

Tecnología de las inmunoglobulinas de yema de huevo

Conferencia del Dr. Horacio Raúl Terzolo

Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria

10 de Septiembre de 2009

El objetivo de esta presentación es introducir una nueva tecnología basada en la utilización de las inmunoglobulinas o anticuerpos de yema de huevo.

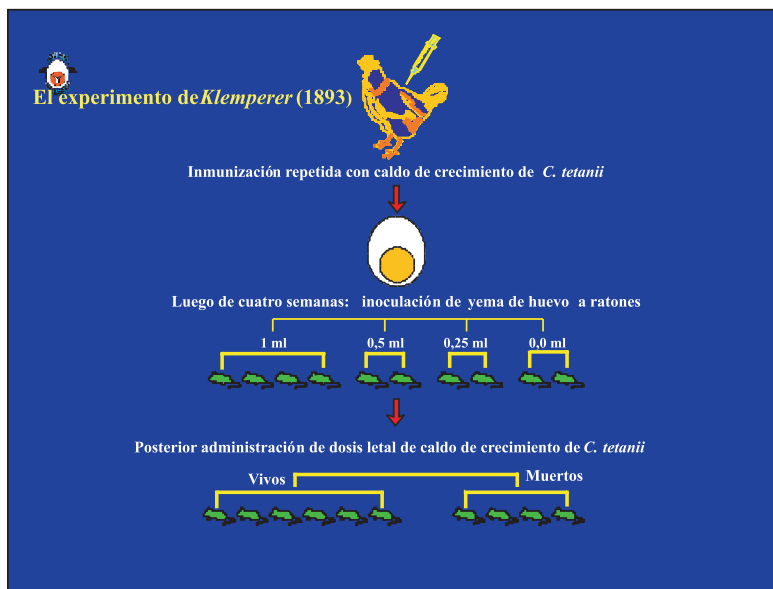
Adopción de esta tecnología

Desarrollo mis trabajos en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) desde mediados de 1974 en el Grupo de Sanidad Animal del Área de Producción Animal de la Estación Experimental Agropecuaria de Balcarce. Mis actividades en el INTA comenzaron mediante un Proyecto de Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) en donde comencé a trabajar en bacteriología veterinaria mediante un Proyecto de entrenamiento mediante el cual se desarrolló un laboratorio de diagnóstico para apoyo del diagnóstico orientado hacia las enfermedades de los animales de producción pecuaria. En esa época en el diagnóstico, además de los procedimientos habituales de laboratorio, se usaban los animales de laboratorio (conejos, cobayos, ratones y hamsters) para diagnóstico e investigación, entre otros usos para la producción de antisueros específicos. Actualmente las técnicas *in vitro* reemplazaron muchos de los procedimientos de diagnóstico en los que antes se usaban animales. Entre estos procedimientos la producción de inmunoglobulinas a partir de la extracción de yemas de huevo es una tecnología que reemplaza el sangrado de los animales por la simple recolección de huevos. Significa menor sufrimiento para los animales de laboratorio y apoyo al bienestar animal.

Otro de los motivos por se decidió trabajar con esta nueva tecnología es la actual orientación internacional de preservar las drogas antibióticas para uso en seres humanos y para ello se prohibió la administración de algunos antibióticos y se recomendó disminuir el empleo de otras en animales domésticos destinados a la producción de alimentos, para de ese modo reducir las posibilidades de que se generen cepas de microorganismos resistentes que luego no puedan ser controladas en seres humanos. Son conocidas las infecciones humanas incontrolables por plásmidos de multiresistencia en hospitales. La tecnología de los anticuerpos de yema huevo aplicada a la inmunoprofilaxis de las enfermedades de los animales de producción pecuaria es una alternativa de reemplazo muy atractiva. Particularmente porque estas inmunoglobulinas cuando se administran por vía oral tienen una serie de ventajas: no generan resistencia de las bacterias, pueden ser dirigidas en forma muy específica contra un amplio rango de agentes microbianos (bacterianos, víricos, parasitarios, etc.) y al ser tan específicas no interfieren con la flora normal, o sea que inclusive su administración es compatible con tratamientos combinados de probióticos.

