



**UST**  
UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

# **Caracterización de anticuerpos IgY de *Nothoprocta perdicaria* (perdiz chilena): capacidad de aglutinación, activación del complemento y presencia de anticuerpos naturales frente a antígenos conocidos.**

Tesis para optar al grado académico de Licenciado en Tecnología Médica

**IVAN ARAYA BENAVIDES**

**Profesor guía: TM Carlos Cisternas**

**Enero, 2019**

**Temuco, Chile**



# UST

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS



Anticuerpos policlonales extraídos de animales de laboratorio



Centro europeo para la validación de métodos alternativos



Producción de anticuerpos de clase IgY extraídos de huevos de gallinas



**UST**

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

# Estructura general de los anticuerpos



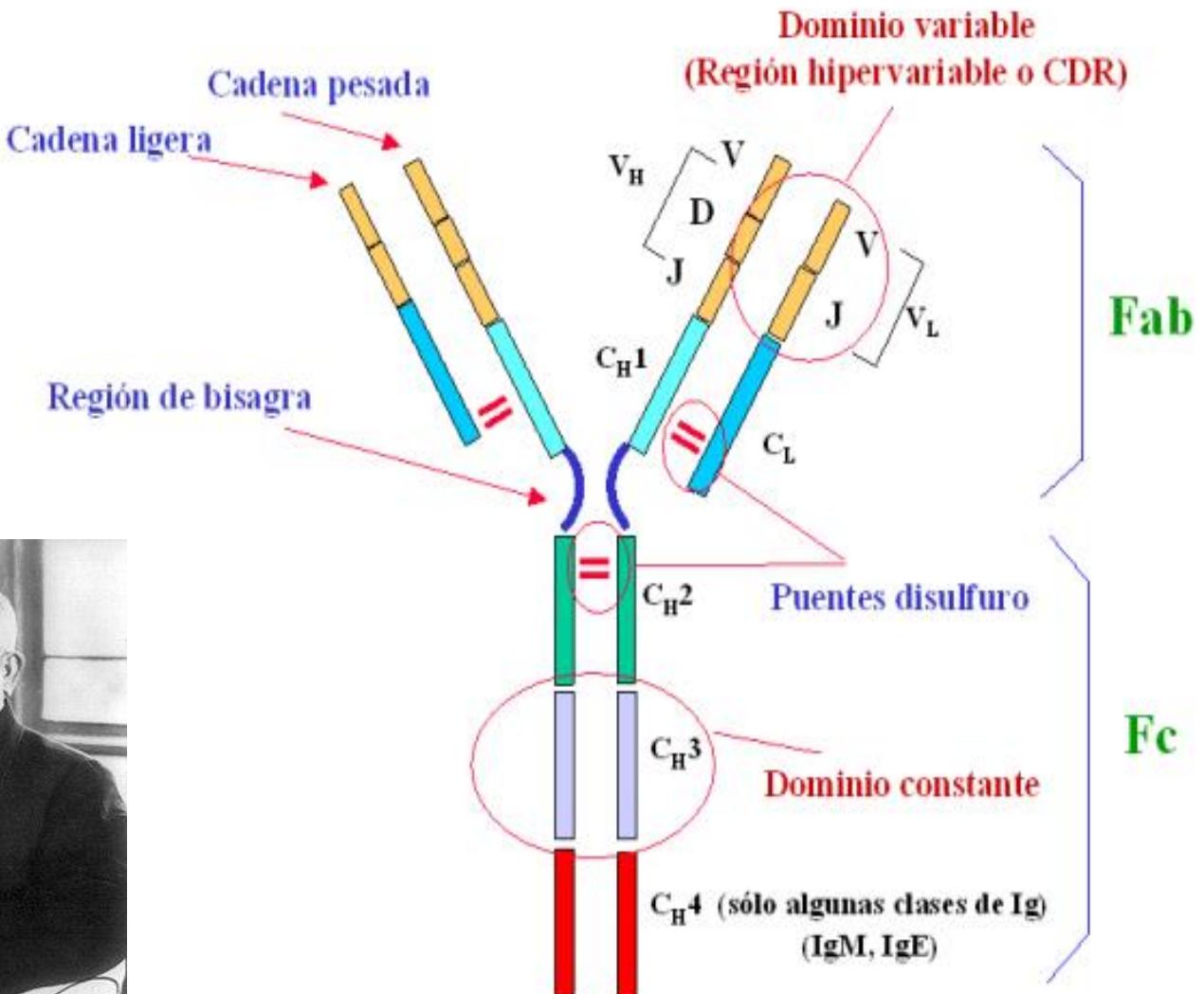
1890

**Emil Adolf von Behring**

Describieron la actividad de los anticuerpos contra la difteria y la toxina tetánica



**Shibasaburo Kitasato**

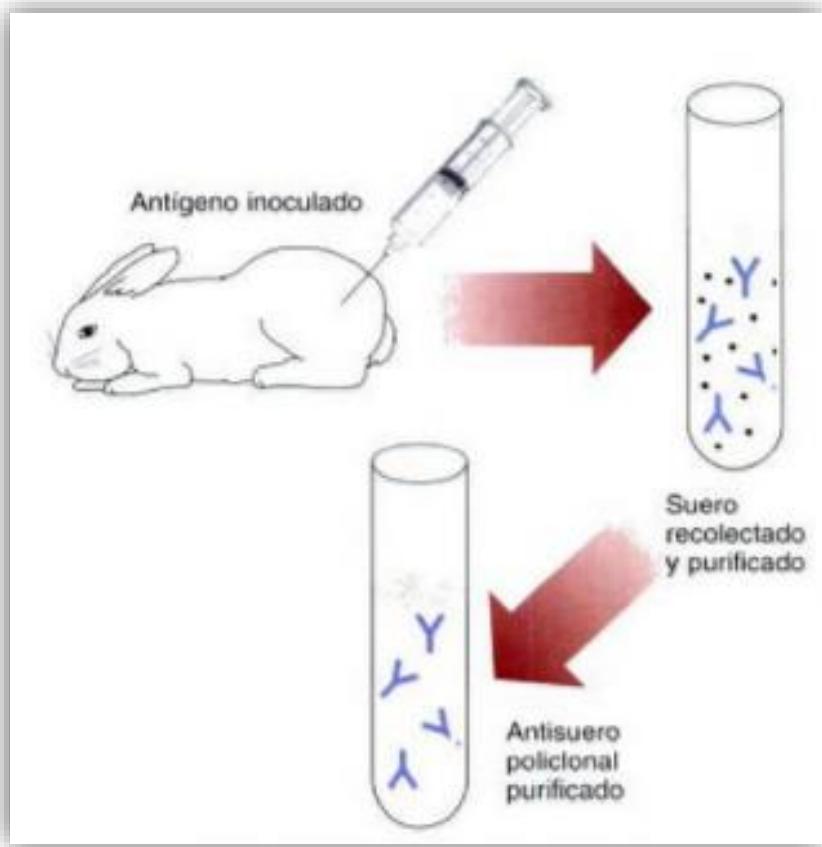




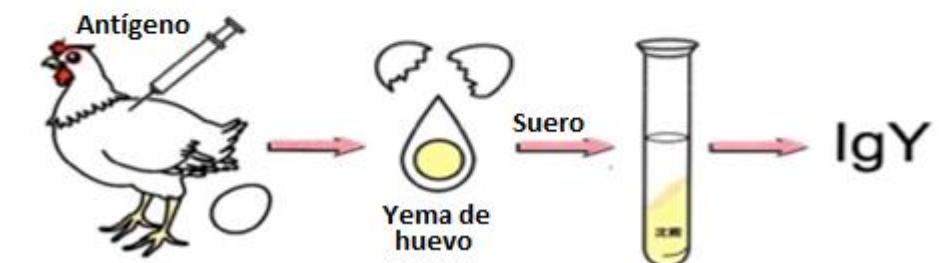
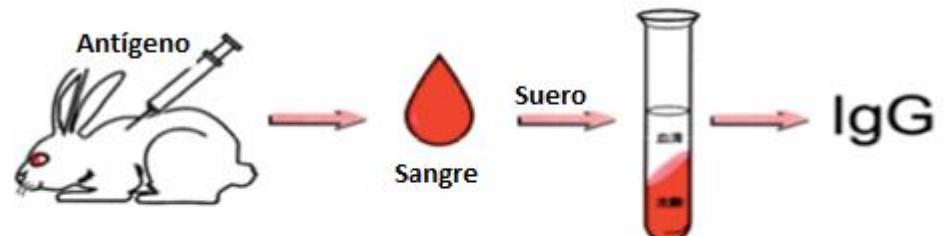
**UST**

