

Producción y purificación de anticuerpos aviares (IgYs) a partir de cuerpos de inclusión de una proteína recombinante central en el metabolismo del NAD⁺

Resumen

El uso de gallinas para la producción de anticuerpos policlonales reduce la manipulación animal, obteniendo además una gran cantidad de anticuerpos. Las aves presentan mayor distancia filogenética entre sus antígenos y los de mamíferos lo que ofrece altos porcentajes de anticuerpos específicos. La producción de anticuerpos requiere antígenos en cantidades considerables; por ello es creciente el uso de proteínas recombinantes para tales fines. No obstante, la obtención de proteínas en sistemas heterólogos conduce frecuentemente a la precipitación en agregados insolubles de limitada utilidad (cuerpos de inclusión). Se presenta una metodología para la producción de anticuerpos policlonales (IgYs) empleando cuerpos de inclusión (CI) como antígeno. Los CI purificados e inoculados corresponden a la Nicotinamida/Nicotinato Mononucleótido Adenililtransferasa (His-GiNMNAT) de *Giardia intestinalis* expresada en *Escherichia coli*. La purificación del antígeno se llevó a cabo mediante solubilización y renaturalización. Los anticuerpos se purificaron de la yema de huevo de gallinas inmunizadas mediante dilución en agua, seguida de precipitación con sulfato de amonio al 60% y afinidad tiofílica. Los anticuerpos fueron evaluados mediante *immunoblot* empleando la proteína His-GiNMNAT. De una yema de huevo se obtuvieron 14,4 mg de IgYs, con alta pureza y con un reconocimiento de hasta 15 ng de His-GiNMNAT. Se mejoró la especificidad de

Production and purification of avian antibodies (IgYs) from inclusion bodies of a recombinant protein central in NAD⁺ metabolism

Abstract

In contrast with other animal models, the use of hens for polyclonal antibodies production not only reduces animal intervention, but also increases the quantity of the obtained immunoglobulins. The phylogenetic distance between birds and mammals, leads to more specific avian antibodies than their mammalian counterparts. Since a large amount of antigen is required for avian antibody production, the use of recombinant proteins for this procedure has been growing faster over the last years. Nevertheless, recombinant protein production through heterologous systems, frequently leads to the formation of insoluble and useless aggregates (inclusion bodies, IC). This article presents a strategy to produce avian polyclonal antibodies (IgYs) from IC. In order to obtain the antigen, the *Giardia intestinalis* nicotinamide mononucleotide adenyltransferase recombinant protein (His-GiNMNAT) was expressed in *Escherichia coli*. The His-GiNMNAT protein was purified through IC solubilization and re-folding. The purified protein was used to immunize hens. The antibodies were purified from egg yolk by water dilution, followed by ammonium sulfate precipitation and thiophilic affinity chromatography. Specificity of the purified antibodies was tested against the His-GiNMNAT protein through Western blot essays. In terms of yield, 14.4 mg of highly pure IgYs were obtained from one egg yolk; these antibodies were able to detect 15 ng of antigen. IgYs

Produção e purificação de anticorpos aviários (IgYs) empregando os corpos de inclusão de uma proteína recombinante importante para o metabolismo do NAD⁺

Resumo

A utilização de galinhas para a produção de anticorpos policlonais, diminui a intervenção sobre o animal e permite a geração de grandes quantidades de anticorpos. As aves têm maior distância filogenética entre os seus antígenos em comparação com os mamíferos, oferecendo altos porcentagens de anticorpos específicos. A produção de anticorpos requerem quantidades consideráveis de antígeno, por conseguinte, é comum a utilização de proteínas recombinantes para esta finalidade. No entanto, a produção de proteínas em sistemas heterólogos muitas vezes leva à precipitação em agregados insolúveis de utilidade limitada (corpos de inclusão).