Historia y Antecedentes

La protección del huevo fue descrita hace muchísimos años pero estos trabajos no permanecieron desconocidos y sin aplicación durante muchos años. En 1893 Klemperer, un adelantado para su época, describió en los Archivos de Patología y Farmacología un ensayo pionero sobre protección pasiva por anticuerpos de yema de huevo. Este investigador inoculó repetidamente a gallinas ponedoras con un caldo en el que había desarrollado una cepa de *Clostridium tetani*. Las gallinas fueron entonces repetidamente inoculadas con ese caldo que contenía la bacteria y su toxina. Luego recolectó los huevos de esas gallinas así hiperinmunizadas y preparó un extracto acuoso de las yemas. Con ese extracto Klemperer inoculó a tres grupos de ratones, respectivamente inyectándolos con 1 ml, 0,5 ml y 0,25 ml; dejó un cuarto grupo de ratones como control sin inocular con el extracto de las yemas. Posteriormente desafió a los cuatro grupos de ratones con una dosis letal del caldo que contenía la bacteria desarrollada con su toxina tetánica. Este investigador descubrió que todos los ratones que habían sido inyectados con 1 ml y 0,5 ml del extracto de yema sobrevivieron e inclusive habían quedado protegidos contra posteriores desafíos letales de la toxina inoculada por vía parenteral, mientras que todos los ratones que sólo habían sido inoculados 0,25 ml del extracto de yema o los animales controles que no habían recibido dicho extracto murieron rápidamente.



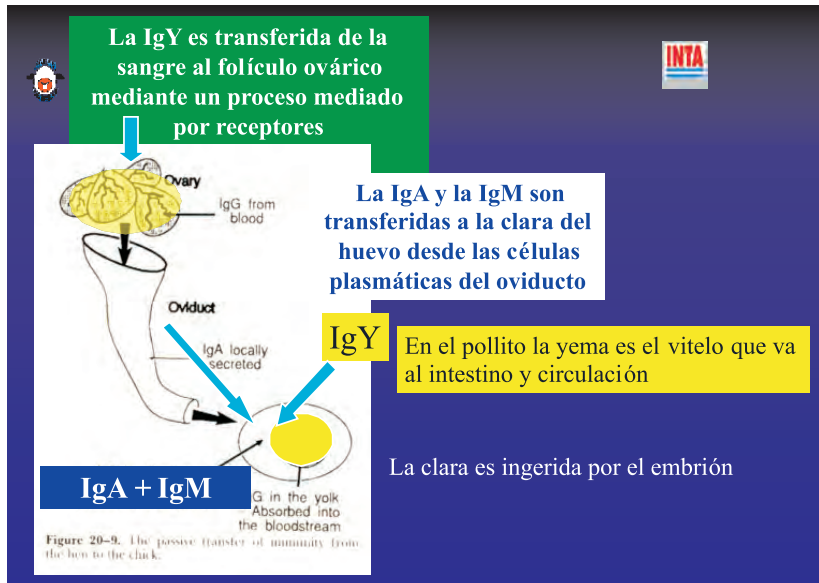
Este experimento demostró por primera vez la protección específica de la yema de los huevos y sentó los principios de lo que hoy conocemos como protección pasiva. Es increíble que este experimento tan importante quedara

en el olvido durante muchísimos años. Este tema recién fue continuado en Alemania de Este en 1959 por Russel y Burch, en su publicación «Los principios de la técnica experimental humana». Pero aún debieron transcurrir más de 20 años para que los resultados de Klemperer fueran finalmente conocidos y aplicados por otros investigadores.

La historia de la participación del INTA en este tema fue reciente. En 1998 Terzolo *et al.* evaluaron bacterinas experimentales inactivadas contra *Salmonella* Enteritidis en gallinas ponedoras y obtuvieron un extracto acuoso de las yemas de los huevos de las gallinas ponedoras que habían sido vacunadas. Fue sorprendente que ese extracto no purificado y simplemente concentrado por diálisis, que contenía inmunoglobulinas junto con otras proteínas del huevo, se comportara como si fuera un «antisuero». De hecho el mencionado extracto fue enviado al Instituto Nacional de Microbiología rotulado como un «suero» y se demostró que aglutinaba en forma específica para *Salmonella* Enteritidis, de la misma manera que lo hubiera hecho un antisuero de referencia de conejo. Este trabajo demostró que la IgY anti-*Salmonella* Enteritidis puede emplearse para identificar esa *Salmonella* por la prueba de aglutinación somática en placa y flagelar en tubo y se comprobó que esta reacción es altamente específica y comparable a la realizada rutinariamente con el antisuero del conejo. En este trabajo se demostró que se puede reemplazar el sangrado de los conejos por la recolección de huevos de las gallinas para producir reactivos específicos para identificar serovariedades de *Salmonella* según el clásico esquema Kauffman-White, que hoy en día se basa exclusivamente en el uso de antisueros de conejo.

