

ARTICULO

Producción y purificación de anticuerpos (IgY) a partir de huevos de gallinas inmunizadas con epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Víctor T. Contreras, Ana R. De Lima, María C. Navarro, Rosa Y. Arteaga, Diana Graterol, Liliana Cabello, María Farias

Laboratorio de Protozoología. Centro de Biología Molecular de Parásitos (BioMolP). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia. Estado Carabobo. Venezuela.

Correspondencia: Victor T. Contreras

E-mail: convictu@cantv.net.ve.

Telefax: + 58-241-8673342

Recibido: marzo 2005 **Aprobado:** junio 2005

RESUMEN

Producción y purificación de anticuerpos (IgY) a partir de huevos de gallinas inmunizadas con epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

No obstante las ventajas de producir anticuerpos en gallinas, no se ha reportado inducción y purificación de anticuerpos contra estadios de *Trypanosoma cruzi* en el modelo aviario. La inducción de anticuerpos anti-estadios de *T. cruzi* en gallina puede garantizar la producción de reactivos útiles en diagnóstico y terapéutica de la enfermedad de Chagas. Aquí reportamos la obtención y rápido aislamiento de IgY procedente de yema de huevos de gallinas inmunizadas contra epimastigotas de *T. cruzi* a los 7, 22 y 61 días post-inmunización. Se compararon tres estrategias de purificación de IgY: el método de la dilución acuosa, el método del polietilén glicol (PEG) y el método del cloroformo-PEG, respecto a un estuche comercial. El método del cloroformo-PEG dio un rendimiento de 6,4 mg/ml de proteínas de yema de huevo de 61 días con una sensibilidad tal que 7 ng de IgY detectaron 1 µg de antígeno (ELISA). Por Western blot, 5 µg/ml de IgY revelaron 11 antígenos diferentes en 8 µg de proteína total de epimastigotas. El análisis por SDS-PAGE demostró que las IgY extraídas contienen dos bandas proteicas dominantes de 70/57 y 37/35 kDa y dos tenues de 81 y 41 kDa, las cuales pueden ser eliminadas por re-precipitación con PEG. Para la extracción de IgY el método del cloroformo-polietilén glicol dio la mejor combinación por facilidad de ejecución y bajo costo. Si bien rindió 50% menos que el estuche comercial bajo las mismas condiciones, la sensibilidad de los anticuerpos fue 4 veces mayor. Estos resultados evidencian la factibilidad del modelo aviario para producir anticuerpos

contra estadios de *T. cruzi* y muestran la experticia para purificarlos usando una tecnología local de bajo costo.

Palabras clave: Inmunoglobulina Y, *Trypanosoma cruzi*, Cloroformo/Polietilén glicol

ABSTRACT

Production and purification of IgY antibodies from eggs laid by hens immunized with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes

Regardless of the advantages of producing antibodies in avian models, reports using hen-produced *Trypanosoma cruzi* stage-specific antibodies have not been found. Such *T. cruzi* antibodies can potentially yield large amounts of useful diagnostic or therapeutic reagents for Chagas disease. Here we report the production and rapid isolation of IgY from egg yolk of hens immunized with *T. cruzi* epimastigotes at 7, 22, and 61 days post-immunization. Three strategies of IgY purification were compared against an improved commercial kit: the water dilution, the polyethylene glycol (PEG) and the chloroform/ PEG methods. The chloroform-polyethylene glycol procedure yielded 6.4 mg/ml from 61-day egg yolk with such a sensitivity that 7 ng of protein detected 1 µg of antigen (as measured by indirect ELISA). By Western blot, 5 µg of IgY per ml revealed 11 different antigens in 8 µg of total proteins from epimastigotes. IgY analysis by SDS-PAGE proved that purified IgY contained two major protein components with a molecular weight of 70/57 and 37/35 kDa and two minor proteins, 81 and 41 kDa, which can be eliminated by re-precipitation with PEG. For IgY extraction, the chloroform-polyethylene glycol method was found to provide the best cost-effective performance. Although under the same conditions the latter yielded 50% less than the commercial kit, its antibody sensitivity was four times higher. These results prove the feasibility of the avian model to produce *T. cruzi* stage-specific antibodies, and show an effective, cost-effective purification method using local technology.