Este trabalho apresenta uma metodologia para a produção de anticorpos policlonais, utilizando proteína recombinante a partir de corpos de inclusão. O antígeno utilizado foi a proteína Nicotinamida / Nicotinato Mononucleótido Adenililtransferasa de *Giardia intestinalis* gerada em *Escherichia coli* (His-GiNMNAT). A purificação do antígeno foi feita por solubilização e renaturalização. Os anticorpos foram purificados a partir da gema de ovo de galinhas imunizadas pelo método de diluição em água, seguido de precipitação com sulfato de amônio (60%) e afinidade tiofílica. Os anticorpos foram avaliados por *immunoblot* utilizando a proteína His-GiNMNAT. De uma gema de ovo foram obtidos 14,4 mg de IgYs com pureza elevada. Estes anticorpos podem reconhecer até 15 ng de His-GiNMNAT. A especificidade dos

los IgYs mediante una purificación adicional por afinidad al antígeno, lo cual permitiría su empleo para el reconocimiento de la proteína del parásito.

Palabras clave: anticuerpos, IgYs, cuerpos de inclusión (CI), *Giardia intestinalis*, NAD⁺, NMNAT.

specificity was improved by means of antigen affinity purification, allowing its implementation for endogenous detection of GiNMNAT protein in *G. intestinalis*.

Keywords: Antibodies, IgYs, inclusion bodies, *Giardia intestinalis*, NAD⁺, NMNAT.

IgYs foi reforçada por outra purificação por afinidade pelo antígeno. Isto irá permitir a sua utilização para o reconhecimento da proteína do parasita.

Palavras-chave: anticorpos, IgYs, corpos de inclusão (CI), *Giardia intestinalis*, NAD⁺, NMNAT.

Introducción

LOS PROTOZOOS DEL GÉNERO *Giardia* son considerados modelos biológicos de gran interés en razón a su posición evolutiva basal, metabolismo reducido y simplicidad estructural. Son parásitos de mamíferos que constituyen un problema de salud pública, humana y veterinaria a nivel mundial (1). *Giardia intestinalis* es un eucariota ancestral con vías metabólicas simplificadas, similares a las procariotas, muchas de las cuales permanecen sin ser dilucidadas.

El Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina (NAD⁺) en sus diversas formas (NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH⁺) tiene un rol fundamental como cofactor de óxido-reductasas, tanto en reacciones catabólicas, como en procesos anabólicos (2-4). Adicionalmente, en la última década se ha acumulado evidencia sobre el papel del NAD⁺ como sustrato para la modificación covalente de proteínas y la generación de movilizadores de calcio (3, 5, 6).

Teniendo en cuenta la multifuncionalidad del NAD⁺, muchos procesos celulares son regulados mediante las rutas de síntesis y consumo de esta molécula, siendo su síntesis indispensable para la viabilidad celular (7,8). En organismos como *Giardia*, el estudio de este tipo de vías centrales es un punto clave para evaluar la divergencia de la maquinaria celular ya que al estudiar el metabolismo energético en organismos basales, se puede tener una mejor comprensión de estos procesos en organismos más complejos (9).

El transcriptoma de *Giardia intestinalis* reporta dos secuencias candidatas para la Nicotinamida / Nicotinato Mononucleótido Adenilil-transferasa (GiNMNAT), enzima central en la síntesis del NAD⁺, ya que constituye el punto de convergencia entre las vías de síntesis conocidas para esta molécula (10). En trabajos realizados previamente, ambas secuencias fueron evaluadas en sistemas heterólogos mediante el uso de proteínas recombinantes, obteniéndose la primera evidencia de la expresión a nivel proteico de ambas isoenzimas; ensayos adicionales han permitido confirmar ambos candidatos como enzimas activas *in vitro* (11-13).

La producción de proteínas recombinantes conduce frecuentemente a la formación de cuerpos de inclusión que se definen como agregados insolubles compuestos casi exclusivamente por proteína recombinante en diferentes estados de plegamiento (14). Los cuerpos de inclusión se consideran un efecto no deseado en ensayos funcionales debido a la pérdida de la estructura nativa; algunas veces, las proteínas pueden ser recuperadas a través de solubilización en agentes denaturantes, seguida de renaturalización. A pesar de la pérdida de la estructura tridimensional, la estructura primaria no se ve alterada y esto permite su empleo como un excelente antígeno para el desarrollo de anticuerpos.