Fundamento biológico

Así como los mamíferos transmiten a su descendencia anticuerpos a través del calostro, la leche o la placenta, las aves transfieren estos anticuerpos a su progenie a través de la yema de los huevos. La IgA y la IgM son transferidas desde las células plasmáticas del oviducto hacia la clara (Lösch, *et al.*, 1986; Rose *et al.*, 1974). La IgY se transfiere exclusivamente a la yema por un proceso activo mediado por receptores (Mohammed *et al.*, 1998; Morrison *et al.*, 2001). De este modo la IgY es la inmunoglobulina predominante en la yema mientras que la IgA y la IgM prevalecen en la clara del huevo. (Tizard, 1992).

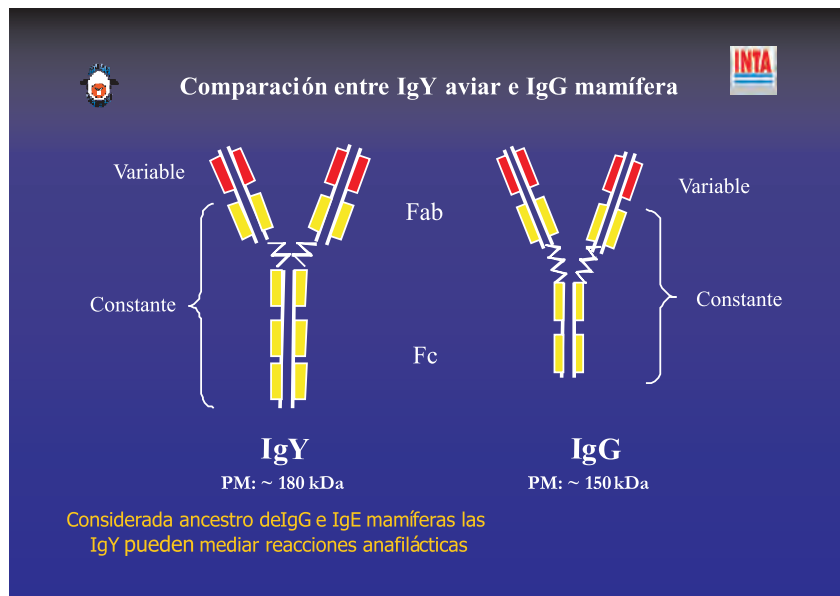


La IgY demora aproximadamente unos 3 a 7 días (lo más común es 5 días) en aparecer en un huevo desde el momento en que es activamente transportada desde la circulación sanguínea al ovocito hasta que es puesto por la gallina (Patterson, *et al.* 1962; Woolley & Landon, 1995). Durante este período de tiempo el ave ovula y el ovocito, a medida que pasa por las distintas secciones del oviducto, va adquiriendo sucesivamente la clara, las membranas internas y finalmente se forma la cáscara en su porción engrosada o útero. En las gallinas de alta postura la maduración de los ovocitos y la producción de huevos es seriada, de modo de casi todos los días estas aves producen un huevo. De modo que como una gallina ponedora de las actuales líneas genéticas pone más de 300 huevos al año, la producción de IgY es muy grande y por ello la gallina pueda ser utilizada para producir en forma económica grandes cantidades de anticuerpos. La cantidad de IgY transportada por cada huevo es independiente del tamaño del mismo (Dohms *et al.*, 1978). La cantidad de IgY transferida se relaciona directamente con su concentración en el suero sanguíneo de las gallinas (Morrison *et al.*, 2001), aunque diferido en el tiempo, pues es la concentración que había en el suero sanguíneo unos 3 a 7 días previos a la puesta del huevo.