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

# Producción de anticuerpos policlonales

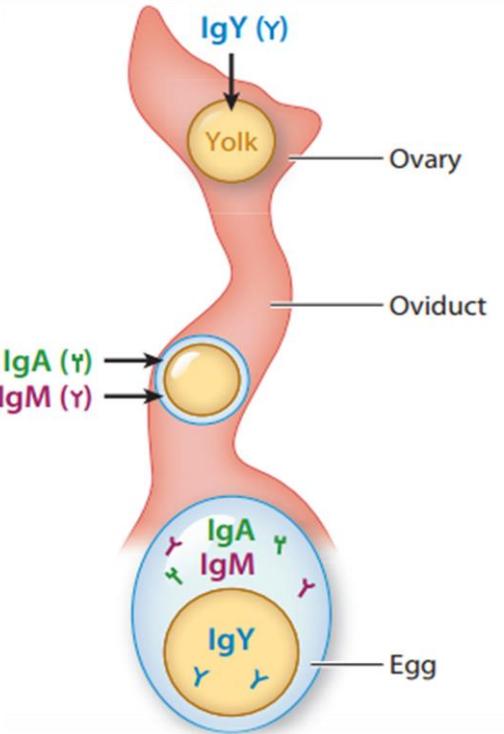


## Preparación de anticuerpos específicos





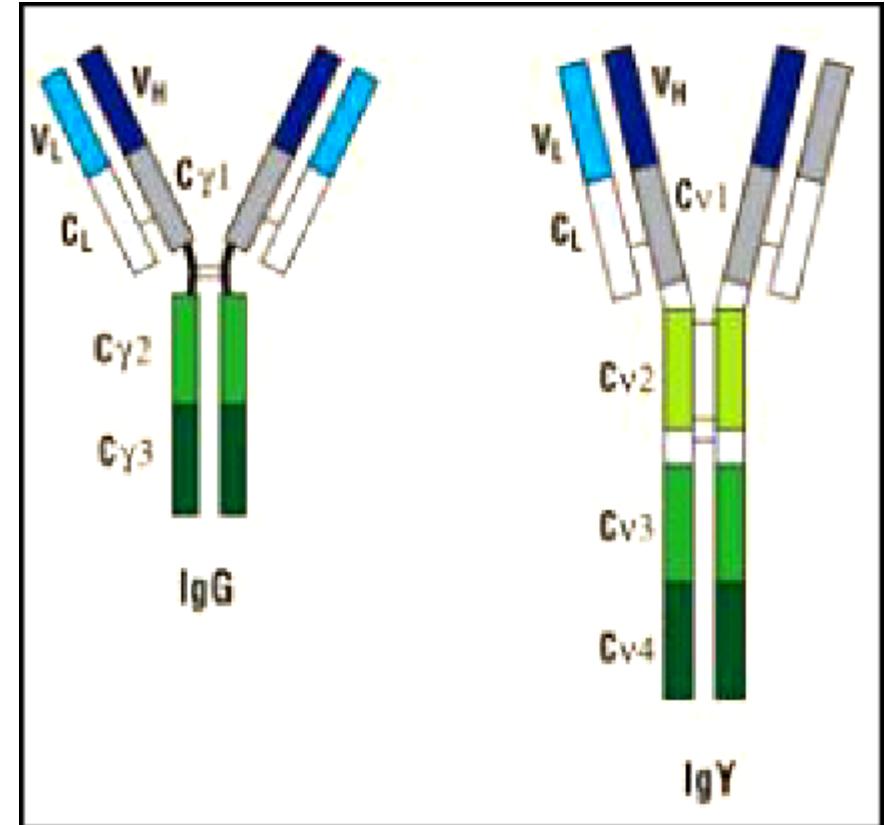
# Anticuerpos policlonales en aves



Translocación de IgY desde la sangre a la yema mediante receptores específicos.

IgA e IgM se depositan luego en la clara de huevo en el oviducto.

(hatta et al. 2008)



Estructura IgG representativa de mamíferos e IgY en su forma truncada.  
(Andrea et al. 2014)



**UST**

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

# Ventajas de la IgY de yema de huevo sobre la IgG de mamíferos

**Tabla comparativa de anticuerpos policlonales entre mamíferos y aves**

	Conejo	Gallina
<b>Numero de animales</b>	1	1
<b>Toma de muestra</b>	Sangrado (20 mL / semana)	Colección diaria huevos
<b>Volumen muestra (en 2 semanas)</b>	40 mL de sangre	14 huevos = 210 mL yema <sup>a</sup>
<b>Anticuerpos totales</b>	200 mg	1120 mg <sup>b</sup>
<b>Anticuerpos específicos</b>	5% (10 mg)	2-10% (22.4112 mg)
<b>Presencia de otras Ig</b>	IgM, IgA, IgE	Ninguno

(Narat,2003)



**UST**  
UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

# Métodos de obtención de anticuerpos Aviares

JOURNAL ARTICLE

## A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure

Tan S, Mohamedali A, Kapur A et al. [See more](#)

*Journal of Immunological Methods* (2012) 380(1-2) 73-76

DOI: [10.1016/j.jim.2012.03.003](https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.03.003)

JOURNAL ARTICLE

## IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation

Pauly D, Chacana P, Calzado E et al. [See more](#)

*Journal of Visualized Experiments* (2011) (51)

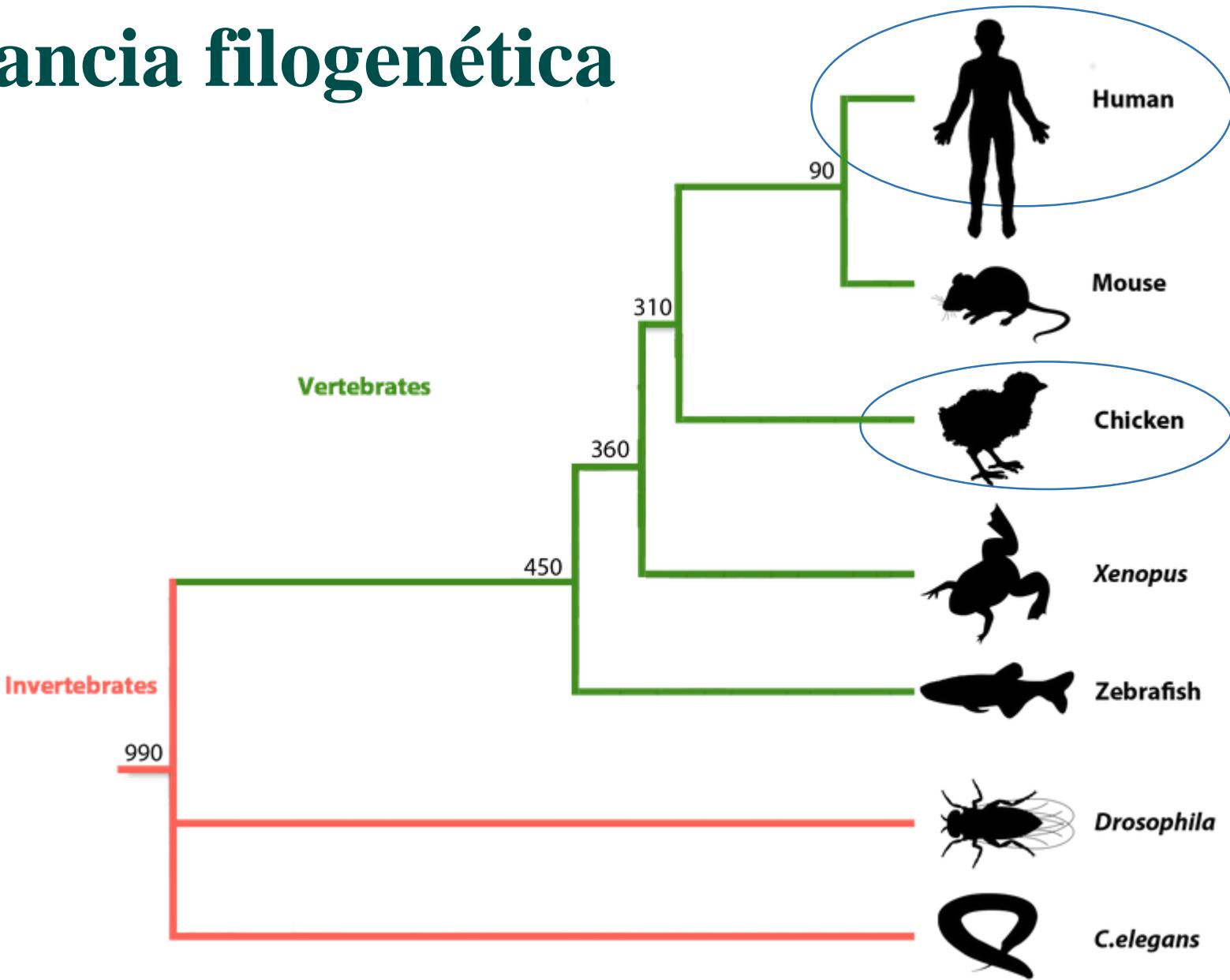
DOI: [10.3791/3084](https://doi.org/10.3791/3084)