Key words: Immunoglobulin Y, *Trypanosoma cruzi*, Chloroform/Polyethylene glycol

INTRODUCCIÓN

En contraste con la abundante bibliografía mostrando la producción de anticuerpos policlonales en conejo contra diferentes estadios de *Trypanosoma cruzi* (16, 2, 10), no se encontraron reportes de producción de anticuerpos anti *T. cruzi* preparados en gallina, quizás porque las aves son refractarias a la infección por *T. cruzi* (21). Entre las ventajas de producir anticuerpos en aves en vez de mamíferos se tiene: (a) no es necesario sangrar al ave porque los anticuerpos se extraen de la yema del huevo; (b) los anticuerpos de gallina no tienen reacciones cruzadas con la IgG de mamífero (factor reumatoide), el receptor Fc y los glóbulos rojos (14); (c) el sistema inmunitario de las aves puede producir anticuerpos contra antígenos de mamíferos altamente conservados, pudiendo reconocer partes de una molécula que no lo haría la IgG (11,3,12); y (d) la cantidad de anticuerpos que se extrae de los huevos es mayor que del conejo. Esta última particularidad reduce los costos de

producción a gran escala de IgY específica, ya que su concentración en la yema de huevo está entre 6 y 13 mg/mL, lo que permite obtener hasta 200 mg de IgY de una sola yema, propiedad fundamental en la elaboración de inmunoreactivos para diagnóstico (25,8). En la producción, extracción y purificación de IgY de aves, se ha utilizado la cromatografía de inmunoafinidad (5,6,27), precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico (1,15), tampón fosfato y tritón X-100 (24), y Polietilén glicol/cloroformo, siendo este último uno de los más utilizados (19,4). Para la comercialización de estuches de extracción y precipitación de IgY, se han patentado modificaciones que optimizan su eficiencia y rendimiento (EGGstract IgY® de Promega).

La producción de anticuerpos IgY anti-estadios de *T. cruzi* abre la posibilidad de obtener una herramienta potencialmente útil en estudios de diferenciación molecular del parásito. Nuestros resultados indican que es posible producir y purificar anticuerpos IgY anti-epimastigotas de *T. cruzi* usando una tecnología local de bajo costo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de masas y lisis de los parásitos. Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* de la cepa Elpidio Padrón (EP) crecidos en medio LIT B a 27°C por 6 días se sedimentaron (12.000 xg a 4°C durante 3 min) y lavaron dos veces con PBS. Se estimaron las masas en tubos Eppendorf previamente pesados y se conservaron a -70 °C hasta su uso. Masas húmedas de peso conocido se fraccionaron por criolisis hipotónica (7) en agua suplementada con una mezcla de inhibidores de proteasas (10 µM E-64, 10 µM leupeptina, 50 µM PMSF, 1 mM benzamidina) en una relación de 300 mg/mL. Las masas resuspendidas se lisaron por tres choques de congelación/descongelación, alternando con agitación mecánica fuerte (vórtex) de 3 min a temperatura ambiente. Los lisados se sedimentaron a 12.000 xg durante 5 min a 4°C, los sobrenadantes se isotonizaron con NaCl 4M y se conservaron a -20 °C hasta su uso. La concentración proteica se determinó mediante Coomassie Plus-200 respecto a patrones de seroalbúmina bovina, según protocolo del fabricante.

Protocolo de inmunización de gallinas. Se inmunizaron dos gallinas ponedoras tipo Rhode Island Red de 25 semanas de edad. Se emulsificaron 20 mg de parásitos resuspendidos en 1 ml de solución salina con igual volumen de adyuvante completo de Freund's. Se inyectó una primera dosis (10 mg) vía intradérmica (bajo las alas) por gallina. Se administraron tres inyecciones de refuerzo (5 mg/gallina) con adyuvante incompleto de Freund's, a intervalos de 10 días. Se colectaron los huevos pre-inmunización (antes de la primera inmunización); durante la inmunización (intervalo de 30 días) y post inmunización (después de la cuarta inmunización) y se mantuvieron a 4 °C por tiempos variables entre una semana y un año, hasta la extracción de las inmunoglobulinas.

Purificación de IgY de huevos. Se emplearon huevos de gallinas no inmunizadas e inmunizadas, con diferentes tiempos de recolección y conservación a 4 °C. Se homogeneizaron las yemas de los huevos por

separado. Volúmenes variables de cada mezcla se procesaron por tres métodos: (i) dilución acuosa de las yemas para extraer lípidos, seguido de precipitación con sulfato de amonio (1), (ii) separación secuencial con concentraciones crecientes de PEG 6000 (20) y (iii) emulsificación de lípidos con cloroformo y precipitación de IgY con PEG 6000 (19). La concentración de proteínas se determinó mediante Coomassie Plus-200. La pureza de las IgY se monitoreó por SDS-PAGE y la actividad se comparó mediante ELISA y Western blot contra antígenos de epimastigotas de *T. cruzi*, partiendo de una concentración inicial de 0,5 mg/ml (equivalente a la concentración de IgG en el suero de conejo).

