

Comparación de dos vías de inoculación en la producción de anticuerpos contra fructosa 1,6-bisfosfatasa en huevos de gallina

Comparison of two immunization routes for the production of chicken antibodies against fructose-1,6-bisphosphatase

R. GATICA¹, M. V.; J. C. SLEBE¹, BQ. Ph.D.; J. ULLOA², M. V. Dr. med. vet.; A.J. YÁÑEZ^{1*}, BQ. Ph.D.

¹Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias.

²Instituto de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile. *e-mail: ayanez@uach.cl

SUMMARY

The present study compares the intramuscular (IM) and subcutaneous (SC) inoculation routes for antibody production in hens. Six laying Leghorn hens were separated in two identical inoculation groups and immunized with purified Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) from pig kidney extract. The hens were inoculated at two and four week intervals with an emulsified mixture of purified FBPase and Freund's complete adjuvant (first inoculation) and Freund's incomplete adjuvant (second and third inoculations). The egg yolk antibodies were purified and titrated with immune dot blot. High amounts of antibody were produced by both hen groups and the titers were comparable. However, in each inoculation group we found some differences which we attributed to individual variations. These results show that both routes of inoculation (SC and IM) are equally effective in generating hen antibodies against a cytosolic enzyme. Moreover, the immune-blot analysis revealed that the antibodies anti-FBPase obtained from intramuscular and subcutaneous inoculations recognized the enzyme in rat liver extract containing much more than 50 different proteins. These results demonstrated that the antibodies produced by these two routes of inoculation are highly specific.

Palabras claves: anticuerpos, huevos de gallina, FBPasa.

Key words: antibodies, hen's eggs, FBPase.

INTRODUCCIÓN

En gallinas, se ha demostrado la existencia de tres clases de inmunoglobulinas análogas a la de mamíferos: IgA, IgM e IgG (Carlander, 2002). Sin embargo, al comparar la estructura de la inmunoglobulina G aviar y mamífera se observan diferencias en la masa molecular, siendo de 200 kDa en las aves y de 160 kDa en los mamíferos (Tizard, 1982). Por otra parte, la inmunoglobulina

G aviar posee gran similitud en su secuencia de ADN con la IgE humana (Shimizu y col., 1992). Estas características permiten que ambas IgG no presenten reacción cruzada (Friendscho, 1994). Producto de estas diferencias la inmunoglobulina IgG aviar fue denominada IgY (Camenish y col., 1999).

Debido a la distancia filogenética entre aves y mamíferos, las gallinas producen anticuerpos más específicos contra antígenos mamíferos que los mismos mamíferos (Li y col., 1998). Además, los anticuerpos IgY resultan adecuados para ensayos inmunológicos pues disminuyen los falsos positivos, al no interactuar con las IgG de mamíferos, con el factor reumatoide o con los receptores de fijación del complemento de los

Aceptado: 01.12.2003.

Este trabajo fue financiado, en parte, por el proyecto FONDECYT 1010720 y por la Dirección de Investigación, Universidad Austral de Chile, DID-UACH 200302.

mamíferos (Montes y col., 1994). La IgY es transportada desde el suero del ave a la yema del huevo, lo cual permite transferir los anticuerpos maternos a la descendencia y posibilita, de esta manera, la adquisición de inmunidad pasiva en los polluelos. La concentración de IgY en el suero de la gallina es de aproximadamente 5-7 mg/ml (Carlander, 2002), en tanto la concentración de IgY en la yema del huevo es de 15 mg/ml, con variaciones entre 8 y 25 mg/ml (Sunwoo y col., 2002; Rose y col., 1974). Por lo tanto, una yema de huevo de un volumen aproximado de 15 ml contiene más de 100 mg de IgY (Carlander y col., 2002; Larsson y col., 1993). Luego, desde una gallina en postura que produce aproximadamente 20 huevos por mes, se podrían aislar desde la yema más de 2 gramos de IgY (Carlander, 2002), cantidad comparable con la producción de grandes mamíferos, como equinos y bovinos (Tizard, 1982). Además, la obtención de anticuerpos a partir de la yema de huevo no representa un procedimiento invasivo, como el sangrado en conejos, evitando de esta manera el estrés y el sufrimiento animal (Broderson, 1989).

Los anticuerpos obtenidos de yema de huevo de gallina, tienen diversas aplicaciones, entre ellas se destaca su empleo en inmunoterapia oral. Larsson y col. (1993) demostraron los efectos positivos de incluir IgY contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalata* en el alimento de vacas de lechería. Este tratamiento produjo una importante reducción en las células somáticas, disminuyendo los costos en el tratamiento de la mastitis (Coleman, 1996). Además, otros investigadores han demostrado que anticuerpos obtenidos de gallinas inmunizadas con *E. coli* enterotoxigénica pueden detener, en 24 horas, la diarrea en lechones (Marquardt y col., 1999). Otra característica importante de la inmunoglobulina IgY, que permite su administración vía oral, es su alto grado de estabilidad ante variaciones de temperatura y pH. La IgY es particularmente resistente al proceso de pasteurización a un pH mayor de 4 (Shimizu y col., 1988). Por esta razón, se ha propuesto su uso en terapia oral en pacientes con fibrosis quística, cáncer (Yang y col., 1997; Carlander y col., 1999), inmunodeprimidos (Coleman, 1999),

y como antisuero en casos de mordeduras de arañas o serpientes (Thalley y Carroll, 1990).