UST

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

# Distancia filogenética



(wheeler & brandli 2009)



**UST**

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

# Nueva alternativa de Ac IgY

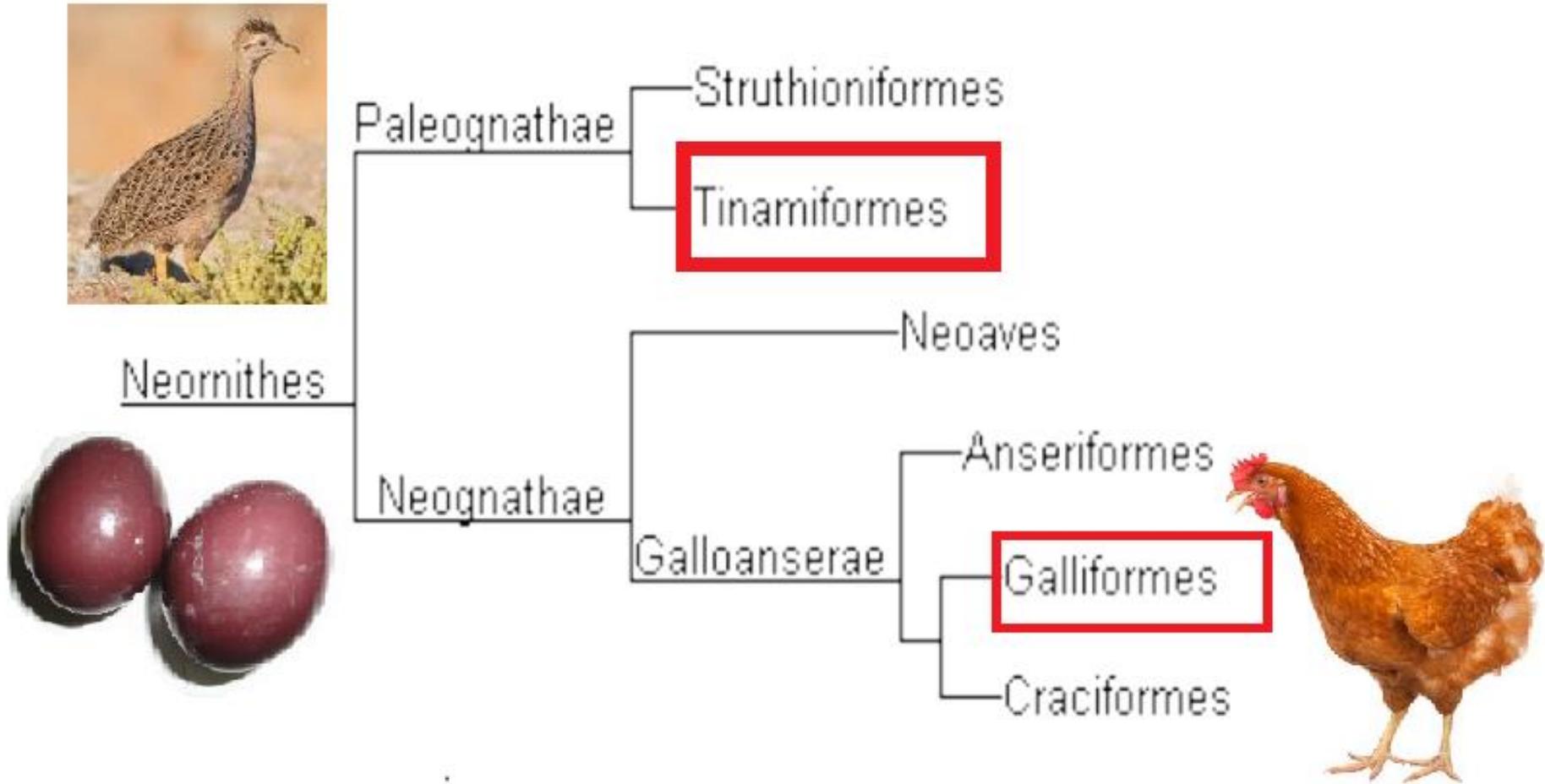




**UST**

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

# Árbol filogenético de las aves modernas



(Matthei, 2014)



# Pregunta

1. ¿Tienen los Anticuerpos de *Nothoprocta perdicaria* la capacidad de aglutinar antígenos particulados?



2. ¿Su Sistema del complemento tiene homología funcional con el complemento de mamíferos?



3. En el suero de *Nothoprocta perdicaria* ¿Se encuentran anticuerpos naturales capaces de reaccionar con un espectro amplio de bacterias?



# Objetivo General

Contribuir al conocimiento del sistema inmune de la perdiz chilena (*Nothoprocta perdicaria*).



## Objetivo específico

Evaluar la capacidad de aglutinación de los anticuerpos de la perdiz chilena

Conocer la capacidad de activar el complemento del suero de la perdiz chilena

Evaluar la presencia de anticuerpos naturales frente a diferentes bacterias.



**UST**  
UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

# Material y métodos



**UST**

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

# Animales e Inmunización



- 7 ratones inmunizados con IgY de perdiz
- 7 ratones inmunizados con GRO
- 3 ratones control.

Gentileza Dr. Miguel Barria.  
Inst. Inmunología. UACH.



**13 perdices inmunizadas con  
GRO**

Gentileza Alberto Matthei,  
Tinamou ciudad de Los Ángeles



**2 gallinas de la  
línea Lohmann  
Lite**



UST

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

# Métodos de extracción de IgY de la yema de huevo de perdiz (*N. perdicaria*)

## Tan



separar la yema de la clara

1 volumen de yema mas 5 volúmenes de solución deslipidante



Solución deslipidante (carragenina 0,06%, pectina de bajo metoxilo 0,18% y CaCl 10uM)

incubar a 4°C por 24 hrs



centrifugar a 10.000 rpm por 15 min



Precipitación con sulfato de amonio al 30%



resuspender con PBS



## Pauly



separar la yema de la clara



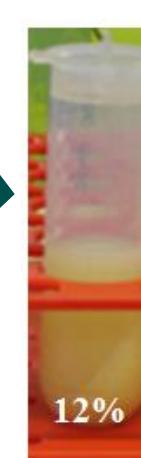
3.5%

centrifugar a 10.000 rpm por 20 min



8,5%

centrifugar a 10.000 rpm por 20 min



12%

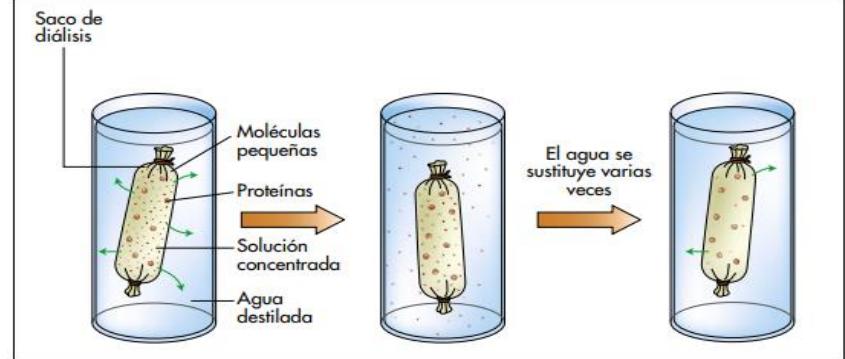
resuspender con PBS



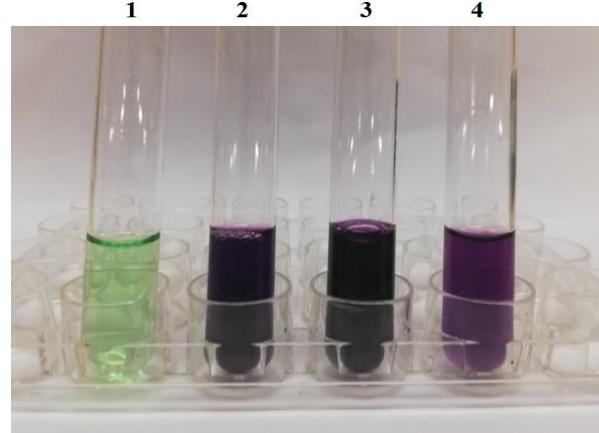


**UST**  
UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

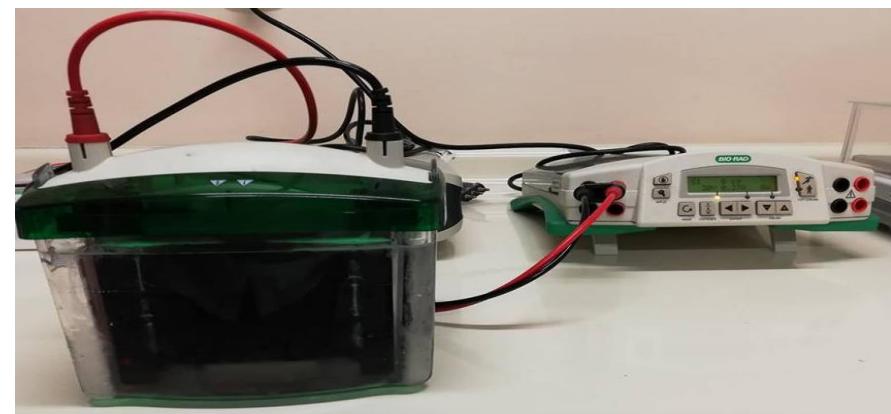
## Diálisis



Cuantificación de proteínas totales por el método BCA



Electroforesis para evaluación de pureza del extracto de IgY de yema de huevo de *Nothoprocta perdicaria*