Se usó como referencia el estuche comercial EGGstract IgY® de Promega, para optimizar el método del cloroformo/PEG. El procedimiento consistió en fase 1: diluir las yemas con tampón fosfato y emulsificar los lípidos con cloroformo, y en fase 2: precipitar las IgY hasta una concentración final de 12% con PEG 6000. Este protocolo se identificó como BioMoIP/BioMoIP y se empleó en huevos de gallinas de 61 días post-inoculación. En el protocolo EGGstract IgY® se usaron las soluciones A y B de Promega y se identificó como Promega/Promega, empleando huevos de gallinas pre-inmunes y de 7 días post-inoculación. Se ensayó también un protocolo emulsificando los lípidos con cloroformo y precipitando las IgY con solución B de Promega identificado como BioMoIP/Promega, utilizando huevos de gallinas de 22 días post-inoculación. Una alícuota de yema de huevos de igual tiempo de inmunización se procesó con el protocolo Promega/Promega para fines de comparación de rendimiento y Western blot. Eventualmente se re-extrajeron las fracciones proteicas obtenidas después de resuspenderlas en PBS, precipitándolas nuevamente con PEG (concentración final de 12%), para incrementar la pureza de las IgY (Figura 1).

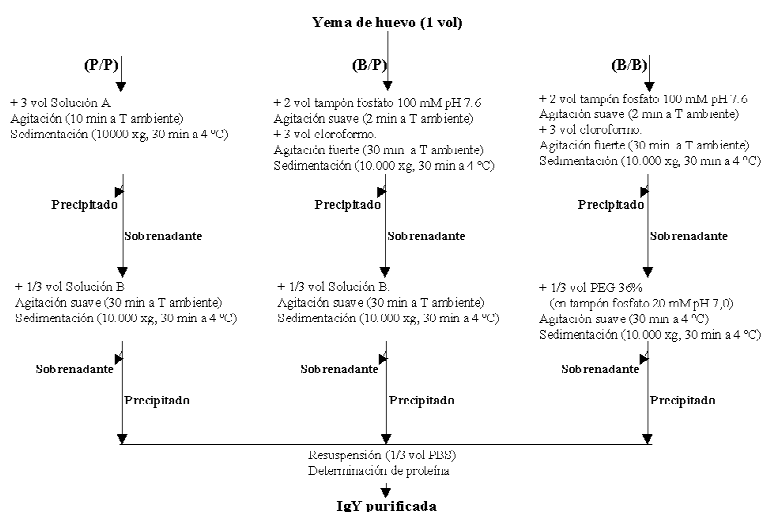


Figura 1. Protocolos de purificación de IgY de yema de huevo. (P/P), Promega/Promega; (B/P), BioMoIP/Promega y (B/B), BioMoIP/BioMoIP.

Análisis electroforético de las IgY. Las IgY se analizaron por electroforesis bajo condiciones reductoras en mini-geles de poliacrilamida al 7,5% con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE) (17), colocando 16 μg de proteína por canal. La pureza de las IgY obtenidas se comparó con una IgY comercial purificada por columna de afinidad (Promega, G1-161). Las masas moleculares de los polipéptidos se estimaron respecto a estándares proteicos (Promega, V8491). La electroforesis se realizó a corriente constante de 8 mA y los polipéptidos separados en los geles se revelaron usando la técnica de la plata metálica (22). Los geles se secaron entre hojas de papel celofán, se digitalizaron en un densitómetro modelo Bio-Rad (GS-690) y se analizaron con el software Bio-Rad Molecular Analyst[®]/PC 1.2.

Titulación por ELISA. La técnica indirecta se hizo según el protocolo de Engvall y Perlmann (1971) (9), usando placas de polivinil de 96 pozos (Pro-Bind, Becton Dickinson) sensibilizadas con 1 μg de antígeno por pozo (epimastigotas lisados). Se hicieron diluciones seriadas dobles de las IgY diluidas en PBS a partir de la concentración inicial (0,5 mg/mL). Se usó como anticuerpo secundario anti-IgY de gallina (diluida 1/2000), preparada en conejo y conjugada a peroxidasa (Promega, G-1351). Como control de reacción se usó suero anti-epimastigotas preparado en conejo con su respectivo conjugado (1/3000). Cada IgY se tituló por duplicado usando como sustrato Ortofenilendiamina.