En la naturaleza la yema de los huevos está destinada proporcionarle alimento y anticuerpos al pollito mediante la comunicación del saco vitelino con el intestino medio. Si bien la gallina ponedora produce huevos infértiles, cada huevo tiene su concentración de anticuerpos específicos contra las enfermedades que ha tenido contacto o que se ha inmunizado la gallina.

Estructura molecular de la IgY

La estructura de la molécula de IgY es comparable a la de las inmunoglobulinas de los mamíferos. La IgY está formada por dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas. A diferencia de los tres dominios constantes de la cadena pesada de la IgG, la cadena pesada de la IgY contiene un dominio variable y cuatro dominios constantes. Mientras que el peso molecular (PM) de la IgG es de alrededor de 160.000 Daltons, según espectrofotometría de masas, el PM de la IgY es de aproximadamente 167.250 Daltons (Sun *et al.*, 2001). La región bisagra de la IgY está poco desarrollada.



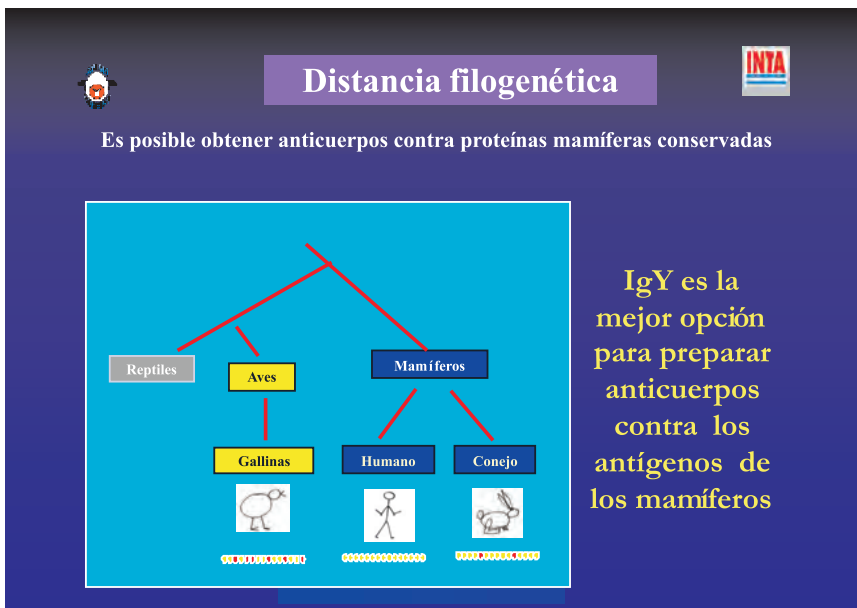
La porción Fc de la IgY es el sitio que presenta la mayor parte de las funciones biológicas efectoras, en forma similar a lo que ocurre con la IgG. El fragmento Fc de la IgY incluye dos cadenas laterales de carbohidratos, a diferencia de la IgG que sólo presenta una. La porción Fc de la IgY es el sitio que presenta la mayor parte de las funciones biológicas efectoras, en forma similar a lo que ocurre con la IgG. El fragmento Fc de la IgY incluye dos cadenas laterales de carbohidratos, a diferencia de la IgG que sólo presenta una.

Ventajas del empleo de la IgY

Desde el punto de vista económico, la tecnología IgY presenta ventajas incomparables (Chacana *et al.* 2004, Schade *et al.*, 2000, 2005 y 2007). El costo de criar una gallina no es muy diferente al de un conejo, a pesar de que la producción de anticuerpos de una gallina más o menos se corresponde con la de un animal grande, como por ejemplo una oveja o una cabra. Una sola gallina produce unos 50 a 100 mg de IgY por huevo y puede permanecer viva. En un año de postura produce una cantidad formidable de anticuerpos (aproximadamente entre 17 y 35 g de IgY/ave/año). Esta inmensa producción de anticuerpos, obtenida con costos relativamente bajos, posibilita la aplicación de esta tecnología en nuevos campos, tales como la inmunoterapia y la inmunoprevención de infecciones virales y bacterianas, tanto en medicina humana como veterinaria. En cambio los conejos, que se usan rutinariamente, deben sacrificarse y sólo producen en total unos 200 mg de IgG.