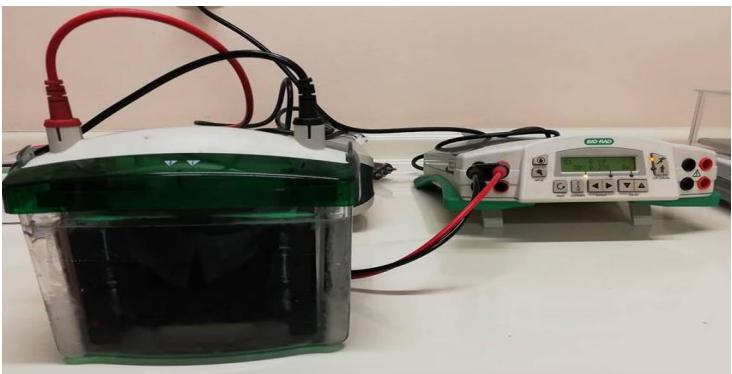
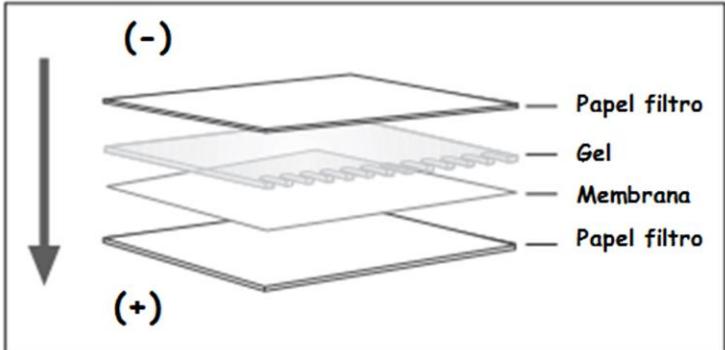




UST®

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

# Evaluación de la especificidad de Ac murinos anti IgY de perdiz por western blot.



# Producción de Ac IgY contra GRO y evaluación de la capacidad de aglutinación





**UST**  
UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

## Evaluación de la capacidad hemolítica del Sistema del Complemento



## Evaluación de anticuerpos naturales de *N. perdicaria* por inmunodot





**UST**

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

**Resultados**

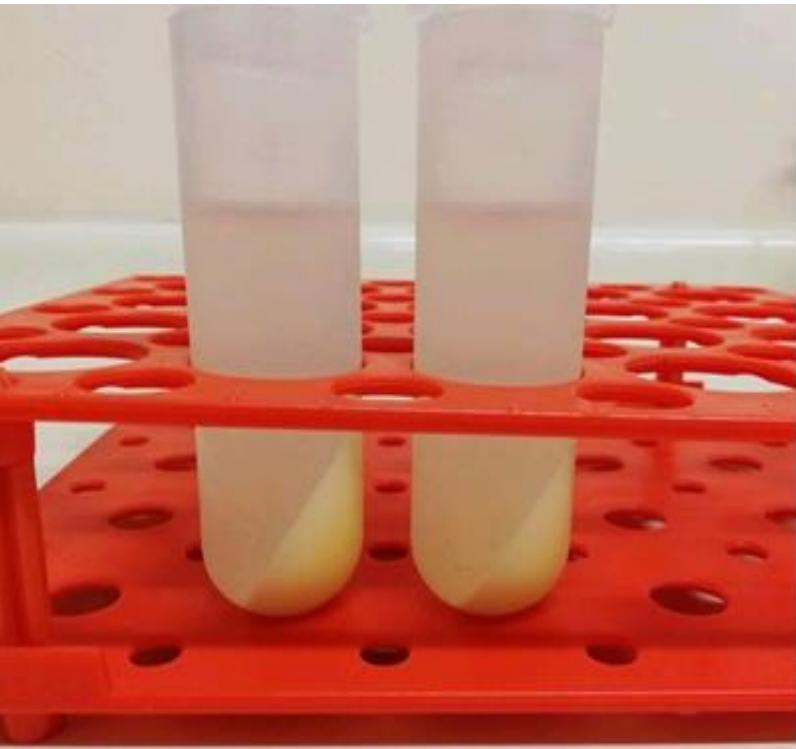
**Discusiones**



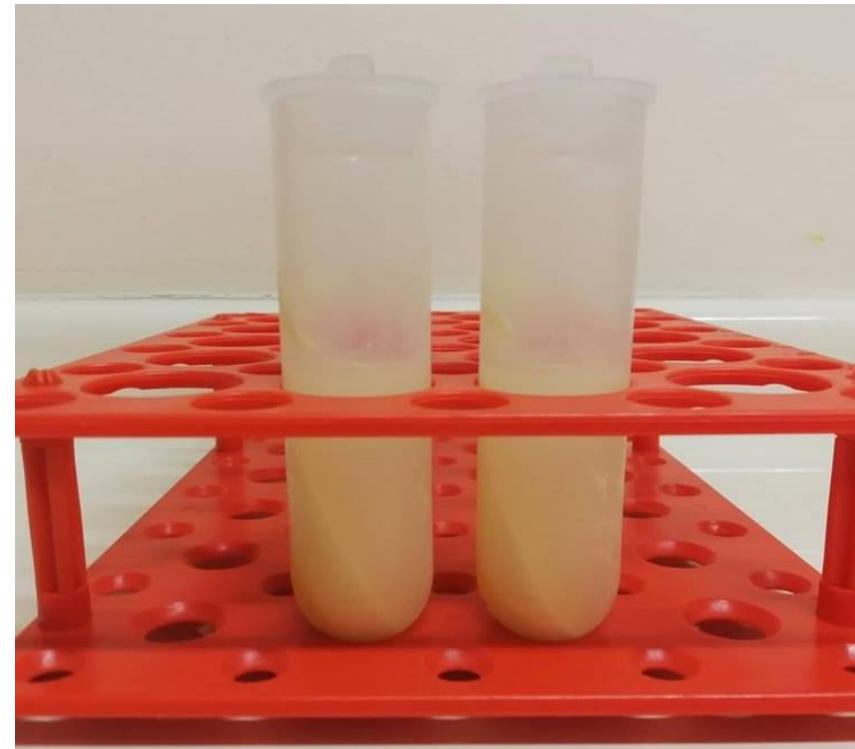
**UST**

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

# Obtención de IgY de yema de huevo de *Nothoprocta perdicaria*



Etapa de deslipidación con el método Tan modificado para la extracción de yema de huevo de *Nothoprocta perdicaria*.



Etapa de deslipidación utilizando el método de Pauly (PEG 6000) para la extracción de IgY de yema de huevo de *N. perdicaria*

# Exploratory and descriptive study on nutritional characteristics and quality of eggs from Chilean partridge (*Nothoprocta perdicaria*)

Arias J, Matthei A, Valenzuela C

*Animal Science Journal* (2018) 89(1) 186-192

DOI: [10.1111/asj.12900](https://doi.org/10.1111/asj.12900)



**UST**  
UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

Demostración de la presencia de IgY de yema de huevo de *Nothoprocta perdicaria* por electroforesis SDS-PAGE 12%: 1 Marcador de PM, 2 y 3 extracto obtenido por método de Pauly, 4 y 5, extracto obtenido por método Tan, 6 y 7 suero de perdiz 8 suero de gallina (*Gallus gallus*).