Reactividad de las IgY. La actividad de las IgY purificadas con los diferentes protocolos se analizó contra antígenos de epimastigotas de *T. cruzi* mediante la técnica de Western blot (26). Los antígenos se separaron en mini-geles uniformes de 7,5% y 10% SDS-PAGE con peine preparativo, colocando 91 μg de antígeno (17). Las bandas peptídicas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa usando un equipo Trans Blot (LKB). Las membranas se bloquearon con leche descremada (5%) en PBS, se cortaron en tiras para obtener 8 μg de antígeno/tira (5 mm) y se incubaron toda la noche a 4 °C individualmente con tres diluciones de cada IgY (1/10; 1/50; 1/100). Las tiras se lavaron 3 veces con 10 mM Tris-HCl 0,02% Tween 20 y se incubaron (90 min a temperatura ambiente) con anti-IgY de gallina (diluida 1:2000) producida en conejo y conjugada a Peroxidasa (Promega G-1351). Después de lavar exhaustivamente (8 veces), los inmunocomplejos se revelaron por quimioluminiscencia (18), usando como sustrato LumiGLO (Kirkegaard & Perry Laboratories), según protocolo del fabricante. Los luminogramas se registraron sobre películas de autorradiografía (Optiphot, AGFA), determinando los pesos moleculares de los polipéptidos por su movilidad relativa respecto a marcadores de peso molecular pre-coloreados (Sigma, C-3437) colocados en el mismo gel. Los perfiles antigénicos se digitalizaron y analizaron como referido anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El propósito de este estudio fue producir anticuerpos anti-epimastigotas de *T. cruzi* en gallinas y comparar la efectividad de varios métodos para purificar IgY a partir de yema de huevo. Puesto que los métodos de purificación involucran procedimientos químicos diferentes, se compararon las IgY

obtenidas bajo condiciones similares. Con el método de la dilución acuosa (1) se obtuvo un bajo rendimiento proteico (resultados no mostrados). No se extrajeron los lípidos eficientemente, fue necesario diluir las proteínas en un volumen grande de agua y dializar para retirar el sulfato de amonio, resultando este protocolo muy laborioso. Con el método de separación de IgY usando concentraciones crecientes de PEG 6000 (23) el rendimiento proteico también fue bajo (resultados no mostrados), con lípidos remanentes en los sobrenadantes en cada paso. Los mejores resultados se obtuvieron emulsificando los lípidos con cloroformo.

Comparación del protocolo BioMolP/BioMolP con el estuche comercial.

Como la emulsificación con cloroformo permitió obtener un sobrenadante libre de lípidos, se compararon los anticuerpos obtenidos con los del estuche comercial de Promega (19). La Tabla 1 muestra el rendimiento y la sensibilidad de las IgY anti-epimastigotas de *T. cruzi* extraídas con diferentes protocolos a diferentes tiempos post-inmunización.

Tabla 1. Rendimiento y sensibilidad de las IgY anti-epimastigota de *T. cruzi* extraídas con diferentes protocolos y tiempos de inmunización

Protocolo Fase 1/ Fase 2	Post-Inmunización (días)	Rendimiento (mg/mL)	Sensibilidad (ng)
Promega/Promega	7	7,3	125
Promega/Promega	22	11,5	125
BioMolP/Promega	22	5,5	31,5
BioMolP/ BioMolP	61	6,4	7,8

Protocolo: indica procedimiento y soluciones según el fabricante (Promega) o el laboratorio (BioMolP). Fase 1 indica la extracción y Fase 2 la precipitación de las IgY. Post-inmunización indica tiempo transcurrido desde la última dosis de inmunización. Sensibilidad indica la cantidad de IgY (ng) capaz de detectar el antígeno (1 µg/pozo) por la técnica de ELISA.

Con el protocolo Promega/Promega se extrajo en promedio 9,4 mg/ml (7,3 y 11,5 mg/mL), correspondiendo a un 98,9% de lo reportado en la bibliografía (25). Con el protocolo BioMolP/Promega se obtuvo 5,5 mg/mL (57,9%) y con el protocolo BioMolP/BioMolP 6,4 mg/mL (67,4%), lo que indica que el mayor rendimiento se obtuvo con el protocolo comercial. Sin embargo, cuando los resultados se comparan en función de la sensibilidad de las IgY extraídas para reconocer antígenos de *T. cruzi*, se observa que las IgY extraídas con el protocolo BioMolP/BioMolP revelan antígenos a una concentración de 7,8 ng de proteínas, una sensibilidad 16 veces mayor. Esta mayor sensibilidad puede deberse a: (a) las IgY provienen de huevos con mayor tiempo post-inmunización, (b) la extracción lipídica con la solución A del estuche comercial afecta la actividad enlazante de los anticuerpos y (c) ambos factores. En apoyo a esta última propuesta, se aprecia que la sensibilidad de las IgY

extraídas de huevos de igual tiempo (22 días post-inmunización) con el protocolo BioMolP/Promega (31,3 ng) fue cuatro veces mayor que la del protocolo Promega/Promega (125 ng) y 4 veces menor (31,3 ng) que las IgY de huevos de 61 días post-inmunización (7,8 ng).