En la literatura se ha informado de diferentes métodos para la obtención de anticuerpos desde huevos de gallina (Carlander, 2002). Para evaluar la respuesta humoral en gallinas se han utilizados las vías de inoculación subcutánea (Chung-seog y col., 1985; Friendscho, 1994), intramuscular (Camenisch y col., 1999; Orsini y col., 2001; Sunwoo y col., 2002; Akita y Nakai, 1992) y endovenosa (Patterson y col., 1962; Gutiérrez y col., 2001). Utilizando el mismo antígeno se comparó la producción de anticuerpos a través de las vías de administración intramuscular y endovenosa, encontrándose diferencias significativas (Gutiérrez y col., 2001). Sin embargo, no hay estudios comparativos de la producción de anticuerpos inmunizando a través de las vías intramuscular y subcutánea. Por lo tanto, en el presente trabajo se compararon dos vías de inoculación (intramuscular y subcutánea), para la obtención de anticuerpos policlonales en gallina. El antígeno utilizado fue la Fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo, enzima tetramérica encargada de catalizar uno de los pasos irreversibles de la gluconeogenesis, la conversión de fructosa-1,6-bisfosfato a fructosa-6-fosfato (Van Schaftingen, 1987).

MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales. En el estudio se utilizaron 6 gallinas de raza Leghorn de un año de edad en producción. Como antígeno se utilizó Fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo (FBPasa). Los reactivos utilizados para ensayo en gota, inmunodetección y electroforesis en geles de poliacrilamida fueron adquiridos en BIORAD®.

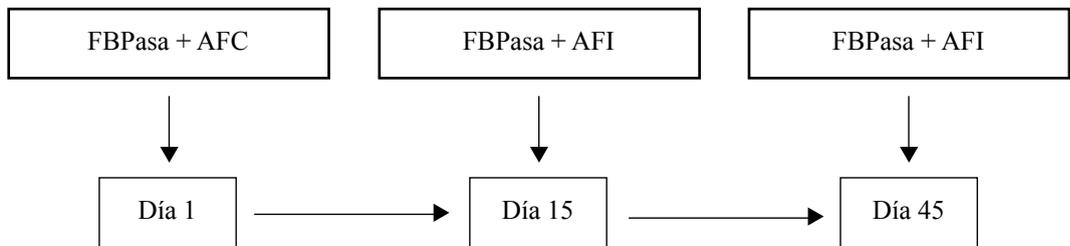
Purificación de FBPasa. A partir de riñones de cerdo recién sacrificados, siguiendo el procedimiento descrito por Colombo y col. (1972), modificado por Reyes y col. (1987), se purificó FBPasa a homogeneidad. Este proceso se basó en tres etapas consecutivas de precipitación con pH, calor y sulfato de amonio, luego de las cuales se realizó una cromatografía de afinidad en Cibacron blue ® (sefarosa azul).

El sedimento obtenido en la precipitación con sulfato de amonio se resuspendió y dializó contra una solución de Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, EDTA 0.1 mM. La solución de proteínas se aplicó en una columna de vidrio de 4 x 15 cm con aproximadamente 150 ml de la resina sefárosa azul equilibrada en el mismo tampón. Una vez aplicada la muestra, se lavó la columna con la solución de equilibrio y la FBPasa se eluyó específicamente con 300 ml de una solución de adenosina monofosfato (AMP) 0.2 mM en Tris-HCl 20mM, pH 7.5, EDTA 0,1 mM, colectándose fracciones de 8 ml, a un flujo de 2 ml/min. Las fracciones con enzima se detectaron midiendo la absorbancia a 280 nm y la actividad bifosfatásica (Saéz y col., 1996). Aquellas fracciones con actividad mayor a 20 unidades/ml fueron reunidas y concentradas por precipitación con sulfato de amonio al 90% de saturación. Después de centrifugar a 10.000 x g, el sedimento se resuspendió y se dializó por 24 horas con tres cambios de 1 litro de una solución de Tris-HCl 20mM, pH 7.5, EDTA 0.1 mM. La enzima purificada presentó una actividad específica de 40 unidades por miligramo de proteína. Para determinar el grado de pureza de la FBPasa, 1 µg de la proteína purificada se separó en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturantes (Laemmli, 1970). Su movilidad electroforética fue comparada con una mezcla de marcadores de peso molecular (Winkler®), que contenía las siguientes proteínas: β-galactosidasa, 116.000; albúmina, 66.000; ovoalbúmina,

45.000; lactato deshidrogenasa, 35.000; endonucleasa de restricción *Bsp98I*, 25.000; β-lactoglobulina, 18.400 y lisozima, 14.400 g/mol.

