante la digestión con papaína

FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography

g: gramo

HCl: Acido clorhídrico

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

ICP: Instituto Clodomiro Picado

IgA: Inmunoglobulina A

IgD: Inmunoglobulina D

IgE: Inmunoglobulina E

IgG: Inmunoglobulina G

IgG(T): Inmunoglobulina G de las subclases 3 y 5

IgM: Inmunoglobulina M

IgY: Inmunoglobulina Y

Ile³²⁴: Isoleucina en la posición 324

¹²⁵I-OS1: Toxina OS1 de *O. scutellatus* marcada con yodo radioactivo 125

¹²⁵I-OS2: Toxina OS2 de *O. scutellatus* marcada con yodo radioactivo 125

k_a: constante de eliminación

kDa: kilodaltons

Kg: kilogramos

LD: Leche descremada

mg: miligramo

min: minutos

mL: mililitro

MRT_∞: Tiempo medio de permanencia (del inglés Mean Residence Time)

NaCl: Cloruro de sodio

NTU: Nephelometric Turbidity Units

OS1: PLA₂ neurotóxica 1 de cadena sencilla de *O. scutellatus*

OS2: PLA₂ neurotóxica 2 de cadena sencilla de *O. scutellatus*

OS3: PLA₂ neurotóxica 3 de cadena sencilla de *O. scutellatus*

OS4: PLA₂ neurotóxica 4 de cadena sencilla de *O. scutellatus*

PBS: Buffer salino de fosfatos

PEG-6000: Polietilenglicol 6000

PLA₂: Fosfolipasas A₂

PMGH: Hospital General de Port Moresby

PNG: Papúa Nueva Guinea

SNTx-1: Short neurotoxin 1

SPs : Proteinasas de serina (del inglés Serine Proteinases)

SVMPs: Metaloproteinasas de venenos de serpientes (del inglés Snake Venom Metalloproteinases)

Thr²⁷⁵: Treonina en la posición 275

USDA: United States Department of Agriculture

V_z: volumen de distribución aparente durante la fase más lenta

WHO: World Health Organization

μL: microlitro

μg: microgramo

1. ANTECEDENTES

1.1. Generalidades del accidente ofídico

El envenenamiento producido por la mordedura de serpientes constituye un problema económico, social y de salud pública muy importante alrededor del mundo, especialmente en regiones rurales de países tropicales y subtropicales del sudeste asiático, África, Oceanía y América latina (Devi et al, 2002; Gutiérrez et al., 2006; Kasturiratne et al., 2008; Cruz et al., 2009).

Varios factores contribuyen a que en muchas poblaciones de estas regiones se experimenten altas tasas de morbilidad y mortalidad. Entre ellos: a) dificultad en el acceso a los servicios de salud, b) condición sub-óptima de los servicios de salud y c) escasez de antivenenos, los cuales son el único tratamiento científicamente validado contra la mordedura por serpientes venenosas (Gutiérrez et al., 2006; Kasturiratne et al., 2008).

Se ha estimado que cada año, en todo el mundo, ocurren al menos 421.000 envenenamientos por mordedura de serpiente, y que aproximadamente 20.000 de esos casos terminan con la muerte del paciente (Kasturiratne et al., 2008). Sin embargo, otras estimaciones sugieren que esas cifras podrían ser tan altas como los 1.8 millones de envenenamientos y las 94.000 muertes anuales (Williams et al., 2011). Un número importante de las víctimas que sobreviven a los accidentes ofídicos terminan con importantes secuelas físicas (i.e. por el daño tisular causado por el veneno) y psicológicas (Gutiérrez et al., 2006; Kasturiratne et al., 2008).

En las regiones rurales de los países tropicales donde las mordeduras de serpientes se presentan más comúnmente, existen pocos datos confiables acerca de la incidencia real de envenenamientos y la mortalidad asociada a estos. Entre las razones principales para que esto suceda está el hecho de que muchas de las víctimas buscan la aplicación de tratamientos tradicionales y algunas de ellas mueren en sus casas sin que el accidente fuera reportado y registrado (Theakston et al., 2003; Gutiérrez et al., 2006; Cruz et al., 2009).

1.2. Accidente ofídico en Papúa Nueva Guinea

Papúa Nueva Guinea (PNG) es un país ubicado en Oceanía, una región conocida como Melanesia, al sudoeste del océano Pacífico. El territorio de PNG abarca la mitad oriental de la isla de Nueva Guinea y las islas volcánicas que conforman el archipiélago de Bismark (Figura 1). Al igual que en muchos países tropicales, el envenenamiento por mordedura por serpientes venenosas constituye un serio problema de salud pública en PNG (Lallo et al, 1995b; Williams y Bal, 2003), que tiene particular importancia en la Provincia Central y el Distrito Capital Nacional (Lalloo et al., 1995b).

Entre 1987-1991 se realizó un amplio estudio en el que se determinó que la incidencia de envenenamientos ofídicos en la Provincia Central de PNG es tan alta como los 215 casos/100.000 habitantes, con una tasa de mortalidad de 8 casos/100.000 habitantes (Lallo et al., 1995b). Esto corresponde a una de las tasas de mortalidad por ofidismo más altas para cualquier región en el mundo, sólo superada por los 15 casos/100.000 habitantes reportados en Burma, y los 60 casos/100.000 habitantes reportados en algunas regiones en Nigeria (Lallo et al., 1995b).

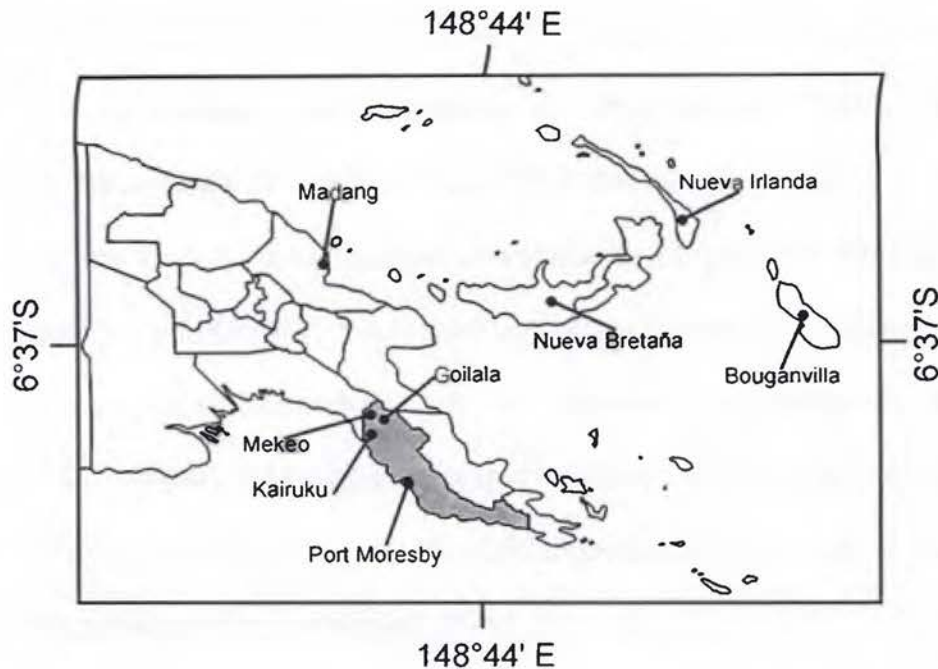


Figura 1. Mapa geográfico de Papúa Nueva Guinea (PNG). En la Provincia Central de PNG (marcada en gris) se encuentra la capital del país, Port Moresby, rodeada por el Distrito Capital Nacional.

En la provincia Central de PNG, incluyendo el Distrito Capital Nacional, se han estimado tasas de mortalidad de 3.7 casos/100.000 habitantes (Lallo et al., 1995b), es decir una tasa unas 100 veces más alta que la de Australia (McGain et al., 2004). En otros estudios llevados a cabo por Campbell en el Hospital General de Port Moresby, se reportó mortalidades de 7% entre 1959-1965 y de 3% entre 1967-1971 (Williams y Winkel, 2005). Un estudio adicional realizado en los años 80 indicó una mortalidad por envenenamientos ofídicos del 8%, en la misma región (Brian y Vince, 1987). Más recientemente, McGain y colaboradores (2004), encontraron que de un total de 722 pacientes admitidos en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital General de Port Moresby entre enero de 1992 y diciembre del 2001, 87 murieron (i.e. un porcentaje de mortalidad del 12%).

Aunque la existencia de datos epidemiológicos es incompleta, varios estudios muestran que la incidencia por mordedura de serpientes en PNG puede variar ampliamente dependiendo de la región geográfica estudiada. Por ejemplo, en la misma Provincia Central de PNG, se ha reportado incidencias de 21 casos/100.000 habitantes en la región montañosa de Goilala, de 526 casos/100.000 habitantes en Kairuku (Lallo et al, 1995b) y en estudios más recientes, se han reportado incidencias de hasta 562 casos/100.000 habitantes en la región de Mekeo (Williams y Winkel, 2005). Estas últimas se encuentran entre las tasas de accidentes ofídicos más altas del mundo (Lalloo et al., 1995b; Currie, 2000; Williams y Winkel, 2005).

Currie y colaboradores (1991) encontraron que en el periodo entre 1987 y 1989, la mortalidad por accidentes ofídicos en la Provincia Central de PNG fue de 4 casos/100.000 habitantes en la zona rural y de 2 casos/100.000 habitantes en la zona urbana (Currie et al., 1991). Este mismo grupo encontró que en el periodo entre 1978 y 1988, la mortalidad para la región de Madang (provincia ubicada al norte de la cordillera central) fue menor a 1 caso/100.000 habitantes (Currie et al., 1991). Sin embargo, sus hallazgos fueron basados únicamente en los casos donde se registró la administración de antiveneno en el centro médico, o en el programa de farmacovigilancia del laboratorio productor del antiveneno (Commonwealth Serum Laboratories). Debido a que muchos pacientes en PNG nunca llegan a recibir el antiveneno, los resultados de este estudio son afectados por un importante sub-registro (Williams, 2005a). Por otra parte, en un estudio retrospectivo llevado a cabo en la región de Madang entre 1977 y 1986, sólo se registraron dos muertes entre todos los pacientes admitidos por mordeduras de serpientes, lo que representa un porcentaje de mortalidad del 1 % (Hudson y Pomat, 1988).

Aunque aún no se conoce con exactitud el número de personas que son mordidas y mueren producto de la mordedura de serpiente en PNG, se estima que ha ocurrido una disminución en el número de muertes de pacientes que son admitidos producto de la mordedura de serpientes en el Hospital General de Port Moresby de un 12% (McGain et al., 2004) a cerca de un 1 % (comunicación personal del Dr. David Williams; Haditsch, 2009).

Los contrastes de incidencia de envenenamientos por mordedura de serpiente en diferentes regiones de PNG, sugieren que las especies de serpientes involucradas en los accidentes ofídicos, así como su densidad varían de una zona geográfica a otra (Lalloo et al., 1995b). Una gran variedad de especies de serpientes se han adaptado a vivir en la mayoría de hábitats de PNG, desde los manglares costeros hasta los bosques de altura. Sin embargo, de las más de 112 especies de serpientes que se pueden encontrar en PNG, solo 3 especies de la familia Elapidae son responsables de la mayoría de los accidentes ofídicos en humanos: *Acanthophis laevis* (víbora de la muerte), *Micropechis ikaheka* (serpiente de ojos pequeños de Nueva Guinea), y *Oxyuranus scutellatus* (taipán papuana). Un número muy pequeño de envenenamientos son causados por otras especies del género de *Acanthophis*, *Pseudechis papuanus* (serpiente negra papuana) y *Pseudonaja textilis* (serpiente marrón de Nueva Guinea) (Williams, 2005b).

1.3. Accidente ofídico por *Oxyuranus scutellatus*

En un amplio estudio prospectivo realizado a mediados de los años noventa, Lalloo y colaboradores (1995a) determinaron mediante ensayos de inmunoadsorción que *O. scutellatus* fue responsable del 83.2% de los envenenamientos por mordedura de

serpientes admitidos en el Hospital General de Port Moresby entre 1990-1992. En la región sur de PNG, así como en la vecina región sur de Papúa, hasta un 95% de las mordeduras de serpientes que amenazan la vida humana son infringidas por *O. scutellatus* (Vargas et al, 2011), constituyéndola en la serpiente de mayor importancia desde el punto de vista médico en toda PNG (Lalloo et al., 1995b; Williams y Bal, 2003).

Durante muchos años la serpiente *O. scutellatus* de la región Papuana ha sido considerada una subespecie separada (*Oxyuranus s. canni*) de las poblaciones Australianas (*Oxyuranus s. scutellatus*). Sin embargo, recientes estudios biogeográficos y taxonómicos han demostrado que a pesar de algunas diferencias morfológicas, el análisis genético molecular no revela una diferencia significativa entre las dos poblaciones. Con base en lo anterior *O. scutellatus* es considerada una única especie con poblaciones Australianas y en PNG (Wüster et al., 2005; Doughty et al., 2007).



Figura 2. Ejemplar adulto de la taipán Papuana (*O. scutellatus*). Fotografía tomada por David Williams.

O. scutellatus es una serpiente terrestre de gran longitud (1.8-2.4 metros en promedio), de hábitos diurnos y que suele de ser color marrón oscuro a negro en la parte superior. Presenta una franja característica en tonos variados de color naranja-rojizo, que se extiende a lo largo de casi toda la zona vertebral dorsal (Campbell, 1967; Williams y Bal, 2003; Williams, 2005b; Figura 2).

En el caso de las poblaciones de PNG, su distribución está restringida a la costa sur, incluyendo la provincia Central, el Distrito Capital Nacional, la provincia Occidental y Golfo (Figura 3), donde suele habitar en pastizales y bosques de sabana a una altitud de unos 400 metros sobre el nivel del mar (Campbell, 1967; Williams, 2005b). Se adapta bien a los asentamientos humanos y es un habitante frecuente de los jardines y zonas residenciales (Williams, 2005b).

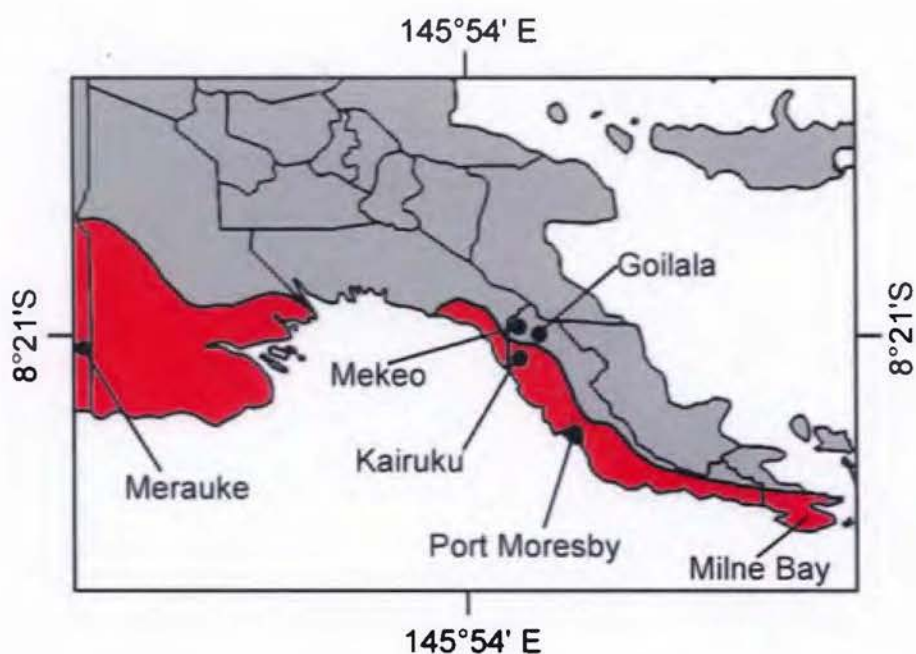


Figura 3. Distribución geográfica de la taipán (*O. scutellatus*) en PNG. Esta serpiente habita en la costa sur de PNG, incluyendo la Provincia Central, el Distrito Capital Nacional, la Provincia Occidental y Golfo, donde suele habitar en pastizales y bosques de sabana a una altitud de unos 400 metros sobre el nivel del mar (Campbell, 1967). Imagen adaptada de WHO, 2010.

Las manifestaciones clínicas características de los envenenamientos causados por la mordedura de *O. scutellatus* incluyen desde manifestaciones locales leves, hasta manifestaciones sistémicas severas tales como coagulopatías con sangrado sistémico espontáneo, alteraciones cardíacas, miotoxicidad, lesión renal aguda, así como parálisis flácida irreversible, que en caso de no ser tratadas llevan a falla respiratoria, cianosis y la muerte (Campbell, 1967; Lalloo et al., 1995a,b,c; Trevett et al., 1997; Williams y Bal, 2003).

1.4. Composición del veneno de *O. scutellatus*

Los venenos de serpientes son una mezcla compleja de péptidos, proteínas, carbohidratos, iones metálicos y compuestos orgánicos; que poseen una gran variedad de actividades biológicas y que sirven para a inmovilizar, matar y facilitar la digestión de presas (Karalliedde, 1995; Lu et al., 2005; Nicholson et al., 2006). Cerca del 95% del peso seco de la mayoría de los venenos lo constituyen proteínas y péptidos, los cuales una vez inyectados son capaces de interferir con múltiples rutas o vías fisiológicas, y producir la muerte de la presa o de la víctima (Karalliedde, 1995; Lu et al., 2005).

En general, la toxicidad de los venenos de las serpientes de la familia Elapidae se debe a la presencia de neurotoxinas que actúan a nivel de la unión neuromuscular y cuya acción puede ser a nivel presináptico, postsináptico o a ambos lados de la unión neuromuscular (Karalliedde, 1995). En el caso específico del veneno de *O. scutellatus* de PNG, su composición incluye: 68.3% de fosfolipasas A₂ (PLA₂) de las cuales aproximadamente el 56% lo constituye la taipoxina, 13.0% de inhibidores tipo Kunitz, 8.9% de metaloproteinasas de venenos de serpientes (SVMPs), 4.2% de toxinas de tres

dedos (3FTxs), 2.5% de oscutarina C, 1.9% péptidos natriuréticos, 0.8% proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISPs) y 0.6% de lectinas tipo C (Figuras 4A y 5A; Herrera et al., 2012).

La mayoría de los componentes del veneno de *O. scutellatus* ya han sido aislados y caracterizados (Fohlman et al., 1976; Speijer et al., 1986; Lambeau et al., 1989; Possani, et al., 1992; Zamudio et al., 1996; Kornhauser et al., 2010; Earl et al., 2011). La acción conjunta de estos componentes hace que el veneno de *O. scutellatus* esté catalogado como el tercer veneno más potente del mundo, según su dosis letal media (DL₅₀) en modelos murinos (Broad et al., 1979).

1.4.1. Enzimas activadoras de protrombina

La protrombina es una glicoproteína de cadena sencilla de 72 kDa, activada en condiciones fisiológicas por el complejo FVa/FXa. Los activadores de protrombina aislados de venenos de serpientes son SVMPS o serina proteinasas (SPs) (Sajevic et al., 2011). Muchas especies de serpientes de la familia Elapidae contienen enzimas activadoras de protrombina, las cuales son similares al factor Xa, y transforman la protrombina en trombina y/o meizotrombina (Lu et al., 2005). Basados en sus propiedades estructurales, características funcionales y requerimientos de cofactores, las enzimas activadoras de protrombina han sido categorizadas en cuatro grupos. Los grupos A y B incluyen metaloproteinasa que transforman eficientemente protrombina en meizotrombina (Kini, 2005). Los grupos C y D incluyen serina proteinasas que convierten la protrombina en trombina madura (Kini et al., 2001).

Mientras que las enzimas activadoras de protrombina del grupo B son Ca^{2+} dependientes, las del grupo A no requieren la presencia de cofactores como iones Ca^{2+} , factor Va y fosfolípidos para manifestar su actividad catalítica. Por otro lado, las enzimas del grupo C requieren iones Ca^{2+} y fosfolípidos cargados negativamente, pero no requieren del factor Va para alcanzar su máxima actividad, mientras que las del grupo D, son fuertemente estimuladas por el factor Va, además de los iones Ca^{2+} y fosfolípidos cargados negativamente (Kini et al., 2001; Kini, 2005; Lu et al., 2005). Las enzimas activadoras de protrombina de los grupos C y D que se han descrito hasta el momento han sido encontradas únicamente en venenos de elápidos australianos (Kini et al, 2001; Kini, 2005; Sajevic et al., 2011).

Del veneno de *O. scutellatus* se ha aislado y purificado un activador de protrombina perteneciente al grupo C; llamado oscutarina. (Speijer et al., 1986). La oscutarina C constituye aproximadamente el 2.5 % del veneno de *O. scutellatus* de PNG (Herrera et al., 2012). Esta toxina constituye un complejo proteico multimérico, con una masa molecular de aproximadamente 300 kDa, formado por una subunidad catalítica (~60 kDa), similar al factor Xa de mamíferos y una subunidad tipo cofactor de mayor tamaño (~220 kDa), similar al factor Va de mamíferos. La subunidad catalítica está formada por dos cadenas polipeptídicas (~30 kDa) unidas por puentes disulfuro, mientras que las dos cadenas de la subunidad cofactor se mantienen unidas por interacciones de tipo no covalente (Speijer et al, 1986; Kini et al., 2001).

En su forma nativa la oscutarina corta los enlaces $\text{Arg}^{274}\text{-Thr}^{275}$ y $\text{Arg}^{323}\text{-Ile}^{324}$ de la protrombina, produciendo trombina madura y meizotrombina como productos de reacción. Esta reacción no se ve afectada por la presencia del factor Va de origen bovino,

pero es fuertemente estimulada en presencia de iones Ca^{2+} y fosfolípidos. La subunidad enzimática de este activador tiene una pobre capacidad catalítica cuando está en forma aislada. Sin embargo, esta actividad es recuperada en presencia del factor Va de origen bovino o de la subunidad no enzimática similar al factor Va del propio activador (Speijer et al., 1986).

Nakagaki y colaboradores (1992) encontraron que la oscutarina es capaz de activar también el Factor VII humano. La activación del factor VII, de manera similar al de la protrombina fue estimulada en presencia de iones Ca^{2+} y fosfolípidos, pero no fue dependiente de la presencia del componente cofactor similar al factor Va (Nakagaki et al., 1992).

1.4.2. Fosfolipasas (PLA_2)

Las fosfolipasas son una clase de enzimas que hidrolizan los enlaces éster presentes en los fosfolípidos. Hay cuatro especies principales de fosfolipasas (A1, A2, C y D) clasificadas según la ubicación del enlace éster sobre el que actúan. La mayoría de las fosfolipasas encontradas en los venenos de serpientes son fosfatidilcolina 2-acilhidrolasas (PLA_2s), las cuales hidrolizan glicerofosfolípidos en la posición *sn*-2 del esqueleto de glicerol, liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos (Fry, 1999).

Los venenos de serpientes constituyen una rica fuente de PLA_2s . Basados en sus características estructurales, las PLA_2s de los venenos de serpientes se clasifican en dos grupos: el grupo I, que incluye las PLA_2s presentes en los venenos de elápidos; y el grupo II, que incluye las PLA_2s presentes en los venenos de vipéridos (Lynch, 2007). La comparación de la secuencia de aminoácidos y de la estructura cristalográfica de muchas

PLA₂s de venenos de serpiente ha evidenciado un alto grado de conservación de la estructura primaria y una importante similitud en su plegamiento tridimensional (Kini, 2003; Gutiérrez y Lomonte, 2013).

A pesar del alto grado de homología en estructura y secuencia entre las PLA₂s de venenos de serpiente, éstas poseen una importante variedad de actividades farmacológicas y tóxicas, incluyendo neurotoxicidad, miotoxicidad, cardiotoxicidad, actividades anticoagulantes y hemolíticas (Kini, 2003; Gutiérrez y Lomonte, 2013). Del veneno de *O. scutellatus* se han aislado PLA₂s neurotóxicas tanto de cadena sencilla como complejos multiméricos (Fry, 1999).

La relación que existe entre la actividad enzimática de las fosfolipasas y su capacidad para producir neurotoxicidad no es clara. Mientras que algunos investigadores han encontrado que la neurotoxicidad producida por algunas de estas PLA₂ no parece estar relacionada directamente a su actividad fosfolipasa (Hodgson y Wickramaratna, 2002), otros han demostrado un rol muy importante de la actividad enzimática en el desarrollo de neurotoxicidad (Paoli et al., 2009).

Estudios recientes, basados en el análisis proteómico del veneno de *O. scutellatus* tanto de las poblaciones australianas como de PNG, indican que las PLA₂s representan aproximadamente el 65% del veneno de estas dos poblaciones, constituyendo el principal componente del mismo (Herrera et al., 2012).

1.4.2.1. PLA₂s neurotóxicas de cadena simple

Lambeau y colaboradores (1989) aislaron a partir del veneno de *O. scutellatus* cuatro PLA₂s de cadena sencilla, designadas como: OS1, OS2, OS3, OS4. Todas son

proteínas básicas con pesos moleculares entre los 14-16 kDa, presentan una alta actividad fosfolipasa, pero sólo tres de ellas (i.e OS2, OS3, OS4) presentaron toxicidad al ser inyectadas en el cerebro de ratones (Lambeau et al., 1989). La OS1 y OS2 han sido de gran importancia en la caracterización de receptores de PLA₂s en diferentes tejidos de mamíferos, específicamente cerebro y músculo. A través de ensayos de competencia y entrecruzamiento utilizando derivados de ambas toxinas marcados con yodo radiactivo (¹²⁵I-OS1 y ¹²⁵I-OS2) se han podido determinar diferentes sitios de unión para estas toxinas, así como para otras PLA₂s tóxicas de venenos de serpientes y del veneno de abeja (Lambeau et al., 1990; Lambeau et al., 1991).