En el presente trabajo se realizó la producción de anticuerpos policlonales contra una de las isoenzimas de *Giardia intestinalis* empleando modelos aviares. Los anticuerpos policlonales constituyen herramientas de gran interés en la investigación científica; por tanto, hoy en día se hace más exigente, no sólo su calidad, sino también la metodología empleada para su producción. Tanto en la sangre como en la yema de huevo de las aves se acumula una inmunoglobulina G homóloga, conocida como IgY. Estas inmunoglobulinas son transferidas desde el sistema cir-

culatorio de la gallina a través del oolema hacia el ovocito en desarrollo en el folículo ovárico. Se producen entre 70 y 100 mg de IgY de acuerdo al tamaño del huevo, siendo una fuente abundante de anticuerpos policlonales que pueden ser adquiridos a partir de huevos obtenidos de gallinas inmunizadas sin involucrar la muerte del animal (15-20). En este trabajo se presenta la obtención, purificación y caracterización de anticuerpos IgY contra una de las isoenzimas GiNMNAT obtenida a partir de cuerpos de inclusión.

Materiales y métodos

Obtención del antígeno

La proteína recombinante His-GiNMNAT se obtuvo a partir del clon de expresión BL21 (DE3) – transformado con el vector pET100D-TOPO/*ginmnat*; un pre-inóculo de las células creció a 37 °C durante toda la noche en medio Luria Bertani (AMRESCO®) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina (Genfar®). Posteriormente se realizó una dilución 1/100 del pre-inóculo en medio Luria Bertani (AMRESCO®) y se llevó a cabo la inducción a la OD₆₀₀ ≈ 0,6 empleando Isopropil-tio-glactopiranosido (IPTG) (Fermentas®) a una concentración final de 1mM, de acuerdo a condiciones experimentales estandarizadas previamente (11-12, 15). Las células fueron colectadas por centrifugación a 6000 rpm durante 10 min; los lisados se obtuvieron mediante el tratamiento de las células con lisozima (1 µg/ml) y la maceración de los mismos se realizó bajo nitrógeno líquido. La separación de fracciones proteicas solubles e insolubles (cuerpos de inclusión, CI) se llevó a cabo mediante centrifugación de los lisados celulares obtenidos a 12000 rpm por 30 min.

La purificación de la proteína se realizó mediante homogeneización de la fracción insoluble en solución de lavado 1 (urea 2M, Tris/HCl 100 mM pH 7, EDTA 5 mM, DTT 5 mM, Tritón X-100 2% p/v) Tritón X-100) y posterior centrifugación a 12000 rpm durante 30 min a 4 °C. Para retirar el exceso de urea y detergente, el precipitado resultante se homogeneizó en una solución de lavado 2 (Tris/HCl 100 mM pH 7, EDTA 5 mM, DTT 5 mM). El precipitado obtenido se homogeneizó en buffer de re-suspensión (hidrocloruro de guanidina 8 M, tris/HCl 50 mM pH 7, EDTA 5 mM, DTT 5 mM) y se centrifugó a 14000 rpm durante 1 hora (h) a 4 °C; de allí se separaron las fracciones solubilizadas de las insolubles (16). Las fracciones solubilizadas se sometieron a proceso de diálisis. Las muestras obtenidas durante el proceso de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE.

Cuantificación de proteínas

Se determinó la cantidad de proteína antigénica total mediante un método semi-cuantitativo (densitometría en gel). Se tomaron diferentes volúmenes (5, 10 y 15 µl) de la proteína antígeno (His-GiNMNAT) y se prepararon para SDS PAGE 12%. La tinción de las bandas obtenidas

Tabla 1. Esquema de inoculación de las gallinas para la obtención de los anticuerpos aviares.

Día	His-GNMNAT			Control		
	0	30	60	0	30	60
Adyuvante	Completo 150 µl	Incompleto 150 µl	Incompleto 150 µl	Completo 150 µl	Incompleto 150 µl	Incompleto 150 µl
Antígeno (µg)	150	150	150	---	---	---
Volumen inyectado (µl)	~300 µl	~300 µl	~300 µl	~300 µl	~300 µl	~300 µl

se realizó con azul de Coomassie 0,1% R-250. Los valores de área e intensidad de las bandas de interés en el gel obtenido se midieron en el densitómetro de análisis molecular (BioRad) empleando el software IMAGEJ (18). Estos valores fueron interpolados de la curva estándar realizada con 0,5, 2 y 4 µg de BSA (Suero de Albúmina Bovina, Sigma, MO, USA).