Immunización. Utilizando 0.2 mg de FBPasa resuspendida en 0.5 ml de PBS (NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7.5), se preparó una emulsión con un volumen de 0.5 ml de adyuvante completo de Freund para la primera inmunización y de 0.5 ml de adyuvante incompleto de Freund en la segunda y tercera inmunizaciones, las cuales se realizaron con un intervalo de 2 semanas (entre la 1^a y 2^a inmunización) y de 4 semanas (entre la 2^a y 3^a inmunización) (esquema 1). Con un volumen final de 1 ml, tres gallinas fueron inmunizadas por vía intramuscular (gallinas N° 1, 2 y 3) y tres por vía subcutánea (gallinas N° 4, 5 y 6). La recolección de huevos y purificación de anticuerpos se realizó periódicamente antes y después de cada inmunización. El daño ocasionado por la inmunización en las gallinas se determinó mediante necropsias.

Purificación de los anticuerpos. Se utilizaron huevos desde el día 12 post-inmunización hasta los colectados un día antes del sacrificio de las aves. La purificación se realizaba con 2 yemas y el volumen final variaba dependiendo del tamaño del huevo. Las proteínas hidrosolubles de la yema fueron precipitadas con sulfato de amonio en un 65% de saturación. Luego de centrifugar las



ESQUEMA I: Diagrama de las inoculaciones con FBPasa. AFC: Adyuvante de Freund Completo. AFI: Adyuvante de Freund Incompleto.

Diagram of FBPase inoculation. AFC: Complete Freund's Adjuvant. AFI: Incomplete Freund's Adjuvant.

muestras a 20.000 g por 15 minutos, el precipitado fue resuspendido en 10 ml de Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, EDTA 0.1 mM, posteriormente dializado y guardado a -20 °C (Akita y Nakai, 1993).

Titulación de anticuerpos. Se realizó mediante el método de ensayo en gota (dot blot) descrito por Gershoni y Palade (1983). Para estimar el título, varias tiras de nitrocelulosa fueron sembradas con 20 ng de FBPasa y luego incubadas con distintas diluciones (1:1.000, 1:10.000, 1:20.000, 1:40.000, 1:50.000, 1:60.000) del anticuerpo IgY purificado, el cual fue inmunodetectado con anticuerpo secundario de cabra anti-IgY de gallina acoplado a peroxidasa (Aves Labs, Inc). Para revelar la actividad del conjugado, el papel de nitrocelulosa se incubó por 5 minutos en una solución de diaminobencidina (DAB) 0.5 mg/ml, H₂O₂ 0,15% (v/v), Tween-20 0.3% (v/v) en PBS. Para, determinar de forma más precisa el título de los anticuerpos inducidos, la marca debida a la precipitación de DAB en los dot blots, fue digitalizada y analizada. Para ello, se utilizó el programa computacional "UN-SCANIT" (Silk Scientific Corporation), con el cual se determinó el número de pixeles presentes en cada marca de la nitrocelulosa. Se utilizó como única dilución, 1:10.000, de los anticuerpos obtenidos días anteriores y posteriores a cada inmunización. El análisis final se obtuvo de forma similar, utilizando dos diluciones (1:10.000 y 1:20.000) de los anticuerpos obtenidos una semana después de la 3^a inmunización. Como control de la reacción para cada anticuerpo se realizó un experimento donde no se adicionó el anticuerpo primario.

Determinación de especificidad de los anticuerpos mediante ensayo en gota (Dot blot). En una tira rectangular de nitrocelulosa se sembraron 100 ng de tres proteínas diferentes (FBPasa, aldolasa A y aldolasa B). Posteriormente, la tira de nitrocelulosa se incubó en una dilución 1:1.000 del anticuerpo IgY purificado y este fue inmunodetectado con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgY de gallina acoplado a peroxidasa. Para revelar la actividad del conjugado, el papel

de nitrocelulosa se mantuvo 5 minutos en una solución de diaminobencidina 0,5 mg/ml, H₂O₂ 0.15% (v/v), Tween-20 0.3% (v/v) en PBS. La presencia de reacción fue estimada de acuerdo a la intensidad de la marca ocasionada por la precipitación de DAB.

Determinación de especificidad de los anticuerpos mediante Inmunodetección (Western blot). Un extracto de proteínas totales de hígado de rata fue sometido a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS en condiciones desnaturantes, de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Posteriormente, las proteínas presentes en el gel de poliacrilamida fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, la cual fue sometida a inmunodetección de acuerdo al método descrito por Tsang y col. (1983). La membrana fue bloqueada con solución de PBS-tween-leche (Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5, Tween-20 0.3% (v/v) y leche descremada 5% (p/v)) a 30 °C por 30 minutos. Posteriormente fue incubada con una dilución 1:1.000 del anticuerpo IgY purificado, el cual fue inmunodetectado con anticuerpo secundario de cabra anti-IgY de gallina acoplado a peroxidasa. El revelado se llevó a cabo de la misma manera que en el ensayo en gota. La presencia de reacción fue estimada de acuerdo a la intensidad de la marca debida a la precipitación de DAB.