La fosfolipasa OS2 induce una importante disminución en la liberación de acetilcolina a nivel de la unión neuromuscular. En una concentración de 20 nM OS2 no tiene efecto en las corrientes o flujos presinápticos de iones K⁺, pero sí induce una importante disminución (más de un 30% en una hora) en el flujo de iones Ca²⁺ a ese mismo nivel. Este efecto puede ser en parte responsable de la disminución en la liberación de acetilcolina a nivel presináptico causada por esta toxina (Fossier et al., 1995).

1.4.2.2. PLA₂s neurotóxicas de múltiples cadenas

Las PLA₂s formadas por múltiples subunidades pueden adoptar dos formas, una en la que están formadas únicamente por unidades fosfolipasa u otra en la que también hay presencia de pequeños componentes peptídicos (Fry, 1999).

La principal neurotoxina aislada del veneno de *O. scutellatus* es la taipoxina. La taipoxina, es una neurotoxina presináptica, inicialmente caracterizada en el veneno de la

O. scutellatus australiana (Fohlman et al., 1976; Fohlman et al., 1977; Fohlman et al., 1979; Lind y Eaker, 1982), y posteriormente en el veneno de la *O. scutellatus* de PNG, aunque en este último caso fue llamada como cannitoxina (Kuruppu et al., 2005). Sin embargo, la cannitoxina corresponde a la taipoxina dado que ambas poblaciones pertenecen a la misma especie (Herrera et al., 2012).

La taipoxina es una sialoglicoproteína moderadamente ácida, con un peso molecular de aproximadamente 45.6 kDa, que presenta una potente actividad neurotóxica (Fohlman et al., 1976; Kuruppu, et al., 2005) y miotóxica (Harris y Maltin, 1982). En las descripciones iniciales de esta toxina se determinó que representa entre el 16-17% del veneno completo de *O. scutellatus* (Fohlman et al., 1976; Kuruppu, et al., 2005), sin embargo en estudios más recientes se encontró que la taipoxina constituye aproximadamente un 20% del veneno de las poblaciones Australianas, y un 56% para el veneno de PNG (Herrera et al., 2012).

Desde el punto de vista estructural, la taipoxina es un complejo ternario, formado por tres subunidades peptídicas tipo fosfolipasa: α -taipoxina, β -taipoxina y γ -taipoxina, presentes en una estequiometría de 1:1:1, que se mantienen unidas por interacciones no covalentes (Fohlman et al., 1976; Kuruppu et al., 2005).

La subunidad α de la taipoxina es muy básica y es la única que presenta actividad neurotóxica y enzimática por sí sola (Fohlman et al., 1979). La subunidad β es neutra y está presente en dos isoformas, β_1 y β_2 , las cuales difieren levemente en su secuencia de aminoácidos (Fohlman et al., 1976) y carece de actividad enzimática (Fohlman et al., 1979). La subunidad γ constituye el componente ácido del complejo trimérico, es la subunidad de mayor tamaño, contiene todo el carbohidrato presente en la molécula de

taipoxina (Fohlman et al., 1976; Kuruppu et al., 2005), y tiene una leve actividad enzimática por si sola (Fohlman et al., 1979).

La taicatoxina es otra neurotoxina aislada del veneno de *O. scutellatus*, distinta estructuralmente a la taipoxina. La taicatoxina está compuesta por tres subunidades diferentes: un péptido similar a una α -neurotoxina con un peso molecular de 8 kDa, una fosfolipasa neurotóxica de 16 kDa y un inhibidor de serina proteasas de 7 kDa. Estas tres subunidades están unidas de manera no covalente en una estequiometría aproximada de 1:1:4, respectivamente, formando en su conjunto un complejo tóxico cargado básicamente (Possani et al., 1992). La taicatoxina se une a la cara extracelular de los canales de calcio de alto umbral en el músculo cardíaco y los bloquea de manera reversible y dependiente de voltaje (Brown et al., 1987).

Aunque inicialmente se creyó que la taicatoxina no tenía ningún efecto sobre las corrientes de calcio de bajo umbral ni sobre los canales de potasio y sodio (Brown et al., 1987), en evaluaciones posteriores de esta toxina se ha observado que es un potente bloqueador de canales de K^+ de baja conductancia activados por calcio intracelular en células de cerebro de rata y células de cromafina (Doorty et al., 1997).

1.4.3. Péptidos de bajo peso molecular

Según su actividad farmacológica los péptidos de bajo peso molecular se pueden dividir en: neurotoxinas e inhibidores enzimáticos.

1.4.3.1. Neurotoxinas

Las α -neurotoxinas que se han aislado de los elápidos australianos son neurotoxinas postsinápticas de cadena corta o larga. Estas toxinas presentan diferentes tamaños y número de enlaces disulfuro dentro del plegamiento de la molécula. Sin embargo, todas ejercen su actividad farmacológica uniéndose a los receptores nicotínicos de acetilcolina en el músculo esquelético (Fry, 1999).

Las neurotoxinas de cadena corta aislada de los elápidos australianos son básicas, constituyen bloqueadores postsinápticos de la transmisión nerviosa y presentan un alto grado de homología entre ellas. Están formadas por entre 60-62 residuos de aminoácidos y presentan cuatro enlaces disulfuro internos (Zamudio et al., 1996).

Del veneno de *O. scutellatus* se han aislado varias α -neurotoxinas. Inicialmente Zamudio y colaboradores (1996) aislaron dos α -neurotoxinas (i.e. taipán toxinas 1 y 2), las cuales inhiben la unión de la α -bungarotoxina a los receptores nicotínicos de acetilcolina en músculo esquelético pero no así a nivel neuronal. En términos de su estructura química, ambas toxinas presentan un alto grado de similitud entre sí y con otras α -neurotoxinas de cadena corta. Ambas toxinas están constituidas por 62 residuos de aminoácidos, la toxina 1 tiene un peso molecular de 6726 Da, mientras que la toxina 2 pesa 6781 Da (Zamudio et al., 1996).

Más recientemente Kornhauser y colaboradores (2010) aislaron dos α -neurotoxinas con actividad postsináptica llamadas α -oxytoxina 1 y α -scutoxina 1. Estas fueron aisladas de los venenos de *O. scutellatus* de PNG (*O. scutellatus canni*) y *O. scutellatus* de Australia (*O. scutellatus scutellatus*) respectivamente y constituyen el 9% y el 6% del

veneno completo. La α -oxytoxina 1 tiene un peso molecular de 6770 Da, mientras que el de la α -scutoxina 1 es de 6781 Da (Kornhauser et al., 2010).

Las neurotoxinas de cadena larga son potentes bloqueadores postsinápticos de la transmisión neuromuscular, pero no todas son básicas y presentan mucho más variación en cuanto a secuencia de aminoácidos, aunque siempre existe un grado de homología significativo entre ellas (Fry, 1999). Las neurotoxinas de cadena larga tienen entre 70-74 residuos de aminoácidos y cinco enlaces disulfuro en su estructura (Zamudio et al., 1996).

1.4.3.2. Inhibidores enzimáticos

La subunidad de menor tamaño de la taicatoxina de *O. scutellatus*, constituye el componente mayoritario de esta toxina. Aunque esta subunidad presenta actividad tóxica y exhibe una potente actividad inhibitoria sobre proteasas como la tripsina y la quimotripsina, es incapaz de bloquear canales de Ca^{2+} en ausencia de las otras dos subunidades. Su secuencia N-terminal no presenta similitud aparente con otras toxinas aisladas del veneno de elápidos, sin embargo en términos de su secuencia primaria presenta una identidad cercana al 64% con el inhibidor de quimotripsina aislado del veneno de la serpiente *Vipera ammodytes* (Possani et al, 1992).

1.5. Antivenenos ofídicos

Los antivenenos ofídicos son formulaciones de inmunoglobulinas (o sus fragmentos $F(ab')_2$ o Fab) capaces de neutralizar los efectos tóxicos inducidos por los venenos de serpiente (Gutiérrez et al., 2011). Estas inmunoglobulinas se obtienen del plasma de animales que han sido inmunizados mediante la inyección sucesiva durante varios meses

de dosis de veneno mezcladas con sustancias adyuvantes de la respuesta inmune (Lalloo y Theakston, 2003).

Como consecuencia de la inyección de veneno en animales ocurren dos procesos simultáneos: a) el desarrollo de los efectos tóxicos inducidos por los componentes del veneno y b) la estimulación de las respuestas inmunes innata y adaptativa del organismo, las cuales tienen como objetivo neutralizar y remover las proteínas del veneno (León et al., 2011).

La capacidad de los componentes del veneno para inducir reacciones inmunológicas (i.e. inmunogenicidad) depende de: a) sus características fisicoquímicas intrínsecas (e.g. peso molecular, estructura, modificaciones postraduccionales y abundancia relativa en el veneno), b) el diseño del método de inmunización (e.g. ruta de administración del veneno, dosis, frecuencia de administración de refuerzos y uso de adyuvantes) y c) las características del animal inmunizado (i.e. constitución genética del individuo, habilidad para procesar las toxinas del veneno y capacidad de la especie para reconocer los componentes del veneno como agentes extraños) (León et al., 2011).

Tradicionalmente los antivenenos se han formulado empleando inmunoglobulinas de mamíferos, sin embargo desde la última década del siglo XX se ha propuesto el uso de aves como fuente de inmunoglobulinas para la producción de antivenenos como una alternativa para obtener productos más baratos (de Almeida et al., 1998) y con menor capacidad de inducir reacciones adversas (Carroll et al., 1992; Paul et al., 2007). Además, representa un refinamiento en el proceso de producción, al reducirse o eliminarse la etapa de sangrado de los animales, cumpliendo de esta forma con algunas de las recomendaciones globales para asegurar el bienestar animal (Araújo et al., 2010; da Silva

y Tambourgi, 2010). Sin embargo, hasta ahora son escasos los estudios donde se comparen antivenenos producidos en mamíferos y aves, en cuanto a su inmunoreactividad y eficacia (Carroll et al., 1992).

1.5.1. Antivenenos formulados con inmunoglobulinas de mamíferos

La gran mayoría de los antivenenos que en la actualidad se emplean para el tratamiento de los envenenamientos ofídicos son producidos empleando caballos como fuente de inmunoglobulinas (WHO, 2010). No obstante, otros animales como ovejas, burros, camellos y llamas también han sido usados en la producción de antivenenos (León et al., 2011).

Entre las ventajas que ofrecen los caballos para ser empleados en la producción de antivenenos se encuentran: a) la docilidad y disposición para entrar y mantenerse tranquilos en las prensas inmovilizadoras durante los procesos de inmunización y sangría, b) el alto título de anticuerpos anti-veneno que producen como resultado de la inmunización (Angulo et al., 1997a), c) la capacidad de soportar la extracción de grandes volúmenes de sangre sin sufrir alteraciones fisiológicas importantes (Lumsden et al., 1975; Magdesian et al., 1992; Angulo et al., 1997b; Malikides et al., 2001) y d) la alta velocidad de eritrosedimentación, que hace innecesario centrifugar la sangre para separar el plasma.

A lo largo de la inmunización de caballos con venenos de serpiente, se estimula la producción de procesos inflamatorios en los sitios de inyección del veneno (León et al., 1998). En modelos murinos se ha demostrado que estos procesos están caracterizados por dolor, edema local y un infiltrado celular que durante las primeras horas es conformado

principalmente por neutrófilos, pero que 48 horas después de la inyección de veneno tiene una predominancia de células presentadoras de antígenos como macrófagos y células dendríticas (Gutiérrez et al., 1986; Lomonte et al., 1993).

La presentación de los antígenos derivados del procesamiento de las proteínas que componen el veneno desencadena una respuesta T-dependiente, que estimula la proliferación de los linfocitos B específicos contra los componentes del veneno y su diferenciación a células de memoria y células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas anti-veneno. La estimulación producida por los linfocitos T también induce el cambio de clase de las inmunoglobulinas anti-veneno, de IgM e IgD a IgG o su inmunoglobulina homóloga en el animal inmunizado (León et al., 2011).

En los antivenenos de origen equino, una sub-clase de inmunoglobulina conocida tradicionalmente como IgG(T) es responsable de la mayor parte de la capacidad neutralizante de la toxicidad de los componentes del veneno (Fernandes et al., 1991; 1997; 2000). La IgG(T) corresponde a las sub-clases denominadas como IgG3 e IgG5 en nomenclaturas más recientes (Wagner, 2006).

Las inmunoglobulinas anti-veneno pueden ser digeridas con pepsina para generar sus fragmentos $F(ab')_2$ (Pope, 1939a,b) o con papaína para generar sus fragmentos Fab (Laloo y Theakston, 2003; Theakston et al., 2003). Estas digestiones se realizan con la intención de generar productos más eficaces y seguros. La afirmación anterior se basa en gran medida en la suposición de que las reacciones adversas tempranas observadas en algunos pacientes sometidos a terapia por antivenenos podrían ser causadas por las anafilatoxinas liberadas por la activación de la cascada del complemento por la vía clásica través de la porción Fc en las moléculas de IgG (León et al., 2013; Squaiella-

Baptistão et al., 2014). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que los antivenenos basados en fragmentos no son más eficaces o seguros que los antivenenos constituidos por inmunoglobulinas completas (Otero-Patiño et al., 2012; León et al., 2013).

Las inmunoglobulinas completas, o sus fragmentos $F(ab')_2$ o Fab, son purificadas a partir del plasma de los animales inmunizados empleando técnicas como: a) el “salting out” con sulfato de amonio o sulfato de sodio, b) la precipitación con polietilenglicol, c) la precipitación con ácido caprílico, o d) diferentes métodos cromatográficos (León et al., 2014). Una vez purificadas las inmunoglobulinas son mezcladas con preservantes, estabilizantes y otros excipientes para formular los antivenenos ofídicos (Segura et al., 2009). La adición de crioprotectores es necesaria cuando se pretende estabilizar la formulación por liofilización (Herrera et al., 2014a).

Cuando son producidos de acuerdo con las Buenas Prácticas de Manufactura, los antivenenos de origen equino (u ovino) cumplen con los requerimientos de eficacia y seguridad para ser empleados en el tratamiento clínico de pacientes envenenados (WHO, 2010).

Se han formulado dos antivenenos contra el veneno de la serpiente *O. scutellatus* empleando inmunoglobulinas equinas completas o sus fragmentos $F(ab')_2$ obtenidos por digestión con pepsina, (Vargas et al., 2011). En estudios pre-clínicos, ambas formulaciones han demostrado eficacia para neutralizar los principales efectos tóxicos producidos por este veneno (Vargas et al., 2011), y una de ellas ya es empleada en el tratamiento de pacientes humanos, mostrando eficacia y seguridad adecuadas para este tipo de productos.

Sin embargo, los altos costos asociados al cuidado de los animales, el mantenimiento de las áreas de pastoreo y los materiales para la sangría y separación del plasma; hacen de la producción de antivenenos en mamíferos un proceso relativamente caro. Adicionalmente, y a pesar de ser el único tratamiento científicamente validado y eficaz para el envenenamiento por mordedura de serpientes (Gutiérrez et al., 2006; Kasturiratne et al., 2008), la administración en humanos de estos derivados del suero animal puede llegar a producir efectos o reacciones adversas tanto tempranas como tardías (Theakson et al., 2003). Tomando en cuenta esas consideraciones, algunos investigadores han planteado la posibilidad de que el uso de gallinas como fuente de inmunoglobulinas anti-veneno podría ser una alternativa más barata y conveniente para producir antivenenos eficaces y seguros (Carroll et al., 1992; de Almeida et al., 1998; Lallo y Theakston et al., 2003; Paul et al., 2007; Meenatchisundaram et al., 2008b).

1.5.2. Antivenenos formulados con inmunoglobulinas de aves

1.5.2.1. Generalidades de la respuesta por anticuerpos de las aves

Anatómicamente, los sistemas inmunológicos de las aves difieren con los de los mamíferos en varios aspectos como por ejemplo: a) en las aves, la diferenciación de los linfocitos B ocurre predominantemente en una estructura denominada la “Bolsa de Fabricio”, mientras que en los mamíferos este proceso ocurre en la médula ósea; b) en las aves existe una infiltración extensa de linfocitos B en el timo y de linfocitos T en la Bolsa de Fabricio; c) el timo de las aves puede estar dividido hasta en doce lóbulos, mientras que el de los mamíferos en dos; d) en las aves se da la presencia de bazo accesorios y e) los

ganglios linfáticos de las aves no muestran la organización típica de los ganglios linfáticos de los mamíferos (Rose, 1979; Fleischer, 1981; Oláh y Vervelde, 2008).

A pesar de las diferencias entre ellos, los sistemas inmunológicos de aves y mamíferos operan mediante mecanismos muy similares en términos funcionales (Sharma, 1991). El sistema inmune en aves puede dividirse en dos partes, una innata (no específica) y otra adquirida, caracterizada por ser específica, heterogénea y presentar memoria, cada una ellas presenta una rama celular y otra no celular (Rose, 1979; Chalghoumi et al., 2009).

Como parte de la respuesta de anticuerpos en aves, existen tres clases principales de inmunoglobulinas, las cuales son diferenciables en concentración, estructura y función inmunológica, la IgM, la IgA y la IgY. Tanto la IgM como la IgA son similares a la IgM e IgA de mamíferos tanto en estructura, movilidad electroforética y función inmunológica (Tizard, 2002; Chalghoumi et al., 2009). La IgM de aves, de manera muy similar a la de mamíferos, se forma predominantemente durante la respuesta inmune primaria después de la exposición inicial a un antígeno (Tizard, 2002).

De manera muy similar a los mamíferos, la inmunización de aves con antígenos de naturaleza proteica, estimula una respuesta inmune T-dependiente, que lleva a la diferenciación de los linfocitos B en células de memoria y células efectoras productoras de anticuerpos. En caso de una segunda exposición al antígeno se produce una respuesta más rápida y fuerte de anticuerpos, además de que se induce el cambio de isotipo (Chalghoumi et al., 2009). La respuesta secundaria está caracterizada por la producción de IgY, la cual es considerada como la predecesora evolutiva de la IgG e IgE de mamíferos (Sharma, 1991; Warr et al., 1995). La IgY es la principal inmunoglobulina

encontrada tanto en el suero como en la yema de huevo de las aves (Chalghoumi et al., 2009). También, la IgY es la principal inmunoglobulina involucrada en la transferencia de inmunidad pasiva de la madre a su descendencia, al inicio del proceso de formación de los huevos (Davison et al., 2008).

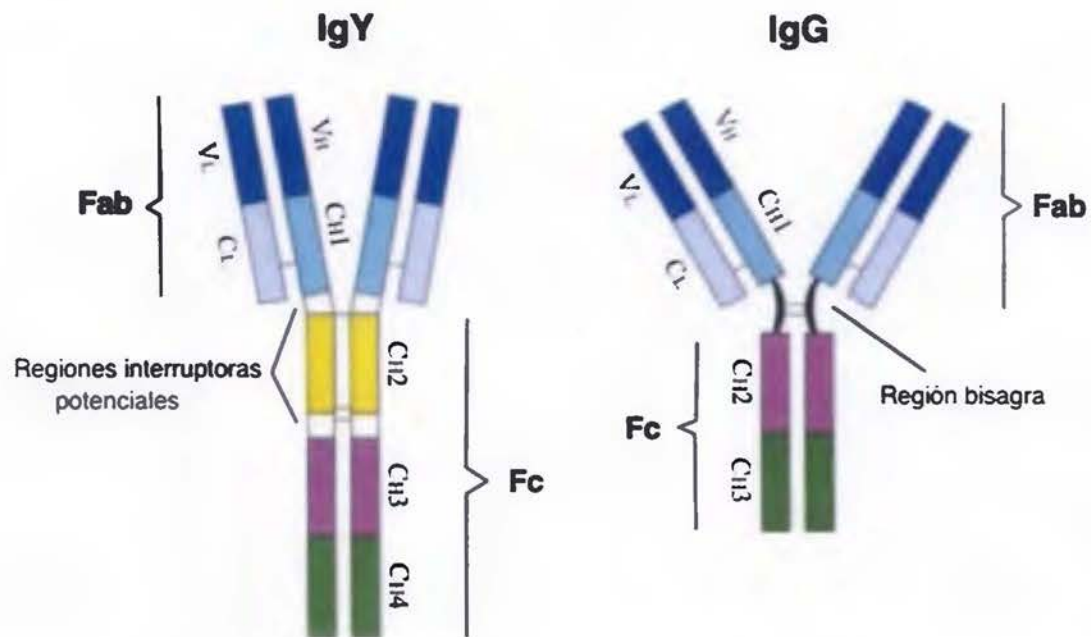


Figura 4. Comparación de la estructura molecular de la IgY aviar y de la IgG de mamíferos. Fab: Fragmento de unión a antígeno, Fc: Fragmento cristalizante (constante), V: dominio variable de la cadena liviana (V_L) y la cadena pesada (V_H), C: dominio constante de la cadena liviana (C_L) y la cadena pesada (C_H). Figura adaptada de Warr et al., 1995.

Estructuralmente, y de manera muy similar a la IgG de mamíferos, la IgY está formada por dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L), las cuales están formadas por dominios o regiones variables y constantes (Figura 4). La principal diferencia con la IgG, radica en la presencia de cuatro y no de tres dominios constantes en la cadena pesada (Warr et al., 1995; Tizard, 2002; da Silva y Tambourgi, 2010). Además, la IgY carece de la región bisagra encontrada en las inmunoglobulinas de mamíferos. En

su lugar, posee una región “interruptora” que le confiere una flexibilidad muy limitada (Warr et al., 1995; Michael et al., 2010). Por eso, las IgY son incapaces de precipitar antígenos en condiciones salinas fisiológicas (Davison et al., 2008).

Interesantemente, mientras que el complemento de los mamíferos no puede ser activado por inmunoglobulinas de la clase IgY (Benson et al., 1961; Rose y Orlans, 1962; Larsson et al., 2012), el complemento de aves sí puede ser activado por inmunoglobulinas de mamíferos (Fleischer, 1981).

Entre las posibles ventajas que ofrece el uso alternativo de gallinas en lugar de mamíferos como fuente de inmunoglobulinas antiveneno están, el ser una fuente más práctica, de menor costo y menos invasiva para la obtención de inmunoglobulinas, dado el bajo costo de mantenimiento de los animales y su fácil manipulación (Gassman et al., 1990), el volumen de yema de huevo que se puede obtener por animal, las cantidades más pequeñas de antígenos de veneno requeridas para la hiperinmunización y la facilidad de la obtención de los anticuerpos a partir de la simple colecta de huevos (Carroll et al., 1992).

Desde el punto de vista clínico otra de las posibles ventajas de la preparación de antivenenos a partir de la IgY de yema de huevos en las obtención de productos más seguros, con un potencial de producir reacciones adversas más leves y con menor incidencia (Carroll et al., 1992). La afirmación anterior se basa en al menos tres aspectos: a) la incapacidad de la IgY de activar el complemento de mamíferos (Benson et al., 1961; Rose y Orlans, 1962; Larsson et al., 1992) por lo que se reduciría el riesgo de reacciones anticomplementarias (Carroll et al., 1992; Paul et al., 2007), las cuales han sido asociadas al desarrollo de reacciones adversas tempranas (León et al., 2013), b) la baja reactividad de la IgY con los receptores Fc humanos (Lindahl et al., 1992; Larsson et al., 1993), lo

cual también debería expresarse en una menor posibilidad de reacciones adversas (Sevcik et al., 2012) y c) al estar formulados por anticuerpos que no son de origen equino u otro mamífero, su uso podría ser más seguro en aquellos pacientes previamente sensibilizados contra proteínas equinas u otros productos del suero de mamíferos (Carroll et al., 1992; Paul et al., 2007).

1.5.2.2. Proceso de ensamblaje de los huevos de aves

El sistema reproductor de las gallinas está formado por el ovario y el oviducto. Durante el desarrollo, el ovario derecho de las gallinas se atrofia, por lo que solo el ovario izquierdo (constituido por la médula y la corteza) tiene capacidad de ovulación. Un ovario de gallina contiene más de 4.000 óvulos microscópicos, pero solo un número reducido llegará a formar huevos (USDA, 2000).

En el ovario de la gallina, al final del proceso de oogénesis se genera un oocito incorporado en una cápsula formada por varias capas de células foliculares. La capa más cercana al oocito es el epitelio folicular o membrana granulosa. La capa siguiente es una delgada lámina de material extracelular denominada membrana propia. Las capas siguientes son la teca interna y la teca externa, respectivamente. Todas estas capas son irrigadas por numerosos vasos sanguíneos (Bellairs, 1965).

Durante la formación de la yema, la cápsula de células foliculares es atravesada por materiales provenientes del plasma y depositados en el interior del oocito. En una primera fase, el diámetro del oocito pasa de 0.05 mm a 1.00 mm. Durante esta fase las sustancias depositadas en el oocito son principalmente lípidos. Durante la segunda fase, el diámetro del oocito alcanza los 6 mm, luciendo por primera vez como una yema muy pequeña.

