

Obtención de IgY Control

Esteban Gutiérrez Calzado, Eduardo Cruz Mariño, Mireya García Garrido* y Emilia Ortiz Beatón.

LABEX, Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales, Calle 23 y Carretera del Caney sin número, Apartado Postal 4032, Código Postal 90400, Santiago de Cuba. *Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.

Recibido: 18 de noviembre de 1999. Aceptado: 15 de noviembre del 2000.

Palabras clave: IgY, anticuerpos policlonales, precipitaciones salinas.

Key words: IgY, polyclonal antibodies, delipidate, saline precipitation, quality control.

RESUMEN. La yema de huevo de gallinas puede ser utilizada como una fuente de anticuerpos, pero los lípidos presentes en ella pueden interferir la actividad de los primeros, por esta razón, deben ser purificados de ella. Se conocen muchos métodos de purificación que pueden ser utilizados para obtener anticuerpos de pollo a gran escala. La posibilidad de purificar grandes cantidades de anticuerpos es de interés particular para la administración oral de anticuerpos específicos para prevenir infecciones bacterianas y virales, especialmente, diarreas en viajeros, además de su uso también, en la prevención de estas entidades bacterianas y otras similares provocadas por rotavirus en diversos modelos animales entre las que se encuentran infecciones por *Escherichia coli* en conejos y puercos neonatos y caries dentales en ratas entre otras muchas. En este trabajo se reporta un método rápido y fácil de obtener Inmunoglobulina Y control a partir de yemas de huevo de gallinas no inmunizadas. El método consiste en la precipitación de los lípidos de la yema con agua destilada estéril acidificada como primer paso en la obtención de la totalidad de las proteínas solubles presentes en ella. Posteriormente, se realizan tres etapas sucesivas de precipitaciones salinas. La primera con sulfato de amonio y las dos restantes con sulfato de sodio, las cuales rinden finalmente, un preparado de IgY con elevado grado de pureza comprobado por electroforesis en gel de poliácridamida. Con el método se recupera aproximadamente el 30 % de toda la inmunoglobulina presente en los sobrenadantes iniciales delipidados de la yema. La inmunoglobulina obtenida fue identificada por técnicas de inmunoprecipitación y puede ser utilizada como proteína control en laboratorios donde se desarrolle la tecnología de producción de anticuerpos policlonales en aves, además de constituir un preparado útil para su uso en posteriores trabajos de caracterización y estructura.

ABSTRACT. Crude egg yolk may be used as an antibody source, but the lipids in the yolk may interfere with the antibody activity. Therefore, antibodies are usually purified from the yolk. There are several published purification methods that can be used for large-scale purification of chicken antibodies. The possibility of purifying large amounts of antibodies is of particular interest for oral administration of specific antibodies to prevent bacterial infections as travelers' diarrhea and other viral infections as rotavirus diseases. Lately, oral administration of egg yolk antibodies has also been successfully used for the prevention of bacterial infections in animal models. It has been used to prevent rotavirus infection in mice, *Escherichia coli* infections in rabbits and piglets, and caries in rats. A rapid and easy method to obtain control IgY from egg yolk of non-immunized hens is reported here. The principle of the method is lipidic precipitation of yolk using acidified water as the first step to obtain the whole soluble proteins of yolk, and later three steps of saline precipitations with ammonium sulphate (one step) and sodium sulphate (two steps) respectively. With this method it was obtained IgY highly pure as shown by SDS-PAGE. Approximately 30 % of total immunoglobulins present in initial delipidated supernatants was recovered. The immunoglobulin obtained was identified by immunodiffusion techniques and can be used as a control protein in laboratories which develop the technology of production of avian polyclonal antibodies besides being a sample to be used later in works of characterization and structural studies.

INTRODUCCION

La yema de huevos de aves está reconocida como una excelente fuente de anticuerpos específicos. Su inmunoglobulina, denominada IgY,¹ difiere de la IgG de mamíferos por su mayor peso molecular (180 kD), punto isoeléctrico (más ácida), en su capacidad de unión con el complemento de mamíferos y a la proteína A (no se une a ninguno de estos elementos).² La IgY es conocida también como gamma livetina y existe en la yema del huevo junto con otras dos proteínas solubles, alfa livetina (albúmina sérica del pollo) y beta livetina (alfa 2 glicoproteína).^{3,4} además de varias lipoproteínas (LDL, HDL), las cuales son los componentes principales de la yema.