Análisis estadístico. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de "t de Student" para muestras pareadas mediante el programa computacional "graph Pad InStat" (Graph Pad Software), considerando un nivel de significancia de p<0.05. Los datos analizados correspondieron a la cantidad de pixeles obtenidos por dot blot en títulos de 1:10.000 y 1:20.000 de los anticuerpos purificados.

RESULTADOS

Purificación de FBPasa. El análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturantes mostró que la enzima se encontraba en un alto grado de pureza. Se

determinó la existencia de una banda única de proteína correspondiente a la FBPasa. Al comparar los píxeles de esta banda con los píxeles del fondo del carril se determinó que aproximadamente la FBPasa se encontraba en un 99% pura. Utilizando un marcador de proteínas de rango amplio y tinción con azul de Coomasie, se determinó que la proteína purificada poseía una masa de 36 kDa correspondiente al monómero de FBPasa (figura 1 A).

Inmunización. Luego de la segunda inoculación, los grupos de aves inoculados por vía intramuscular y subcutánea presentaron un período de muda de plumas y la consecuente disminución en la producción de huevos. Por otra parte, al finalizar el ensayo se realizaron necropsias en todas las gallinas, encontrándose lesiones inflamatorias, con contenido caseoso en el tejido circundante al punto de inoculación. La magnitud de las lesiones fue similar en ambos grupos de gallinas, encontrándose pequeñas diferencias individuales dentro de un mismo grupo.

Título de los anticuerpos. Luego de la tercera inmunización se determinó el título de los anticuerpos producidos por ambas vías de inoculación (cuadro 1). El análisis de imagen digital indicó que el nivel de anticuerpos contra

CUADRO 1. Vía de inoculación y título de los anticuerpos luego de la tercera inoculación.

Inoculation route and antibody titer after third immunization.

Gallina	Vía de inoculación	* Título
Nº 1	intramuscular	1:30.000
Nº 2	intramuscular	1:50.000
Nº 3	intramuscular	1:50.000
Nº 4	subcutánea	1.50.000
Nº 5	subcutánea	1:60.000
Nº 6	subcutánea	1:40.000

* El título de los anticuerpos fue estimado analizando las marcas de DAB producidas en membranas de nitrocelulosa sembradas con 20 ng de FBPasa pura. The antibody titer was determined by analyzing the DAB staining in dot blots using nitrocellulose membranes spotted with 20 ng of pure FBPase.

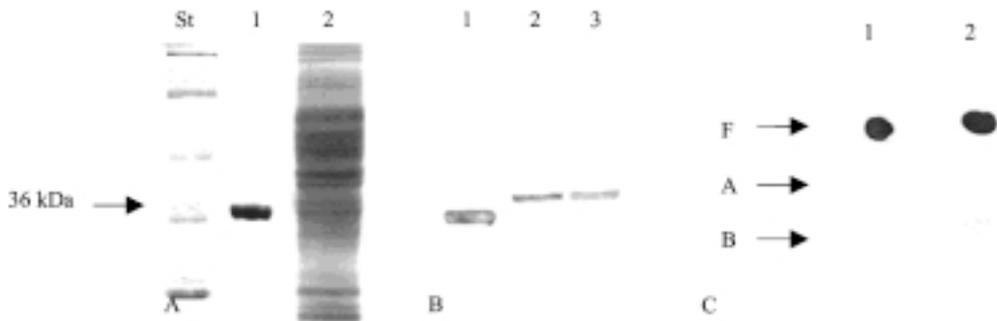


FIGURA 1. Determinación de la especificidad de los anticuerpos obtenidos por inoculación intramuscular y subcutánea mediante western blot (B) y dot blot (C). A: Análisis mediante gel de poliacrilamida 12%: FBPasa purificada (1) y extracto de proteína total de hígado de rata (2) teñido con azul de Coomasie. St: Marcador de proteínas rango amplio (15-116 KDa). B: inmunodetección de FBPasa con anticuerpos de gallina en muestra con FBPasa pura (1) y en extracto de proteína total de hígado de rata con anticuerpo obtenido por inoculación intramuscular (2) y por inoculación subcutánea (3). C: análisis mediante ensayo en gota con anti-FBPasa, en dilución de 1:1.000, obtenida por inoculación intramuscular (1) y subcutánea (2). F: FBPasa; A: aldolasa A; B: aldolasa B.

Specificity of antibodies obtained by intramuscular and subcutaneous inoculation determined by western blot and dot blot A: analysis by PAGE shows: purified FBPase (1) and total protein extract of rat liver (2). St: Molecular weight standard (15-116 KDa). B: immunodetection of FBPase with hen antibodies in a sample of pure FBPase (1) and a rat liver total protein extract with antibodies obtained by intramuscular (2) and subcutaneous (3) inoculations. C: dot blot analysis with anti-FBPase, in diluted 1:1000, obtained by intramuscular (1) and subcutaneous inoculations (2). F: FBPase; A: aldolase A; B: aldolase B.