Aunque en esta fase también se acumulan lípidos en el oocito, las proteínas son las moléculas que se depositan con más abundancia (Arjamaa y Talo, 1983).

Durante la tercera fase (también conocida como fase de crecimiento rápido) la acumulación principalmente de lípidos, pero también de proteínas plasmáticas (i.e. IgY) hace que el oocito alcance los 35 mm (Bellairs, 1965). La IgY plasmática es transferida de manera selectiva del torrente sanguíneo a la yema de los oocitos en desarrollo, mediante un receptor específico, localizado en la superficie de la membrana del saco de la yema, lo que permite la transferencia de todas las poblaciones de IgY presentes en el suero (Shade et al., 2005; Chalghoumi, et al., 2009; Murai et al., 2013). En las primeras etapas las membranas celulares de las células foliculares y del oocito se encuentran juntas, pero posteriormente la membrana del oocito origina una membrana llamada la zona radiata (o zona estriada) y de las células foliculares se deriva lo que se conoce como la membrana vitelina (Bellairs, 1965).

Una vez que la yema está totalmente formada, ocurre la dehiscencia folicular, es decir la separación del oocito del ovario durante la ovulación. Tras la ruptura de la membrana folicular, la yema se desprende del ovario y pasa por el oviducto, un tubo de 60 a 70 cm de largo y que está constituido por las siguientes secciones: a) el infundíbulo, que es una estructura con forma de embudo por donde la yema encuentra la entrada al oviducto. Durante el recorrido por el infundíbulo, el cual tarda de 15 a 30 minutos, se forman las dos capas más externas de la membrana vitelina, la cual previene la entrada de agua desde la clara a la yema. También, es en el infundíbulo donde ocurre la fertilización del huevo; b) el magno, que es la sección en la que en un recorrido que tarda cerca de 3.5 horas, la yema se recubre de albúmina; c) el istmo, donde la albúmina es rodeada por las

membranas testáceas y d) el útero (o glándula cascarógena), donde luego de 18-22 horas el huevo adquiere la cáscara, la cual está formada principalmente de carbonato de calcio, además aquí termina el proceso de hidratación de la clara, proceso conocido como “plumping”. Finalmente, el huevo es expulsado por la cloaca (Taylor, 1977; USDA, 2000).

1.5.2.3. Métodos de purificación de IgY

Las IgY anti-veneno pueden ser purificadas de la yema de huevo mediante técnicas como la precipitación con polietilenglicol-6000 (Pauly et al., 2011), precipitación con ácido caprílico (McLaren et al., 1994) o combinando la precipitación con ácido caprílico seguida por un “salting out” con sulfato de amonio (Ruan et al., 2005). Con métodos similares, así como la implementación de otros procesos de purificación menos convencionales como la cromatografía de filtración en gel (Maya et al., 2002b), cromatografía de afinidad y la cromatografía de intercambio iónico, varias formulaciones de antivenenos experimentales han sido preparadas empleando como sustancia activa inmunoglobulinas de la clase IgY, purificadas a partir de yemas de huevos provenientes de gallinas inmunizadas con venenos de serpientes de los géneros *Crotalus* (Carroll et al., 1992; de Almeida et al., 1998; de Andrade et al., 2013), *Trimeresurus* (Carroll et al., 1992), *Daboia* (Maya et al., 2002a; Meenatchisundaram et al., 2008a; Meenatchisundaram et al., 2009), *Pseudonaja* (Madaras et al., 2005), *Echis* (Paul et al., 2007; Meenatchisundaram et al., 2008a; Meenatchisundaram et al., 2009), *Bitis* (de Almeida et al., 2008), *Bungarus* (Meenatchisundaram et al., 2008b; Meenatchisundaram et al., 2009), *Naja* (de Almeida et al., 2008; Meenatchisundaram et al., 2008b;

Meenatchisundaram et al., 2009), *Bothrops* (de Almeida et al., 1998; Araújo et al., 2010; de Andrade et al., 2013); *Vipera* (Zolfagharian y Dounighi, 2015), y *Micrurus* (Aguilar et al., 2014).

El grado de inmunogenicidad de una molécula depende de factores como su peso molecular, su abundancia y complejidad estructural (León et al., 2011). Además la inmunogenicidad depende de la distancia filogenética entre el organismo del cual dicha molécula se deriva y el organismo cuyo sistema inmune quiere estimularse (Kindt et al., 2007); y a que la distancia filogenética entre reptiles y aves es menor que la que existe entre reptiles y mamíferos (Hedges, 1994; Kumar y Hedges, 1998) (Figura 5), se hace necesario determinar si los antivenenos producidos en gallinas tienen un perfil de inmunoreactividad menos diverso que el obtenido mediante la inmunización de caballos y consecuentemente podrían ser menos eficaces que las formulaciones basadas en inmunoglobulinas equinas.

A pesar de la importancia que tiene la selección del animal empleado como fuente de inmunoglobulinas para la producción de antivenenos ofídicos, escasos son los estudios que comparan formulaciones equivalentes preparadas en mamíferos y aves, en cuanto a su perfil de inmunoreactividad y sus propiedades neutralizantes de las actividades tóxicas inducidas por venenos de serpiente. Por eso, para evaluar el efecto de la alteridad de los venenos de serpiente en su inmunogenicidad, se desarrolló un antiveneno formulado con IgY purificadas de la yema de huevos de gallinas inmunizadas contra el veneno de la serpiente *O. scutellatus* y se comparó en términos de su productividad, eficacia, efectividad y seguridad con el de una formulación similar de inmunoglobulinas equinas.

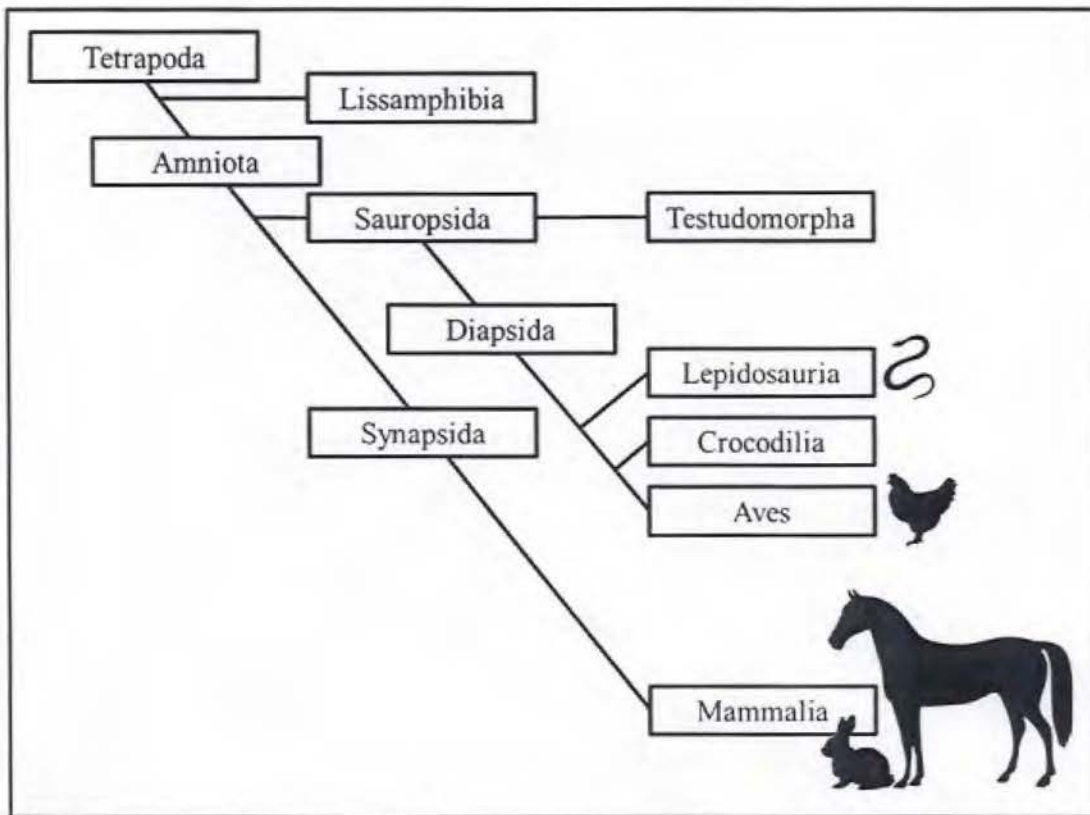


Figura 5. Cladograma mostrando las relaciones filogenéticas entre diferentes grupos de tetrápodos. Fuente: figura elaborada por Guillermo León Montero a partir de estado de conocimiento actual.

2. HIPÓTESIS:

Los antivenenos producidos en gallinas tienen un perfil de inmunoreactividad menos diverso que el obtenido mediante la inmunización de caballos y consecuentemente son menos eficaces que las formulaciones basadas en inmunoglobulinas equinas.

3. OBJETIVO GENERAL:

Comparar la respuesta por anticuerpos anti-veneno de taipán inducida en caballos y gallinas por este veneno, para evaluar si la especie seleccionada como fuente de inmunoglobulinas afecta la eficacia de los antivenenos formulados con estos anticuerpos.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

4.1. Comparar la magnitud de la respuesta por anticuerpos inducida por el veneno de taipán en gallinas y caballos, para evaluar si la especie seleccionada como fuente de inmunoglobulinas afecta la productividad de inmunoglobulinas anti-taipán.

4.2. Comparar la inmunoreactividad y la capacidad neutralizante de las inmunoglobulinas anti-taipán obtenidas en gallinas y caballos, para evaluar si la especie seleccionada como fuente de inmunoglobulinas afecta la efectividad del antiveneno.

4.3. Comparar la farmacocinética e inmunogenicidad de inmunoglobulinas anti-taipán obtenidas en gallinas y caballos, para evaluar si la especie empleada como fuente de inmunoglobulinas afecta la eficacia y seguridad del antiveneno.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Consideraciones éticas

Este anteproyecto cumple con los Principios de la Guía Internacional para la Investigación Biomédica que involucra Animales (CIOMS, 1985) y las Guías ARRIVE para el Reporte de experimentos *in vivo* (Kilkenny et al., 2010). Todos los procedimientos que involucraron el uso de animales de experimentación fueron aprobados por el Comité Institucional del Cuido y Uso de Animales de Laboratorio (CICUA) de la Universidad de Costa Rica, en su sesión N° 124, según consta en el oficio CICUA-21-12 (Anexo A).

5.2. Veneno de *O. scutellatus*

Se utilizó una mezcla de veneno obtenido de doce especímenes adultos saludables de *O. scutellatus* que luego de ser capturados en la Provincia de Milne Bay y la Provincia Central de PNG (Figura 2), fueron mantenidos en cautiverio en el serpentario de la Universidad de Papúa Nueva Guinea. El veneno fue extraído por estimulación mecánica de las glándulas de veneno, congelado a -80 °C, liofilizado y almacenado en oscuridad a -20 °C. Todas las soluciones de veneno fueron preparadas inmediatamente antes de ser usadas.

5.3. Antiveneno anti-taipán de origen equino (AvDC)

Se utilizó el antiveneno anti-taipán producido por el Instituto Clodomiro Picado (lote 5210313TALQ, con fecha de expira en octubre del 2016), el cual es una formulación de inmunoglobulinas purificadas a partir del plasma de caballos inmunizados con el veneno de la serpiente *O. scutellatus* de PNG. El AvDC fue formulado a concentración de

proteína total de 5.0 g/dL, fenol 0.25%, NaCl 0.9% y pH 7.0 (Vargas et al., 2011). También se empleó muestras de plasma de los caballos empleados para elaborar este antiveneno.

5.4. Animales de laboratorio.

Para la preparación del antiveneno anti-taipán formulado con IgY se empleó gallinas domésticas (*Gallus domesticus*) de la variedad o raza Rhode Island (gallinas colorada) de 12 semanas de edad, con un peso corporal entre los 1.4 y 2.1 kg, mantenidas en una jaula 3 x 3 x 3 metros, a temperatura ambiente y con un ciclo de 12 horas de luz de día. Para la determinación de la letalidad del veneno de *O.scutellatus* de PNG y su neutralización se empleó ratones de la cepa CD-1, de ambos sexos, con peso corporal de 16-18 g, los cuales fueron mantenidos en cajas de 42,5 cm x 26,6 cm x 18x5 cm (5 animales por caja) a temperatura ambiente. Para los estudios de farmacocinética e inmunogenicidad se empleó conejos de la cepa Nueva Zelandia de entre 2.5 y 3.0 kg peso corporal, los cuales fueron mantenidos a temperatura ambiente en jaulas de 82.3 cm x 66.0 cm x 11.0 cm (1 animal por jaula). Durante su uso, todos los animales tuvieron acceso *ad libitum* a agua y alimento

5.5. Preparación de un antiveneno anti-taipán formulado con IgY (AvDG)

5.5.1. Inmunización de gallinas con veneno de taipán

Se inmunizó un grupo de 12 gallinas. Los huevos puestos durante la cuarta semana de ovoposición fueron recolectados y conservados como muestra basal previa al proceso de inmunización. En esa misma semana, también se colectó por punción de las venas

alares, muestras basales de sangre heparinizada. El plasma de esas muestras fue separado por centrifugación y conservado a -20°C . A partir de la quinta semana de ovoposición las gallinas fueron inyectadas cada 2 semanas con $50\ \mu\text{g}$ de veneno de *O. scutellatus* de PNG, disuelto en $125\ \mu\text{L}$ de un amortiguador de fosfatos (i.e. PBS: NaCl $0.14\ \text{M}$, fosfatos $0.04\ \text{M}$ y pH 7.2) y contenidos en $250\ \mu\text{L}$ de una emulsión simple. Dosis similares han sido empleadas para producir otros antivenenos en gallinas (Meenatchisundaram et al., 2008a,b). Para la primera dosis, esta emulsión fue preparada con el adyuvante de Freund completo (Catalogo # F5881; Sigma-Aldrich). Para los demás refuerzos, los cuales fueron aplicados durante un periodo de 6 meses, la emulsión fue preparada con el adyuvante de Freund incompleto. Las inyecciones fueron administradas por vía subcutánea sobre el músculo pectoral, en un único punto de inyección, alternando entre el lado derecho e izquierdo entre refuerzos. A lo largo del esquema de inmunización se recolectó muestras de plasma y huevos, para medir en ellos la concentración de anticuerpos anti-taipán y reunir material para la producción del AvDG.

5.5.2. Extracción primaria de los anticuerpos IgY de la yema de huevo

Como primer paso para la purificación de IgY a partir de la yema de huevo, se siguió una modificación del procedimiento de dilución en agua bajo condiciones ácidas previamente descrito por Akita y Nakai (1996), con el fin de obtener una fracción acuosa rica en proteínas (IgY). Para esto, las yemas fueron separadas de sus claras utilizando un separador comercial de yemas, lavadas superficialmente con agua destilada y posteriormente se secaron sobre un papel filtro con el fin de eliminar la mayor cantidad de proteínas contaminantes procedentes de la clara. Luego, el contenido de las yemas fue

extraído mediante la ruptura de las membranas vitelinas con una punta de micropipeta automática. Las yemas líquidas fueron diluidas 1:3 con agua destilada fría (2-8 °C) acidificada (pH de 4.9-5.2) y agitadas fuertemente durante 1 hora. Las yemas diluidas fueron congeladas a -20 °C hasta su procesamiento.

5.5.3. Purificación por precipitación con ácido caprílico/sulfato de amonio

Antes de iniciar el proceso de purificación, las yemas previamente diluidas y congeladas a -20 °C (punto 5.4.2) fueron descongeladas a 4 °C. Luego, la mezcla fue centrifugada a 10.000 x g durante 10 min con el fin de estratificar los lípidos. La fracción acuosa rica en IgY (i.e. extracto primario) fue sometida al siguiente proceso de purificación. Para la purificación de las IgY el pH de una muestra de la yema de huevo diluida fue ajustado a 4.6 con ácido acético. Una vez ajustado el pH y bajo condiciones de agitación fuerte, se agregó por goteo lento ácido caprílico hasta una concentración final de 6% (v/v). Esta mezcla fue mantenida en agitación constante a temperatura ambiente (TA) por 2 h. Luego, la mezcla fue filtrada utilizando un papel filtro Whatman 2V (GE healthcare biosciences, UK). El pH del filtrado fue ajustado a 7.4 mediante la adición de Tris 1 M. La temperatura del filtrado fue llevada a 4 °C para posteriormente agregar sulfato de amonio a una concentración de 1.75 M. La mezcla fue agitada por 1 h a 4 °C, al cabo de la cual fue filtrada utilizando un papel filtro Whatman 2V (GE Healthcare Biosciences, UK). El material precipitado retenido en el filtro fue disuelto en PBS, dializado contra agua y formulado de forma que se obtuvieran las siguientes concentraciones finales: NaCl 0.9 g/dL, fenol 0.25 g/dL y pH 7.0. Finalmente, el AvDG

fue esterilizado por filtración en una membrana de 0.22 μm (Minisart, Sartorius, Göttingen, Germany), y dispensado en viales de borosilicato de 10 mL.

5.6. ELISA para la cuantificación de anticuerpos anti-taipán

La determinación cuantitativa de anticuerpos anti-taipán se llevó a cabo por la técnica de ELISA en placas de 96 pozos (Costar 9017, Corning Inc.). Cada pocillo de las placas fue recubierto con 100 μL de una solución de veneno de *O. scutellatus* disuelto en PBS a una concentración de 0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Luego de una incubación de toda la noche a TA (20-22°C), las placas fueron lavadas 5 veces con agua destilada. Posteriormente, por triplicado, se agregó a cada pocillo 100 μL de muestra (i.e. plasma de caballo o gallina, extracto primario de IgY, AvDC, AvDG, o suero de conejos inyectados con antiveneno), o de patrones de anticuerpos anti-taipán purificados por cromatografía de afinidad, a partir de los antivenenos comparados (i.e. AvDC y AvDG). Tanto las muestras como los patrones fueron diluidos en una solución de leche en polvo descremada en PBS (LD 2%-PBS). Las placas fueron incubadas durante 1 h a TA y después fueron lavadas 5 veces con agua destilada. Después, en cada pocillo se agregó 100 μL de un conjugado anti-IgY marcado con peroxidasa preparado en conejos (Catalogo # A9046; Sigma-Aldrich), ó 100 μL de un conjugado anti-IgG equina marcado con peroxidasa preparado en conejos (Catalogo # A6917; Sigma-Aldrich), dependiendo de si los anticuerpos anti-taipán en la muestra eran de caballo o de gallina. En ambos casos, los conjugados fueron diluidos 1:5000 con LD 2%-PBS. Una vez más, las placas fueron incubadas por 1 h a TA. Al finalizar el tiempo de incubación, la placa fue lavada 5 veces con agua destilada, luego de lo cual se agregó a cada pocillo 100 μL del sustrato para peroxidasa [2 mg/mL de orto-

fenilendiamina (Catálogo # P9029; Sigma-Aldrich)] disuelto en una solución amortiguadora de citrato de sodio 0.1 M, pH 5, y en presencia de H₂O₂ (4 µL de H₂O₂ al 30% por cada 10 mL de solución final). La reacción de color producida fue detenida agregando 50 µL de HCl 1.0 M a cada uno de los pocillos. La lectura de la absorbancia se realizó con un lector para placas de ELISA (MultiSkan FC, ThermoScientific) a 492 nm. La concentración de anticuerpos anti-taipán fue calculada interpolando las absorbancias de las muestras en curvas de calibración corridas en las mismas placas. Estas curvas de calibración fueron construidas graficando la absorbancia de los patrones como una función de su concentración de anticuerpos anti-taipán (Anexo B).

5.7. Caracterización fisicoquímica de los antivenenos

El contenido de monómeros de anticuerpos se determinó mediante FPLC (Anexo C), en una columna de filtración en gel Superdex 200 10/300 GL, donde se utilizó como eluente NaCl 0.15 M, Tris 20 mM, pH 7.5. La turbidez fue determinada utilizando un turbidímetro (La Motte, modelo 2020, Chestertown, MD) y la misma fue expresada en unidades NTU (Nephelometric Turbidity Units). La pureza fisicoquímica de los antivenenos fue calculada mediante el análisis densitométrico de las bandas de inmunoglobulinas separadas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5%, bajo condiciones no reductoras (Laemmli, 1970) y teñidas con colorante Coomassie Brilliant Blue-250 (Anexo D). Por otro lado, la pureza inmunoquímica fue calculada como el porcentaje de la proteína total del antiveneno, determinada por el método de Biuret (Gornall et al., 1949), que corresponde a anticuerpos específicos contra el veneno de *O. scutellatus* determinados por ELISA (Segura et al., 2013).

5.8. Comparación del perfil de inmunoreactividad

5.8.1. Preparación de columnas de inmunoafinidad

Las columnas de inmunoafinidad fueron preparadas acoplando 100 mg de proteína del AvDC o el AvDG a 3.0 g de Sepharose® activada por CNBr (Catálogo # C9142; Sigma-Aldrich). Para esto, la sefarosa fue hidratada con una disolución de HCl 1 mM por 15 min. Una vez hidratado, el gel fue lavado 3 veces con la misma solución. Un cuarto lavado fue realizado con amortiguador de acople (NaHCO₃ 0.1 M, NaCl 0.5 M y pH 8.3). Después, el gel fue transferido a una disolución de AvDC o AvDG, previamente diluida en amortiguador de acople. Esta mezcla se agitó suavemente en un rotador por 20 horas a 4 °C. Luego de finalizado el periodo de incubación, se bloqueó el exceso de grupos reactivos con una disolución de glicina 0.2 M a pH 8.0 durante 2 horas a TA. Finalmente, el gel fue empacado en una jeringa de 20 mL y la proteína no acoplada fue lavada haciendo 4 ciclos de lavado alternando el amortiguador de acople con un amortiguador de acetato (acetato de sodio 0.1 M, NaCl 0.5 M y pH 4.0).

5.8.2. Cromatografías de inmunoafinidad

Para llevar a cabo las cromatografías de inmunoafinidad se utilizó un cromatógrafo Bio-Rad (Bio Logic™ LP System) y un detector ajustado para leer absorbancias a 280 nm. Las columnas acopladas con cada antiveneno fueron equilibradas con PBS. Una vez equilibrada, la columna fue cargada con 5 mg de veneno de *O. scutellatus* de PNG disuelto en PBS. Posteriormente las columnas fueron lavadas con PBS hasta que toda la fracción no unida fuese retirada de la columna. Después, la fracción de veneno unida a la columna fue eluida con una solución de glicina 0.1 M, pH

2.8-3.0. El pH de la fracción unida fue ajustado entre 6.9-7.1 con una solución de NaOH 2 M. Ambas fracciones (i.e. unida y no unida) fueron almacenadas a -20 °C hasta ser analizadas por HPLC (Herrera et al., 2014b).

5.8.3. HPLC de las fracciones de veneno obtenidas por cromatografía de inmunoafinidad

El análisis de las fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad se realizó por HPLC (Herrera et al., 2012), con algunas modificaciones. Brevemente, se empleó una columna C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm de tamaño de partícula; Agilent), y un cromatógrafo Agilent 1100 con detector UV de onda variable (Agilent 1100 Series). Para la elución de las proteínas, se utilizó un flujo de 1 mL de solvente/min bajo las siguientes condiciones: 5% de la solución B [(solución B: 95% acetonitrilo, 5% H₂O y 0.01% ácido trifluoroacético (TFA))] por 10 min, seguido de 5-15% de la solución B por 20 min, 15-45% B por 120 min, y 45-70% B por 20 min. La detección de proteínas se realizó a una longitud de onda de 215 nm. La identificación de las fracciones de veneno se realizó por comparación de cromatograma obtenido con el cromatograma reportado previamente por Herrera et al (2012).

5.9. Determinación de las actividades tóxicas del veneno de *O. scutellatus*

5.9.1. Actividad coagulante

La actividad coagulante se determinó empleando una mezcla de muestras de plasma humano citratado, obtenidas de varios voluntarios. Diferentes alícuotas de 200 µL de plasma fueron atemperadas a 37 °C y posteriormente fueron mezcladas con 100 µL de solución salina (NaCl 0.15 M) conteniendo diferentes cantidades de veneno. Como

control negativo se utilizó una mezcla de plasma a la que se agregó 100 μ L de solución salina. La Dosis Coagulante Mínima (DCM), se calculó como aquella dosis de veneno que causó la coagulación del plasma en 60 segundos. El resultado obtenido fue expresado como el promedio de dos pruebas independientes con su respectiva desviación estándar.

5.9.2. Letalidad

Grupos de cinco ratones fueron inyectados por la vía intraperitoneal, con distintas cantidades del veneno de *O. scutellatus*, contenido en 0.5 mL de PBS. Como control se inyectó 5 ratones con PBS. Se registró el número de muertes durante las 48 horas posteriores a la inyección de veneno. La Dosis Letal Media (DL_{50}), entendida como la cantidad de veneno que resulta letal para la mitad de los animales inyectados, se determinó utilizando el método de Próbitos (Finney, 1971). Al finalizar los experimentos, todos los animales fueron sometidos a eutanasia mediante inhalación de CO_2 .