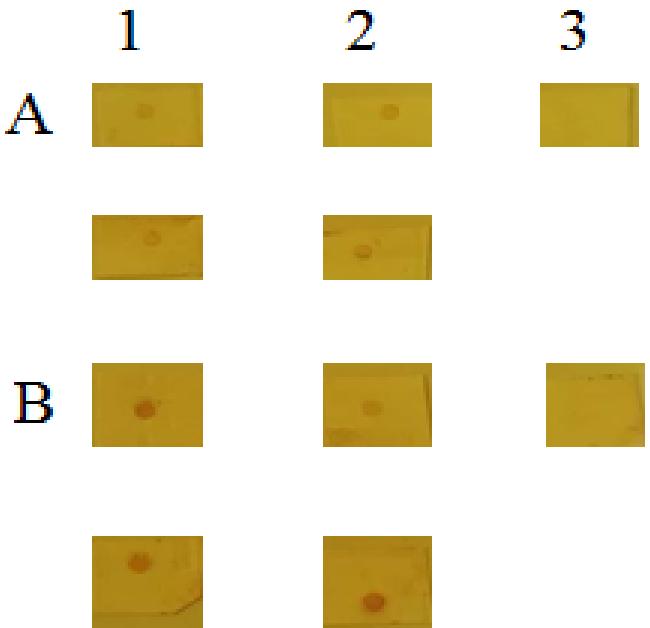
MÉTODO DE EXTRACCIÓN	CONCENTRACIÓN DE IgY
Tan	2,37 mg/ml
PEG 6000	10,5 mg/ml



**UST**

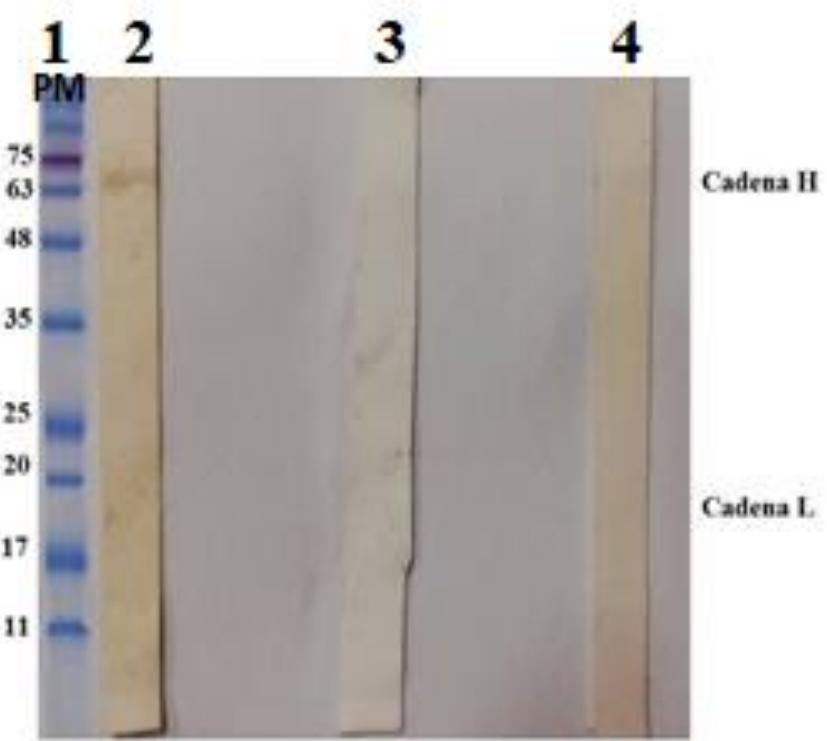
UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

# Producción de anticuerpos murinos anti IgY de perdiz.



## Demostración por Inmunodot.

1 IgY de yema de huevo, 2 suero de perdiz, 3 IgY suero de gallina (control negativo) Diluciones: A1/10 y B 1/50 ambos en duplicado.



## Western blot

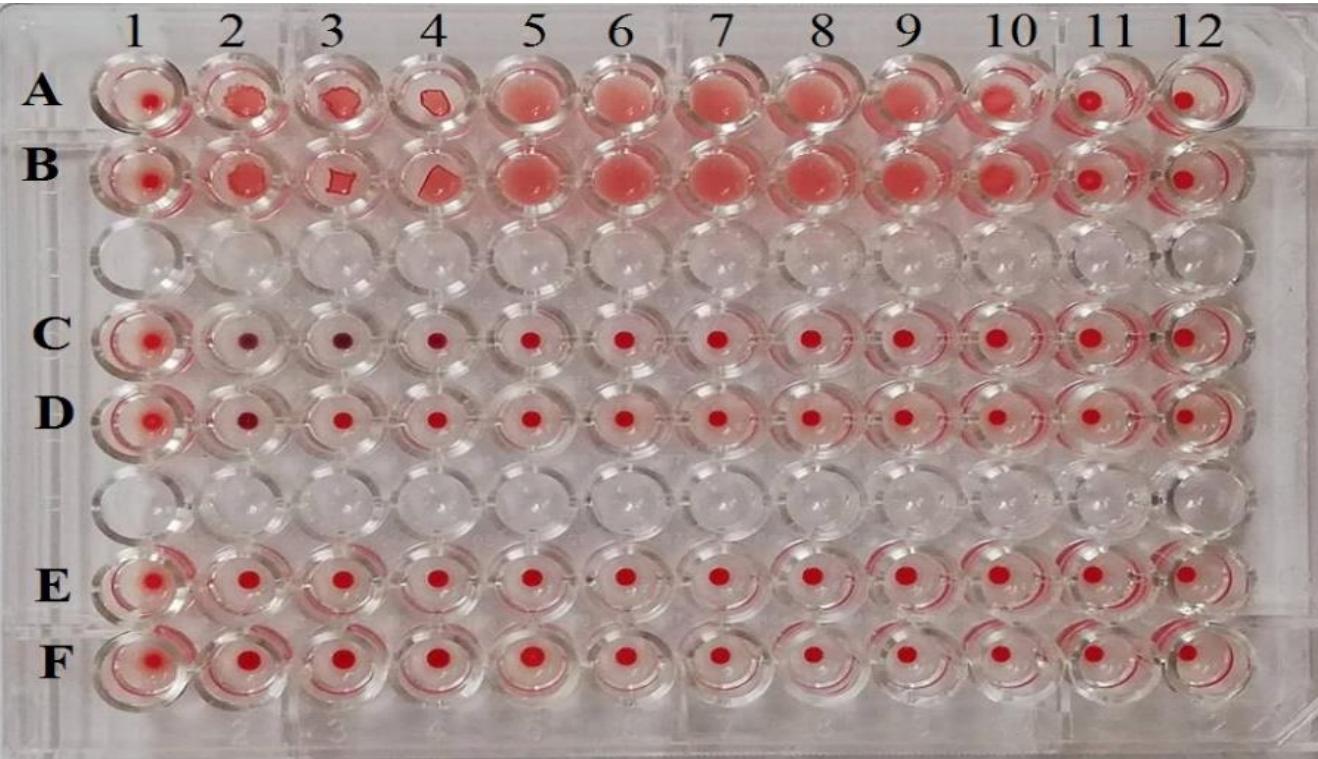
1. Marcador PM 2 Suero de perdiz 3 control suero ratón no inmunizados 4 suero de gallina (*Gallus gallus*).