Pureza de las IgY. Con objeto de analizar la pureza de las IgY, las fracciones proteicas extraídas usando protocolos diferentes se compararon mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 2).

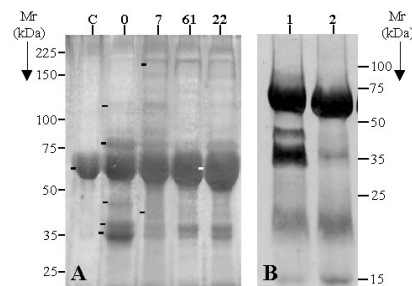


Figura 2. Análisis por SDS-PAGE 7,5% (A) y 10% (B) de las IgY anti-epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* coloreadas con plata (16 µg/canal). Panel A, los canales 0, 7, 61 y 22 corresponden a diferentes tiempos post-inmunización y protocolos de extracción (0 y 7, Promega/Promega; 61, Biomolp/Biomolp y 22, Biomolp/Promega). Preinmune (0) se refiere a huevos de gallina no inmunizadas. C corresponde a IgY comercial. Panel B, re-extracción con 36% PEG 6000 (canal 2) de la IgY extraída con el protocolo Promega/Promega (canal 1). Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

En el canal C del gel A se aprecia que la IgY comercial purificada por columna de afinidad procedente de gallina no inmunizada consta de una banda proteica ancha (65 a 69 kDa, trazo corto a la izquierda del canal A) con masa molecular promedio de 66 kDa, correspondiente a la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Para las IgY extraídas, esta banda proteica se ensancha alcanzando valores entre 70 y 55 kDa (trazo claro a la izquierda del canal 22) y es común a todas las fracciones proteicas obtenidas en el laboratorio (canales 0, 7, 61 y 22). Los perfiles proteicos de las fracciones obtenidas en el laboratorio muestran mayor complejidad que la de IgY comercial, sugiriendo la presencia de otras proteínas de la yema del huevo. La IgY de gallina preinmune extraída con el protocolo Promega/Promega muestra cinco bandas proteicas de diferente intensidad (120, 81, 47, 37 y 35 kDa, trazos cortos a la izquierda del canal 0) comunes a la de gallinas inmunizadas (canal 0 vs canales 7, 61 y 22). En IgY de gallina con 7 días de inmunización extraída con el mismo protocolo, se aprecian dos polipéptidos adicionales de baja intensidad (190 y 40 kDa, trazos cortos a la izquierda del canal 7),

comunes a IgY de gallina inmune extraída con los protocolos BioMoIP/BioMoIP y BioMoIP/Promega (canal 7 vs canales 61 y 22). Los polipéptidos con masas moleculares de 37 y 35 kDa son compatibles con las cadenas livianas de las IgY (25).

Con el propósito de incrementar su pureza, a la IgY extraída se le repitió el paso de precipitación con PEG. El canal 2 del gel B de la Figura 2 muestra el efecto de la re-extracción sobre la fracción proteica obtenida inicialmente (canal 1). Se aprecia que la re-extracción con PEG 6000 elimina otras proteínas de la yema del huevo, enriqueciendo consecuentemente los péptidos característicos de la IgY comercial purificada (canal C, Figura 2A) como la banda proteica de 66 kDa (Figura 2B).

Capacidad discriminante de antígenos de Trypanosoma cruzi. A fin de establecer las condiciones de trabajo para revelar antígenos de *T. cruzi* se ensayaron diferentes diluciones de las IgY a partir de una concentración inicial de 0,5 mg/mL y se probaron diferentes diluciones de conjugado en Western blot. La Figura 3A muestra que las IgY de gallinas post-inmunes revelan perfiles antigénicos más complejos y de mayor intensidad que las IgY de gallinas pre-inmunes.