5.10. Determinación de capacidad neutralizante de los antivenenos anti-taipán

5.10.1. Neutralización de la actividad coagulante

Para la neutralización de la actividad coagulante se mezcló una dosis de reto igual a 2 DCM con diferentes diluciones de antiveneno y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, 100 μ L de las mezclas conteniendo 2 DCM fueron agregadas a 200 μ L plasma humano. El tiempo de coagulación fue medido. La capacidad del antiveneno de neutralizar la actividad coagulante fue expresada como la Dosis Eficaz (DE), la cual correspondió a la razón de nanogramos de veneno por miligramos de antiveneno anti-taipán en la que el tiempo de coagulación es prolongado 3 veces si se compara con el

tiempo de coagulación del plasma incubado solamente con el veneno. Cada determinación se llevó a cabo por triplicado y como control se utilizó un experimento similar en el cual la muestra de antiveneno fue substituida por una solución de PBS (Vargas et al., 2011).

5.10.2. Neutralización de la letalidad

La neutralización de la letalidad del veneno se realizó empleando una dosis de reto de 4 DL₅₀. Esta dosis de reto fue incubada con diferentes diluciones de antiveneno a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, 0.5 mL de cada mezcla de veneno y antiveneno fue inyectada en grupos de 8 ratones por la vía intraperitoneal. Se registró el número de muertes durante las 48 horas posteriores a la inyección de las mezclas. La capacidad neutralizante de la actividad letal del antiveneno se calculó con el método de Próbitos y se expresó como la DE₅₀, la cual corresponde a la razón de miligramos de veneno por mililitro de antiveneno en la que el número de muertes ocurridas es igual al 50% de los ratones inyectados (Finney, 1971; Anexo E). Al finalizar los experimentos, los ratones fueron sometidos a eutanasia mediante inhalación de CO₂.

5.11. Determinación de la farmacocinética de los antivenenos anti-taipán

5.11.1. Administración del antiveneno y recolección de muestras de sangre

Grupos de tres conejos fueron inyectados mediante bolo intravenoso (i.e. dosis aplicada en menos de un minuto), ya sea de AvDG o AvDC, a una dosis de 3 mg de anticuerpos anti-taipan por kilogramo de peso corporal. Se tomó muestras de sangre a los 0, 1, 5, 15, 30, 60, 180, 360, 720, 1440 y 2880 minutos luego de la administración del

antiveneno. El suero en cada muestra de sangre fue separado por centrifugación y almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis por ELISA para la determinación de su concentración de anticuerpos anti-taipán, como fue descrito en la sección 5.5.

5.11.2. Cálculo de los parámetros farmacocinéticos

El análisis farmacocinético fue realizado sin asumir alguna distribución compartimental. La concentración máxima ($C_{n\text{máx}}$) y el tiempo requerido para alcanzarla ($t_{\text{máx}}$) fueron determinados mediante el análisis de curvas concentración plasmática/tiempo. Los otros parámetros farmacocinéticos fueron calculados con el software WinNonlin® (version 5.1) (Anexo F). El volumen aparente de distribución durante la fase más lenta (V_z) fue calculado de acuerdo a la ecuación $V_z = D/(k_{el}AUC_x)$, siendo D la dosis o bolo inicial y k_{el} una constante de eliminación. El aclaramiento sistémico (CL) y el tiempo medio de permanencia (MRT_x) fueron calculados de acuerdo a las siguientes ecuaciones: $CL = k_{el} \cdot V_z$; $MRT_x = AUMC_x/AUC_x$. Para cada grupo experimental, los parámetros farmacocinéticos fueron expresados como el promedio \pm DE de los parámetros calculados para cada animal ($n = 3$).

5.12. Determinación de la inmunogenicidad de las inmunoglobulinas anti-taipán

Los anticuerpos de conejo producidos contra la IgY de gallina o la IgG equina fueron cuantificados en las muestras de suero tomadas de los conejos utilizados en el estudio de farmacocinética (sección 5.11), antes y 14 días después de la administración del antiveneno. Para calcular el título de anticuerpos anti-inmunoglobulinas, se recubrió placas de poliestireno de 96 pozos (Costar 9017, Corning Inc.) con $100\text{ }\mu\text{L}$ de una

solución de IgY o IgG equina (3 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$), durante toda la noche a TA. Después de lavar las placas 5 veces con agua destilada, se agregó por triplicado 100 μL de las muestras de suero de conejo, diluidas de manera seriada con una solución LD 2%-PBS. Cada placa fue incubada por 1 h a TA y luego lavada cinco veces con agua destilada. Luego, en cada pocillo fue agregado 100 μL de una solución de anticuerpos anti-IgG de conejo producidos en oveja, conjugados con peroxidasa (Catálogo # A4914; Sigma-Aldrich), diluidos 1:6000 en LD 2%-PBS. Una vez más las placas fueron incubadas por 1 h a TA y después de un paso final de lavado con agua destilada, se agregó 100 μL del sustrato para peroxidasa [2 mg/mL de orto-fenilendiamina (Catálogo # P9029; Sigma-Aldrich)] disuelto en una solución amortiguadora de citrato de sodio 0.1M, pH 5, y en presencia de H_2O_2 al 30%. La reacción de color producida fue detenida agregando 50 μL de HCl 1.0 M a cada uno de los pocillos. La lectura de la absorbancia se realizó con un lector para placas de ELISA (MultiSkan FC, ThermoScientific) a 492 nm. El título de anticuerpos anti-IgY de gallina y anti-IgG equina fue calculado como la dilución de la muestra de suero recolectada después de la administración del antiveneno cuya absorbancia fue igual a 10 veces la absorbancia de las muestras tomadas antes de la administración del antiveneno.

5.13. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado empleando el programa IBM SPSS Statistics for Windows, version 22.0 (Armonk, NY: IBM Corp). La significancia de las diferencias entre ambos antivenenos respecto a su contenido de monómeros, turbidez, pureza y neutralización de la actividad coagulante fue evaluada mediante una comparación de

muestras independientes por *t* de Student, considerando igualdad de varianzas según se comprobó por una prueba de Levene y asumiendo el principio del teorema del límite central. La significancia de las diferencias en los parámetros farmacocinéticos del AvDC y el AvDG, y en el título de anticuerpos de conejo anti-IgY o anti- IgG equina fueron determinados por la prueba no-paramétrica U de Mann-Whitney. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados significativos.

6. RESULTADOS

6.1. Productividad de inmunoglobulinas anti-taipán

Después de la inmunización inicial con el veneno de *O. scutellatus* se produjo un incremento en la concentración plasmática de IgY anti-veneno en las gallinas. Este incremento fue detectado mediante ELISA dos semanas después de iniciado el esquema de inmunización, previo a la aplicación del primer refuerzo y fue significativo en relación al nivel basal (Figura 6).

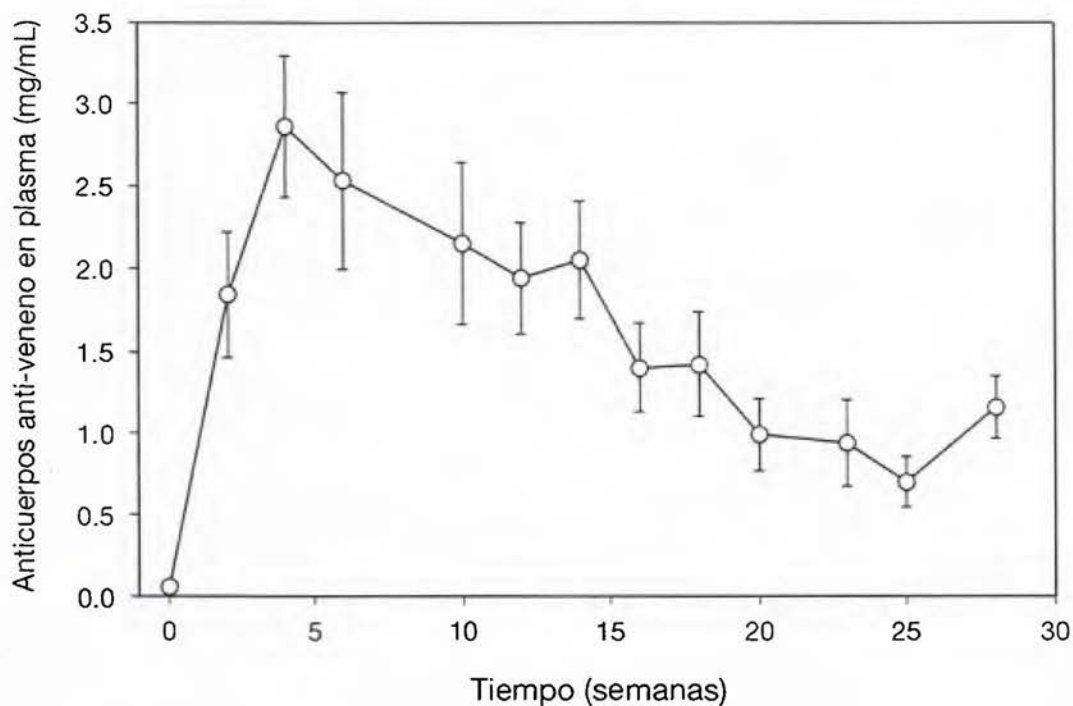


Figura 6. Cinética de la producción de anticuerpos IgY antiveneno en el plasma de gallinas inmunizadas con el veneno de *O. scutellatus*. El título de anticuerpos fue determinado por ELISA como se describió en materiales y métodos (sección 5.5).

Luego de la aplicación del primer refuerzo, hubo un incremento sostenido en la respuesta de anticuerpos, alcanzándose un pico máximo cercano a los 3 mg/mL de anticuerpos antiveneno en la cuarta semana. Posterior a la aplicación del segundo

refuerzo (4 semanas), la concentración plasmática de IgY anti-veneno disminuyó gradualmente hasta un valor de entre 0.5 y 1 mg/mL en la semana 25 (Figura 6).

Durante las dos semanas siguientes al inicio de la inmunización, las gallinas redujeron su frecuencia de ovoposición. Sin embargo, a partir de la tercera semana cada gallina produjo un huevo diario. Al estudiar la cinética de la producción de IgY anti-veneno en las yemas de los huevos de las gallinas inmunizadas, se pudo observar que el pico máximo de IgY anti-taipán se alcanzó en la quinta semana luego de iniciado el esquema (Figura 7), y durante las siguientes 20 semanas se mantuvo en alrededor de los 34 ± 3 mg de IgY anti-veneno por cada yema de huevo procesada. Sin embargo, el análisis de las yemas individuales demostró que es posible alcanzar productividades de hasta 115 mg de IgY anti-veneno por huevo en algunos casos.

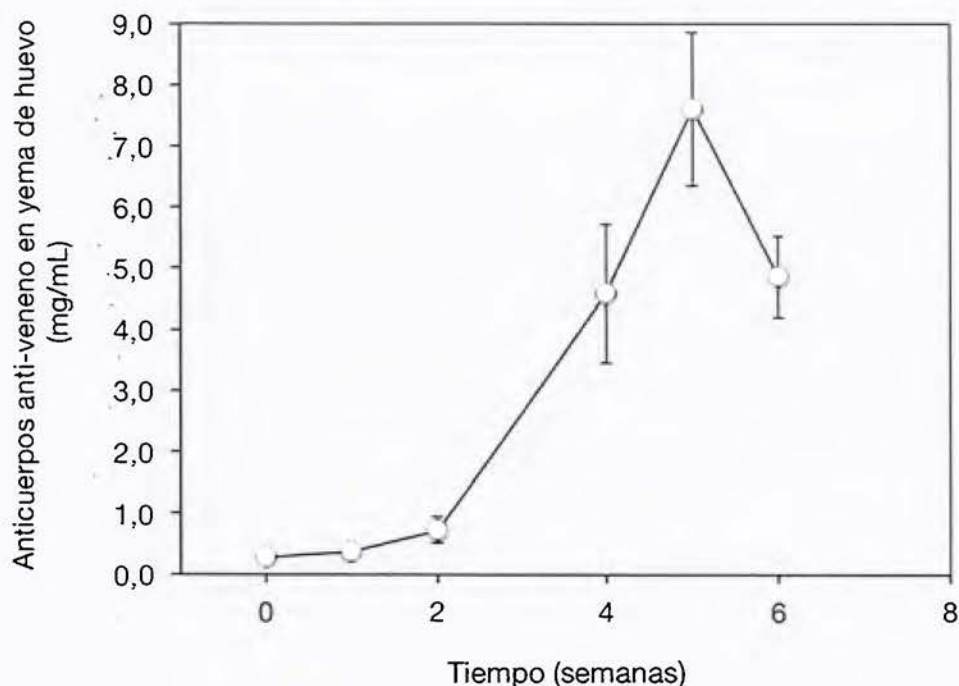


Figura 7. Cinética de la producción de anticuerpos IgY antiveneno en la yema de huevo de gallinas inmunizadas con el veneno de *O. scutellatus*. El título de anticuerpos fue determinado por ELISA como se describió en materiales y métodos (sección 5.5).

Al comparar la cinética en la producción de anticuerpos IgY anti-veneno en plasma y su aparición en la yema, se pudo observar que el aumento en anticuerpos en plasma fue detectable a los 14 días después de iniciado el esquema, mientras que en la yema fue detectable a partir del día 21. Además, el valor máximo de anticuerpos IgY anti-veneno específicos en el plasma (2.9 mg/mL) fue detectable a los 28 días de iniciado el esquema (Figura 6), mientras que el valor máximo en la yema de huevo (7.6 mg/mL) se observó en el día 35 post-inmunización (Figura 7). Al menos en las primeras seis semanas posteriores al inicio del esquema de inmunización, el valor de IgY anti-veneno siempre fue más alto en la yema de huevo que en el plasma de las gallinas, exceptuando, la semana dos.

Los anticuerpos IgY anti-taipán fueron purificados a partir de las yemas de huevo siguiendo una estrategia de múltiples pasos. Inicialmente se obtuvo un extracto acuoso o fracción soluble acuosa producto de la dilución en agua de las yemas y su posterior congelación. Luego, esta fracción fue sometida a una precipitación con ácido caprílico, seguida de “salting out” con sulfato de amonio (Ruan et al., 2005). Después de aplicado el proceso de purificación se logró recuperar $50 \pm 2\%$ de las IgY anti-taipán del extracto primario, con una pureza físicoquímica del $74.6 \pm 0.5\%$ (Figura 8; Anexo D) y una pureza inmunoquímica del $11.5 \pm 3.8\%$, según las definiciones de Segura y colaboradores (2013). En el carril 3 de la figura 8 aparece una banda de bajo peso molecular que corresponde a la transferrina (Segura et al., 2013). El contenido de monómeros (Anexo D) y la turbidez del AvDG fueron similares a las del AvDC (Cuadro 1).

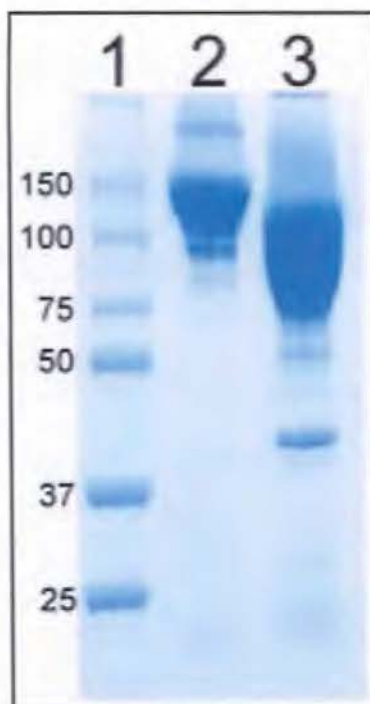


Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5 % bajo condiciones no reductoras del antiveneno derivado de gallinas (carril 2) y el antiveneno derivado de equinos (carril 3). El carril 1 corresponde al estándar de peso molecular. El análisis densitométrico indica que la pureza fisicoquímica de los antivenenos derivados de gallinas y caballos fue $74.6 \pm 0.5\%$ y $75.3 \pm 1.1\%$, respectivamente ($P > 0.05$).

Cuadro 1. Caracterización fisicoquímica de los antivenenos anti-taipán.

Característica	Antiveneno derivado de gallinas (AvDG)	Antiveneno derivado de caballos (AvDC)	Valor de P
Contenido de monómeros (%)	88.9 ± 0.6	95.8 ± 0.8	< 0.001
Turbidez (NTU) ^a	37.6 ± 0.3	25.6 ± 0.6	< 0.001
Pureza fisicoquímica ^b	$74.6 \pm 0.5\%$	$75.3 \pm 1.1\%$	0.380
Pureza inmunoquímica ^c	$11.5 \pm 3.8\%$	$25.4 \pm 2.3\%$	0.006

^a La turbidez fue expresada como Unidades Nefelométricas de Turbidez (NTU por sus siglas en inglés).

^b La pureza fisicoquímica de los antivenenos fue calculada mediante el análisis densitométrico de las bandas de inmunoglobulinas separadas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7.5%, bajo condiciones no reducidas, teñidos con colorante Coomassie Brilliant Blue R-250.

^c La pureza inmunoquímica fue calculada como el porcentaje de la proteína total del antiveneno, determinada por el método de Biuret, que corresponde a anticuerpos específicos contra el veneno de *O. scutellatus* determinados por ELISA.

Paralelamente, se encontró que el plasma de caballos inmunizados con el veneno de *O. scutellatus* tiene una concentración de alrededor de 13 ± 2 mg/mL de anticuerpos anti-taipán. Además, el AvDC presentó una pureza fisicoquímica del 75.3 ± 1.1 % (Figura 8) que no es diferente de la del antiveneno preparado con IgY ($P > 0.05$), y una pureza inmunoquímica de 25.4 ± 2.3 %, la cual es significativamente mayor que la encontrada en el antiveneno formulado con IgY ($P < 0.05$).

6.2. Perfil de inmunoreactividad y capacidad neutralizante de inmunoglobulinas anti-taipán

Según el análisis de las fracciones unidas a la columna de inmunoafinidad, los anticuerpos del AvDC fueron capaces de capturar las proteínas presentes en la mayoría de las fracciones de HPLC del veneno de taipán (Figura 9B). En contraste, los anticuerpos del AvDG fueron incapaces de unir o inmunocapturar proteínas tales como las subunidades alfa y gama de la taipoxina, y la oscutarina C (Figura 9C). Las SVMPs no fueron recuperadas en ninguna de las fracciones obtenidas con ambos antivenenos. Evidentemente, para cada antiveneno, la suma de fracciones reconocidas y las fracciones no reconocidas no es igual al cromatograma del veneno completo (Figuras 9 y 10). Por lo tanto la comparación de los cromatogramas de las fracciones reconocidas y no reconocidas del AvDG y el AvDC debe limitarse a un análisis cualitativo más que cuantitativo. Un análisis de las propiedades analíticas de la técnica antivenómica queda pendiente de ser realizado.

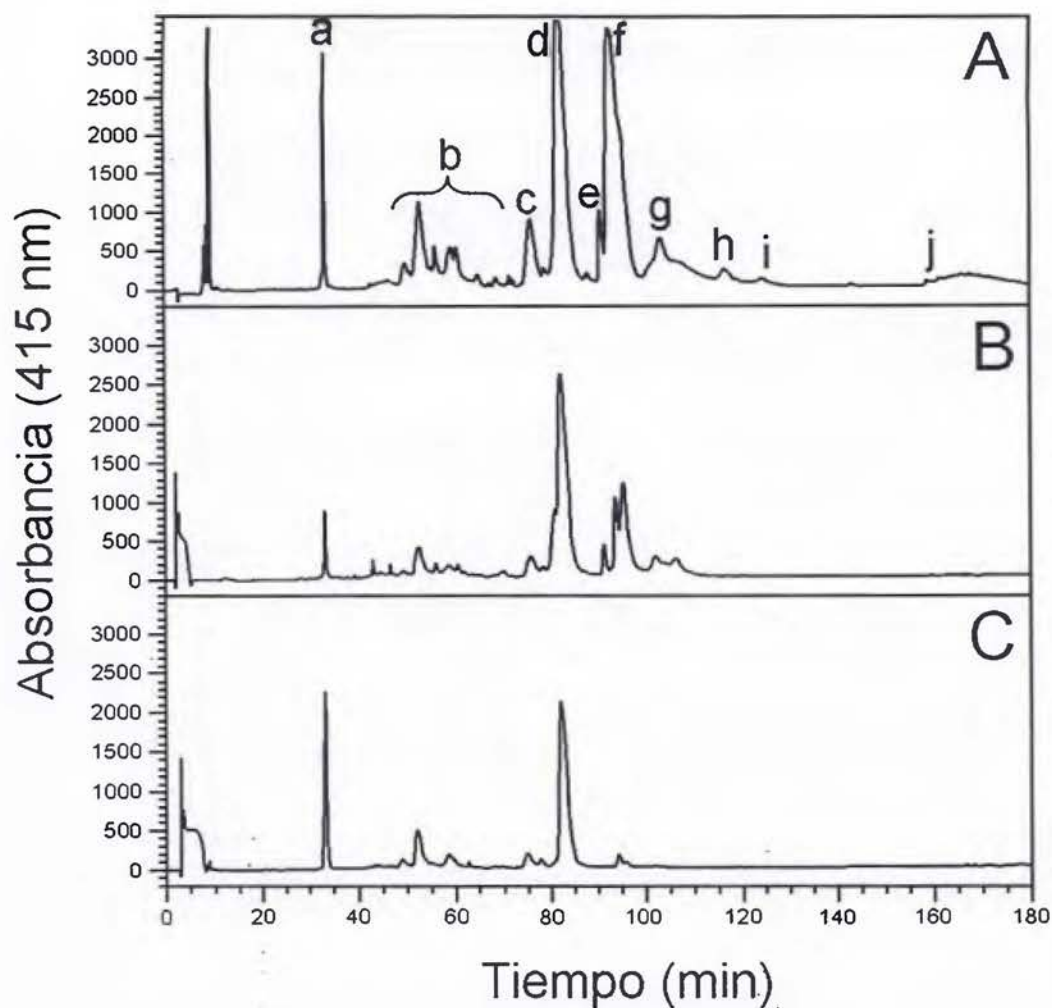


Figura 9. Cromatogramas de HPLC de fase reversa del veneno completo de *O. scutellatus* de PNG (A) y las fracciones reconocidas por el AvDC (B) y el AvDG (C). Las fracciones más abundantes del veneno fueron identificadas de acuerdo a Herrera et al. (2012) e incluyen: toxinas de tres dedos como la SNTx-1 (a); los inhibidores tipo Kunitz tales como el inhibidor 1 de proteasas de veneno y el inhibidor de serinaproteasas Taicatoxina (b); la PLA₂ OS7 (c), la cadena beta de la taipoxina (d y g), la PLA-6 (e), la PLA₂ OS₁ (f), la cadena alfa de la taipoxina (f y g), la cadena gama de la taipoxina (f y h), la oscutarina C (i) y SVMPs como la scutellateasa-1 (j).

Por otra parte, el análisis por HPLC de las fracciones no unidas en la cromatografía de afinidad reveló que proteínas tales como una α -neurotoxina de tres dedos (SNTx-1), la cadena beta de la taipoxina, la PLA-6, la PLA₂ OS₁ y las cadenas alfa y gama de la taipoxina sólo fueron parcialmente inmunocapturadas por el AvDC (Figura

10B). De manera similar la SNTx-1, la cadena beta de la taipoxina y la PLA-6, fueron parcialmente inmunocapturados por el AvDG (Figura 10C).

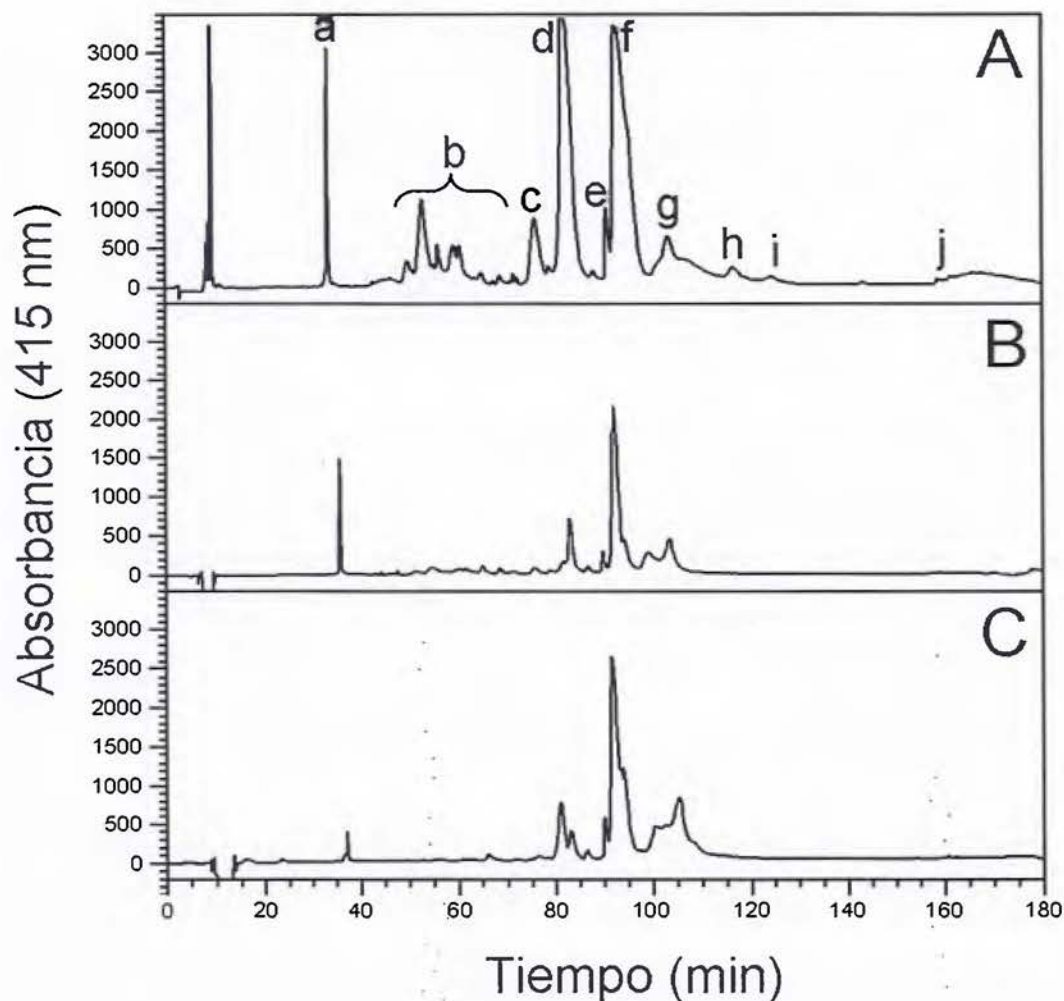


Figura 10. Cromatogramas de HPLC de fase reversa del veneno completo de *O. scutellatus* de PNG (A) y las fracciones no unidas por el AvDC (B) o el AvDG (C). Las fracciones más abundantes del veneno fueron identificadas de acuerdo a Herrera et al. (2012) e incluyen: toxinas de tres dedos como la SNTx-1 (a); los inhibidores tipo Kunitz como el inhibidor 1 de proteasas de veneno y el inhibidor de proteasas de serina taicatoxina (b); la PLA₂ OS7 (c), la cadena beta de la taipoxina (d y g), la PLA-6 (e), la PLA₂ OS1 (f), la cadena alfa de la taipoxina (f y g), la cadena gama de la taipoxina (f y h), la oscutarina C (i) y SVMPs como la scutellateasa-1 (j).