Las ventajas que ofrecen las inmunoglobulinas de la yema de huevo sobre la producción convencional de anticuerpos están bien establecidas.^{4,5} Estas incluyen la potencialidad de producir más anticuerpos específicos contra antígenos de mamíferos dada la distancia filogenética que existe entre ellos;⁶ su costo inferior⁷ y su mayor compatibilidad con las regulaciones modernas de protección animal.⁸ Además, la producción y mantenimiento de elevados niveles de anticuerpos es relativamente fácil.^{9,10}

Se han utilizado muchos métodos para el aislamiento y la purificación de inmunoglobulinas de yemas de huevos de aves,^{2,4,5,11-16} sin embargo, estos métodos no han sido muy adecuados, por ser tediosos y costosos.^{2,16} El procedimiento de selección para la preparación de inmunoglobulinas de yemas de huevos no solo

debe abarcar reactivos que permitan el uso en alimentos, sino que debe ser simple, fácil de escalar y a un costo efectivo.

Hatta en 1988, utilizó alginato de sodio grado alimentario para recuperar IgY en la fracción soluble en agua de la yema del huevo. Kwan en 1991, utilizó agua para fraccionar esta porción soluble de los componentes insolubles de la yema, reportando hasta el 90 % de la actividad inmunológica de la yema en la fracción soluble en agua. Estos elementos deben tenerse en cuenta para seleccionar un método de purificación de IgY. La primera etapa para su aislamiento consiste en la separación las proteínas solubles en agua de las lipoproteínas y debe tenerse en cuenta que la yema del huevo contiene otros elementos importantes activos biológica y funcionalmente con diversas aplicaciones en las industrias alimentaria y farmacéutica.

Los métodos más recientes reportados para el aislamiento primario de la IgY emplean procedimientos de dilución en agua^{4,5} y constituyen métodos rápidos, simples y eficientes y permiten la separación de esta con elevada actividad tanto como otros componentes importantes de la yema del huevo (ejemplo fosfolípidos).

Con estos antecedentes este trabajo se propuso obtener una preparación pura de IgY para su uso como proteína control en toda la tecnología de producción de anticuerpos policlonales específicos en yema de huevo y la valoración de su factibilidad para utilizarla en la obtención de preparados puros de anticuerpos específicos en casos en los que se requiere una elevada pureza de estos.

MATERIALES Y METODOS

Se tomaron 40 huevos frescos puestos por gallinas no inmunizadas las cuales habían sido mantenidas en un local convencional del Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales.

Se utilizó agua destilada estéril acidulada con ácido clorhídrico hasta pH 5 y sulfato de amonio y de sodio, ambos puro para análisis (Merck).

Determinación de proteínas totales

Las proteínas totales se determinaron por el método de Lowry¹⁷ utilizando como referencia albúmina sérica bovina (Sigma Co. Ltd.) a 660 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 1000 (Pharmacia).

Electroforesis en gel de poliacrilamida

De acuerdo con el método de Laemmli,¹⁸ la electroforesis se realizó en un sistema vertical de cubeta (Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba) donde se prepararon sendos geles, uno concentrador al 5 % y otro separador al 12,5 % tomando como patrones la IgG humana (IMEFA, Cuba) y una IgG de ratón purificada en el laboratorio (LABEX, Cuba) que sirvieron de marcadores de peso molecular. La corrida se realizó con una fuente de poder EPS-600 (Pharmacia) y bajo condiciones no reductoras, ya que no le fue adicionado mercaptoetanol al estabilizador de las muestras.

Purificación de IgY

La purificación de la IgY se realizó por el método de precipitación de los lípidos con agua destilada, modificación del método de Akita y Nakai,¹⁹ y precipitaciones salinas sucesivas^{20,21} con sulfato de amonio y de sodio (Merck) realizando la dilución del volumen de yema en agua destilada a una proporción de 9:1 agua : yema y llevando esta dilución hasta pH 5 con HCl 0,1 mol/L (Merck) para precipitar los lípidos por centrifugación posterior a 2 500 r/min, cosecha del sobrenadante al que se le aplicaron tres precipitaciones salinas sucesivas con sulfato de amonio al 33 % y de sodio al 18 y 14 % respectivamente. El precipitado final se dializó contra estabilizador fosfato pH 7,2.

Determinaciones inmunológicas

Para medir el contenido de IgY en todos los pasos de purificación, se utilizó un método de inmunodifusión radial simple (IDRS),²⁰ empleando un antisuero anti IgY obtenido en el laboratorio por la inmunización de conejos con preparados de IgY comercial (Sigma), la que también sirvió para la preparación de una curva patrón de concentraciones conocidas para la extrapolación de los resultados de concentración de las muestras de IgY obtenidas en el laboratorio. Este sistema permitió a su vez, evaluar la actividad biológica del material en estudio.