FBPasa presente en la yema de los huevos, previo a las inmunizaciones, fue mínimo o no existente, determinándose un número de pixeles cercanos a la respuesta basal (20 pixeles). Elevados títulos de anticuerpos fueron detectados ya a doce días después de la primera inyección, alcanzando su máximo 1-2 semana después de la tercera inoculación (figura 2). Resultados similares se obtuvieron con las otras gallinas inmunizadas (datos no mostrados). Además, al comparar la

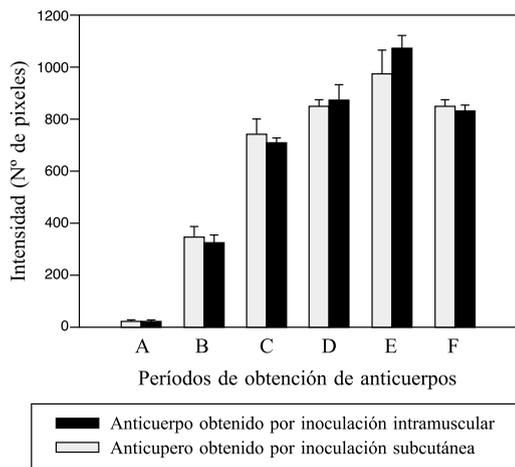


FIGURA 2. Análisis digital de la tinción de DAB, obtenidas mediante ensayo en gota con los anticuerpos anti-FBPasa. Se muestra el análisis de una gallina de cada grupo de inoculación usando una dilución de 1:10.000, a diferentes tiempos de inmunización. A: preinmune; B: 12 días después de la 1ª inmunización; C: 1 semana después de la 2ª inmunización; D: 1 semana antes de la 3ª inmunización; E: 1 semana después de la 3ª inmunización; F: 4 semanas después de la 3ª inmunización. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos, lo cual fue determinado por la prueba de *t* de Student.

Digital analysis of DAB signals obtained by dot blot with anti-FBPase antibodies. Analysis of one chicken from each inoculation group at different immunization stages was diluted 1:10.000. A: pre-immune; B: twelve days after the first immunization; C: one week after the second immunization; D: one week before the third immunization; E: one week after the third immunization; F: four week after the third immunization. No significant difference was observed between both groups as determined by Student's *t* test.

cantidad de pixeles, durante los distintos tiempos del experimento, se encontró que ambas vías de inoculación no presentaron diferencias (figura 2). Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos dentro de cada grupo de inoculación, se observó que existen diferencias individuales en la producción de anticuerpos (figura 3). Utilizando un título bajo (1/1000) no se observa esta diferencia, la que comienza a ser evidente al realizar el análisis con un título de 1:10.000. De esta forma, se determinaron diferencias entre un 50 % y un 100 % entre gallinas del mismo grupo, encontrándose las mayores variaciones en las aves inoculadas por vía subcutánea (figura 3). Sin embargo, se determinó que no existen diferencias significativas entre las vías utilizadas para la producción de anticuerpos anti-FBPasa.

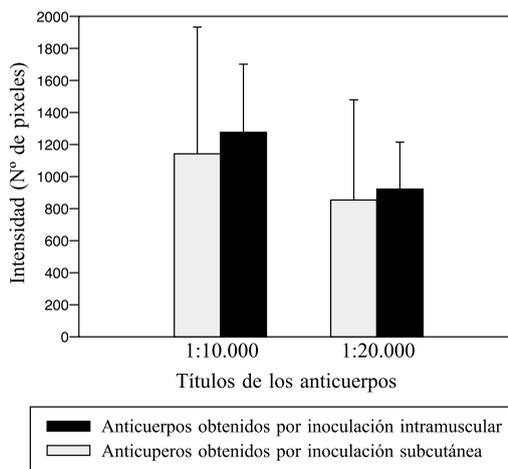


FIGURA 3: Análisis digital de la intensidad de las marcas de DAB obtenidas mediante ensayo en gota, usando dos diluciones (1:10.000 y 1:20.000) de los anticuerpos anti-FBPasa (1 semana después de la 3ª inmunización) de ambos grupos de inoculación. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos, lo cual fue determinado por la prueba de *t* de Student.

Digital analysis of the DAB signals obtained by dot blot, using two dilution (1:10.000 and 1:20.000) of anti-FBPase antibodies (1 week after the third immunization) of both inoculation groups. No significant difference was observed between both groups as determined by Student's *t* test.

Determinación de especificidad de los anticuerpos anti-FBPasa. Mediante ensayo en gota, se determinó la posible reacción cruzada que pudieran presentar los anticuerpos purificados, con dos enzimas que copurifican en condiciones similares a las de FBPasa (aldolasa A y aldolasa B). Los anticuerpos obtenidos por inmunización intramuscular y subcutánea mostraron ser específicos para FBPasa, no detectándose reacción con las otras dos proteínas (figura 1C). Posteriormente, mediante análisis de Western blot de un extracto de proteína total de hígado de rata, se determinó que los anticuerpos producidos a través de ambas vías de inoculación reconocían una banda de masa ligeramente superior a 36 kDa (figura 1B), correspondiente a la masa molecular de la FBPasa de hígado de rata, dentro de una población con más de 50 proteínas diferentes.