Interesantemente, la fracción correspondiente a las SVMPs del veneno de *O. scutellatus* no aparece en los cromatogramas de las fracciones unidas, ni en los de las fracciones no unidas (Figuras 9 y 10).

Con respecto a la neutralización de las actividades tóxicas del veneno, la dosis coagulante mínima calculada para el veneno de *O. scutellatus* fue de $0.33 \pm 0.13 \mu\text{g/mL}$ y la dosis letal media por la vía intraperitoneal en el modelo murino fue de $0.04 \pm 0.01 \mu\text{g}/16\text{-}18 \text{ g}$ peso corporal. El AvDG logró neutralizar la actividad coagulante *in vitro* del veneno de *O. scutellatus* de PNG, sin embargo su dosis eficaz fue aproximadamente 20 veces menor en comparación a la del AvDC (Cuadro 2). A diferencia del AvDC, el AvDG fue incapaz de neutralizar la letalidad inducida por el veneno de *O. scutellatus* en ratones (Cuadro 2). Esta incapacidad del AvDG para neutralizar la letalidad del veneno de taipán se mantuvo aun cuando las dosis reto de veneno fue reducida a 2 DL_{50} .

Cuadro 2. Caracterización farmacológica de los antivenenos anti-taipán.

Actividad	Antiveneno derivado de gallinas (AvDG)	Antiveneno derivado de caballos (AvDC)	Valor de <i>P</i>
DE anti-coagulante ($\text{ng}_{\text{Ven}}/\text{mg}_{\text{AcsAt}}$) ^a	27 ± 1	583 ± 12	< 0.001
DE ₅₀ anti-letal ($\mu\text{g}_{\text{Ven}}/\text{mg}_{\text{AcsAt}}$) ^b	< 28	1228 (999-1623)	No aplica

^a La neutralización de la actividad coagulante fue expresada como Dosis Eficaz (DE), definida como la razón veneno/antiveneno (ng veneno/ mg anticuerpos anti-taipán) en la cual el tiempo de coagulación fue incrementado tres veces en comparación con el tiempo de coagulación del plasma incubado con sólo veneno. Los resultados son presentados como promedio \pm desviación estándar ($n = 2$).

^b La neutralization de la letalidad fue expresada como Dosis Eficaz Media (DE₅₀), definida como la razón veneno/antiveneno (μg veneno/ mg anticuerpos anti-taipán) en la cual la letalidad inducida por el veneno fue inhibida en un 50%. Los intervalos de confianza del 95% fueron incluidos entre paréntesis.

6.3. Farmacocinética e inmunogenicidad de inmunoglobulinas anti-taipán

En la figura 11 se muestra la evolución a lo largo del tiempo de la concentración sérica en conejos de los anticuerpos IgY e IgG del AvDG y del AvDC respectivamente.

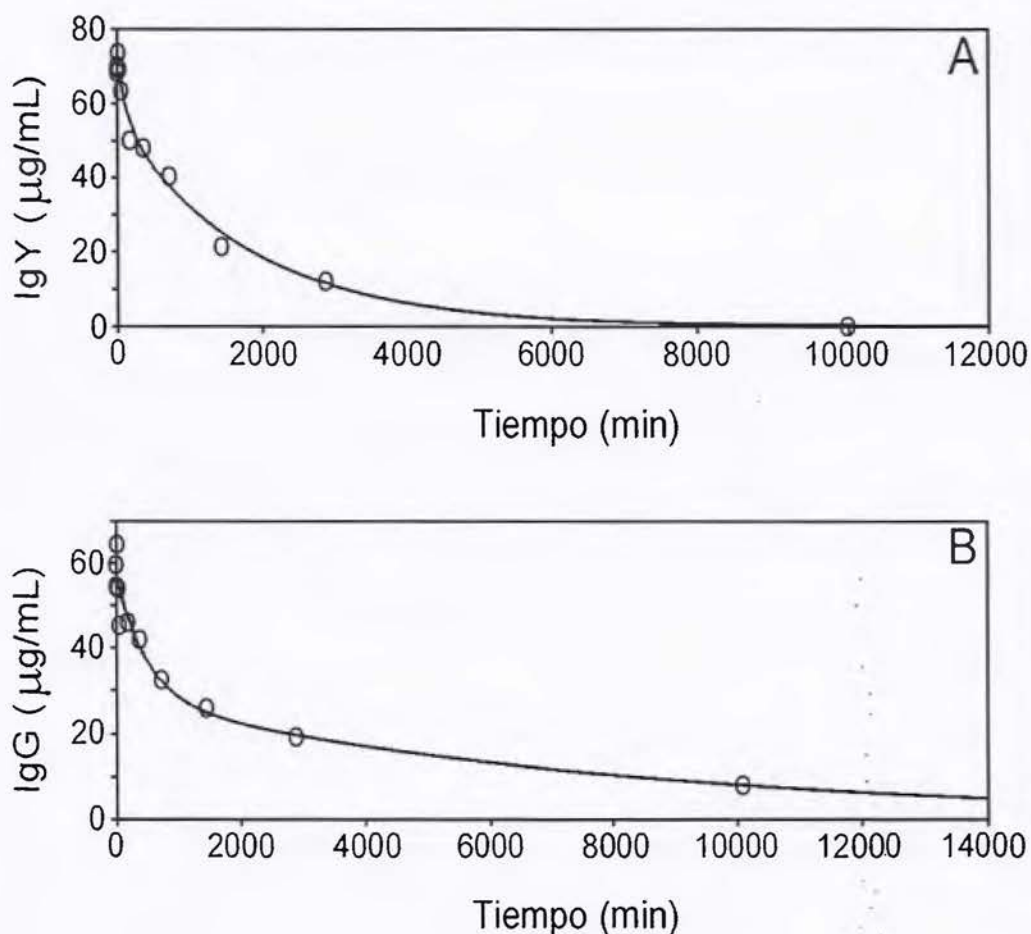


Figura 11. Farmacocinética de antivenenos anti-taipán luego de su administración intravenosa en un modelo leporino. La figura representa los datos de concentración de anticuerpos tipo IgY del AvDG (panel A) y anticuerpos tipo IgG del AvDC (panel B) en función del tiempo para un solo animal. Las curvas farmacocinéticas para los otros dos conejos (n=3) fueron similares.

Luego de ser administrados a la misma dosis, los antivenenos AvDG y AvDC aparentan distribuirse en volúmenes similares, alcanzando concentraciones máximas similares en tiempos equivalentes (Cuadro 3). Por su parte, la IgY fue aclarada más

rápida que la IgG equina (Figura 11). Sin embargo, esta diferencia en la velocidad de aclaramiento no fue suficiente para producir diferencias significativas entre los valores de MRT_{∞} de ambos antivenenos (Cuadro 3). Catorce días después de la administración intravenosa de los antivenenos, los conejos desarrollaron un título de 13.404 ± 1.232 de anticuerpos anti-IgY, el cual fue significativamente mayor que el título de 785 ± 44 de anticuerpos anti-IgG equina ($Z = -3.004$; $P = 0.003$).

Cuadro 3. Parámetros farmacocinéticos del AvDG y el AvDC*.

Parámetro farmacocinético	Antiveneno derivado de gallinas (AvDG)		Antiveneno derivado de caballos (AvDC)		Valor de <i>P</i>
	Mediana	I.C. 95%	Mediana	I.C. 95%	
V_z (mL)	147	127; 177	262	72; 490	0.05
t_{max} (min)	15	-14; 47	30	-21; 62	0.82
Cn_{max} (µg/mL)	79	42; 113	64	62; 68	0.12
CL (mL/min)	0.08	0.06; 0.09	0.04	0.02; 0.05	0.04*
MRT_{∞} (min)	1856	1478; 2313	6800	1628; 11252	0.05

*Los antivenenos fueron administrados por vía intravenosa a una dosis de 3.0 mg de proteína antiveneno/kg de peso corporal en conejos.

(V_z), volumen de distribución aparente durante la fase más lenta; (t_{max}), tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima (Cn_{max}); (CL_{obs}), aclaramiento sistémico; (MRT_{∞}), tiempo medio de permanencia. Los resultados fueron expresados como la mediana y su intervalo de confianza del 95% ($n = 3$). La significancia de las diferencias entre parámetros fue determinada por la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. *Valores de $P < 0.05$ fueron considerados significativos.

7. DISCUSIÓN

7.1. Productividad de inmunoglobulinas anti-taipán

A pesar de ser bastantes similares, el sistema inmune de las aves y mamíferos difiere en varios aspectos tales como la organización de los nódulos linfáticos, el número de lóbulos en que está dividido el timo y la presencia de bazos accesorios en las aves. Además, mientras que en mamíferos la diferenciación de los linfocitos B se da en la médula ósea, en las aves este proceso ocurre en la Bolsa de Fabricio (Fleischer, 1981). Estas diferencias entre los sistemas inmunes de aves y mamíferos sugieren que pueden existir diferentes respuestas por anticuerpos inducidas por venenos de serpientes en gallinas y caballos.

Durante el proceso de inmunización las gallinas fueron estimuladas para producir anticuerpos contra el veneno de *O. scutellatus*. La inmunización con el veneno completo despertó una respuesta humoral típica en las gallinas, con un aumento inicial en el título de anticuerpos, seguido por un aumento mayor luego de una segunda exposición al antígeno. Al igual que en mamíferos, los primeros anticuerpos producidos en aves contra un inmunógeno son de la clase IgM (Tizard, 2002). Sin embargo, luego de la exposición repetida al mismo antígeno se da un cambio de clase al isotipo IgY (Tizard, 2002). Como consecuencia de la inmunización con el veneno de *O. scutellatus*, la concentración plasmática de IgY anti-taipán incrementó a niveles entre los 0.5 y 3 mg/mL.

En las primeras seis semanas de iniciado el esquema de inmunización, se pudo observar una correlación directa positiva en la cinética de producción de anticuerpos IgY antivieno plasmáticos con la aparición de los mismos en la yema de huevo. Mediante la técnica de ELISA, se encontró que las variaciones en los niveles plasmáticos de IgY

antiveneno se expresaron de forma paralela y directa en los valores de IgY antiveneno en la yema de huevo, aunque estos últimos fueron detectables con al menos siete días de retraso en relación a los valores plasmáticos. Lo anterior indica básicamente que las variaciones en la concentración de IgY en la yema son producto de las variaciones en la concentración plasmática IgY. Estos resultados confirman los hallazgos de varios autores que han determinado que existe una correlación directa entre los niveles de IgY depositada en la yema de huevo con los niveles de IgY circulantes en la sangre de la gallina y que la concentración de IgY en la yema es proporcional a la concentración plasmática (Loeken y Roth, 1983; Hamal et al., 2006; Kitagushi et al., 2008; Sun et al., 2013).

Adicionalmente, el hecho de que las variaciones en la concentración de IgY anti-taipán se expresaran con aproximadamente una semana de atraso en la yema de huevo, es coincidente con algunos reportes que indican que los anticuerpos IgY antigéno específicos son transportados del plasma a la yema de huevo con un retraso de 5-6 días (Shade et al., 2005; Davison, 2008).

Exceptuando la semana dos, en las primeras 6 semanas de iniciado el esquema de inmunización (i.e semana 4 y 6), se encontró que la concentración de anticuerpos IgY anti-taipán fue mayor en la yema de huevo en comparación con el plasma en una razón de 1.6-2.1 veces mayor respectivamente. Existe controversia acerca de los niveles de IgY plasmáticos y en la yema de huevo. Algunos autores han reportado que no existe diferencia entre estos, otros han detectado concentraciones más altas en la yema (Shade, 2005), mientras que también existen reportes de niveles más altos en el plasma (Kowalczyk, et al., 1985; Hamal et al., 2006; Kitagushi et al., 2008). Se ha especulado

que estas diferencias y variaciones pueden estar influenciada por factores como las diferencias individuales, variaciones entre razas o líneas genéticas de gallinas, métodos de extracción y purificación de la IgY, métodos de evaluación y más recientemente se ha postulado que estas discrepancias también podrían ser afectadas debido a la existencia de oscilaciones biológicas (i.e ritmos circadianos) que dan origen a fluctuaciones en los niveles de IgY en sangre y en yema (Pauly et al., 2009; He et al., 2014)

A través de un proceso mediado por un receptor presente en la membrana plasmática de los oocitos en desarrollo en el folículo ovárico, las IgY anti-taipán fueron transferidas selectivamente desde la sangre hasta las yemas de los huevos (Murai et al., 2013), alcanzándose una concentración de alrededor (34 ± 3 mg de anticuerpos anti-taipán por huevo).

Por otra parte, encontramos que el plasma de caballos inmunizados con el veneno de *O. scutellatus* tiene una concentración de alrededor de 13 ± 2 mg/mL de anticuerpos anti-taipán, lo que equivale a una concentración unas 5 veces mayor de anticuerpos antivieno en comparación con el valor encontrado en la yema de huevo. Con los datos anteriores puede calcularse que aproximadamente 382 huevos de gallinas inmunizadas son necesarios para obtener un valor equivalente a un litro de plasma equino, en términos de su contenido de anticuerpos anti-taipán. El valor anterior representaría aproximadamente la puesta anual de huevos de una gallina en su valor máximo (365 huevos/año), excluyendo cualquier fluctuación.

De acuerdo con nuestros datos no publicados, un caballo inmunizado con el veneno de *O. scutellatus*, que cada 7 semanas es sometido a sangría (i.e. extracción de 8 L de sangre, durante tres días consecutivos, con autotransfusiones en el segundo y tercer

día) produce aproximadamente 60 L de plasma por año. Comparando los valores de anticuerpos específicos determinados en ambos antivenenos, podemos decir que se necesitaría de al menos 63 gallinas, en su capacidad de puesta máxima (1 huevo/día), para obtener la producción anual de anticuerpos anti-taipán de un sólo caballo.

Tomando en consideración los costos actuales para: a) el cuidado de animales, b) el mantenimiento de las áreas de pastoreo, c) el mantenimiento de la infraestructura requerida para el manejo de animales, d) la compra de los materiales empleados en los procesos de sangría y separación de plasma y e) la compra de los materiales requeridos para la cosecha de los huevos, se calcula que la producción de anticuerpos anti-taipán en Costa Rica sería 40% más barata si se utilizaran gallinas como fuentes de inmunoglobulinas en lugar de caballos. Esto no significa que la producción de AvDG sería 40% más barata que la producción de AvDC, ya que los costos asociados con la purificación de inmunoglobulinas y la formulación de antivenenos son similares, sea que se utilicen gallinas o caballos como fuentes de inmunoglobulinas (datos sin publicar).

Se ha estimado que la concentración de IgY total está entre los 100-200 mg por huevo (Shade et al., 2005), aunque existen reportes de valores inferiores (Pauly et al., 2009) y mayores (McLaren et al., 1994). Lo anterior es dependiente del método de extracción, purificación, la sensibilidad de los ensayos utilizados, las líneas o razas de gallina empleadas, así como oscilaciones biológicas que producen variaciones en los niveles de IgY (Shade et al., 2005; He et al., 2014).

Con base en nuestros hallazgos, sólo el 50 ± 2 % de los anticuerpos IgY anti-taipán fueron recuperados después de la precipitación con ácido caprílico y sulfato de amonio del extracto primario de yemas de huevo. Kitagushi y colaboradores (2008)

reportaron porcentajes de recuperación de IgY similares (i.e 50-60 %), utilizando un método de fraccionamiento y purificación similar al utilizado en el presente estudio. Otros autores, empleando estrategias similares de purificación han reportado diferentes niveles de rendimiento y pureza en la extracción de IgY a partir de la yema de huevo, que pueden ir desde un 12% (McLaren et al., 1994), hasta un 75% de recuperación (Ko y Ahn, 2007). Sin embargo, en estos estudios el rendimiento es determinado con base en la recuperación de IgY total en yema. Es posible que el empleo de otras técnicas de extracción y purificación diferentes a las empleadas en este estudio tengan rendimientos mayores, tal y como lo han reportado otros autores (Hatta et al., 1990; Stalberg y Larsson, 2001; Bizanov y Jonauskiené, 2003; Dong et al., 2008). De todos modos, este rendimiento contrasta con el $72 \pm 2\%$ obtenido durante la purificación de anticuerpos equinos anti-taipán, mediante la precipitación de plasma de caballos inmunizados con el veneno de *O. scutellatus* con ácido caprílico (Registros no publicados del ICP).

Los antivenenos AvDC y AvDG mostraron características fisicoquímicas (i.e. contenido de monómeros y turbidez) similares. Además presentan pureza fisicoquímica similar. Esto significa que ambas formulaciones están constituidas principalmente por inmunoglobulinas, y que ambos métodos de purificación son similares en cuanto a su habilidad para remover proteínas no-inmunoglobulinas contaminantes, aunque es importante tener en cuenta que a diferencia de la purificación de inmunoglobulinas equinas, la purificación de IgY a partir de la yema de huevo requiere un paso de fraccionamiento previo a la purificación con el fin de eliminar la mayor cantidad de lípidos interferentes. Por otro lado, la pureza inmunoquímica del AvDG fue

significativamente menor que la del AvDC, evidenciando que el título de anticuerpos anti-taipán en el plasma equino fue mayor que en los huevos de gallina.

7.2. Perfil de inmunoreactividad y capacidad neutralizante de inmunoglobulinas anti-taipán

El análisis del perfil de inmunoreactividad indicó que el AvDC es capaz de reconocer las proteínas presentes en la mayoría de las fracciones de HPLC del veneno de *O. scutellatus*. La sensibilidad de la técnica empleada no permitió establecer si las fracciones menos abundantes (cadena gama de la taipoxina, oscutarina C y SVMPs) se encontraban presentes en las fracciones reconocidas o no reconocidas por el AvDC. Este perfil de inmunoreactividad es coincidente con el estudio antivenómico previamente reportado por Herrera y colaboradores (2014b) para este mismo antiveneno. De modo consecuente con su perfil de inmunoreactividad, el AvDC fue capaz de neutralizar las actividades coagulante y letal inducidas por el veneno de *O. scutellatus* de PNG. Por otro lado, la sensibilidad de la técnica empleada no permitió determinar si la fracción correspondiente a la oscutarina C fue reconocida o no por el AvDG. La oscutarina C es un activador de protrombina perteneciente al grupo C, que es responsable de la actividad coagulante del veneno de *O. scutellatus* (Speijer et al., 1986). La oscutarina C activa la protrombina y de este modo induce defibrinación, incoagulabilidad de la sangre y en algunos casos el sangrado sistémico (Lalloo et al., 1995a; Trevett et al., 1995). Es posible que la menor eficacia de este antiveneno para neutralizar la actividad coagulante del veneno de *O. scutellatus* en comparación con el AvDC sea debida a una menor capacidad de reconocer esta fracción del veneno.

Aunque a dosis tan altas como 50 μg de veneno las muertes inducidas por el veneno de *O. scutellatus* se deben al efecto trombótico inducido por la oscutarina C, a las dosis empleadas en este estudio para la evaluación de la capacidad neutralizante de la letalidad, las muertes son producidas por el bloqueo neuromuscular inducido por la taipoxina (Herrera et al., 2012). La taipoxina es un trímero de PLA_2 (Fohlman et al., 1976) que ejerce una potente actividad neurotóxica al hidrolizar fosfolípidos en la membrana plasmática de las terminales nerviosas presinápticas (Paoli et al., 2009). Debido a su habilidad de alterar la estructura de la membrana plasmática de las células musculares, la taipoxina también es capaz de inducir miotoxicidad (Harris y Maltin, 1982). El AvDG no fue capaz de reconocer la fracción de HPLC correspondiente a la subunidad α de la taipoxina la cual es la principal responsable de la actividad neurotóxica e hidrolítica de esta PLA_2 (Fohlman et al., 1979; Cendron et al., 2012). Esta podría ser la razón por la que este antiveneno tampoco fue capaz de neutralizar la letalidad inducida por el veneno de *O. scutellatus*.

Una de las pocas fracciones del veneno de *O. scutellatus* que el AvDG logró inmunocapturar en mayor proporción al AvDC fue la correspondiente a las SNTx-1 (Figura 8C y 9C). Las SNTx-1 son alfa neurotoxinas de cadena corta de “tres dedos”, las cuales tienen un bajo peso molecular (menor a los 10 kDa). Lo anterior contrasta con los hallazgos de Madaras y colaboradores (2005), quienes a partir del desarrollo de un antiveneno polivalente para uso veterinario contra el veneno de especies del género *Pseudonaja* spp., formulado a partir de una mezcla de inmunoglobulinas de gallina (IgY) y suero hiperimmune de oveja (IgG), encontraron que las IgY producidas por gallinas eran muy efectivas contra toxinas de peso molecular mayor a 30 kDa, pero mostraban una

respuesta deficiente contra toxinas postsinápticas de bajo peso molecular (Madaras et al., 2005). Aún con estas diferencias encontradas en el perfil de reconocimiento, ellos también determinaron que las IgY no eran capaces de neutralizar la mayoría de toxinas encontradas en el veneno de *Pseudonaja spp.* (Madaras et al., 2005).

El hecho de que las SVMPs se encuentren ausentes tanto en las fracciones unidas como en las no unidas, sugiere la posibilidad de que estas toxinas se unan tan fuertemente a los anticuerpos inmovilizados en las columnas de inmunoafinidad, que no es posible eluirlos con el cambio de pH aplicado. Este argumento ha sido empleado para explicar hallazgos similares con otros venenos y antivenenos (Sánchez et al., 2015).

Las diferencias encontradas en el patrón de inmunoreactividad entre el AvDC y el AvDG no pueden ser explicadas por variaciones individuales en la respuesta hacia el veneno, ya que ambos formulados fueron producidos a partir de una mezcla de yemas de huevo y plasma de 12 gallinas y 4 caballos, respectivamente. De manera alternativa, el hecho de que algunas toxinas del veneno de *O. scutellatus* sean menos inmunogénicas para las gallinas que para los caballos podría deberse a una alteridad diferenciada de las toxinas del veneno, en virtud de la menor distancia filogenética existente entre gallinas y serpientes en comparación a la que hay entre mamíferos (e.g caballos y conejos) y serpientes (Hedges, 1994; Kumar y Hedges, 1998). La hipótesis anterior necesita ser estudiada con mayor profundidad, ya que, aunque la diferencia en el desarrollo filogenético de ambos grupos (aves y mamíferos) es un factor que contribuye a explicar las frecuentemente descritas diferencias en la especificidad de la respuesta de anticuerpos entre mamíferos y gallinas, aún en animales inmunizados de manera idéntica (Shade et al., 2005), esta diferencia ha sido evaluada a partir del uso de proteínas o péptidos

altamente conservados en mamíferos, que han sido utilizados como antígenos y para los cuales las gallinas han presentado una respuesta de anticuerpos más eficiente en comparación con conejos (Carroll y Stollar, 1982; Gassman et al., 1990; Gerl et al., 1996; Matsushita et al., 1998).

En nuestro caso el inmunógeno utilizado es un veneno de serpiente, una diferencia importante, teniendo en cuenta la evolución acelerada característica que existe en las toxinas de los venenos (Li et al., 2005). El proceso de evolución acelerada descrito para las toxinas de los venenos de serpientes, entre ellas las PLA₂ (Li et al., 2005; Kini, 2003), tiene consecuencias en la presencia de distintas isoformas de PLA₂ dentro de un mismo veneno, la diversificación de sus moléculas blanco y la expresión de las diversas actividades farmacológicas (Li et al., 2005).