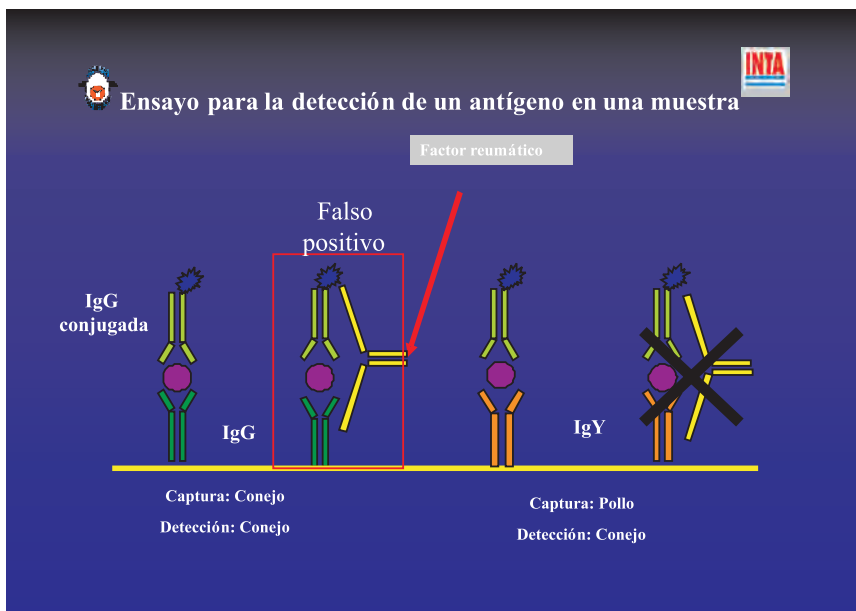
Otra de las ventajas es el bienestar animal pues, como dijimos anteriormente, la recolección de huevos reemplaza al sangrado, el cual puede ser muy traumático, por ejemplo cuando se emplean conejos que se sangran a blanco.

La distancia filogenética que existe entre las aves y los mamíferos es otra de las ventajas del uso de la IgY de las aves con respecto a la IgG de los mamíferos.



En el caso de proteínas ó péptidos altamente conservados, los pollos pueden producir anticuerpos en forma más eficaz que los conejos. Esto se debe a que existe una mayor similitud entre las secuencias de proteínas humanas y de conejos que la existente entre estos mamíferos y los pollos. El sistema inmune del conejo es incapaz de reconocer una proteína humana como una sustancia extraña. Esta proteína permanece indetectable para el sistema inmune del conejo, el cual entonces produce una respuesta «silenciosa». Por el contrario, esta misma proteína tiene mayores probabilidades de ser detectada como extraña por el sistema inmune de un ave. Por lo tanto, si un pollo y un conejo son inmunizados en forma similar con el mismo antígeno de origen mamífero, existen más probabilidades de que el ave responda más eficientemente que el conejo. Este es el caso de antígenos de origen mamífero que están filogenéticamente muy conservados.

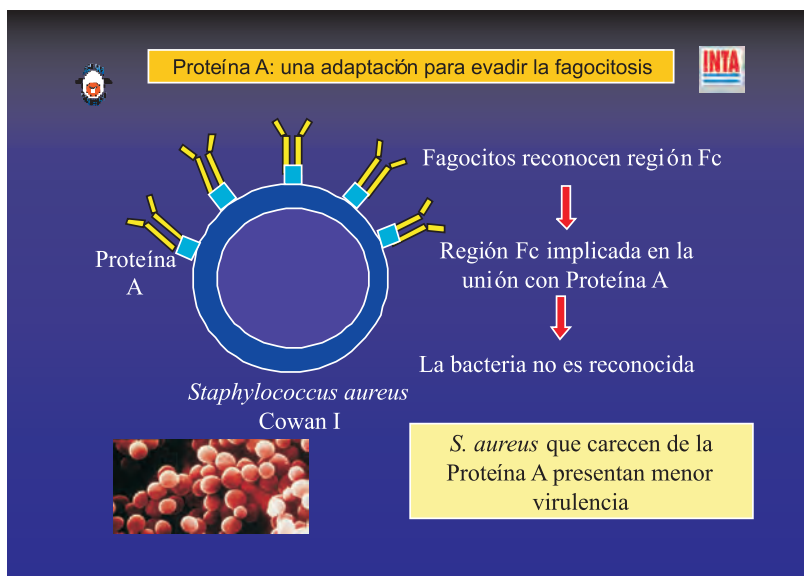
Otra gran ventaja de la IgY es la ausencia de reacciones inespecíficas con el complemento, factores reumatoides y heteroaglutininas de los mamíferos. Esta ausencia de reacciones inespecíficas hacen que la IgY pueda ser una inmunoglobulina de elección para ser utilizada para pruebas de ELISA evitando así resultados falsos positivos.