Los anticuerpos aviares (IgY) se sometieron a cuantificación de proteína total por el método de Bradford, empleando BSA en diferentes concentraciones como patrón para la curva de calibración espectrofotométrica.

Producción de anticuerpos policlonales

Esquema de inmunización aviar y recolección de huevos

Se emplearon gallinas Babcock Brown de 19 semanas de edad (tres por tratamiento). Se realizaron inoculaciones intramusculares con antígeno His-GiNMNAT y un control sin antígeno (Tabla 1). Se recogieron 72 huevos de cada gallina. Adicionalmente, para analizar los IgY plasmáticos, al cabo de un mes de inoculación se tomaron muestras de sangre de las aves.

Purificación de los anticuerpos obtenidos

Deslipidación de las yemas de los huevos recolectados

Se empleó el método descrito por Akita y Nakai (19); se extrajo la yema retirando la clara y se solubilizó en 9 volúmenes de agua destilada; el pH de la solución se equilibró en 5,0. Se sometió la solución a 16 h de agitación a 4 °C y se centrifugó a 8000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se conservó a -80 °C. 2 ml del sobrenadante se sometieron a precipitación con sulfato de amonio (60%). El precipitado se solubilizó en 2 ml de PBS para posteriormente realizar análisis de ELISA y determinar las yemas con mayor contenido de IgYs.

Cromatografía tiofilica

A partir de los huevos que contenían la mayor cantidad de IgY, se realizó la purificación de los mismos mediante métodos de afinidad (1). Se adicionaron 87 mg de sulfato de sodio por cada mililitro de solución a la muestra. Se dializó a 4 °C toda la noche, se centrifugó dos veces a 10000 x g durante 30 min, se filtró tres veces utilizando membranas de 0,45 µm. Se utilizó el kit Pierce® Thiophilic Adsorbent, equilibrando la columna con 24 ml de buffer de unión (sulfato de potasio 0,5 M, fosfato de sodio 50 mM, azida de sodio 0,05%, pH 8,0). A continuación se aplicó la muestra y se recogieron fracciones de 2 ml monitorizadas a 280 nm, eliminando las proteínas no unidas mediante lavados con el buffer de unión. Las inmunoglobulinas se eluyeron, utilizando 24 ml de buffer de elución (fosfato de sodio 50 mM, azida de sodio 0,05%, pH 8,0).

Las fracciones obtenidas mediante ELISA y las IgYs eluidas se almacenaron con glicerol 10% (V/V) a 4 °C (20). El procedimiento completo de purificación de IgY se visualiza mediante SDS-PAGE al 12%.

Obtención de IgYs a partir de sangre de gallina

La sangre obtenida de la vena alar de las aves experimentales fue incubada a 37 °C 30 min y posteriormente centrifugada. El suero resultante fue suplementado con glicerol al 10% (v/v). Las muestras se conservaron a -20 °C para posteriores ensayos.

Purificación de anticuerpos IgY-αGiNMNAT por afinidad al antígeno

1 mg de la proteína recombinante antigénica fue cargada en SDS-PAGE al 12% y transferida a una membrana de nitrocelulosa. La banda correspondiente a la His-GiNMNAT (31 kDa.) fue evidenciada mediante tinción con solución de Ponceau S. (Sigma) y fue cortada y pre tratada con una solución de glicina 100 mM pH 2,5 por 10 min. Posteriormente fue lavada durante 5 min con 100 µl de amortiguador Tris salino (TBS) (50 mM de Tris, 150 mM NaCl); luego las membranas fueron bloqueadas con TBS suplementando leche descremada al 5%, durante 1 h a temperatura ambiente y lavadas tres veces con TBS. Posteriormente las membranas fueron sumergidas en una alícuota de 100 µl del anticuerpo puro durante 18 horas a 4 °C bajo agitación. El anticuerpo IgY-αGiNMNAT purificado se eluyó al incubar la membrana con 100 µl de una solución de glicina 100 mM pH 2,5 durante dos minutos. Seguidamente, el anticuerpo eluido se neutralizó de la solución adicionando 10 µl de Tris HCl 2M pH 8,5. La elución se repitió tres veces y se obtuvo un volumen final de 300 µl llegando a una concentración final de 150 mM Tris HCL. Los anticuerpos IgY-αGiNMNAT puros y eluidos se cuantificaron mediante un ensayo de Bradford (15).