Tasas de mutación elevadas en los exones de los genes de estas toxinas se expresan en niveles altos de sustitución de residuos de aminoácidos, principalmente los residuos superficiales (Li et al., 2005). Por lo tanto el proceso de evolución acelerada de estas toxinas tiene consecuencias en el proceso de diversificación estructural y funcional de las PLA₂ (Li et al., 2005; Harris y Scott-Davey, 2013), los cuales pueden afectar la inmunogenicidad de estas toxinas y por ende tener implicaciones en el desarrollo y efectividad de los antivenenos producidos contra estas (Harris y Scott-Davey, 2013). El fenómeno anterior es un factor importante a considerar en términos de la inmunogenicidad que las toxinas del veneno de taipán puedan desarrollar en gallinas dada la menor distancia filogenética existente entre aves y serpientes en comparación a la que hay entre este último grupo y caballos.

7.3. Farmacocinética e inmunogenicidad de inmunoglobulinas anti-taipán

Luego de la administración intravenosa las inmunoglobulinas del antiveneno se distribuyen en el compartimento central (i.e. el compartimiento formado por la sangre y los tejidos altamente irrigados como corazón, pulmones, bazo y riñones). En pocos minutos, los anticuerpos alcanzan su $C_{n_{max}}$. Luego, la concentración de inmunoglobulinas del antiveneno disminuye bi-exponencialmente, con una fase inicial de declive rápido, influenciada principalmente por la distribución del antiveneno (i.e. paso de los anticuerpos del compartimento central al compartimento periférico o tisular), seguido por una fase terminal más lenta debida principalmente a la eliminación del antiveneno (Gutiérrez et al., 2003).

Mientras circulan en el compartimento central, las inmunoglobulinas heterólogas son expuestas al reconocimiento por parte del sistema inmune del animal que recibe el antiveneno, estimulándolo a producir una respuesta inmunológica contra sus inmunoglobulinas. Debido a que la distancia filogenética entre conejos y caballos es menor a la existente entre conejos y gallinas, es de esperarse que en los conejos, las IgY tengan un grado de alteridad mayor que el de las IgG equinas. Por lo tanto no es de extrañar que aunque las inmunoglobulinas equinas son inmunogénicas en los conejos (Vázquez et al., 2010), son menos inmunogénicas que las inmunoglobulinas de gallina (Díaz et al., 2014). La diferencia en el grado de alteridad ha sido señalada como responsable de que las inmunoglobulinas heterólogas sean eliminadas más rápidamente que las homólogas (Smolens et al., 1961; Rojas et al., 2013). De un modo similar, podría argumentarse que las diferencias en la alteridad entre la IgY y la IgG equina podría ser un

componente importante de las diferencias farmacocinéticas entre los antivenenos AvDG y AvDC (Vásquez et al., 2010; Díaz et al., 2014).

Debido a que en conejos la inmunogenicidad de las IgY es mayor que la de las IgG equinas (Vásquez et al., 2014) es probable que en humanos los AvDGs induzcan reacciones adversas tardías más severas y con mayor frecuencia que los AvDCs (Sevcik et al., 2008; León et al., 2013; Díaz et al., 2014). Además, la demostración de que en el plasma humano normal hay mayor concentración de anticuerpos heterofilicos contra las IgYs que contra las IgGs de origen equino (Sevcik et al., 2008) sugiere que los AvDG podrían inducir en humanos una incidencia de reacciones tempranas más alta que la inducida por AvDC (Sevcik et al., 2008; Díaz et al., 2014). Sin embargo, existe evidencia previa que no apoya la relación entre la concentración de anticuerpos heterofilicos con la seguridad de los antivenenos ofídicos (Herrera et al., 2005; León et al., 2008).

8. CONCLUSIONES:

La inmunización de gallinas con el veneno de *O. scutellatus* es capaz de despertar una respuesta de anticuerpos específica, similar a la que se produce en equinos, en cuanto a la cinética de formación de anticuerpos. Los anticuerpos específicos son transferidos a la yema de huevo, donde pueden ser detectados, extraídos y purificados. La producción de anticuerpos anti-taipán puede llegar a ser hasta un 40% más barata si se emplea huevos de gallinas inmunizadas, en lugar de caballos, como fuente de anticuerpos.

En comparación con el AvDC, el AvDG presenta una menor eficacia para reconocer y neutralizar a algunas de las toxinas más relevantes del veneno de taipán. Es posible que la diferencia de la inmunogenicidad del veneno de taipán en gallinas y caballos se encuentre relacionada con las diferencias en las distancias filogenéticas entre esas especies. Esta hipótesis requiere ser estudiada en mayor detalle empleando otros venenos como antígenos, evaluando a detalle el perfil de inmunoreactividad contra los distintos componentes del veneno, además de determinar la capacidad neutralizante de los antivenenos formulados, de modo que pueda establecerse si los hallazgos de este trabajo son excepcionales o constituyen una tendencia general.

Por otro lado, la IgY fue más inmunogénica en conejos que la IgG equina. Este resultado es esperable debido a que la distancia filogenética que hay entre gallinas y conejos es mayor que la que hay entre caballos y conejos. Estos resultados sugieren que durante el tratamiento antiofídico de pacientes humanos envenenados, los AvDG podrían inducir una incidencia de reacciones adversas más alta que la inducida por los AvDCs. Además, es posible que la mayor inmunogenicidad de la IgY propiciara que el AvDG fuera aclarado más rápidamente que el AvDC.

En resumen, la inmunogenicidad del veneno de taipán se ve influenciada por la distancia filogenética entre esta serpiente y los caballos o gallinas empleadas como fuente de inmunoglobulinas para la producción de antivenenos. Similarmente, la inmunogenicidad de un antiveneno administrado en un modelo leporino varía dependiendo de si las inmunoglobulinas heterólogas provienen de caballos o gallinas.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

9.1. Establecer las características del patrón de inmunoreactividad de otros antivenenos producidos en gallinas haciendo uso de otros venenos como antígenos, con el fin de determinar si los hallazgos encontrados en el presente estudio con respecto al perfil de inmunoreactividad, capacidad neutralizante del veneno, farmacocinética e inmunogenicidad, fueron excepcionales o pueden constituir un patrón de comportamiento.

9.2. El uso de inmunoglobulinas de gallinas como una potencial fuente para producir antivenenos de aplicación terapéutica, ya sea para uso animal y humano, debe ser analizado y estudiado a mayor profundidad. Se deben tomar en cuenta aspectos que vayan más de allá de capacidad de producir una respuesta de anticuerpos, neutralizar a nivel experimental las actividades fármacológicas de los distintos venenos, elementos que ya han sido experimentalmente comprobados por varios autores desde hace ya varias décadas. Se debe explorar a profundidad las implicaciones que tiene la distancia filogenética que hay entre aves y serpientes en el perfil de reconocimiento y especificidad contra las principales toxinas del veneno, así como las implicaciones que esta diferencia pueda tener desde el punto de vista del posible uso terapéutico de las inmunoglobulinas de gallina, ya sea en la generación de reacciones adversas tanto tempranas como tardías, y en los procesos farmacocinéticos y farmacodinámicos.

9.3. Determinar el efecto que tiene la reducida o menor flexibilidad de la IgY en comparación con la IgG de mamíferos en el patrón de reconocimiento antigénico de esta molécula durante el proceso de la respuesta inmune. Lo anterior es importante pues

podría ser un factor que pueda tener un impacto importante en el perfil de reconocimiento de las distintas toxinas de los veneno serpientes, más allá del que pueda tener la distancia filogenética existente entre estos grupos de estudio.

10. BIBLIOGRAFÍA

Akita, E. M., y S. Nakai., 1992. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *J Food Sci.* 57, 629-634.

Aguilar, I., Sánchez, E.E., Girón, M.E., Estrella, A., Guerrero, B., Rodríguez-Acosta, F.A., 2014. Coral snake antivenom produced in chickens (*Gallus domesticus*). *Rev Inst Med Trop o Paulo* 56, 61-66.

Angulo, Y., Estrada, R., Gutiérrez, J.M., 1997a. Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (Crotaline) antivenom. *Toxicon* 35, 81-90.

Angulo, Y., Estrada, R., Gutiérrez, J.M., 1997b. Effects of bleeding in horses immunized with snake venoms for antivenom production. *Rev Biol Trop.* 45, 1215-1221.

Araújo, A.S., Lobato, Z.I., Chávez-Olórtegui, C., Velarde, D.T., 2010. Brazilian IgY-*Bothrops* antivenom: studies on the development of a process in chicken egg yolk. *Toxicon* 55, 739-744.

Arjamaa, O., Talo, A., 1983. Smooth muscle of the quail oviduct functions as a stretch receptor during ovum transport. *Biol Reprod.* 29, 472-478.

Bellairs, R., 1965. The relationship between oöcyte and follicle in the hen's ovary as shown by electron microscopy. *J Embryol Exp Morphol.* 13, 215-233.

Benson, H.N., Brumfield, H.P., Pomeroy, B.S., 1961. Requirement of avian C'1 for fixation of guinea pig complement by avian antibody-antigen complexes. *J Immunol.* 87, 616-622.

Bizanov, G., Jonauskiené, I., 2003. Production and purification of IgY from egg yolk after immunization of hens with pig IgG. *Bull Vet Inst Pulawy* 47, 403-410.

Brian, M. J., y Vince, J.D., 1987. Treatment and outcome of venomous snake bite in children, Port Moresby General Hospital, Papua New Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 81, 850-852.

Broad, A.J., Sutherland, S.K., Coulter, A.R., 1979. The lethality in mice of dangerous Australian and other snake venom. *Toxicon* 17, 661-664.

Brown, A.M., Yatani, A., Lacerda, A.E., Gurrola, G.B., Possani, L.D., 1987. Neurotoxins that act selectively on voltage-dependent cardiac calcium channels. *Circ Res.* 61, Suppl. I, 6-9.

Campbell, C. H., 1967. The taipan and the effect of its bite. *Med J Aust.* 15, 735-738.

Carroll, S.B., Stollar, D., 1982. Antibodies to calf thymus RNA polymerase II from egg yolks of Immunized hens. *J Biol Chem.* 258, 24-26.

Carroll, S.B., Thalley, B.S., Theakston, R.D., Laing, G., 1992. Comparison of the purity and efficacy of affinity purified avian antivenoms with commercial equine crotalid antivenoms. *Toxicon* 30, 1017-1025.

Cendron, L., Micetic, I., Polverino, P., Paoli, M., 2012. Structural analysis of trimeric phospholipase A2 neurotoxin from the Australian taipan snake venom. *FEBS J.* 279, 3121-3135.

Chalghoumi, R., Beckers, Y., Portetelle, D., Théwis, A., 2009. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. *Biotechnol Agron Soc Environ.* 13, 295-308.

Council of International Organizations of Medical Sciences (CIOMS), 1985. *The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals.*

Cruz, L. S., Vargas, R. y Lopes, A.A., 2009. Snakebite envenomation and death in the developing world. *Ethn Dis.* 19, 41-46.

Currie, B. J., Sutherland, S.K., Hudson, B.J., y Smith, A.M., 1991. An epidemiological study of snake bite envenomation in PNG. *Med J Aust.* 154, 266-268

Currie, B. J., 2000. Snake bite in tropical Australia, Papua Nueva Guinea e Irian Jaya. *Emerg Med Australas.* 12, 285-294.

da Silva, W. D., Tambourgi, D.V., 2010. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol.* 135, 173-180.

da Silva, W.D., Tambourgi, D.V., 2011. The humoral immune response induced by snake venom toxins. *Inflamm Allergy Drug Targets* 10, 343-357.

Davison, F., Magor, K.E., Kaspers, B., 2008. Structure and function of avian immunoglobulins. ISBN: 978-0-12-370634-8, In: Davison, F., Kaspers, B., Schat, K.A., editors. *Avian immunology* (pp 107-127). London, United Kingdom: Elsevier.

de Almeida, C.M., Kanashiro, M.M., Rangel, F.B., Mata, M.F., Kipnis, T.L., da Silva, W.D., 1998. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. *Vet Rec.* 143, 579-584.

de Almeida, C.M., da Silva, C.L., Couto, H.P., Escocard, R.C., da Rocha, D.G., Sentinelli, L.P., Kipnis, T.L., da Silva, W.D., 2008. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. *Toxicon* 52, 293-301.

de Andrade, F.G., Eto, S.F., dos Santos-Ferraro, A.C.N., Marioto, D.T.G., Vieira, N.J., Cheirubim, A.P., Ramos, S. P., Venâncio, E.J., 2013. The production and characterization

of anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies in laying hens: A long term experiment. *Toxicon* 66, 18-24.

Devi, C. M., Bai, M.V., Krishnan, L.K., 2002. Development of viper-venom antibodies in chicken egg yolk and assay of their antigen binding capacity. *Toxicon* 40, 857-861.

Díaz, P., Malavé, C., Zerpa, N., Vázquez, H., D'Suze, G., Montero, Y., Castillo, C., Alagón, A., Sevcik, C., 2014. IgY pharmacokinetics in rabbits: implications for IgY use as antivenoms. *Toxicon* 90, 124-133.

Dong, D., Liu, H., Xiao, Q., Li, R., 2008. Affinity purification of egg yolk immunoglobulins (IgY) with a stable synthetic ligand. *J Chromatogr B*. 870, 51-54.

Doorty, K.B., Bevan, S., Wadsworth, J.D.F., Strong, P.N., 1997. A novel small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel blocker from *Oxyuranus scutellatus* taipan venom: Re-evaluation of taicatoxin as a selective Ca^{2+} channel probe. *J Biol Chem*. 272, 19925-19930.

Doughty, P., Maryan, B., Donnellan, S.C., Hutchinson, M.N., 2007. A new species of taipan (Elapidae: *Oxyuranus*) from central Australia. *Zootaxa* 1422, 45-58.

Earl, S.T.H., Robson, J., Trabi, M., de Jersey, J., Masci, P.P., Lavin, M.F., 2011. Characterisation of mannose-binding C-type lectin from *Oxyuranus scutellatus* snake venom. *Biochimie* 93, 519-527.

Fernandes, I., Takehara, H.A., Mota, I., 1991. Isolation of IgGT from hyperimmune horse anti-snake venom serum: its protective ability. *Toxicon* 29, 1373-1379

Fernandes, I., Takehara, H.A., Santos, A.C., Cormont, F., Latinne, D., Barzin, H., Mota, I., 1997. Neutralizing of bothropic and crotalic venom toxic activities by IgG(T) and IgGa subclasses isolated from immune horse serum. *Toxicon* 35, 931-936.

Fernandes, I., Tavares, F.L., Sano-Martins, I.S., Takehara, H.A., 2000. Efficacy of bothropic antivenom and its IgG (T) fraction in restoring fibrinogen levels of *Bothrops jararaca* envenomed mice. *Toxicon* 38, 995-998.

Finney, D. J., 1971: Probit analysis. 3d ed., Cambridge University Press

Fleischer, B., 1981. The avian immune system. *Immunol Today* 2, 195-200.

Fohlman, J., Eaker, D., Karlsson, E., Thesleff, S., 1976. Taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian snake taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*). Isolation, characterization, quaternary structure and pharmacological properties. *Eur J Biochem.* 68, 457-469.

Fohlman, J., Lind, P., Eaker, D., 1977. Taipoxin, an extremely potent presynaptic snake venom neurotoxin. Elucidation of the primary structure of the acidic carbohydrate-containing taipoxin subunit, a phospholipase homolog. FEBS Lett. 84, 367-371.

Fohlman, J., Eaker, D., Dowdall, M.J., Lüllmann-Rauch, R., Sjödin, T., Leander, S., 1979. Chemical modification of taipoxin and the consequences for phospholipase activity, pathophysiology, and inhibition of high-affinity choline uptake. Eur J Biochem. 94, 531-540.

Fossier, P., Lambeau, G., Lazdunski, M., Baux, G., 1995. Inhibition of ACh release at an *Aplysia synapse* by neurotoxic phospholipases A2: Specific receptors and mechanisms of action. J Physiol. 489, 29-40.

Fry, B. G., 1999. Structure-function properties of venom components from Australian elapids. Toxicon 37, 11-32.

Gassmann, M., Thömmes, P., Weiser, T., Hübscher, U., 1990. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. FASEB J. 4, 2528-2532.

Gerl, M., Steinert, C., Quint, M., Schade, R., Günzler, V., 1996. Immunisation of chickens with the aminoterminal propeptide of bovine procollagen type III. ALTEX 3, Suppl. 1, 51-56.

Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.N., 1949. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J Biol Chem.* 177, 751-766.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 2013. Phospholipases A2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon* 62, 27-39.

Gutiérrez, J. M., Chaves, F., Cerdas, L., 1986. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. *Rev Biol Trop.* 34, 209-219.

Gutiérrez, J.M., León, G., Lomonte, B. 2003. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. *Clin Pharmacokinet.* 42, 721-741.

Gutiérrez, J. M., Theakston, R.D.G., Warrell, D.A., 2006. Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership. *PLoS Med.* 3, e150.

Gutiérrez, J.M., León, G., Lomonte, B., Angulo, Y., 2011. Antivenoms for snakebite envenomings. *Inflamm Allergy Drug Targets* 10, 369-380.

Haditsch, M., 2009. Management of snake bites in the tropics-Based on the example of Papua New Guinea. *Wien Klin Wochenschr.* 121, 53-56.

Hamal, K.R., Burgess, S.C., Pevzner, I.Y., Erf, G.F., 2006. Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. *Poult Sci.* 85, 1364-1372.

Harris, J.B., Maltin, C.A., 1982. Myotoxic activity of the crude venom and the principal neurotoxin, taipoxin, of the Australian taipan, *Oxyuranus scutellatus*. *Br J Pharmacol.* 76, 61-75.

Harris, J.B., Scott-Davey, T., 2013. Secreted phospholipases A2 of snake venoms: Effects on the peripheral neuromuscular system with comments on the role of phospholipase A2 in disorders of the CNS and their uses in industry. *Toxins* 2013, 2533-2571.

Hatta, H., Kim, M., Yamamoto, T., 1990. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". *Agric Biol Chem.* 54, 2531-2535.

He, J.X., Thirumalai, D., Shade, R., Zhang, X.Y., 2014. Chronobiological studies of chicken IgY: Monitoring infradian, circadian and ultradian rhythms of IgY in blood and yolk of chickens. *Vet Immunol Immunopathol.* 160, 266-272.

Hedges, S.B., 1994. Molecular evidence for the origin of birds. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91, 2621-2624.

Herrera, M., León, G., Segura, A., Meneses, F., Lomonte, B., Chippaux, J.P., Gutiérrez, J.M., 2005. Factors associated with adverse reactions induced by caprylic acid-fractionated whole IgG preparations: comparison between horse, sheep and camel IgGs. *Toxicon* 46, 775-781.

Herrera, M., Fernández, J., Vargas, M., Villalta, M., Segura, A., León, G., Angulo, Y., Paiva, O., Matainaho, T., Jensen, S.D., Winkel, K.D., Calvete, J.J., Williams, D.J., Gutiérrez, J.M., 2012. Comparative proteomic analysis of the venom of the taipan snake, *Oxyuranus scutellatus*, from Papua New Guinea and Australia: role of neurotoxic and procoagulant effects in venom toxicity. *J Proteomics* 75, 2128-2140.

Herrera, M., Tattini, V., Pitombo, R., Gutiérrez, J.M., Borgognoni, C., Vega-Baudrit, J., Solera, F., Cerdas, M., Segura, A., Villalta, M., Vargas, M., León, G., 2014a. Freeze-dried snake antivenoms formulated with sorbitol, sucrose or mannitol: Comparison of their stability in an accelerated test. *Toxicon* 90, 56-63.

Herrera, M., Paiva, O.K., Pagotto, A.H., Segura, A., Serrano, S.M., Vargas, M., Villalta, M., Jensen, S.D., León, G., Williams, D.J., Gutiérrez, J.M., 2014b. Antivenomic characterization of two antivenoms against the venom of the taipan, *Oxyuranus scutellatus*, from Papua New Guinea and Australia. *Am J Trop Med Hyg.* 91, 887-894.

Hodgson, W.C., Wickramaratna, J.C., 2002. *In vitro* neuromuscular activity of snake venoms. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 29, 807-14.

Hudson, B.J., Pomat, K., 1988. Ten years of snake bite in Madang Province, Papua New Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 82, 506-508.

Karalliedde, L., 1995. Animal toxins. *Br J Anaesth.* 74, 319-327

Kasturiratne, A., A. R. Wickremasinghe, N. de Silva, N. K. Gunawardena, A. Pathmeswaran, R. Premaratna, L. Savioli, D. G. Lalloo, and H. J. de Silva. 2008. The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med.* 5, e218.

Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M., Altman, D.G., 2010. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE Guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 8, e1000412.

Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A., 2007. Antigenos y anticuerpos. ISBN 13: 978-1-4292-0211-4, En: Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A. *Inmunología de Kuby* (pp 76-110), sexta edición. México, D.F., México: McGraw-Hill.

Kini, R.M., 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon* 42, 827-840.

Kini, R.M., 2005. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 34, 200-204.

Kini, R.M., Rao, V.S., Joseph, J.S., 2001. Procoagulant proteins from snake venoms. *Haemostasis* 31, 218-224.

Kitaguchi, K., Minoura, M., Noritake, M., Mizutani, M., Kinoshita, K., Horio, F., Murai, A., 2008. Determination of immunoglobulin Y concentration in yolk prepared by water dilution method: Comparisons among three strains of chickens. *J Poult Sci.* 45, 82-87.

Ko, K.Y., Ahn, D.U., 2007. Preparation of immunoglobulin Y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. *Poult Sci.* 86, 400-407.

Kowalczyk, K., Daiss, J., Halpern, J., Roth, T.F., 1985. Quantification of maternal-fetal IgG transport in the chicken. *Immunology* 54, 755-762.

Kumar, S., Hedges, B., 1998. A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature* 392, 917-920.

Kuruppu, S., Reeve, S., Banerjee, Y., Kini, R.M., Smith, A.I., Hodgson, W.C., 2005. Isolation and pharmacological characterization of cannitoxin, a presynaptic neurotoxin from the venom of the Papuan Taipan (*Oxyuranus scutellatus canni*). *J Pharmacol Exp Ther.* 315, 1196-1202.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Laloo, D.G., Trevett, A.J., Saweri, A., Naraqi, S., Theakston, R.D., Warrell, D.A., 1995a. The epidemiology of snake bite in Central Province and National Capital District, Papua New Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 89, 178-182.

Laloo, D.G., Trevett, A.J., Korinhona, A., Nwokolo, N., Laurenson, I.F., Paul, M., Black, J., Naraqi, S., Mavo, B., Saweri, A., Hutton, R.A., Theakston, R.D.G., Warrell, D.A., 1995b. Snake bites by the Papuan taipan (*Oxyuranus scutellatus canni*): paralysis, hemostatic and electrocardiographic abnormalities, and effects of antivenom. *Am J Trop Med Hyg.* 52, 525-531.

Laloo, D.G., Trevett, A.J., Owens, D., Minei, J., Naraqi, S., Saweri, A., Hutton, R.A., Theakston, R.D., Warrell, D.A., 1995c. Coagulopathy following bites by the Papuan taipan (*Oxyuranus scutellatus canni*). *Blood Coagul Fibrinolysis* 6, 65-72.

Laloo, D.G., Theakston, R.D., 2003. Snake antivenoms. *J Toxicol Clin Toxicol.* 41, 277-290.

Lambeau, G., Barhanin, J., Schweitz, H., Qar, J., M. Lazdunski, M., 1989. Properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom. *J Biol Chem.* 264, 1503-1510.

Lambeau, G., Schmid-Alliana, A., Lazdunski, M., Barhanin, J., 1990. Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A2 in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 265, 9526-9532.

Lambeau, G., Barhanin, J., Lazdunski, M., 1991. Identification of different receptor types for toxic phospholipases A2 in rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett.* 293, 29-33.

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 Methods* 156, 79-83.

Larsson, A., Balow, R.M., Lindahl, T.L., Forsberg, P.O., 1993. Chicken antibodies: Taking advantage of evolution. A review. *Poult Sci.* 72, 1807-1812.

León, G., Estrada, R., Chaves, F., Rojas, G., Ovadia, M., Gutiérrez, J.M., 1998. Inhibition by CaNa₂EDTA of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom: Application in horse immunization for antivenom production. *Toxicon* 36, 321-331.

León, G., Segura, A., Herrera, M., Otero, R., França, F.O.S., Barbaro, K.C., Cardoso, J. L.C., Wen, F.H., Medeiros, C.R. Lopes, J.C., Malaque, C.M., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., 2008. Human heterophilic antibodies against equine immunoglobulins: Assessment of their role in the early adverse reactions to antivenom administration. *Trans R Soc Trop Med. Hyg.* 102, 1115-1119.

León, G., Sánchez, L., Hernández, A., Villalta, M., Herrera, M., Segura, A., Estrada, R., Gutiérrez, J.M., 2011. Immune response towards snake venoms. *Inflamm Allergy Drug Targets* 10, 381-398.

León, G., Herrera, M., Segura, Á., Villalta, M., Vargas, M., Gutiérrez, J.M., 2013. Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. *Toxicon* 76, 63-76.

Li, M., Fry, B.G., Kini, M., 2005. Putting the brakes on snake venom evolution: The unique molecular evolutionary pattern of *Aipysurus eydouxii* (Marbled sea snake) phospholipase A₂ toxins. *Mol Biol Evol.* 22, 934-941.