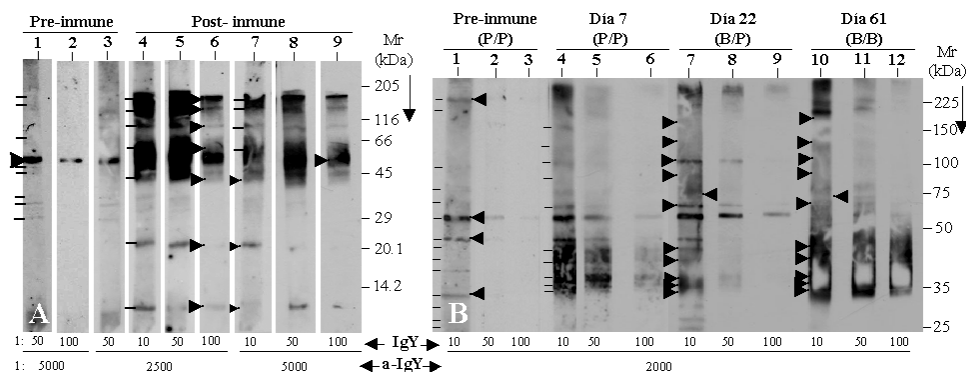


Figura 3. Western blot en tiras para revelar antígenos de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (8 µg/tira) separados en SDS-PAGE 7,5%. Panel A, estandarización usando diluciones de IgY anti-epimastigotas procedentes de huevos de gallinas de 7 días post-inmunización purificada con el protocolo Promega/Promega. Panel B, IgYs purificadas con diferentes protocolos (P/P, Promega/Promega; B/P, Biomolp/Promega; B/B, Biomolp/Biomolp) y con diferentes tiempos post-inmunización (Día). Las IgY se diluyeron a partir de una concentración inicial de 0,5 mg/ml (IgY). Los luminogramas se revelaron usando diferentes diluciones de anti-IgY preparada en conejo y conjugada a peroxidasa (α-IgY). Mr indica la movilidad relativa de los marcadores de peso molecular en kiloDaltons (kDa).

La IgY pre-inmune diluida 1/50 usando conjugado diluido 1/5000, reacciona intensamente con una banda de 55 kDa (punta de flecha a la izquierda del

canal 1) y detecta ocho bandas adicionales (175, 135, 70, 47, 45, 41, 39 y 29 kDa, trazos cortos a la izquierda del canal 1) con muy baja intensidad. Utilizando conjugado menos diluido (1/2500, canal 3), se muestra el mismo perfil con un mayor fondo. El anticuerpo anti-epimastigota diluido 1/10 (canal 4) con conjugado 1/2500, adicionalmente reveló siete antígenos intensos (155, 125, 92, 60, 43, 22 y 10 kDa, trazos cortos a la izquierda del canal 4) cuyas masas moleculares son diferentes a los revelados inespecíficamente por la IgY pre-inmune. La especificidad de estos anticuerpos la confirma el hecho de continuar revelando antígenos de epimastigotas aún a la dilución 1/100 (canal 6). Usando conjugado diluido 1/5000, el anticuerpo diluido 1/10 reveló con menor fondo, los mismos antígenos específicos que usando conjugado 1/2500 (trazos y/o puntas de flechas, canal 7 y 4, respectivamente) y a la dilución 1/100 (canal 9), dejó de revelar tres antígenos de mediano y bajo peso molecular (43, 22 y 10 kDa, puntas de flechas a la izquierda del canal 7), lo que indica una menor cantidad de anticuerpos contra ellos. Llama la atención que el anticuerpo diluido 1/100 y conjugado 1/5000 revela con mayor intensidad la banda de 55 kDa (punta de flecha a la izquierda del canal 9), en contraste con la IgY preinmune (canal 2), lo que puede deberse a la existencia de un antígeno con peso molecular similar a la proteína inespecíficamente identificada por la IgY pre-inmune (canales 1, 2 y 3). Tomando en conjunto estos resultados se puede establecer que las condiciones de trabajo para revelar antígenos de *T. cruzi* con IgY en Western blot son 8 µg de proteína total por tira, una dilución de conjugado en torno a 1/2500 y diluciones de la IgY entre 1/50 y 1/100.