**UST**

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

# Producción de Ac IgY de perdices contra GRO y evaluación de la capacidad de aglutinación

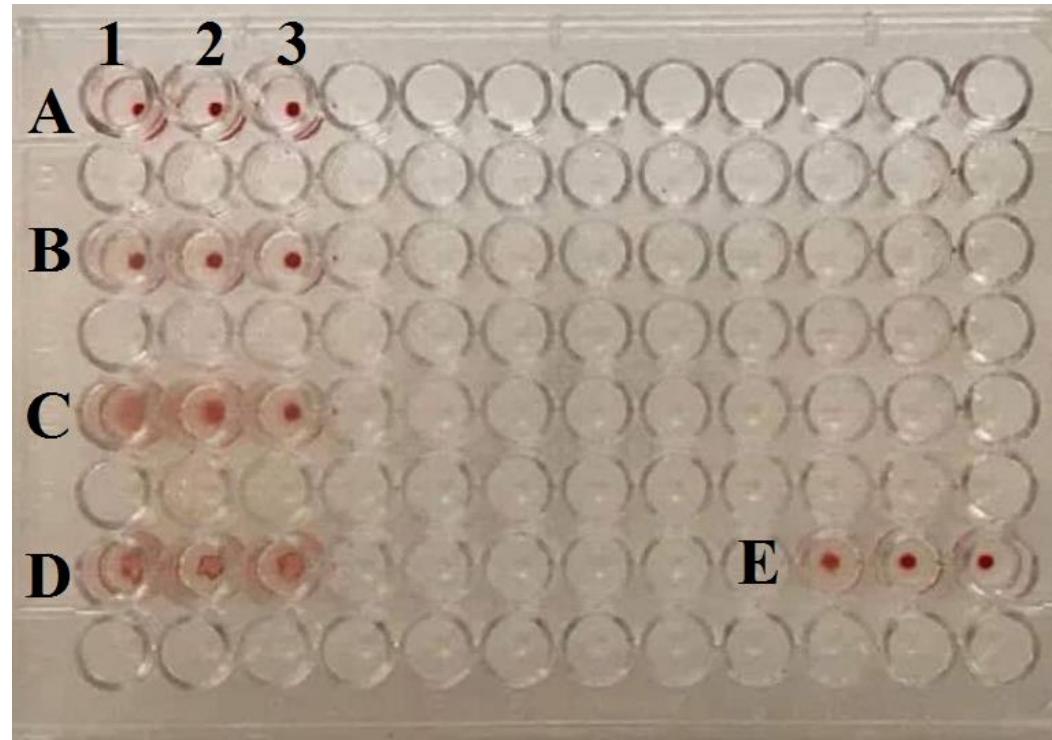
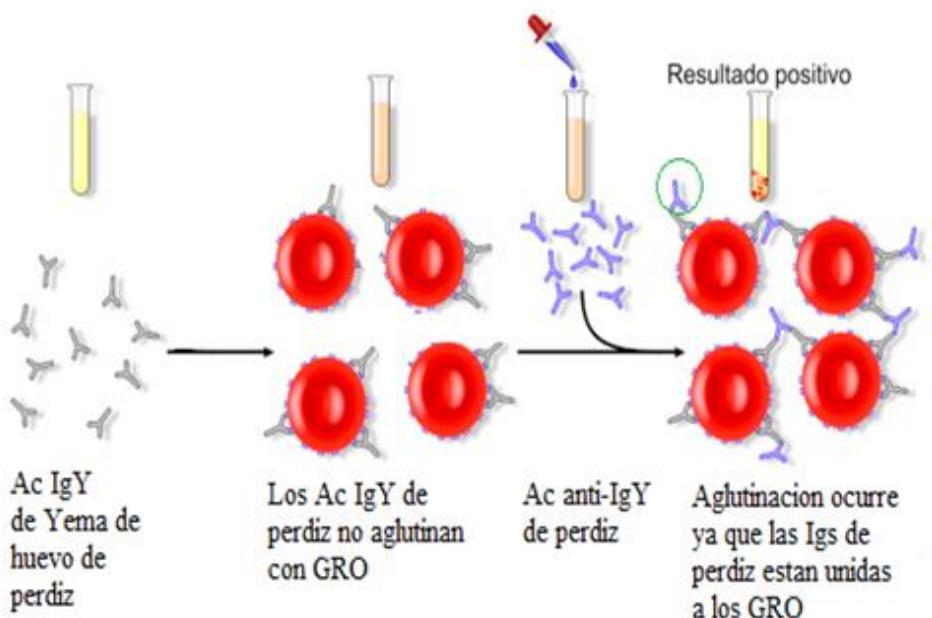


Aglutinación de GRO incubados con diferentes esquemas: pocillos 1 A al F. C -, pocillos del 2 al 12 con distintas diluciones seriadas desde 1/2 hasta 1.024. Fila A y B con suero de Ratón anti GRO, filas C y D Ac IgY anti GRO de yema de huevos de perdiz. Filas E Suero de perdiz y F suero de gallina (*Gallus gallus*).



# UST

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS



Aglutinación de GRO incubados con diferentes esquemas: fila A C-, pocillos del 1 al 3 con distintas diluciones seriadas. Filas B Ac IgY anti GRO de yema de huevos de perdiz. Filas C y E, suero de ratón con Ac anti IgY de perdiz, D C+ suero ratón con Ac anti GRO.



**UST**

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

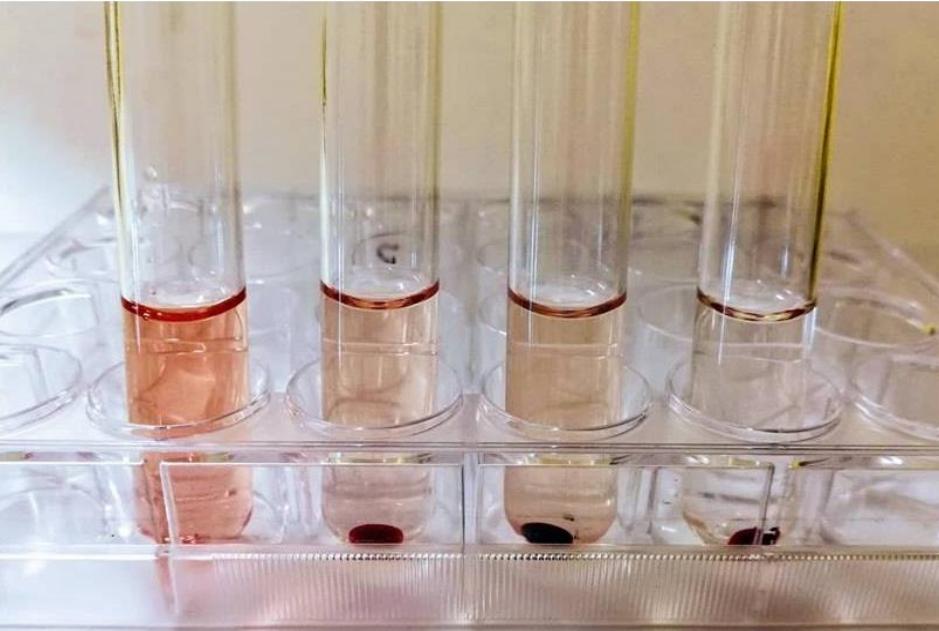
# Actividad hemolítica del Sistema del Complemento del suero de perdices.

1

2

3

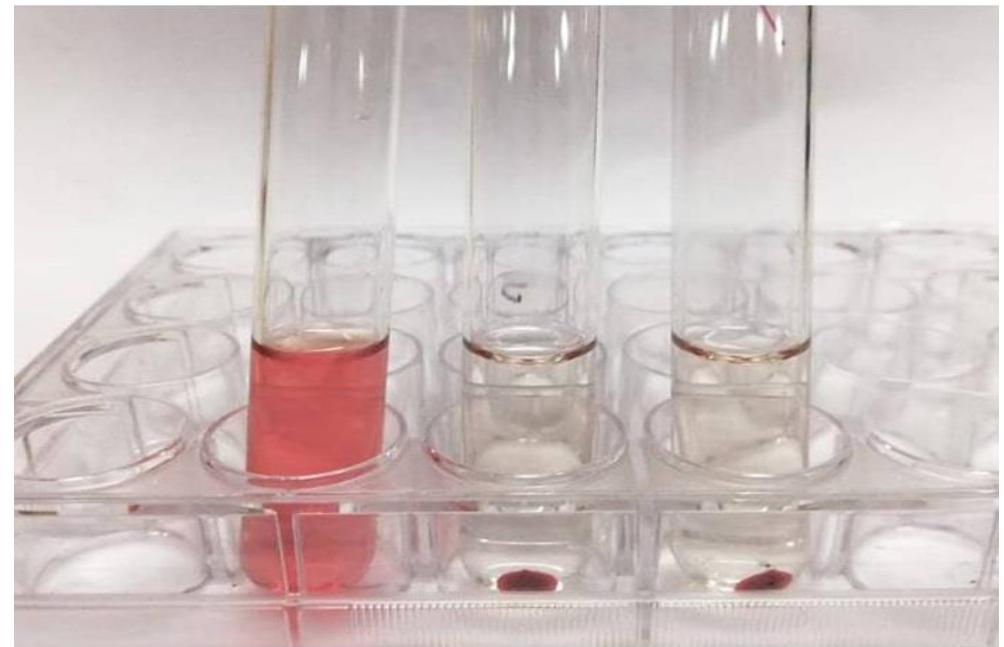
4



1

2

3



- 1 Control 100% hemolysis
- 2 Con suero de ratón,
- 3 Con suero de *N. perdicaria*
- 4 Con suero de *gallus gallus*.

- Evaluación con sueros inactivados**
- 1. Control 100% hemolysis,
  - 2. Con suero inactivado de ratón
  - 3. Con suero inactivado de *N. perdicaria*.