Extracción y purificación de la IgY

Para lograr la ruptura de la emulsión de la yema de huevo y obtener el extracto acuoso, la yema se homogeneiza con buffer ó agua, por ejemplo en una relación de 1:5 ó 1:9, se congela por aproximadamente 24 o más horas y después se descongela lentamente a 4° C (Schade *et al.*, 2000). El descongelado lento es un factor importante para la separación de las fases acuosa y lipídica mediante filtración simple o centrifugación.

Existen distintos métodos para la extracción de la IgY (De Meulenaer & Huyghebaert, 2001). Se cuenta con métodos de precipitación utilizando sulfato de amonio ó de sodio, polietilenglicol (PEG), ácido caprílico, Caragenina ó ftalato de hidroxil-propil-metil-celulosa. También es posible la purificación de la inmunoglobulina mediante metodologías cromatográficas. (Schade *et al.*, 2000). Para la purificación de algunas IgG de mamíferos se utilizan en forma rutinaria el método de cromatografía utilizando proteínas bacterianas que fijan inespecíficamente a la IgG por su fracción Fc (Tizard, 1992).



Algunas bacterias patógenas como el *Staphylococcus aureus* cepa Cowan I o una cepa de *Streptococcus suis* tienen a estas proteínas para evadir la respuesta inmune, evitando evidenciar sus antígenos cuando invaden los tejidos del huésped.

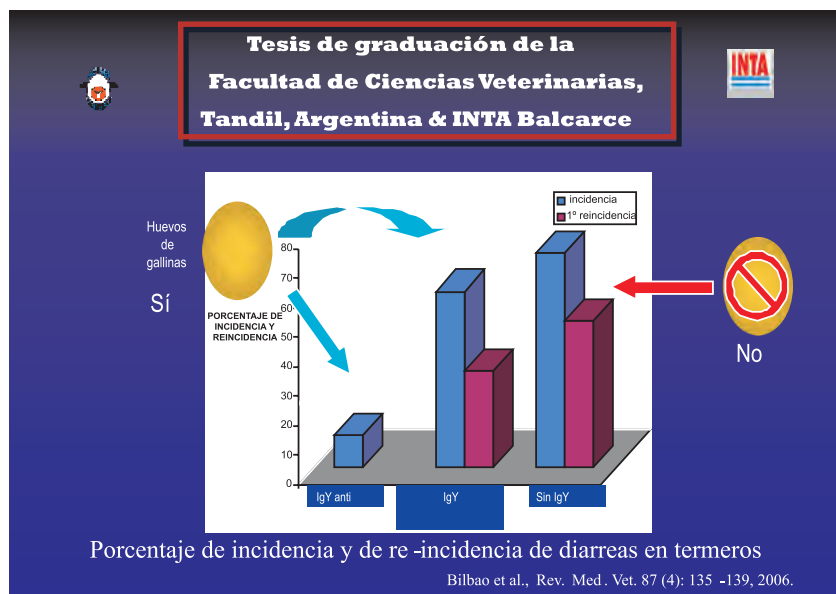
Como la IgY no se fija a estas proteínas no se pueden usar estas técnicas de purificación. Por ello, en el INTA de Balcarce, se realizó un trabajo de tesis doctoral del Lic. Pablo A. Chacana (2008), presentada en la UBA, para la búsqueda de estas proteínas en bacterias de origen avícola y en bacterias de

diversos orígenes, lográndose aislar bacterias con proteínas fijadoras de IgY aisladas de aves y del suelo e inclusive identificar los compuestos responsables de esta fijación inespecífica de la IgY a la fracción Fc.