Pruebas de identidad inmunológica

Las pruebas de identidad inmunológicas se realizaron según técnica descrita por Ouchterlony (inmunodifusión doble bidimensional)²⁰ enfrentando un antisuero anti IgY obtenido en el laboratorio a partir de inmunizaciones en conejos con una

preparación comercial de IgY (Sigma) a dos muestras, una correspondiente a suero de pollo y otra a IgY obtenida por el método propuesto (Fig. 1).

Procesamiento estadístico

En el análisis de la técnica de inmunodifusión radial simple (IDRS) se utilizó un programa estadístico para la determinación de regresión lineal que permitió obtener la relación *diámetro cuadrado de los anillos de precipitación/logaritmo de la concentración de los patrones de concentración conocida* y la extrapolación de los valores de las muestras problema, además, se utilizó una calculadora científica para realizar las determinaciones de las medias y desviaciones estándar de los datos procesados.

RESULTADOS Y DISCUSION

Diferentes e importantes indicadores relacionados con el contenido del huevo fueron medidos durante el curso de la experimentación (Tabla 1). Se pudo comprobar que la IgY constituye aproximadamente la quinta parte de todas las proteínas solubles presentes en los sobrenadantes delipidados iniciales de yema de huevo, oscilando en un contenido un poco superior a los 100 mg por yema, lo que se corresponde con lo reportado por otros autores.^{1,7,8,19} El método de dilución en agua reporta una separación bastante clara y eficiente de las proteínas solubles en la yema, de los otros gránulos lipídicos que ella posee.

Los métodos para obtener preparados de proteínas con elevado nivel de pureza por medio de precipitaciones salinas sucesivas, no son factibles para ser llevados a gran escala.^{2,21} Sin embargo, el que ha sido utilizado en este trabajo constituye un procedimiento rápido y de fácil acceso en la obtención de pequeños lotes de inmunoglobulina control susceptible de ser utilizado en la tecnología de producción de anticuerpos policlonales en aves, con un rendimiento de alrededor de 30 mg de IgY por huevo (Tabla 1) con un elevado grado de pureza (Fig. 2), lo que se corresponde con más del 26 % de toda la IgY presente en cada huevo que es alrededor de 100 mg, como ya se había señalado.^{1,7,8,19} El proceso reporta una pérdida de un 70 % aproximadamente, lo que concuerda con los métodos de purificación mediante precipitaciones salinas sucesivas en los que este hecho ha sido bien establecido,^{1,2,19,21} pero teniendo en cuenta

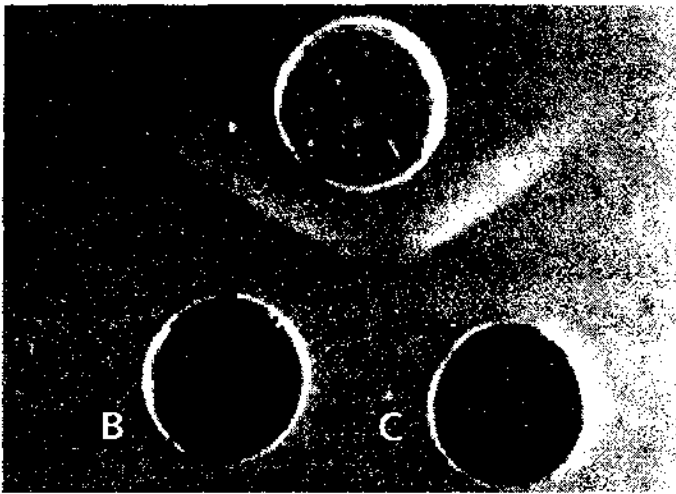


Fig. 1. Immunodifusión doble bidimensional (Técnica de Ouchterlony). B Suero de pollo. C Muestra de IgY de yema de huevo procesada por el método descrito. Obsérvese la reacción de identidad al enfrentarse a un suero anti-IgY obtenido en conejo.

Tabla 1. Principales indicadores obtenidos en el proceso de obtención de IgY por cada yema.