DISCUSIÓN

El proceso de inmunización produjo zonas con daño tisular, lo cual puede ser atribuido a la utilización del adyuvante. En ambos grupos experimentales se encontraron lesiones macroscópicas similares con contenido caseoso circundantes al punto de inoculación. Estas observaciones difieren de las descritas por Gassmann y col. (1990), quienes informan que el adyuvante completo es bien tolerado y no produce reacciones inflamatorias. Como las lesiones macroscópicas son comparables en ambos grupos de inoculación no es posible recomendar en forma preferencial el uso de una de estas vías. Sin embargo, se estima que estas lesiones cumplieron un rol importante en la estimulación anticipada del inicio del período de muda de plumas en las gallinas, lo que condujo a una fuerte disminución en la producción de huevos. A pesar de esta interrupción en la producción, ambos grupos de inoculación mantuvieron elevados títulos de anticuerpos (cuadro 1). Al respecto, Carlander y col. (2001) indican que el transporte de IgY desde el suero a la yema del huevo no decrece al producirse una interrupción en la postura de los huevos. No obstante, se estima importante seleccionar

gallinas jóvenes, previo o al inicio de su período de postura, para comenzar la etapa de inmunización. Evitando de este modo que el estrés ocasionado por la manipulación durante las inoculaciones y la acción irritante del adyuvante, disminuyan la producción de huevos y con ello la producción de anticuerpos. La inoculación con aldolasa B y adyuvante completo de Freund en otro grupo de aves, antes del período de postura de huevos, evitó la disminución de la producción de huevos y con ello la disminución de los anticuerpos obtenidos (datos no mostrados). Otros autores han propuesto que es factible sustituir el adyuvante completo por el incompleto en la inmunización primaria, lo que no alteraría una efectiva respuesta inmunológica, evitando las lesiones y disminuyendo la mortalidad de las aves (Schade y col., 1996).

De acuerdo a Patterson y col. (1962) los anticuerpos aparecen en la yema 8 días después de la inoculación primaria, obteniéndose el máximo nivel a partir del día 12. Teniendo en cuenta esta información, la determinación de anticuerpos se inició doce días después de la primera inmunización. Las gallinas utilizadas en este ensayo proporcionaron huevos con una alta tasa de anticuerpos por un período de a lo menos dos meses (figura 2). En este sentido, la persistencia de elevados títulos de anticuerpos en yema es mayor que la observada en el suero de las aves (Patterson y col., 1962). La primera medición del nivel de anticuerpos, en la yema del huevo post-inoculación, mediante análisis digital, arrojó un número de 350 pixeles, indicando una elevada cantidad de anticuerpos a pocos días de iniciarse el ensayo.

El nivel de anticuerpos luego de la segunda inmunización es mayor al obtenido luego de la primera, este incremento se debe a la acción de las células B de memoria que permiten una más fácil y rápida respuesta ante el antígeno (Kuby, 1997). Posteriormente, el nivel de los anticuerpos se mantuvo relativamente alto sin mayores declinaciones durante el período experimental (11 semanas) observándose la mayor intensidad en la marca de la nitrocelulosa luego de la tercera inmunización (8 semanas). La persistencia de

altos títulos de anticuerpos y la alta cantidad de inmunoglobulinas presente en la yema de un huevo, equivalentes a las obtenidas por el sangramiento de un conejo (Frendscho, 1994), determina que la producción de anticuerpos desde huevos de gallina es una alternativa mucho más conveniente y barata, sólo comparable en cantidad con lo producido por grandes mamíferos, como bovinos o equinos (Larsson y col., 1993).

Las diferencias obtenidas dentro de cada grupo de inoculación, de un 50 % a un 100% en el número de píxeles (figura 3), pueden ser atribuidas a factores individuales. Sin embargo, al comparar el número de píxeles promedio entre ambos grupos de inoculación, no se encontraron diferencias importantes, lo cual estaría indicando que la utilización de cualquiera de estas dos vías de inoculación para promover la producción de anticuerpos de proteínas citosólicas (como la FBPasa) en gallinas, es igualmente efectiva.