Ejemplos de las aplicaciones de la Tecnología IgY en la Argentina

En el INTA de Balcarce Cipolla *et al.* (2001) produjeron anticuerpos contra *Campylobacter fetus* en pollos y conejos. Ambos anticuerpos fueron evaluados por dos laboratorios de la Argentina empleando una prueba de inmunofluorescencia directa usada el diagnóstico de la campylobacteriosis genital bovina. Se pudo demostrar que la IgG y la IgY tuvieron una eficiencia comparable en lo concerniente a su especificidad y sensibilidad, aunque el uso de los IgY indujo menor contraste inespecífico de fondo en las preparaciones microscópicas que la IgG.

La IgY fue exitosamente utilizada para la prevención y tratamiento de la diarrea neonatal de terneros y lechones contra diferentes cepas de *Escherichia coli*, rotavirus y coronavirus (Mine & Kovacs-Nolan, 2002). En la Argentina Bilbao *et al.* (2006) realizaron ensayos en terneros de guachera demostrando que la administración de huevos de gallinas vacunadas contra virus (rotavirus y coronavirus) y bacterias (*Salmonella* Dublin, Enteritidis y Typhimurium y *E. coli*) protegió significativamente a los terneros contra los síntomas y la reincidencia de la enfermedad con respecto a otros lotes de terneros que habían sido tratados con huevos de gallinas no inmunizadas o que no habían recibido huevos.



Recientemente Cigoy (2009) demostró, en su tesis de grado de la Universidad de Mar del Plata, la efectividad de los anticuerpos IgY anti-S. Enteritidis para inhibir el desplazamiento y desarrollo del microorganismo. Estos resultados señalan la importancia de implementar planes de vacunación en gallinas ponedoras para optimizar los títulos de IgY anti-S. Enteritidis en la yema de los huevos y así proteger al consumidor de las infecciones a través de huevos contaminados.

En 2008 se realizó en el INTA de Balcarce una tesis doctoral de la Facultad de Odontología de la UBA por la Odontóloga Soledad Pérez Lozano. Se inmunizaron gallinas con bacterinas elaboradas con cepas de *Streptococcus mutans* demostrándose, entre otros estudios, que la IgY específica inhibe la adherencia de esta bacteria a piezas de composite por lo que podría ser utilizada para prevenir caries, ya sea agregada a pastas dentales, colutorios o golosinas.

 **Tecnología IgY en Argentina:
Caries dental** 

Inhibición de la adherencia de *Streptococcus mutans*

Piezas de composite incubadas con *S. mutans* en presencia de IgY



S. mutans en caldo Cerebro corazón con sacarosa al 5% + IgY-anti- *S. mutans*.
24 hs. a 37°C + CO₂.
Lavado PBS pH 7,2.
Tinción con eritrosina.

**Tesis de Doctorado de Soledad Pérez Lozano
Fac. Odontología, UBA, 2008.**

Futuro de la Tecnología IgY

La tecnología IgY atrae cada vez más el interés de los científicos provenientes de distintos campos de la investigación, ya sea en medicina humana (diagnóstico pato-bioquímico, odontología, medicina forense, investigaciones biomédicas en general, etc.) como también en ciencias veterinarias (producción animal, agricultura, acuicultura, etc.).

Deberá determinarse si las formulaciones terapéuticas o profilácticas basadas en la IgY (huevo en polvo, soluciones de yema, etc.) son en realidad consideradas medicamentos, sobre los cuales se reglamentarán las correspondientes regulaciones, o bien si son considerados alimentos funcionales o aditivos alimenticios, los cuales pueden ser usados sin ninguna restricción, siendo así mucho más económicos que los medicamentos.