Principales indicadores	Valor medio
Huevos procesados	40
Peso del huevo (g)	60,9 ± 1,94
Volumen de yema (mL)	14 ± 1,18
Volumen de sobrenadante delipidado (mL)	111 ± 2,5
Proteínas totales (Lowry) (mg)	498,92 ± 15,11
Concentración de IgY por IDRS (mg)	114,97 ± 7,51
Proteínas totales purificadas por Lowry (mg)	34,82 ± 3,37
Concentración de IgY purificada por IDRS (mg)	30,78 ± 2,51
Rendimiento de IgY (%)	26,8 %

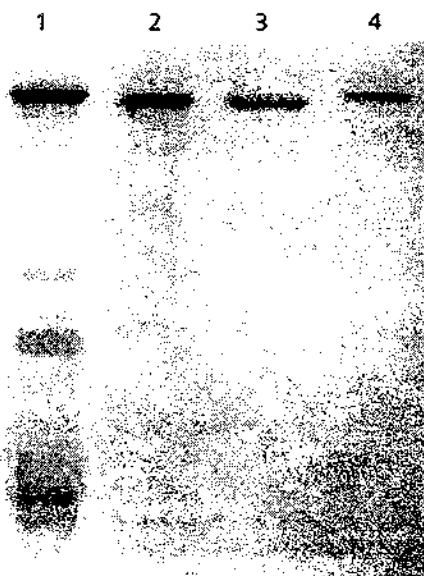


Fig. 2. SDS-PAGE (Condiciones no reductoras). 1. Sobrenadante delipidado de yema de huevo. 2. Patrón comercial de IgG humana (IMEFA, Cuba). 3. IgG de ratón purificada por Proteína A Sepharosa (LABEX, Cuba). 4. IgY purificada por método propuesto. Obsérvese que con este método se obtiene una banda electroforética pura que se corresponde con el patrón de migración de la IgY que aparece en el carril 1. Nótese además, diferencias de migraciones entre IgY (1 y 4) e IgG (2 y 3).

ta la materia prima empleada, el saldo es altamente rentable por análisis de costo-beneficio realizados.

Se comprobó que la concentración final de IgY purificada se corresponde con el 88 % aproximadamente de toda la proteína presente en el preparado final (Tabla 1), lo que no significa que sea su nivel de pureza, se corresponda con la cantidad de inmunoglobulina activa que es capaz de ser reconocida por su anticuerpo específico y cuantificable por la técnica de IDRS. Puesto que de hecho, pueden existir en el preparado cantidades desnaturalizadas que reportan resultados en términos de proteínas totales, los autores consideran su pureza muy superior por los patrones electroforéticos observados (Fig. 2) y aunque no se tienen resultados densitométricos, la presencia de una banda única sin contaminantes en el carril 4 de esta figura, si se compara con la corrida del preparado inicial de donde esta partió (carril 1 de esta misma figura) da muestra de este hecho.

La figura 1 permite comprobar que la inmunoglobulina presente en estos sobrenadantes delipidados de yema de huevo obtenida por el método propuesto es la misma IgY correspondiente a la del suero del pollo, al observarse las reacciones de precipitación de identidad inmunológica frente a un suero específico anti IgY de pollo.

CONCLUSIONES

Se realizó el aislamiento de las proteínas solubles en agua de la yema del huevo por un método simple de dilución en ella con un pobre recobrado final, pero con la obtención de una proteína con un elevado grado de pureza y actividad biológica comprobada mediante técnicas inmunológicas específicas (inmunodifusión radial simple y de doble bidimensional o técnica de Ouchterlony) lo que permite recomendar la utilización del método dada la efectividad del balance costo-beneficio realizado, avalado principalmente por la factibilidad de la materia prima que se utiliza (huevos frescos) con elevadas concentraciones de estas proteínas y la gran facilidad de aplicación de esta tecnología que posibilita poder prescindir de métodos muy costosos como los cromatográficos.

La inmunoglobulina obtenida por su pureza y actividad biológica puede utilizarse como proteína control en los laboratorios donde se desarrolle la tecnología de producción de anticuerpos policlonales en aves,

siendo útil también, para estudios de caracterización y estructura y procesos tecnológicos que requieran preparados puros de esta proteína.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Calixto García, director de la División de Biotecnología del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio de Cuba por brindarnos suficiente cantidad de IgY muy pura, patrón comercial de la firma Sigma Co. LTD que nos permitió la realización de este trabajo con el rigor requerido y por darnos acceso al uso de su material de oficina incluyendo su computadora para realizar las copias de este trabajo que fueron enviadas para ser sometidas a juicio de los árbitros competentes.