Un aspecto importante de la investigación fue determinar la especificidad de los anticuerpos purificados desde yema de huevo. Se ha descrito que FBPase interactúa con otras enzimas del metabolismo y que en ciertas condiciones de purificación puede estar contaminada con otras enzimas. Entre ellas, la más descritas son su interacción con la aldolasa A y B. Los ensayos en gota muestran que no existe reacción cruzada entre el anticuerpo anti-FBPasa con aldolasa A y aldolasa B, y que el anticuerpo producido detecta exclusivamente a la FBPasa (figura 1C). Estos resultados indican fuertemente que el anticuerpo obtenido es altamente específico. Este análisis fue corroborado realizando un inmunoblot de un extracto de proteínas totales de hígado de rata. Los resultados de inmunodetección muestran inequívocamente que el anticuerpo purificado desde huevos contra FBPasa presenta una alta especificidad, detectándose específicamente a la enzima en un extracto de proteínas totales de hígado de rata (figura 1B). Además, como se muestra en la carril 1 de la figura 1B se confirmó que el anticuerpo producido reconoce a la FBPasa purificada. Esta alta especificidad demostrada por el anticuerpo anti-FBPasa permitirá su utilización en ensayos

de inmunohistoquímica. Este análisis podría posteriormente dilucidar la localización de la fructosa-1,6-bisfosfatasa a nivel celular en diferentes condiciones fisiológicas. Asimismo, debido a las características inmunológicas de IgY de disminuir los falsos positivos y no interactuar con las IgG de mamíferos posibilitaría la realización de estudios de co-localización, utilizando a la vez anticuerpos mamíferos de otras enzimas relacionadas en sus procesos metabólicos

En conclusión, en este trabajo se compararon dos vías de inmunización para la obtención de anticuerpos desde la yema del huevo de gallinas mediante la estimación del título y la caracterización de los anticuerpos a través de diversos ensayos inmunológicos. Estos son los primeros estudios donde se muestra que no existen diferencias entre estas dos vías de inmunización (intramuscular y subcutánea) para la producción de anticuerpos de proteínas citosólicas como la FBPasa. Las diferencias detectadas dentro de cada grupo pueden atribuirse a factores individuales. Por otra parte, la elevada concentración de anticuerpos en cada huevo (15mg/ml), el largo período de postura de las gallinas (1 año) y la gran cantidad de IgY (100-300 mg/huevo) hace a este método una alternativa mucho más económica que las utilizadas convencionalmente.

RESUMEN

El presente estudio comparó las vías de inoculación intramuscular (IM) y subcutánea (SC) para la producción de anticuerpos en gallinas. Seis gallinas Leghorn de postura fueron separadas en dos grupos de inoculación idénticos e inmunizadas con fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) purificada de riñón de cerdo. Las gallinas fueron inoculadas con un intervalo de 2 y 4 semanas, con una emulsión mezclada con FBPasa purificada y adyuvante de Freund completo (primera inoculación) y adyuvante de Freund incompleto (segunda y tercera inoculación). Los anticuerpos obtenidos desde yema de huevo fueron purificados y titulados por ensayo en gota. Elevadas cantidades de

anticuerpo fueron producidas por ambos grupos de gallinas y los títulos fueron comparables. Sin embargo, en cada grupo de inoculación se encontraron algunas diferencias atribuibles a variaciones individuales. Los resultados muestran que ambas vías de inmunización (SC e IM) son igualmente efectivas en la generación de anticuerpos desde gallinas contra enzimas citosólicas. Además, el análisis mediante inmunodetección reveló que los anticuerpos anti-FBPasa obtenidos por inoculación intramuscular y subcutánea, reconocieron a la enzima en extractos de hígado de rata, los cuales contenían más de 50 diferentes proteínas. Estos resultados demostraron que los anticuerpos producidos por estas dos vías de inoculación son altamente específicos.