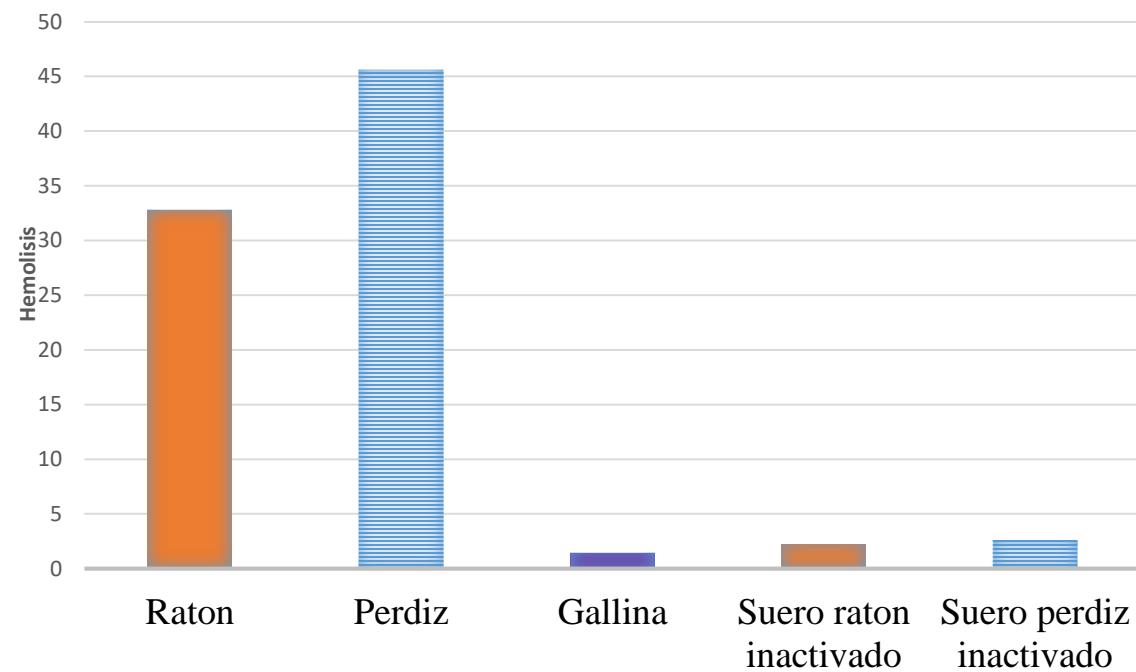


**UST**

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

Volumen de suero	hemolisis de GRO con suero de ratón	hemolisis de GRO con suero de perdiz	hemolisis de GRO con suero de gallina
100 µL	32,8 %	45,6 %	
50 µL	22,1 %	31,5 %	
20 µL	13,4 %	18,1 %	
10 µL	10,6 %	15,4 %	
Suero incubado a 56° C			
100 µL	2,2 %	2,6 %	
50 µL	2,0 %	2,4 %	

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO DE PERDICES.

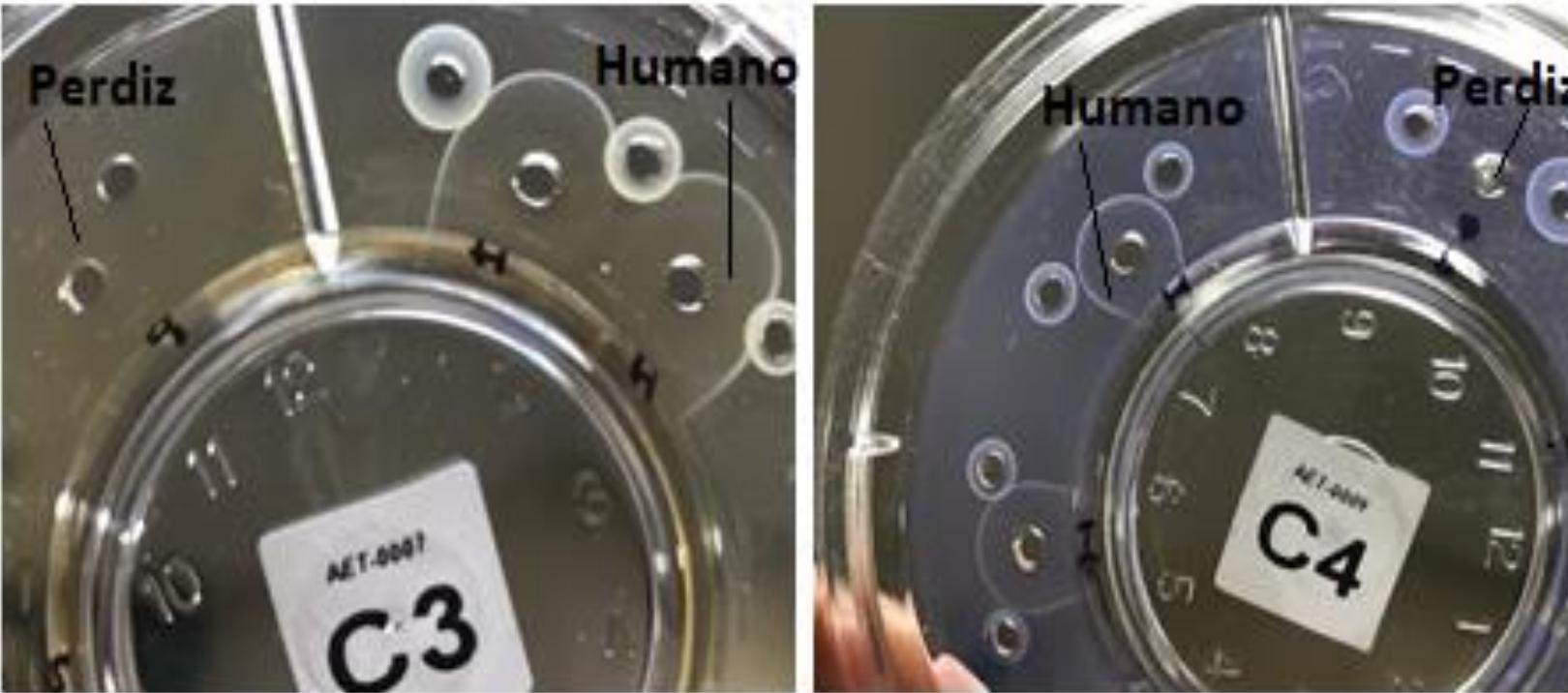


Evaluación del complemento hemolítico suero de ratón, perdiz y gallina más suero inactivado a 56° C.



**UST**  
UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

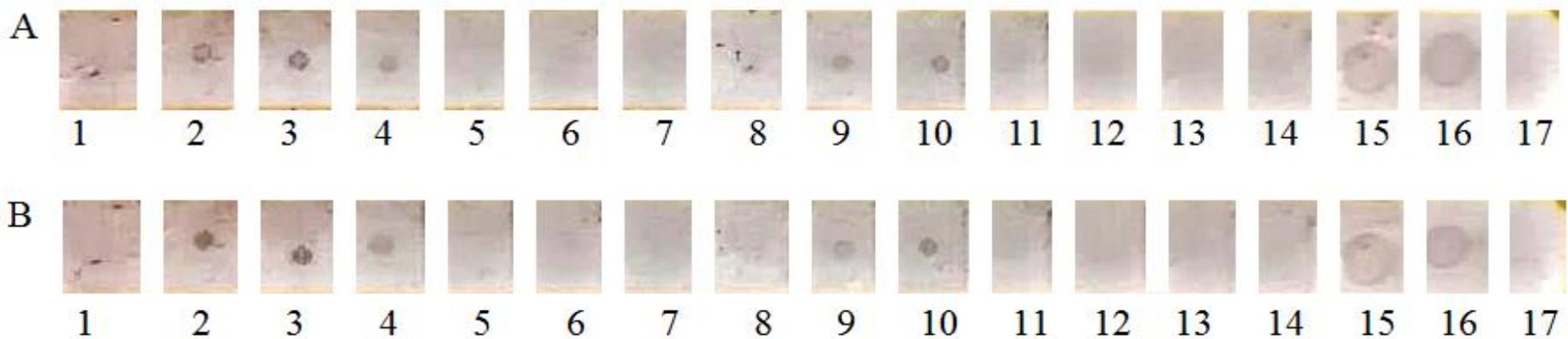
# Evaluación de la reactividad cruzada entre C3 y C4 de suero humano y de perdiz



Placas de Inmunodifusión radial para medición de C3 y C4 humano. Se incorporan sueros de perdiz (*Nothoprocta perdicaria*)



# Evaluación de Ac naturales de *N. perdicaria* por método Inmunodot



1 *Citrobacter freundii*  
2 *Escherichia coli*  
3 *Salmonella* grupo D  
4 *Shigella flexnerii*  
5 *Proteus mirabilis* Blee (+)

6 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700609  
7 *Yersinia enterocolitica*  
8 *Pseudomonas aeruginosa*, 9  
*Acinetobacter baumanii*,  
10 *Listeria monocytogenes*

11 *Arcanobacterium haemolyticum*  
12 *Bacillus cereus*  
13 *Enterococcus faecalis*  
Va R  
14 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923  
15, 16 C + 17 C -

# Conclusiones

- Los métodos de extracción para IgY de gallina, son útiles, pero no son los óptimos para la extracción de IgY de yema de huevo de *Nothoprocta perdicaria*. Además ambas Igs no presentan reactividad cruzada
- Los Ac IgY de la perdiz no tienen capacidad de aglutinación con GRO
- El suero de la perdiz tiene gran capacidad de activar el sistema del complemento por la vía alterna.
- Como podía suponerse, *Nothoprocta perdicaria* presenta anticuerpos naturales, frente a numerosas bacterias no necesariamente contra todas.