Lind, P., Eaker, D., 1982. Amino-acid sequence of the β -subunit of taipoxin, an extremely potent presynaptic neurotoxin from the Australian snake Taipan (*Oxyuranus s. scutellatus*). *Eur J Biochem.* 124, 441-447.

Lindahl, T., Festin, R., Larsson, A., 1992. Studies of fibrinogen binding to platelets by flow cytometry: An improved method for studies of platelet activation. *Thromb Haemost.* 68, 221-225.

Loeken, M.R., Roth, T.F., 1983. Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte. *Immunology* 49, 21-28.

Lomonte, B., A. Tarkowski, and L. A. Hanson. 1993. Host response to *Bothrops asper* snake venom. *Inflammation* 17, 93-105.

Lu, Q., J. M. Clemetson, and K. J. Clemetson. 2005. Snake venoms and hemostasis. *J. Thromb Haemost.* 3, 1791-1799.

Lumsden, J.H., Valli, V.E.O., McSherry, B.J., 1975. The hematological response to hemorrhagic anemia in the standardbred horse. In: Krehbiel, J.D. (Ed.), *Proceedings of the First International Symposium on Equine Hematology of the American Association of Equine Practitioners*. American Association of Equine Practitioners, East Lansing, pp. 356-361.

Lynch, V., 2007. Inventing an arsenal: adaptive evolution and neofunctionalization of snake venom phospholipase A2 genes. *BMC Evol Biol.* 7, 2.

Madaras, F., Mirtschin, P., Kuchel, T., 2005. Antivenom development in Australia. *Toxin Rev.* 24, 79-94.

Magdesian, K.G., Brook, M.S., Wickler, S.J., 1992. Temporal effects of plasmapheresis on serum proteins in horses. *Am J Vet Res.* 53, 1149-1153.

Malikides, N., Hodgson, J.L., Rose, R.J., Hodgson, D.R., 2001. Cardiovascular, haematological and biochemical responses after large volume blood collection in horses. *Vet J.* 162, 44-55.

Matsushita, K., Horiuchi, H., Furusawa, S., Horiuchi, M., Shinagawa, M., Matsuda, H., 1998. Chicken monoclonal antibodies against synthetic bovine prion protein peptide. *J Vet Med Sci.* 60, 777-779.

Maya, D.C, Vasantha, B.M., Krishnan L.K., 2002. Development of viper-venom antibodies in chicken egg yolk and assay of their antigen binding capacity. *Toxicon* 40, 857-861.

McGain, F., Limbo, A., Williams, D., Didei, G., Winkel, K.D., 2004. Snakebite mortality at Port Moresby General Hospital, Papua New Guinea, 1992-2001. *Med J Aust.* 181, 687-691.

McLaren, R.D., Prosser, C.G., Grieve, R.C.J., Borissenko, M., 1994. The use of caprylic acid for the extraction of the immunoglobulin fraction from egg yolk of chickens immunised with ovine α -lactalbumin. *J Immunol Methods* 177, 175-184.

Meenatchisundaram, S., Parameswari, G., Michael, A., Ramalingam, S., 2008a. Studies on pharmacological effects of Russell's viper and Saw-scaled viper venom and its neutralization by chicken egg yolk antibodies. *Int Immunopharmacol.* 8, 1067-1073.

Meenatchisundaram, S., Parameswari, G., Michael, A., Ramalingam, S., 2008b. Neutralization of the pharmacological effects of Cobra and Krait venoms by chicken egg yolk antibodies. *Toxicon* 52, 221-227.

Meenatchisundaram, S., Selvakumaran, R., Parameswari, G., Michael, A., 2009. Comparison of antivenom potential of chicken egg yolk antibodies generated against bentonite and adjuvant coated venomes of common poisonous snake in India. *Bangl. J. Vet. Med.* 7, 259-267.

Michael, A., Meenatchisundaram, S., Parameswari, G., Subbraj, T., Selvakumaran, R., Ramalingam, S., 2010. Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. *Indian J Sci Technol.* 3, 468-474.

Murai, A., Murota, R., Doi, K., Yoshida, T., Aoyama, H., Kobayashi, M., Horio, F., 2013. Avian IgY is selectively incorporated into the egg yolks of oocytes by discriminating Fc amino acid residues located on the Cu3/Cu4 interface. *Dev Comp Immunol.* 39, 378-387.

Nakagaki, T., Lin, P., Kisiel, W., 1992. Activation of human factor VII by the prothrombin activator from the venom of *Oxyuranus scutellatus* (Taipan snake). *Thromb Res.* 65, 105-116.

Nicholson J, Mirtschin P, Madaras F, Venning M, Kokkinn M (2006) Digestive properties of the venom of the Australian Coastal Taipan, *Oxyuranus scutellatus*, (Peters,

1867). *Toxicon* 48, 422-428.

Oláh, I., Vervelde, L., 2008. Structure of the avian lymphoid system. ISBN: 978-0-12-370634-8. In: Davison, F., Kaspers, B., Schat, K.A., editors. *Avian immunology* (pp 13-50). London, United Kingdom: Elsevier.

Otero-Patiño R., Segura A., Herrera M., Angulo Y., León G., Gutiérrez J.M., Barona J., Núñez V., Estrada S., Pereañez A., Quintana J.C., Vargas L.J., Gómez J.P., Díaz A., Suárez A.M., Fernández J., Ramírez P., Fabra P., Perea M., Fernández D., Arroyo Y., Betancur D., Pupo, L., Córdoba, E.A., Ramírez, C.E., Arrieta, A.B., Rivero, A., Mosquera, D.C., Conrado, N.L., Ortiz, R., 2012. Comparative study on the efficacy and safety of two polyvalent, caprylic acid fractionated IgG and F(ab')₂ antivenoms, in *Bothrops asper* bites in Colombia. *Toxicon* 59, 344-355.

Paoli, M., Rigoni, M., Koster, G., Montecucco, C., Postle, A.D., 2009. Mass spectrometry analysis of the phospholipaseA₂ activity of snake pre-synaptic neurotoxins in cultured neurons. *J Neurochem.* 111, 737-744.

Paul, K., Manjula, J., Deepa, E.P., Selvanayagam, Z.E., Ganesh, K.A., Subba, R.P.V., 2007. Anti-*Echis carinatus* venom antibodies from chicken egg yolk: isolation, purification and neutralization efficacy. *Toxicon* 50, 893-900.

Pauly, D., Dörner, M., Zhang, X., Hlinak, A., Dörner, B., Shade, R., 2009. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over two-year period. *Poult Sci.* 88, 281-290.

Pauly, D., P. A. Chacana, E. G. Calzado, B. Brembs, and R. Schade. 2011. IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation Technology. *J Vis Exp.* 51, e3084.

Pope, C.G., 1939a. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. I. True digestion of the proteins. *Br J Exp Pathol.* 20, 132-149.

Pope, C.G., 1939b. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. II. Heat denaturation after partial enzyme action. *Br J Exp Pathol.* 20, 201-212.

Possani, L.D., Martin, B.M., Yatani, A., Mochca-Morales, J., Zamudio, F.Z., Gurrola, G.B., Brown, A.M., 1992. Isolation and physiological characterization of taicatoxin, a complex toxin with specific effects on calcium channels. *Toxicon* 30, 1343-1364.

Rojas, A., Vargas, M., Ramírez, N., Estrada, R., Segura, A., Herrera, M., Villalta, M., Gómez, A., Gutiérrez, J.M., León, G., 2013. Role of the animal model on the pharmacokinetics of equine-derived antivenoms. *Toxicon* 70, 9-14.

Rojas, G., Jiménez, J.M., Gutiérrez, J.M., 1994. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: Description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon* 32, 351-363.

Rose, M.E., Orlans, E., 1962. Fowl antibody: III. Its haemolytic activity with complements of various species and some properties of fowl complement. *Immunology* 5, 633-641.

Rose, M.E., 1979. The immune system in birds. *J R Soc Med.* 72, 701-704.

Ruan, G. P., Ma, L., He, X.W., Meng, M.J., Zhu, Y., Zhou, M.Q., Hu, Z.M., Wang, X.N., 2005. Efficient production, purification, and application of egg yolk antibodies against human HLA-A*0201 heavy chain and light chain (β 2m). *Protein Expr Purif.* 44, 45-51.

Sajevic, T., Leonardi, A., Križaj I., 2011. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* 57, 627-645.

Sánchez, L.V., Pla, D., Herrerra, M., Chippaux, J.P., Calvete, J.J., Gutiérrez, J.M., 2015. Evaluation of the preclinical efficacy of four antivenoms, distributed in sub-Saharan Africa, to neutralize the venom of the carpet viper, *Echis ocellatus*, from Mali, Cameroon, and Nigeria. *Toxicon* 106, 97-107.

Segura, A., Herrera, M., González, E., Vargas, M., Solano, G., Gutiérrez, J.M., León, G., 2009. Stability of equine IgG antivenoms obtained by caprylic acid precipitation: Towards a liquid formulation stable at tropical room temperature. *Toxicon* 53, 609-615.

Segura, A., Herrera, M., Villalta, M., Vargas, M., Gutiérrez, J.M., León, G., 2013. Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical and immunochemical methods. *Biologicals* 41, 93-97.

Sevcik, C., Díaz, P., D'Suze, G., 2008. On the presence of antibodies against bovine, equine and poultry immunoglobulins in human IgG preparations, and its implications on antivenom production. *Toxicon* 51, 10-16.

Sevcik, C., D'Suze, G., Salazar, V., Díaz, P., Vázquez, H., 2012. Horse IgG- and ostrich IgY- F(ab')₂ groups have different affinities for mice erythrocytes and lymphocytes. Implications for avian immunoglobulin therapeutic usefulness. *Toxicon* 60, 1215-1221.

Schade, R., Calzado, E.G., Sarmiento, R., Chacana, P.A., Porankiewicz-Asplund, J., Terzolo, H.R., 2005. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern Lab Anim.* 33, 129-154.

Sharma, J. M. 1991. Overview of the avian immune system. *Vet Immunol Immunopathol.* 30, 13-17.

Smolens, J., Vogt, A.B., Crawford, M.N., Stokes, J., 1961. The persistence in the human circulation of horse and human tetanus antitoxins. *J Pediatr.* 59, 899-902.

Speijer, H., Govers-Riemslog, J.W., Zwaal, R.F., Rosing, J., 1986. Prothrombin activation by an activator from the venom of *Oxyuranus scutellatus* (Taipan snake). *J Biol Chem.* 261, 13258-13267.

Squaiella-Baptistão, C.C., Marcelino, J.R., da Cunha, L.E.R., Gutiérrez, J.M., Tambourgi, D.V., 2014. Anticomplementary activity of horse IgG and F(ab')₂ antivenoms. *Am J Trop Med Hyg.* 90, 574-584.

Stalberg, J., Larsson, A., 2001. Extraction of IgY from egg yolk using a novel aqueous two-phase system and comparison with other extraction methods. *Ups J Med Sci.* 106, 99-110.

Sun, H., Chen, S., Cai, X., Xu, G., Qu, L., 2013. Correlation analysis of the total IgY level in hen serum, egg yolk and offspring serum. *J Anim Sci Biotechnol.* 4, 1-4.

Theakston, R.D., Warrell, D.A., Griffiths, E., 2003. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon* 41, 541-557.

Tizard, I., 2002. The avian antibody response. *Sem Avian Exotic Pet Med.* 11, 2-14

Trevett, A.J., Lalloo, D.G., Nwokolo, N.C., Naraq, S., Kevau, I.H., Theakston, R.D.G., Warrell, D.A., 1995. The efficacy of antivenom in the treatment of bites by the Papuan taipan (*Oxyuranus scutellatus canni*). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 89, 322-325.

United States Department of Agriculture (USDA), 2000. Structure, composition, and formation of the egg, In: Egg-grading manual [en línea]. Agricultural Handbook Number 75. Washington, DC, USA, pp 11-14. Disponible en: <http://www.ams.usda.gov>.

Vargas, M., Segura, A., Herrera, M., Villalta, M., Estrada, R., Cerdas, M., Paiva, O., Maitainaho, T., Jensen, S.D., Winkel, K.D., León, G., Gutiérrez, J.M., Williams, D.J., 2011. Preclinical evaluation of caprylic acid-fractionated IgG antivenom for the treatment of Taipan (*Oxyuranus scutellatus*) envenoming in Papua New Guinea. *PLoS Negl Trop Dis.* 5, e1144.

Vázquez, H., Olvera, F., Paniagua-Solís, J., Alagón, A., Sevcik, C., 2010. Pharmacokinetics in rabbits and anti-sphingomyelinase D neutralizing power of Fab, F(ab')₂, IgG and IgG(T) fragments from hyper immune equine plasma. *Int Immunopharmacol.* 10, 447-454.

Wagner, B. 2006. Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse. *Dev Comp Immunol.* 30, 155-164.

Warr, G.W., Magor, K.E., Higgins, D.A., 1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today* 16, 392-398.

Williams, D.J., Bal, B., 2003. Papuan taipan (*Oxyuranus scutellatus canni*) envenomation in rural PNG. *Annals of the ACTM* 4, 6-9.

Williams, D. 2005a. Snakebite in Papua New Guinea. ISBN 0-975937-0-5, In: Williams DJ, Jensen SD, Nimorakiotakis B, Winkel KD, editors. *Venomous bites and stings in Papua New Guinea: a treatment guide for health workers and doctors*. Melbourne, Australia: AVRU, University of Melbourne; 1.1-1.24.

Williams, D. 2005b. Snakes of Papua New Guinea. ISBN 0-975937-0-5, In: Williams DJ, Jensen SD, Nimorakiotakis B, Winkel KD, editors. *Venomous bites and stings in Papua New Guinea: a treatment guide for health workers and doctors*. Melbourne, Australia: AVRU, University of Melbourne; 2.1-2.23.

Williams, D., Winkel, K.D., 2005. Snakebite epidemiology in Papua New Guinea. *Annals of the ACTM* 6, 19-23.

Williams, S.S., Wijesinghe, C.A., Jayamanne, S.F., Buckley, N.A., Dawson, A.H., Lalloo, D.G., de Silva, J.H., 2011. Delayed psychological morbidity associated with snakebite envenoming. *PLoS Negl Trop Dis.* 5, e1255.

World Health Organization (WHO), 2010. WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. World Health Organization, Geneva.

Wüster, W., Dumbrell, A.J., Hay, C., Pook, C.E., Williams, D.J., Fry, B.G., 2005. Snakes across the Strait: trans-Torresian phylogeographic relationships in three genera of Australasian snakes (Serpentes: Elapidae: *Acanthophis*, *Oxyuranus*, and *Pseudechis*). *Mol Phylogenet Evol.* 34, 1-14.

Zamudio, F., Wolf, K.M., Martin, B.M., Possani, L.D., Chiappinelli, V.A., 1996. Two novel alpha-neurotoxins isolated from the taipan snake, *Oxyuranus scutellatus*, exhibit reduced affinity for nicotinic acetylcholine receptors in brain and skeletal muscle. *Biochemistry* 35, 7910-7916.

Zolfagharian, H., Dounighi, N.M., 2015. Study on development of *Vipera lebetina* snake antivenom in chicken egg yolk for passive immunization. *Hum Vaccin Immunother.* En prensa.

Anexo A

Acta de la sesión ordinaria N° 124 del CICUA de la Universidad de Costa Rica



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

Comité Institucional del Cuido
y Uso de Animales

COMITÉ INSTITUCIONAL DEL CUIDO Y USO DE ANIMALES
(CICUA)

ACTA DE LA SESIÓN ORDINARIA N° 124
Celebrada el Jueves 28 de junio del 2012

TABLA DE CONTENIDO

ARTÍCULO	PÁGINA
1- Lectura y Aprobación del acta 123.....	5
2- Producción de antivenenos ofídicos en gallinas”.....	5
3- “Determinación de efecto oxidativo/antioxidativo de la terapia de reemplazo hormonal con Drospirenona en un modelo de rata ooforectomizada: un estudio prospectivo randomizado”.....	5
4- “Coloides basados en hidroxipariras modificadas como adyuvantes en la producción de suero anti-abeja (<i>Apis mellifera</i>)”.....	5
5- “Caracterización de la actividad hialuronidasa del veneno de la serpiente <i>Bothrops asper</i> . Papel en la patología local y análisis de la actividad inhibitoria de las plantas <i>Vernonia patens</i> , <i>Buddleja americana</i> , <i>Phenax rugosus</i> y <i>Phenax angustifolius</i> ”.....	6
6- “Ecología, comportamiento y amenazas a la toboba de árbol <i>Bothriechis nigroviridis</i> (Serpentes: Viperidae) en Costa Rica”.....	6
7- “Identificación de iniciadores microsatélites para las tortugas de agua dulce y las tortugas terrestres de Costa Rica”.....	6
8- “Cuantificación en suero de los niveles de IL-4, IL-2 y TNF alfa en el modelo de inmuno supresión causado por <i>Trypanosoma lewisi</i> en la rata blanca durante la infección por <i>Toxoplasma gondii</i> ”.....	6
9- “Diagnóstico de la presencia de cepas resistentes a antibióticos en el tracto respiratorio de cerdos en granjas comerciales”.....	7
10- Revisión del proyecto “Caracterización de los niveles de Selenio en sangre, leche y orina de vacas Jersey en pastoreo en tres zonas lecheras de Costa Rica”.....	7

11- Revisión del proyecto: "Prevalencia de cetosis clínica y subclínica en un hato de vacas Holstein en pastoreo y su relación con el número de parto, longitud del periodo seco, pico de lactancia y calificación de condición corporal".....	7
12- Revisión del proyecto: "Determinación de valores de referencia hematológicos y bioquímicos de las serpientes <i>Crotalus simus</i> y <i>Bothrops asper</i> en condición de cautiverio".....	7
13- Revisión del proyecto: "Validación 'in vitro' de la técnica de bipartición de embriones bovinos en la Unidad de Reproducción Animal"	8
14- Revisión del proyecto: "Anatomía cerebral de las hormigas parásitas, facultativas y mutualistas del cornizuelo (<i>Acacia Fabaceae: Mimosoidae</i>)".....	8
15- Revisión del proyecto: "Estudio morfológico ultraestructural de las setas de las patas de arañas de la subfamilia <i>Hadrotarsinae</i> (<i>Araneae, Theridiidae</i>) y su función".....	8
16- Revisión del proyecto: "Diversidad de ácaros en plumas de reinitas (<i>Parulidae</i>) migratorias y residentes".....	8
17- Revisión del proyecto: "Evaluación andrológica y del desempeño reproductivo de conejos para producción de carne y como mascota".....	8
18- Revisión del proyecto: "Detección y caracterización de coronavirus en murciélagos neotropicales de zonas bajas de Costa Rica".....	8
19- Correspondencia.....	9
20- Asuntos varios.....	9

Acta 124 celebrada el jueves veintiocho de junio del dos mil doce, a las trece horas con treinta minutos, en la sala de sesiones del Laboratorio de Ensayos Biológicos (LEB²).

Miembros presentes: Dra. Liliana Pazos Sanou, Dr. Rubén Arjona Brown, M.Sc. Carlos Boschini Figueroa, Dr. Alfredo Castro Castillo, Dr. Guillermo León Montero y M.Sc. Jorge Granados Zúñiga, quien preside.

Miembros Ausentes: Dra. Beatriz Badilla Baltodano, Dra. Marcela León, Dr. Paul Hanson Snortum y Dr. Nien Tsung Weng Huang.

ORDEN DEL DÍA

- 1- Aprobación del acta 123
- 2- Revisión del proyecto "Producción de antivenenos ofídicos en gallinas".
- 3- Revisión del proyecto "Determinación de efecto oxidativo/antioxidativo de la terapia de reemplazo hormonal con Drospirenona en un modelo de rata ooforectomizada: un estudio prospectivo y randomizado".
- 4- Revisión del proyecto "Coloides basados en hidroxipariras modificadas como adyuvantes en la producción de suero anti-abeja (*Apis mellifera*)".
- 5- Revisión del proyecto "Caracterización de la actividad hialuronidasa del veneno de la serpiente *Bothrops asper*. Papel en la patología local y análisis de la actividad inhibitoria de las plantas *Vernonia patens*, *Buddleja americana*, *Phenax rugosus* y *Phenax angustifolius*".
- 6- Revisión del proyecto "Ecología, comportamiento y amenazas a la toboa de árbol *Bothriechis nigroviridis* (Serpentes: Viperidae) en Costa Rica"
- 7- Revisión del proyecto "Identificación de iniciadores microsatélites para las tortugas de agua dulce y las tortugas terrestres de Costa Rica"
- 8- Revisión del proyecto "Cuantificación en suero de los niveles de IL-4, IL-2 y TNF alfa en el modelo de inmuno supresión causado por *Trypanosoma lewisi* en la rata blanca durante la infección por *Toxoplasma gondii*".
- 9- Revisión del proyecto "Diagnóstico de la presencia de cepas resistentes a antibióticos en el tracto respiratorio de cerdos en granjas comerciales"
- 10- Revisión del proyecto "Caracterización de los niveles de Selenio en sangre, leche y orina de vacas Jersey en pastoreo en tres zonas lecheras de Costa Rica"
- 11- Revisión del proyecto: "Prevalencia de cetosis clínica y subclínica en un hato de vacas Holstein en pastoreo y su relación con el número de parto, longitud del periodo seco, pico de lactancia y calificación de condición corporal"
- 12- Revisión del proyecto: "Determinación de valores de referencia hematológicos y bioquímicos de las serpientes *Crotalus simus* y *Bothrops asper* en condición de cautiverio"
- 13- Revisión del proyecto: "Validación 'in vitro' de la técnica de bipartición de embriones bovinos en la Unidad de Reproducción Animal"
- 14- Revisión del proyecto: "Anatomía cerebral de las hormigas parásitas, facultativas y mutualistas del cornizuelo (*Acacia Fabaceae: Mimosoidae*)"

-
- 15- Revisión del proyecto: "Estudio morfológico ultraestructural de las setas de las patas de arañas de la subfamilia *Hadrotarsinae* (*Araneae*, *Theridiidae*) y su función".
 - 16- Revisión del proyecto: "Diversidad de ácaros en plumas de reinitas (*Parulidae*) migratorias y residentes"
 - 17- Revisión del proyecto: "Evaluación andrológica y del desempeño reproductivo de conejos para producción de carne y como mascota"
 - 18- Revisión del proyecto: "Detección y caracterización de coronavirus en murciélagos neotropicales de zonas bajas de Costa Rica"
 - 19- Correspondencia
 - 20- Asuntos varios

CONTROL DE ACUERDOS

Artículo 1. Aprobación del acta 123.

El M.Sc. Jorge Granados Zúñiga somete a conocimiento el acta de la sesión 123 celebrada el jueves 10 de mayo de 2012 para su aprobación.

El M.Sc. Jorge Granados Zúñiga somete a votación el acta de la sesión 123 y se obtiene el siguiente resultado: Total 6 votos, ninguno en contra.

Por lo tanto, se **APRUEBA** el acta de la sesión 123.

Artículo 2. Se evalúa el proyecto de investigación: Producción de antivenenos ofídicos en gallinas, presentado por la Dra. Yamileth Angulo Ugalde, Directora del Instituto Clodomiro Picado.

Se le solicita que aclare el peso de las Gallinas Rhode Island, ya que no se indica en el formulario.

El M.Sc. Jorge Granados Zúñiga somete a votación el mismo y se obtiene el siguiente resultado: Total 6 votos, ninguno en contra.

Por lo tanto se **APRUEBA** sin restricciones dicho proyecto.

Artículo 3. Se evalúa el proyecto de investigación: Determinación de efecto oxidativo/antioxidativo de la terapia de reemplazo hormonal con Drospirenona en un modelo de rata ooforectomizada: un estudio prospectivo y randomizado, presentado por la Dra. Silvia Quesada Mora, Directora del departamento de Bioquímica, Escuela de Medicina.

Se le solicita que aclare en cuanto al punto II. 11, ¿Quién realizará la ooforectomía?

El M.Sc. Jorge Granados Zúñiga somete a votación el mismo y se obtiene el siguiente resultado: Total 6 votos, ninguno en contra.

Por lo tanto se **APRUEBA** sin restricciones dicho proyecto.

Artículo 4. Se evalúa el proyecto de investigación: Coloides basados en hidroxiapatitas modificadas como adyuvantes en la producción de suero antiabeja (*Apis mellifera*), presentado por el Sr. Mavis Montero, del Centro de Electroquímica y Energía Química de la Escuela de Química.

El M.Sc. Jorge Granados Zúñiga somete a votación el mismo y se obtiene el siguiente resultado: Total 6 votos, ninguno en contra.

Por lo tanto se **APRUEBA** sin restricciones dicho proyecto.

Artículo 5. Se evalúa el proyecto de investigación: Caracterización de la actividad hialuronidasa del veneno de la serpiente *Bothrops asper*. Papel en la patología local y análisis de la ctividad inhibitoria de las plantas *Vernonia patens*, *Budleja americana*, *Phenax rugosus* y *Phenax angustifolius*, presentado por el Dr. José María Gutiérrez Gutiérrez del Instituto Clodomiro Picado.

El M.Sc. Jorge Granados Zúñiga somete a votación el mismo y se obtiene el siguiente resultado: Total 6 votos, ninguno en contra.

Por lo tanto se **APRUEBA** sin restricciones dicho proyecto.