A objeto de conocer la actividad biológica de los anticuerpos obtenidos de huevos mantenidos por 1 año a 4 °C, las IgY se extrajeron usando los protocolos Promega/Promega (P/P), BioMolP/Promega (B/P) y BioMolP/BioMolP (B/B) y se compararon usando huevos procedentes de gallinas con 7, 22 y 61 días de post-inmunización. Los anticuerpos se compararon por su capacidad para revelar antígenos de epimastigotas mediante Western blot usando las condiciones padronizadas con una dilución de conjugado de 1/2000. La Figura 3B muestra que independiente del protocolo de extracción, a diluciones iguales de anticuerpos, las IgY revelan perfiles antigénicos equivalentes. A la dilución de 1/10, la IgY pre-inmune reveló inespecíficamente catorce antígenos (225, 175, 105, 78, 70, 55, 47, 45, 41, 39, 29, 27, 26 y 25 kDa, trazos finos a la izquierda del canal 1), cuatro de ellos con mayor intensidad (225, 55, 47 y 29 kDa, puntas de flecha a la derecha del canal 1) los cuales se debilitan con la dilución (canales 2 y 3). El anticuerpo anti-epimastigota diluido 1/10 en la extracción según el protocolo P/P, reconoció 10 antígenos (155, 125, 110, 92, 60, 43, 40, 38, 36 y 33 kDa, trazos finos a la izquierda del canal 4) que son comunes a los extraídos con los protocolos B/P y B/B (puntas de flecha a la izquierda de los canales 7 y 10), indicando que las propiedades biológicas de las IgY no se modifican con la extracción. Es de hacer notar que los anticuerpos anti-epimastigotas procedentes de huevos de 22 y 61 días post-inmunización, reconocieron un antígeno adicional de 72 kDa (punta de flecha a la derecha de los canales 7 y 10) ausente en el perfil reconocido por las IgY de 7 días post-inmunización (canal 4), lo que sugiere que la capacidad discriminante se incrementa a mayor tiempo post-inmunización. Vale destacar que tiempo post-inmunización corresponde al tiempo transcurrido desde la última inmunización y no a mayor tiempo de inmunización. La aparición tardía

de esa IgY anti-72 kDa puede corresponder a un inmunógeno débil que necesita mayor tiempo de sensibilización, el cual se logra con la liberación prolongada del antígeno emulsificado con adyuvante incompleto en la cuarta inoculación. Alternativamente, podría deberse a que la concentración relativa de los anticuerpos se incrementa con el tiempo post-inmunización y que a la dilución de 1/10, la IgY anti-72 kDa no alcanzó a formar suficientes inmunocomplejos para ser detectada en la luminografía. Apoyando esta última propuesta se observa que el reconocimiento de antígenos mayores que 50 kDa se pierde más rápidamente con la dilución (1/50 y 1/100) en anticuerpos de 7 días (canales 5 y 6) que en anticuerpos de 61 días (canales 11 y 12), mientras que el reconocimiento de antígenos menores de 50 kDa se mantiene intenso a una dilución de 1/100 con anticuerpos de 61 días (canal 12). La validez de esta observación permite proponer que los anticuerpos IgY deben ser extraídos a partir de los 22 días post-inmunización. Se destaca la alta capacidad discriminante de los anticuerpos obtenidos, nótese que la misma inmunoglobulina IgY anti-epimastigotas de 7 días (criopreservada por un año) mostró diferencias en los perfiles reconocidos en epimastigotas criopreservados por igual tiempo (canales 4, 5 y 6 Panel A vs y canales 4, 5 y 6 Panel B, Figura 3). Estas diferencias pueden atribuirse a modificaciones en el antígeno mas que a la actividad de los anticuerpos ya que, IgY recientemente extraídas (canales 7 y 10 Figura 3B) reconocieron los mismos antígenos que la IgY criopreservada (canal 4 Figura 3A). Por otro lado, llama la atención que la IgY pre-inmune revela en *T. cruzi* varios antígenos inespecíficamente (canal 1, Figura 3A y B), los cuales desaparecen con la dilución (canales 2 y 3 Figura 3A y B) y esta observación no ha sido referida previamente en la literatura. Si este comportamiento sólo ocurre con antígenos de *T. cruzi*, es un evento que debe ser estudiado ya que en nuestra experiencia el suero control pre-inmune de conejo, reconoce inespecíficamente muy pocos antígenos en *T. cruzi*. Estas particularidades de los anticuerpos IgY no están referidas en estudios con otros antígenos. Sin embargo, su gran capacidad discriminante hace de los anticuerpos IgY una herramienta útil para estudios de expresión antigénica de *T. cruzi*.

Las evidencias obtenidas demuestran la factibilidad del modelo aviario para producir anticuerpos altamente específicos contra estadios *T. cruzi*, potencialmente útiles para discriminar antígenos diferentes entre clones de una misma cepa. Se establecieron las condiciones de inmunización y recolección de los huevos de gallina y se demostró que las IgY pueden ser extraídas conservando la actividad biológica de los anticuerpos con un rendimiento satisfactorio usando una tecnología local de bajo costo.

Financiamiento: FONACIT S1-2001000683; CDCH-UC FCS-2003005; CDCH-UC FCS-97018 e Investigaciones Menores CDCH-UC-823-2003; CDCH-UC-655-2004; CDCH-UC-2101-2004; CDCH-UC-2102-2004.