**UST**

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS



# Bibliografía

- Al, F. De. (s. f.). *TIPO EJEMPLO GENERAL EJEMPLO ESPECÍFICO Sales minerales Hidróxido de Al.*
- Anti-Human Globulin, Collection, S., Procedure, T., & Use, I. (s. f.). Anti-Human Globulin.
- Arias, J. L., Matthei, A., & Valenzuela, C. (2018). Exploratory and descriptive study on nutritional characteristics and quality of eggs from Chilean partridge (*Nothoprocta perdicaria*). *Animal Science Journal*, 89(1), 186–192. <https://doi.org/10.1111/asj.12900>
- Avian IgY Antibody. (2002). *In Vitro*.
- Bruno. (s. f.). *UNIVERSIDAD DE COSTA RICA Facultad de Microbiología Instituto Clodomiro Picado Manual de Métodos Inmunológicos*.
- Budama-Kilinc, Y., Cakir-Koc, R., Ozdemir, B., Kaya, Z., & Badur, S. (2018). Production and characterization of a conserved M2e peptide-based specific IgY antibody: evaluation of the diagnostic potential via conjugation with latex nanoparticles. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1525564>
- Calzado, E. G., Garrido, R. M. G., & Schade, R. (2001). Human haemoclassification by use of specific yolk antibodies obtained after immunisation of chickens against human blood group Antigens. En *ATLA Alternatives to Laboratory Animals* (Vol. 29, pp. 717–726).



- Carlander, D., Wilhelmson, M., & Larsson, A. (2003). Immunoglobulin Y Levels in Egg Yolk From Three Chicken Genotypes. *Food and Agricultural Immunology*, 15(1), 35–40. <https://doi.org/10.1080/0954010031000138087>
- Casswall, T. (1999). *PhD thesis: Passive Immunisation as Therapy for Gastrointestinal Infections in Children*.
- Chacana, P., Terzolo, H. R., Justo, E., & Calzado, G. (s. f.). *Anticuerpos de yema de huevo ó Tecnología IgY*.
- Ciriaco, E., Píñera, P. P., Díaz-Esnal, B., & Laurà, R. (2003). Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). *Microscopy Research and Technique*, 62(6), 482–487. <https://doi.org/10.1002/jemt.10416>
- Closas, A. (1983). Respuesta inmune de las aves y sus alteraciones. *Arxius*, 81–90. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1387323>
- Cray, C., & Villar, D. (2008). Cross-reactivity of anti-chicken IgY antibody with immunoglobulins of exotic avian species. *Veterinary Clinical Pathology*, 37(3), 328–331. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2008.00055.x>
- Davison, T. F. (2003). The immunologists' debt to the chicken. *British Poultry Science*, 44(1), 6–21. <https://doi.org/10.1080/0007166031000085364>
- Dias da Silva, W., & Tambourgi, D. V. (2010). IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 135(3–4), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.12.011>
- Ferrara, F., D'Angelo, S., Gaiotto, T., Naranjo, L., Tian, H., Gräslund, S., ... Bradbury, A. R. M. (2015). Recombinant renewable polyclonal antibodies. *mAbs*, 7(1), 32–41. <https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989047>

- Ghosh, P., Sahoo, R., Vaidya, A., Chorev, M., & Halperin, J. A. (2015, junio). Role of complement and complement regulatory proteins in the complications of diabetes. *Endocrine Reviews*. The Endocrine Society. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1099>
- Hatta, H., Kim, M., & Yamamoto, T. (1990). A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(10), 2531–2535. <https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10870349>
- He, J. X., Thirumalai, D., Schade, R., & Zhang, X. Y. (2014). Chronobiological studies of chicken IgY: Monitoring of infradian, circadian and ultradian rhythms of IgY in blood and yolk of chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 160(3–4), 266–272. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.05.016>
- Hjelm, B., Forsström, B., Igel, U., Johannesson, H., Stadler, C., Lundberg, E., ... Uhlén, M. (2011). Generation of monospecific antibodies based on affinity capture of polyclonal antibodies. *Protein Science*, 20(11), 1824–1835. <https://doi.org/10.1002/pro.716>
- Kaufmann, S. H. E. (2017). Remembering Emil von Behring: from Tetanus Treatment to Antibody Cooperation with Phagocytes. *mBio*, 8(1), e00117-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00117-17>
- Larsson, A., Wejåker, P. E., Forsberg, P. O., & Lindahl, T. (1992). Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. *Journal of immunological methods*, 156(1), 79–83.
- Lebacq-Verheyden, A.-M., Vaerman, J.-P., & Heremans, J. F. (1974). Quantification and distribution of chicken immunoglobulins IgA, IgM and IgG in serum and secretions. *Immunology*, 27(4), 683–692.

- Lee, H. Y., Abeyrathne, E. D. N. S., Choi, I., Suh, J. W., & Ahn, D. U. K. (2014). Sequential separation of immunoglobulin y and phosvitin from chicken egg yolk without using organic solvents. *Poultry Science*, 93(10), 2668–2677. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-04093>

- Lutz, H. U., Binder, C. J., & Kaveri, S. (2009). Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease. *Trends in Immunology*, 30(1), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.10.002>

- Mayer, M.M. (1967) Complement and complement fixation. In: Kabat, E.A. and Mayer, M.M., Eds., Experimental Immunochemistry. Charles C, Thomas, publisher, Springfiled III.

- Marcq, C., Marlier, D., & Beckers, Y. (2015). Improving adjuvant systems for polyclonal egg yolk antibody (IgY) production in laying hens in terms of productivity and animal welfare. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 165(1–2), 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.02.012>

- Matthei, A. (s. f.). Perdiz chilena.

- 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 : an international journal of immunological engineering*, 4(2), 115–125.

- Morrison, S. L., Mohammed, M. S., Wims, L. A., Trinh, R., & Etches, R. (2002). Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Molecular Immunology*, 38(8), 619–625. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00095-5](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00095-5)

- Panda, S., & Ding, J. L. (2015). Natural Antibodies Bridge Innate and Adaptive Immunity. *The Journal of Immunology*, 194(1), 13–20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400844>

- Pascual, G., Veterinarias, C., Marzi, M. C. De, & Aires, B. (2018). Descubre cómo como conectarte, 1–31.

- Perdiz chilena - AVES DE CHILE. (s. f.).
- Ricklin, D., Reis, E. S., & Lambris, J. D. (2016). Complement in disease: a defence system turning offensive. *Nature reviews Nephrology*, 12(7), 383–401. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.70>
- Schleinitz, N., Vély, F., Harlé, J. R., & Vivier, E. (2010). Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology*, 131(4), 451–458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03360.x>
- Stålberg, J., & Larsson, A. (2001). Extraction of IgY from egg yolk using a novel aqueous two-phase system and comparison with other extraction methods. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 106(2), 99–110. <https://doi.org/10.3109/2000-1967-162>
- Sunwoo, H. H., Lee, E. N., Menninen, K., Suresh, M. R., & Sim, J. S. (2002). Growth Inhibitory Effect of Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) on *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Science*, 67(4), 1486–1494.
- Swisher, J. F. A., Haddad, D. A., McGrath, A. G., Boekhoudt, G. H., & Feldman, G. M. (2014). IgG4 can induce an M2-like phenotype in human monocyte-derived macrophages through Fc $\gamma$ RI. *mAbs*, 6(6), 1377–1384. <https://doi.org/10.4161/19420862.2014.975657>
- Tan, S. H., Mohamedali, A., Kapur, A., Lukjanenko, L., & Baker, M. S. (2012). A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure. *Journal of Immunological Methods*, 380(1–2), 73–76. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.03.003>

- Tini, M., Jewell, U. R., Camenisch, G., Chilov, D., & Gassmann, M. (2002). Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. En *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* (Vol. 131, pp. 569–574). [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00508-6](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00508-6)
- Tisné Brousse, L. (2016). Manual De Procedimientos De Unidad De Medicina Transfusional. HOSPITAL SANTIAGO ORIENTE, 1–313. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622004000400014>
- Tong, C., Geng, F., He, Z., Cai, Z., & Ma, M. (2015). A simple method for isolating chicken egg yolk immunoglobulin using effective delipidation solution and ammonium sulfate. *Poultry Science*, 94(1), 104–110. <https://doi.org/10.3382/ps/peu005>
- Yamazaki-Nakashimada, M. A., Gámez-González, L. B., Murata, C., Honda, T., Yasukawa, K., & Hamada, H. (2018). IgG levels in Kawasaki disease and its association with clinical outcomes. *Clinical Rheumatology*. <https://doi.org/10.1007/s10067-018-4339-0>
- Zhao, C. X., & Zhao, F. Z. (2010). Asymptotic expansions of certain sums involving powers of binomial coefficients. *Journal of Integer Sequences*, 13(4), 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.04026.x>