BIBLIOGRAFIA

- AKITA, E., S. NAKAI. 1992. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *J. Food Sci.* 57: 629-634.
- AKITA, E., S. NAKAI. 1993. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli strain. *J. Immunol. Methods.* 160: 207-214.
- BRODERSON, J. R. 1989. A retrospective review of lesson associated with the use of Freund's adjuvant. *Lab. Anim. Sci.* 39: 400-405.
- CAMENISCH, G., M. TINI, D. CHILOV, I. KVETIKOVA, V. SRINIVAS, J. CARO, P. SPIELMANN, R. WENGER, M. GASSMANN. 1999. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 alfa. *FASEB J.* 13: 81-88.
- CARLANDER, D., H. KOLLBERG, P. WEJAKER, A. LARSSON. 1999. Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization by gargling with specific antibodies: A preliminary report. In: Egg Nutrition and Biotechnology. Sim JS, Nakai S and Guenter W (Eds) CABI Publishing, Wallingford, UK.
- CARLANDER, D., M. WILHELMSON, A. LARSSON. 2001. Limited day to day variation of IgY levels in eggs from individual laying hens. *Food Agr. Immunol.* 13: 87-92.
- CARLANDER, D. 2002. Avian IgY antibody *in vitro* and *in vivo*. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine. Acta Universitatis Upsaliensis.
- COLEMAN, M. A. 1996. Oral administration of chicken yolk immunoglobulin to lower somatic cell count in the milk of lactating ruminants. US Patent # 5585098.
- COLEMAN, M. A. 1999. Using egg antibodies to treat diseases. In: Egg Nutrition and Biotechnology. Sim JS, Nakai S and Guenter W (Eds) CABI Publishing, Wallingford, UK.
- COLOMBO, G., E. HUBERT, F. MARCUS. 1972. Selective alteration of the regulatory properties of fructose-1,6-diphosphatase by modification with pyridoxal 5'-phosphate. *Biochemistry* 11: 1798-1803.
- SONG, C. S., J. H. YU, D. H. BAI, P. HESTER, K. H. KIM. 1985. Antibodies to the alfa-subunit of insulin receptor from eggs of immunized hens. *J. Immunol.* 135: 3354-3359.
- FRENDSCHO, M. 1994. Why IgY? Chicken polyclonal antibody, an appealing alternative. *Promega Notes* 46: 11.
- GASSMANN, M., P. THOMMES, T. WEISER, U. HUBSCHER. 1990. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* 4:2528-2532.
- GERSHONI, J. M., G. E. PALADE. 1983. Protein blotting: Principles and applications. *Anal. Biochem.* 131: 1-15.
- GUTIERREZ, E., R. GARCIA, R. SCHADE. 2001. Human haemoclassification by use of specific yolk antibodies obtained after immunisation of chickens against human blood group antigens. *Altern. Lab. Anim.* 29: 717-726.
- KUBY, J. 1997. Cell-mediated and humoral effector responses. 3rd ed. New York: W.H. Freeman and Company. 379-413.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LARSSON, A., R. BALÖW, T. LINDAHL, P. FROSBERG. 1993. Chicken antibodies: Taking advantage of evolution- A review. *Poultry Sci.* 72: 1807-1812.
- LI, X., T. NAKANO, H. SUNWOO, B. PAEK, H. CHAE, J. SIM. 1998. Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. *Poultry Sci.* 77: 266-270.
- MARQUARDT, R., L. JIN, J. KIM, L. FANG, A. FROHLICH, S. BAIDOO. 1999. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. *FEMS Immunol. Med. Mic.* 23: 283-288.

- MONTES, P., M. MURCIA, Q. ZARCO. 1994. Producción de anticuerpos anti progesterona a partir de yema de huevo de gallinas y de suero sanguíneo de conejos, para ser utilizados en radioinmunoanálisis. *Vet. Méx.* 25: 117-125.
- ORSINI, G., P. LAVOIE, E. SMITH, A. NANCI. 2001. Immunochemical characterization of a chicken egg yolk antibody to secretory forms of rat incisor amelogenin. *J. Histochem. Cytochem.* 49: 285-292.
- PATTERSON, R., J. YOUNGNER, W. WEIGLE, F. DIXON. 1962. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J. Immunol.* 89: 272-278.
- REYES, A., M. BURGOS, E. HUBERT, J. SLEBE. 1987. Selective thiol group modification renders fructose-1,6-bisphosphatase insensitive to fructose-2,6-bisphosphate inhibition. *J. Biol. Chem.* 262: 8451-8454.
- ROSE, M., E. ORLANS, N. BUTTRES. 1974. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur. J. Immunol.* 4: 521-523.
- SAEZ, D., C. FIGUEROA, I. CONCHA, J. SLEBE. 1996. Localization of the fructose-1,6-bisphosphatase at the nuclear periphery. *J. Cell. Biochem.* 63: 453-462.
- SCHADE, R., C. STAAK, C. HENDRIKSEN, M. ERHARD, H. HUGL, G. KOCH, A. LARSSON, W. POLLMANN, M. VAN REGENMORTEL, E. RIJKE, H. SPIELMANN, H. STEINBUSCH, D. STRAUGHAN. 1996. The production of avian (Egg Yolk) Antibodies – IgY. The report and recommendations of ECVAM Workshop 21. <http://www.sph.jhu.edu/~altweb/science/pubs/ECVAM/ecvam21.htm>.
- SHIMIZU, M., R. FITZSIMMONS, S. NAKAI. 1988. Anti-*E.coli* Immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J. Food Sci.* 53: 1360-1366.
- SHIMIZU, M., H. NAGASHIMA, K. SANO, K. HASHIMOTO, M. OZEKI, K. TSUDA. 1992. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosci. Biotech. Bioch.* 56: 270-274.
- SUNWOO, H., E. LEE, K. MENNINEN, M. SURESH, J. SIM. 2002. Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Escherichia coli* 0157:H7. *J. Food Sci.* 67: 1486-1494.
- THALLEY, B., S. CARROLL. 1990. Rattlesnake and scorpion antivenoms from the egg yolks of immunized hens. *Biotechnol.* 8: 934-938.
- TIZARD, I. 1982. An introduction to veterinary immunology. 2nd edition. W. B. Saunders. Philadelphia.
- TSANG, V., J. PERALTA, A. SIMONS. 1983. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Method. Enzimol.* 92: 377-391.
- VAN SCHAFTINGEN, E. 1987. Fructose-2,6-bisphosphate. *Adv. Enzymol.* 59: 315-395.
- YANG, H., Z. JIN, Q. YU, T. YANG, H. WANG, L. LIU. 1997. The selective recognition of IgY for digestive cancers. *Chinese J. Biotech.* 13: 85-90.