Agradecimientos: Los autores agradecen la colaboración en el desarrollo de este trabajo a Wilmer Pineda, José Gregorio Flores, Malvis Morillo de Polo y Jhonny Albanese.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Aikita EM, Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *Int Immunol Meth* 1993; 160: 207-214.
- 2.- Andrews NW, Hong K, Robbins ES, Nussenzweig V. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 1987; 64: 474-484.
- 3.- Behn II, Hommel U, Oertel M, Hauschildt S. Kinetics of IgY formation after immunization of hens with different protein antigens. *Altex* 1996; 13: 18-21.
- 4.- Camenisch G, Tini M, Chilov D, Kvietikova I, Srinivas V, Caro J., Spielmann P, Wenger R, Gassmann M. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1- α . *Faseb J* 1999; 13: 81-88.
- 5.- Chen CC, Li L, Xu XH, Zhang RZ, Rao PF. Immunoaffinity purification of specific immunoglobulin from egg yolk. *Se Pu* 1999; 17: 563-566.
- 6.- Chen CC, Tu YY, Chen TL, Chang HM. Isolation and characterization of immunoglobulin in yolk (IgY) specific against hen egg white lysozyme by immunoaffinity chromatography. *J Agric Food Chem* 2002 ; 50: 5424-5428.
- 7.- Contreras VT, De Lima AR, Navarro MC, Montenegro MM, Medina DD. Separación de polipéptidos antigénicos de *Trypanosoma cruzi* por resuspensión en soluciones de pH diferentes. *Salus* 2001; 5:18-26.
- 8.- Du Plessis DH, Van Wyngaardt W, Romito M, Du Plessis M, Maree S. The use of chicken IgY in a double antibody sandwich ELISA for detecting african horsesickness virus. *J Vet Res* 1999 ; 66: 25-28.
- 9.- Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay for immunoglobulin G. *Immunochem* 1971; 8: 871-876.
- 10.- García- Escalante MG, Ehrengberg-Enríquez J, Puerto FI. Estudio del perfil antigénico de *Trypanosoma cruzi* a través de la reactividad de sueros hiperinmunes preparados en conejos. *Rev Biomed* 1996; 7: 133-145.
- 11.- Gassmann M, Thommes P, Weiser T, Hubscher M. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *Faseb J* 1990; 4: 2528-2532.
- 12.- Gross M, Speck J. Avian yolk antibodies in diagnosis and research. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1996; 103: 417-422.
- 13.- Gutiérrez E, García RM, Schade R. Human haemoclassification by use of specific yolk antibodies obtained after immunization of chickens against human blood group antigens. *Altern Lab Anim* 2001; 29: 717-726.
- 14.- Gutiérrez E, Cruz ME, Samon CT, Vázquez E, Corona Z, Schade R. Extraction of a monospecific coombs-reagent from chicken eggs. *Altex* 2003; 20: 21-25.
- 15.- Hansen P, Scoble JA, Hanson B, Hoogerraad NJ. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. *J Immunol Methods* 1998; 215: 1-7.

- 16.- Kloetzel J, Camargo ME, Giovannini VL. Antigenic differences among epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J Protozool 1975; 22: 259-261.
- 17.- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.
- 18.- Leskawa KC, Hicerson S, Cambron LDA. Quantitative method for assessing protein abundance using enhanced chemiluminescence. BioTechniques 1993; 15: 790-794.
- 19.- Polson A. Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. Immunol Invest 1990; 19:253-258.
- 20.- Polson A, von Wechmar MB, van Regenmortel MH. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. Immunol Commun 1980; 9: 475-493.
- 21.- Rey L (2000). Flagelados parásitos do sangue e dos tecidos: *Trypanosomatidae*. En Parasitologia. Editora Guanabara Koogan S.A. (pp. 115-127).
- 22.- Sammons DW, Adams LD, Nishizawa EE. Ultra sensitive silver based color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. Electrophoresis 1981; 2: 135-142.
- 23.- Schade R, StaaK C, Hendriksen C, Erhard M, Hugl H, Koch G, Larsson A, Polimann W, van Regenmortel M, Rijke E, Spielmann H, Steinbusch H, Straughan D. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM (2004); Workshop 21. Disponible en <http://altweb.jhsph.edu/publications/ECVAM/ecvam21.htm> (gratuito).
- 24.- Stalberg J, Larsson A. Extraction of IgY from egg yolk using a novel aqueous two-phase system and comparison with other extraction methods. Ups J Med Sci 2001; 106: 99-110.
- 25.- Tini M, Jewell UR, Camenisch G, Chilov D, Gassmann M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. Comp Biochem Physiol 2002; 131: 569-574.
- 26.- Towbin H, Stachelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 79: 4350-4354.
- 27.- Verdoliva A, Basile G, Fassina G. Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic legend. J Chromatogr 2000; 749: 233-242.