BIBLIOGRAFIA

1. Schade R., Pfister C., Halastch R., Henklein P. Polyclonal IgY Antibodies from Chicken Egg Yolk. An alternative to the production of Mammalian IgG type antibodies in rabbit. *Atla*, 19, 403, 1991.
2. Jensenius J.C., Andersen I., Hau J., Crove M., Koch C. Eggs: Conveniently package antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J. Immunol. Methods*, 46, 115, 1981.
3. Polson A., Von Wechmar M.B., Van Regermortel M.H.V. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Communications*, 9, 475, 1980.
4. Polson A., Coetzer T., Kruger J., Von Maltzahn E., Van der Merwa K.J. Im-

- provements in the isolation of IgY from the yolks of egg laid by immunized hens. *Imm. Invest.*, 14, 323, 1985.
5. Larsson A., Balow R.M., Lindhal T.L., Forshberg P.O. Chicken antibodies: Tasking advantage of Evolution. A Review. *Poultry Sci.*, 72, 1807, 1993.
6. Larsson A., Sjoquist J. Chicken IgY. Utilizing the evolutionary difference. *Comparative-Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 13, 199, 1990.
7. Schade R., Staak C., Hendricksen C., et al. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop 21. *Atla*, 24, 925, 1997.
8. Hatta H. Passive immunization against dental plaque formation in humans: Effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, 31, 268, 1997.
9. Losso J.N., Nakai S. International Food Technology, Annual Meeting, Alberta, Canada, April, 1995.
10. Otake S., Nishihara Y., Makimura M., Hatta H., Kim M., Yamamoto T., Hirasawa M. Protection of rats against dental caries by passive immunization with hen egg yolk antibodies (IgY). *J. Dent. Res.*, 70, 162, 1991.
11. Reyes V.H., López M.F. Un método simple de obtener anticuerpos policlonales: Elaboración de Anticuerpos de gallina. *B.E.B.*, 96, 270, 1996.
12. Reveles H.R., Saldívar S., Muñoz E.J., Moreno M.A. Purificación de Anti-IgG de *T. spiralis*. Avances en Biotecnología Moderna. Biotecnología Havana '97, 4, 19, 1997.

13. Gutiérrez E. Anticuerpos en yema de huevo de gallina. Usos potenciales. III Cong. Nac., V Jornada Latinoamericana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia, La Habana, 201, 1997.
14. Diéguez R. Producción de Anticuerpos policlonales en gallinas. Purificación de IgY. Avances en Biotecnología Moderna. Biotecnología Havana '97, 47, 1997.
15. Burley R.W., Vadehra D.V. The Avian Egg. Chemistry and Biology. John Wiley and Sons. New York, 8, 7, 1989.
16. McCully K.A., Mok C.C., Common R.H. Paper electrophoretic characterization of proteins and lipoproteins of hens egg yolk. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 40, 937, 1962.
17. Fischbach F.A. Manual of Laboratory and Diagnostic Test. Chapter 8. Fourth Edition. J.B. Lippincott Company Ed., 458-565, 1992.
18. Western Blotting Technical Manual. Polyacrilamide gel electrophoresis of proteins and total protein detection in polyacrilamide gel. Amersham International Plc. U.K., 7-11, 1991.
19. Akita E.M., Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid immunized with enterotoxigenic *E. coli* strain. *Journal of Immunological Methods*, 160, 207, 1993.
20. Margni A. Inmunología e Inmunología química. Cap.11. Ed. Científico Técnica, La Habana, 1982.
21. Baines M., Thorpe R. Purification of immunoglobulin G (IgG). Methods in Molecular Biology. Immunochemical Protocols, Vol. 10, Chapter 8. Ed. M. Manson, 79-104, 1992.

ACTIVIDADES CIENTIFICAS MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

CONVENCION UNIVERSITARIA "UNIVERSIDAD DE GRANMA 2001"

Del 17 al 19 de octubre.
Universidad de Granma.

TEMATICAS: *Biotecnología Vegetal: micropropagación, mejoramiento genético y conservación in vitro. Biodiversidad Vegetal: Manejo y estrategia de conservación. Producción Animal: nutrición y alimentación animal, mejoramiento de la reproducción animal, sanidad animal. La universidad y la comunidad. Preparación y superación de los directivos. Costos ambientales y sector empresarial. Ciencias Básicas: Síntesis química. Química analítica. Productos naturales. Diseño de fármacos. Informática educativa y computación aplicada. Medio ambiente y educación ambiental. Didáctica de la educación superior.*

CUOTA DE INSCRIPCION: 100,00 USD. Se pagará en el momento de la acreditación en el evento.

COMITE ORGANIZADOR: Dra. Antonia María Castillo Ruiz.

TELEFONO: (53) (23) 92186. FAX: (53) (23) 92130. E-MAIL: paco@udg.granma.inf.cu