Bibliografía

1. Bilbao, G. N.; Chacana, P. A.; Mendiburu, A.; Rodríguez, E.; Blackhall, J. O.; Terzolo, H. R. (2006). Suministro de inmunoglobulinas de yema de huevo de gallina (IgY) como preventivo de la diarrea neonatal de los terneros de tambo. *Rev. Med. Vet.* 87 (4): 135-139.
2. Cigoy, M. L. (2009). Inhibición del desplazamiento y desarrollo *in vitro* de *Salmonella* Enteritidis mediante anticuerpos de yema de huevo. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Mar del Plata.
3. Cipolla, A.; Cordeviola, J.; Terzolo, H.; Combessies, G.; Bardon, J.; Nosedá, R.; Martínez, A.; Medina, D.; Morsella, C.; Malena, R. (2001). *Campylobacter fetus* diagnosis: Direct immunofluorescence comparing chicken IgY and rabbit IgG conjugates. *ALTEX* 18: 165-170.
4. Chacana, P. A. (2008). Estudio de proteínas bacterianas con afinidad a las inmunoglobulinas de yema de huevo (IgY) de gallina (*Gallus gallus*). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, . Universidad Nacional de Buenos Aires.
5. Chacana, P. A.; Terzolo, H. R.; Gutiérrez Calzado, E.; Schade, R. (2004). Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. *Revista de Medicina Veterinaria* 85 (5): 179-189.
6. De Meulenaer, B.; Huyghebaert, A., (2001) Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: A review. *Food Agricult. Immunol.* 13: 275-288.
7. Dohms, J.E.; Saif, Y.M.; Bacon, W.L. (1978). Studies on metabolism and concentration of immunoglobulin G in the newly hatched turkey poul. *Am. J. Vet. Res.* 39: 1466-1471.
8. Klemperer, F., 1893, Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisierungstherapie. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 31: 356-382.

9. Lösch, U.; Schraner, I.; Wanke, R.; Jürgens, L. (1986). The chicken egg, an antibody source. *J. Vet. Med. B* 33: 609-619.
10. Mine, Y.; Kovacs-Nolan, J. 2002. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *J. Med. Food* 5: 159-169.
11. Mohammed, S.M.; Morrison, S.; Wims, L.; Trinh, K.R.; Wildeman, A.G.; Bonselaar, J.; Etches, R.J. (1998). Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. *Immunotechnology* 4: 115-125.
12. Morrison SL; Mohammed SM; Wims, L.A.; Trinh, R.; Etches, R., 2001, Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Mol. Immunol.* 38: 619-625.
13. Patterson, R.; Youngner, J.S.; Weigle, W.O.; Dixon, F.J., (1962). Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J. Immunol.* 89: 272-278.
14. Pérez Lozano, Soledad. Tesis de Doctorado. Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA). Título de Tesis: «Inmunoprofilaxis pasiva oral de las caries humanas con IgY anti-Streptococcus mutans». Marzo de 2003 – Septiembre de 2008.
15. Rose, M.E.; Orlans, E.; Buttress, N. (1974). Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur. J. Immunol.* 4: 521-523.
16. Russel, W.M.S.; Burch, R.L. (1959). *The principles of human experimental technique.* Methuen, London.
17. Schade R.; Zhang, X. & Terzolo H.R. (2007). Use of IgY Antibodies in Human and Veterinary Medicine. In: *Bioactive Egg Compounds.* R. Huopalahti, R. Lopez-Fandiño, M. Anton & R. Schade (Eds.). Springer, Germany. ISBN 978-3-540-37883. Chapter 23, pp. 213-222,.
18. Schade, R.; Behn, I.; Erhard, M.; Hlinak, A.; Staak, C. (2000). *Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application.* IgY-Technology. (Ed) Springer, Lab Manuals, Berlin Heidelberg, New York pp. 255.
19. Schade, R.; Gutierrez Calzado, E.; 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 in human and veterinary medicine. *ATLA* 33 (2): 129-154.
20. Sun, S.; Mo, W.; Ji, Y.; Liu, S. (2001). Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15: 708-712.

21. Terzolo, H.R.; Sandoval, V.E.; Caffer, M.I.; Terragno, R.; Alcain, A. (1998). Aglutinacion de inmunoglobulinas de yema de huevo de gallina (IgY) contra *Salmonella enterica* serovariedad enteritidis. Rev. Arg. Microbiol. 30: 84-92.
22. Tizard, I., 1992, The phylogeny of the immune system. En: Veterinary Immunology an introduction, W.B. Saunders Company, Pennsylvania, p.465-466.
23. Woolley, J.A.; Landon, J. (1995). Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. J. Immunol. Meth. 178: 253-265.