Artículo 6. Se evalúa el proyecto de investigación: Ecología, comportamiento y amenazas a la toboba de árbol *Bothriechis nigroviridis* (Serpentes: Viperidae) en Costa Rica, presentado por el Sr. Aarón Gómez Arguello, de la Facultad de Microbiología.

Se le recuerda que al utilizar animales silvestres también se debe acatar las disposiciones de la Ley de Conservación de Vida Silvestre 7317.

El M.Sc. Jorge Granados Zúñiga somete a votación el mismo y se obtiene el siguiente resultado: Total 6 votos, ninguno en contra.

Por lo tanto se **APRUEBA** sin restricciones dicho proyecto.

Artículo 7. Se evalúa el proyecto de investigación: Identificación de iniciadores microsatélites para las tortugas de agua dulce y las tortugas terrestres de Costa Rica, el cual es presentado por el Dr. Gustavo Gutiérrez Espeleta, de la Escuela de Biología.

Se le recuerda que al utilizar animales silvestres también se debe acatar las disposiciones de la Ley de Conservación de Vida Silvestre 7317.

El M.Sc. Jorge Granados Zúñiga somete a votación el mismo y se obtiene el siguiente resultado: Total 6 votos, ninguno en contra.

Por lo tanto se **APRUEBA** sin restricciones dicho proyecto.

Artículo 8. Se evalúa el proyecto de investigación: Cuantificación en suero de los niveles de IL-4, IL-2 y TNF alfa en el modelo de inmuno supresión causado por *Trypanosoma lewisi* en la rata blanca durante la infección por *Toxoplasma gondii*, presentado por el Dr. Alfredo Castro Castillo, de la Facultad de Microbiología.

El M.Sc. Jorge Granados Zúñiga somete a votación el mismo y se obtiene el siguiente resultado: Total 6 votos, ninguno en contra.

Por lo tanto se **APRUEBA** sin restricciones dicho proyecto.

Artículo 9. Se evalúa el proyecto de investigación: Diagnóstico de la presencia de cepas resistentes a antibióticos en el tracto respiratorio de cerdos en granjas comerciales, presentado por el MSc. Sergio Salazar Villanea de la Escuela de Zootecnia.

El M.Sc. Jorge Granados Zúñiga somete a votación el mismo y se obtiene el siguiente resultado: Total 6 votos, ninguno en contra.

Por lo tanto se **APRUEBA** sin restricciones dicho proyecto.

Artículo 10. Se evalúa el proyecto de investigación: Caracterización de los niveles de Selenio en sangre, leche y orina de vacas Jersey en pastoreo en tres zonas lecheras de Costa Rica, presentado por el Lic. Alejandro Saborío Montero, del Centro de Investigaciones en Nutrición Animal.

El M.Sc. Jorge Granados Zúñiga somete a votación el mismo y se obtiene el siguiente resultado: Total 6 votos, ninguno en contra.

Por lo tanto se **APRUEBA** sin restricciones dicho proyecto.

Artículo 11. Se evalúa el proyecto de investigación: Prevalencia de cetosis clínica y subclínica en un hato de vacas Holstein en pastoreo y su relación con el número de parto, longitud del periodo seco, pico de lactancia y calificación de condición corporal, presentado por el Lic. Alejandro Saborío Montero, del Centro de investigaciones en Nutrición Animal.

Se indica con respecto al punto II 4.b que este procedimiento también es Etológico.

El M.Sc. Jorge Granados Zúñiga somete a votación el mismo y se obtiene el siguiente resultado: Total 6 votos, ninguno en contra.

Por lo tanto se **APRUEBA** sin restricciones dicho proyecto.

Artículo 12. Se evalúa el proyecto de investigación: Determinación de valores de referencia hematológicos y bioquímicos de las serpientes *Crotalus simus* y *Botrops asper* en condición de cautiverio, presentado por Cynthia Arroyo Portilla, de la Facultad de Microbiología.

Se le solicita verificar la duración real de dicho proyecto ya que en el punto I. 6 indican 1 año y medio y en el punto II. 10 indican 1 año.

El M.Sc. Jorge Granados Zúñiga somete a votación el mismo y se obtiene el siguiente resultado: Total 6 votos, ninguno en contra.

Por lo tanto se **APRUEBA** sin restricciones dicho proyecto.

Artículo 13. Se evalúa el proyecto de investigación: Validación '*in vitro*' de la técnica de bipartición de embriones bovinos en la Unidad de Reproducción Animal, presentado por el Ing. Róger Molina Coto, de la Escuela de Zootenia.

En el punto II. 10 no se indica la duración definida, por lo que se le solicita la aclaración.

El M.Sc. Jorge Granados Zúñiga somete a votación el mismo y se obtiene el siguiente resultado: Total 6 votos, ninguno en contra.

Por lo tanto se **APRUEBA** sin restricciones dicho proyecto.

Artículo 14. Se evalúa el proyecto de investigación: Anatomía cerebral de las hormigas parásitas, facultativas y mutualistas del cornizuelo (*Acacia Fabaceae: Mimosoidae*), presentado por Sabrina Amador, de la Escuela de Biología.

Se le solicita verificar la duración real de dicho proyecto ya que en el punto I. 6 indican 2 años y en el punto II. 10 indican 1 año.

El M.Sc. Jorge Granados Zúñiga somete a votación el mismo y se obtiene el siguiente resultado: Total 6 votos, ninguno en contra.

Por lo tanto se **APRUEBA** sin restricciones dicho proyecto.

Artículo 15. Se evalúa el proyecto de investigación: Estudio morfológico ultraestructural de las setas de las patas de arañas de la subfamilia *Hadrotarsinae (Araneae, Theridiidae)* y su función, presentado por Gilbert Barrantes Montero, del Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMIC).

Se le recuerda que al utilizar animales silvestres también se debe acatar las disposiciones de la Ley de Conservación de Vida Silvestre 7317.

El M.Sc. Jorge Granados Zúñiga somete a votación el mismo y se obtiene el siguiente resultado: Total 6 votos, ninguno en contra.

Por lo tanto se **APRUEBA** sin restricciones dicho proyecto.

Artículo 16. Se evalúa el proyecto de investigación: Diversidad de ácaros en plumas de reinitas (*Parulidae*) migratorias y residentes, presentado por Paula Calderón Mesén, del Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic).

En el punto II. 10 no se indica la duración definida, por lo que se le solicita la aclaración.

Se le recuerda que al utilizar animales silvestres también se debe acatar las disposiciones de la Ley de Conservación de Vida Silvestre 7317.

El M.Sc. Jorge Granados Zúñiga somete a votación el mismo y se obtiene el siguiente resultado: Total 6 votos, ninguno en contra.

Por lo tanto se **APRUEBA** sin restricciones dicho proyecto.

Artículo 17. Se evalúa el proyecto de investigación: "Evaluación andrológica y del desempeño reproductivo de conejos para producción de carne y como mascota", presentado por la M.Sc. Andrea Brenes Soto, del Área de Especies Alternativas de la Escuela de Zootecnia.

El M.Sc. Jorge Granados Zúñiga somete a votación el mismo y se obtiene el siguiente resultado: Total 6 votos, ninguno en contra.

Por lo tanto se **APRUEBA** sin restricciones dicho proyecto.

Artículo 18. Se evalúa el proyecto de investigación: Detección y caracterización de coronavirus en murciélagos neo-tropicales de zonas bajas de Costa Rica, presentado por Andrés Moreira Soto, del Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales.

En el punto II. 10 no se indica la duración definida, por lo que se le solicita la aclaración.

Se le recuerda que al utilizar animales silvestres también se debe acatar las disposiciones de la Ley de Conservación de Vida Silvestre 7317.

El M.Sc. Jorge Granados Zúñiga somete a votación el mismo y se obtiene el siguiente resultado: Total 6 votos, ninguno en contra.

Por lo tanto se **APRUEBA** sin restricciones dicho proyecto.

Artículo 19. Correspondencia:

Se da lectura al oficio EB-858-2012, enviada por el Dr. Gustavo Gutiérrez, Director de la Escuela de Biología, donde comunica la designación del Dr. Paul Hanson como sustituto del M.Sc. Daniel Briceño ante el CICUA.

Artículo 20. Asuntos Varios

Se le extiende la invitación al Comité al Curso de Animales de Laboratorio a efectuarse del 3 al 5 de diciembre del presente año.

Se discute acerca de la información recibida acerca de que en el CICA están realizando investigaciones con peces sin la debida autorización. Se decide enviarles una nota al respecto solicitando la aclaración respectiva.

Se decide que la próxima reunión se realizará el 01 de agosto del año en curso.

A las dos horas con treinta minutos, se levanta la sesión.

Anexo B

Ejemplo del cálculo de concentración de anticuerpos anti-taipán determinados por ELISA

1-Distribución de muestras en la placa de ELISA

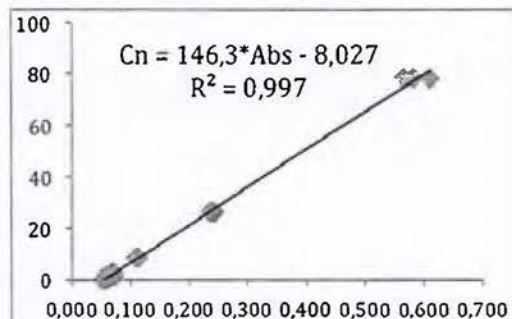
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Patrón 703.8 ng/mL			C4;t ₀ *	C5;t ₀	C6;t ₀	C4;t ₃₆₀	C5;t ₃₆₀	C6;t ₃₆₀			
B	Patrón 234.6 ng/mL			C4;t ₁	C5;t ₁	C6;t ₁	C4;t ₇₂₀	C5;t ₇₂₀	C6;t ₇₂₀			
C	Patrón 78.2 ng/mL			C4;t ₅	C5;t ₅	C6;t ₅	C4;t ₁₄₄₀	C5;t ₁₄₄₀	C6;t ₁₄₄₀			
D	Patrón 26.1 ng/mL			C4;t ₁₅	C5;t ₁₅	C6;t ₁₅	C4;t ₂₈₈₀	C5;t ₂₈₈₀	C6;t ₂₈₈₀			
E	Patrón 8.7 ng/mL			C4;t ₃₀	C5;t ₃₀	C6;t ₃₀	C4;t ₁₀₀₈₀	C5;t ₁₀₀₈₀	C6;t ₁₀₀₈₀			
F	Patrón 2.9 ng/mL			C4;t ₆₀	C5;t ₆₀	C6;t ₆₀	C4;t ₁₂₉₆₀	C5;t ₁₂₉₆₀	C6;t ₁₂₉₆₀			
G	Patrón 1.0 ng/mL			C4;t ₁₈₀	C5;t ₁₈₀	C6;t ₁₈₀						
H	Patrón 0.3 ng/mL			C4;t ₁₈₀	C5;t ₁₈₀	C6;t ₁₈₀						

2-Absorbancias obtenidas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3.800	3.630	3.986	0.055	0.061	0.071	0.289	0.290	0.242			
B	1.612	1.502	1.470	0.443	0.496	0.419	0.184	0.194	0.178			
C	0.610	0.583	0.566	0.451	0.577	1.013	0.133	0.144	0.140			
D	0.244	0.242	0.235	0.472	0.536	0.415	0.047	0.049	0.074			
E	0.112	0.113	0.110	0.446	0.460	0.424	0.047	0.055	0.149			
F	0.073	0.070	0.071	0.414	0.409	0.419	0.048	0.075	0.063			
G	0.063	0.072	0.058	0.341	0.366	0.332						
H	0.061	0.054	0.053	0.330	0.355	0.306						

3-Curva de calibración

	Concentración	Absorbancia		
		1	2	3
A	---	---	---	---
B	---	---	---	---
C	Patrón 78.2 ng/mL	0.610	0.583	0.566
D	Patrón 26.1 ng/mL	0.244	0.242	0.235
E	Patrón 8.7 ng/mL	0.112	0.113	0.110
F	Patrón 2.9 ng/mL	0.073	0.070	0.071
G	Patrón 1.0 ng/mL	0.063	0.072	0.058
H	Patrón 0.3 ng/mL	0.061	0.054	0.053



4-Interpolación de la absorbancia de las muestras en la curva de calibración

Tiempo (min)	Absorbancia			Concentración (ng/mL)			Corrección por FD (mg/mL)		
	C4	C5	C6	C4	C5	C6	C4	C5	C6
0	0.055	0.061	0.071	0	1	2	0	1	2
1	0.443	0.496	0.419	57	65	53	57	65	53
5	0.451	0.577	1.013	58	76	---	58	76	---
15	0.472	0.536	0.415	61	70	53	61	70	53
30	0.446	0.460	0.424	57	59	54	57	59	54
60	0.414	0.409	0.419	53	52	53	53	52	53
180	0.341	0.366	0.332	42	46	41	42	46	41
360	0.330	0.355	0.306	40	44	37	40	44	37
720	0.289	0.290	0.242	34	34	27	34	34	27
1440	0.184	0.194	0.178	19	20	18	19	20	18
2880	0.133	0.144	0.140	11	13	12	11	13	12
10080	0.047	0.049	0.074	-1	-1	3	-1	-1	3
12960	0.047	0.055	0.149	-1	0	14	-1	0	14
20160	0.048	0.075	0.063	-1	3	1	-1	3	1

Anexo C

Determinación del contenido de monómeros de anticuerpos en el AvDG mediante el perfil de filtración en gel en FPLC.

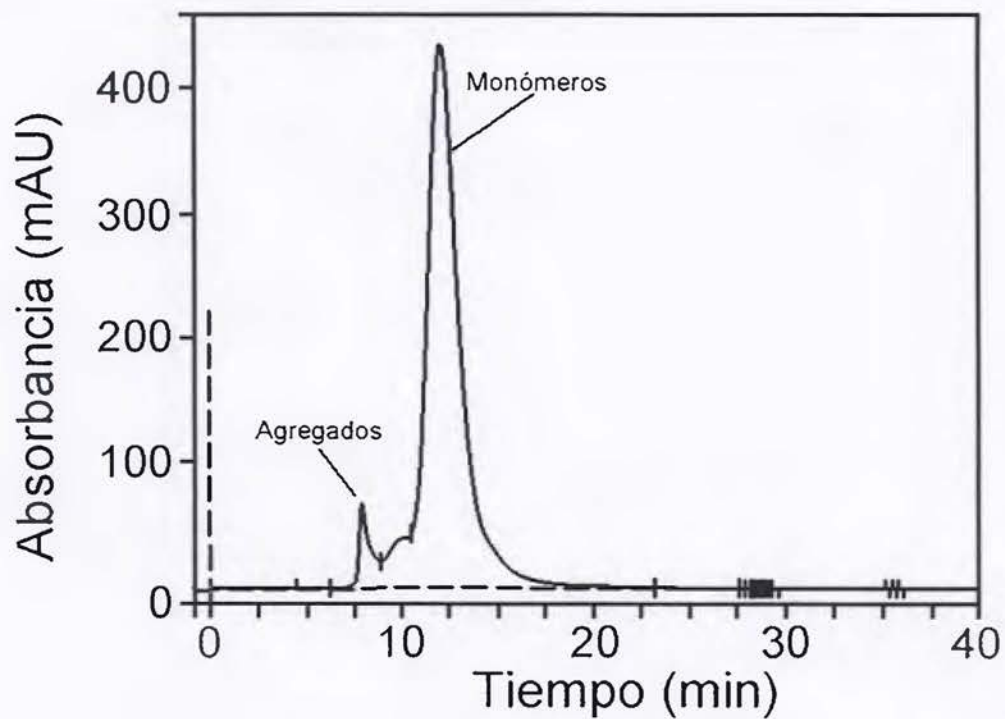


Figura 12. Perfil de filtración en gel por FPLC del AvDG.

Anexo D

Determinación de la pureza fisicoquímica del AvDG mediante análisis densitométrico de bandas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

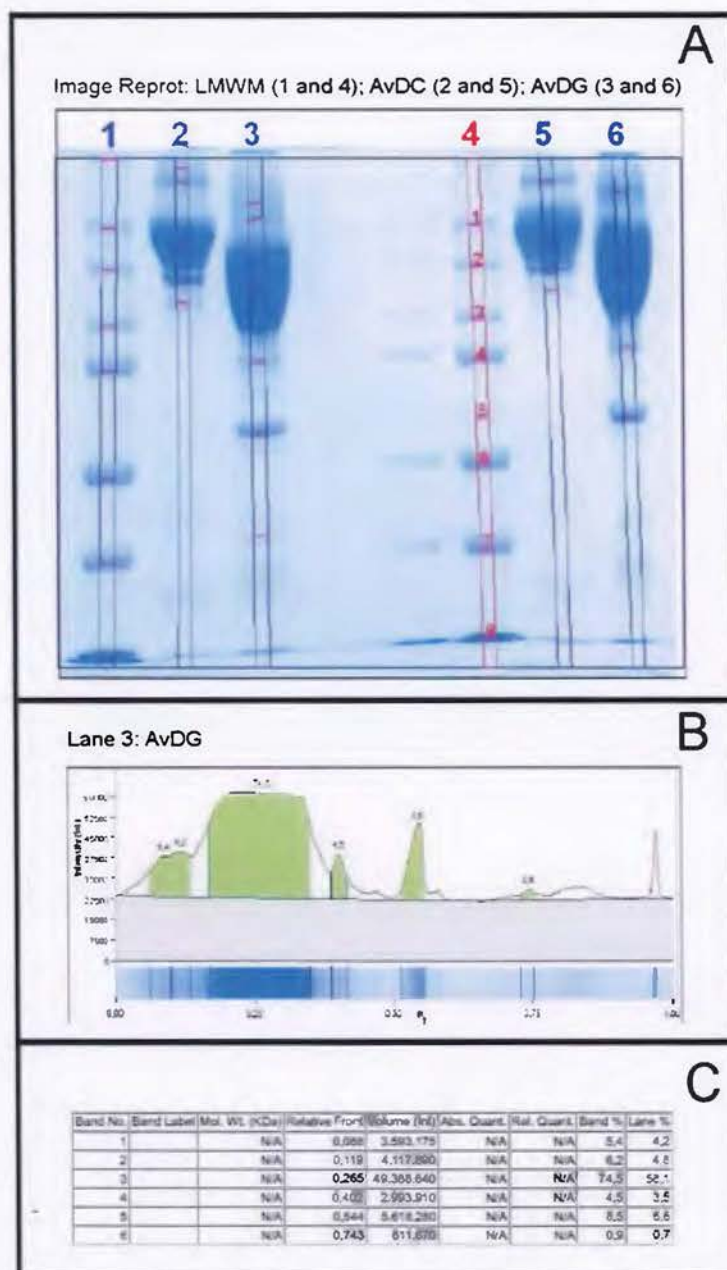


Figura 13. Análisis densitométrico del AvDG. Se muestra el gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7% (A), el densitograma (B) y el cuadro resumen del análisis (C).

Anexo E

Ejemplo del cálculo de la DE₅₀ del antiveneno anti-taipán.

Cálculo de la Dosis Eficaz Media (DE₅₀) del antiveneno anti-taipán*						
Veneno: <i>Oxyuranus scutellatus</i> (taipán)						
Solución patrón de veneno:						
Dosis reto: 0.192 mg.						
Nivel (mg/mL)	Igs anti-veneno (1/1000)		PBS	Veneno		Ratones muertos/ratones inyectados
	mL	mg		mL	mg	
452	3.254	0.042	1.656	0.090	19	0/8
678	2.157	0.028	2.753	0.090	19	0/8
1055	1.444	0.018	3.466	0.090	19	2/8
1583	0.960	0.012	3.950	0.090	19	7/8
2375	0.640	0.008	4.270	0.090	19	8/8
Control	0.000	0.000	4.910	0.090	19	8/8
DE ₅₀ (LC 95%):** 1228 (999-1623)						

*Calculado por Probitos.

*Límites de confianza del 95%

ANEXO F

Figuras suplementarias de farmacocinética de los antivenenos anti-taipán.

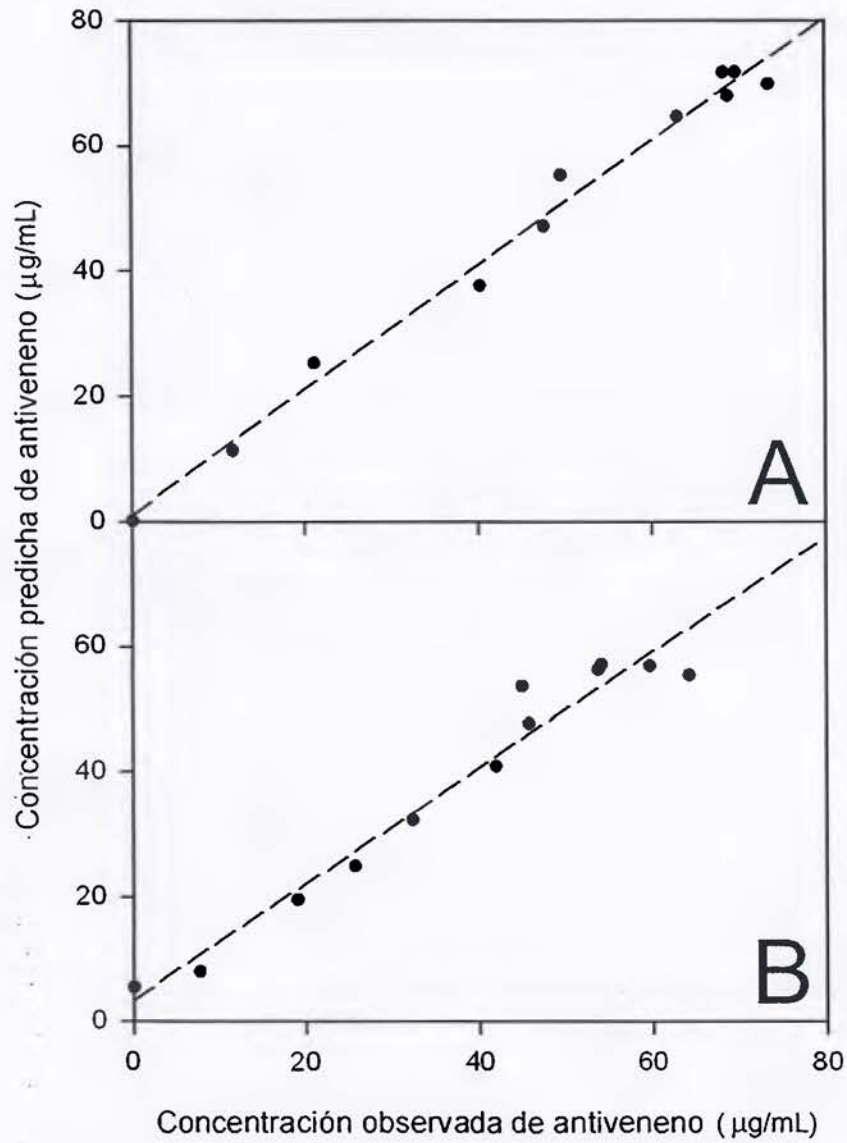


Figura 14. Concentraciones observadas versus concentraciones predichas de los antivenenos producidos en gallinas (A) y caballos (B), en el suero de conejos.

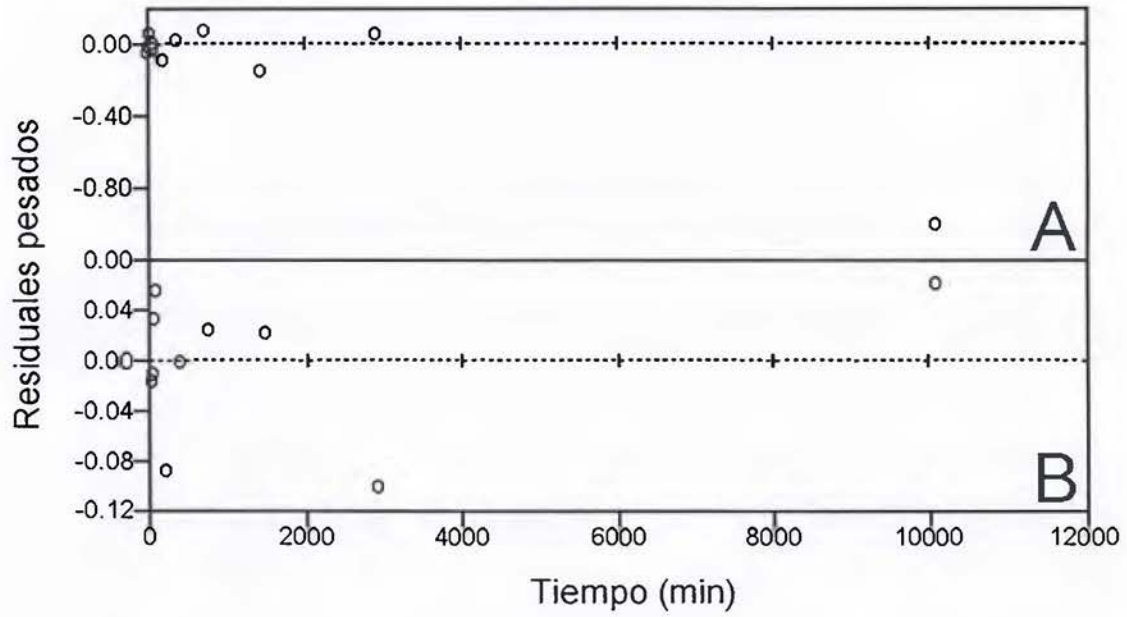


Figura 15. Residuales pesados versus el tiempo para los antivenenos formulados con IgY (A) e IgG equina (B).