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se realizaron ELISAs indirectos según procedimientos estándar (20,21). Se emplearon placas de 96 pozos activadas con 10 ng de la proteína recombinante His-GiNMNAT; las IgYs a evaluar fueron empleadas en dilución 1:100 en PBS. Como anticuerpo secundario se empleó IgG de burro anti IgY acoplado a peroxidasa (dilución 1:100000, Sigma Aldrich), utilizando como sustrato o-fenildiamina dihidrocloridrato (OPD) (Thermo Scientific) a una concentración de 0,4 mg/ml. Luego de 30 min de reacción, las placas se midieron a una densidad óptica de 490 nm para evidenciar la reacción colorimétrica producida por el sustrato OPD.

Inmunodetección mediante *immunoblot*

Con el objeto de evaluar los anticuerpos obtenidos, se realizaron ensayos de reconocimiento sobre proteína recombinante en membranas de nitrocelulosa (Thermo Scientific). Para ello, se sembraron diferentes concentraciones del antígeno en geles discontinuos SDS-PAGE al 12%, seguido del proceso de electrotransferencia y bloqueo de inespecificidades con TBS leche descremada al 5%. El reconocimiento se llevó a cabo mediante inmunodetección empleando las IgYs obtenidas como anticuerpo prima-

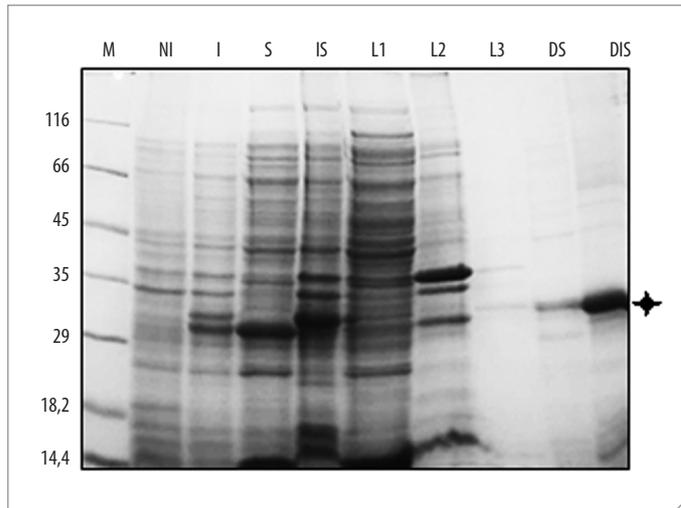


Figura 1. Expresión y purificación del antígeno (His-GiNMNAT) a partir de los cuerpos de inclusión de *E. coli* BL21. M: marcador de bajo peso molecular (kDa); NI: bacterias no inducidas; I: bacterias inducidas; S: fracción soluble; IS: fracción insoluble (cuerpos de inclusión); L1: primer lavado; L2: segundo lavado; L3: tercer lavado; DS: fracción soluble diálisis; DIS: fracción insoluble diálisis. SDS PAGE 12% teñido en Coomassie R-250 His-GiNMNAT.

rio; como anticuerpo secundario se utilizó IgG de burro anti IgY (Sigma) mediante el sistema de revelado de peroxidasa de rábano con los sustratos cloronaftol y peróxido al 4% según lo reportado (19).

Resultados y discusión

Como primer paso para la generación de anticuerpos policlonales es indispensable tener una gran cantidad de antígeno con un alto grado de pureza. En trabajos previos se determinó que la mayor cantidad de proteína recombinante His-GiNMNAT, expresada en *Escherichia coli*, se acumula en los cuerpos de inclusión (12, 13). Obtener proteínas en forma de cuerpos de inclusión es desventajoso para el estudio biológico de las mismas; sin embargo, estos resultan bastante útiles para la obtención de altas cantidades de proteína, uno de los requisitos que deben tener los antígenos a ser inoculados para la producción de anticuerpos en cualquier sistema por lo que se escogió esta fracción como fuente del antígeno (14).

La purificación de la proteína se llevó a cabo en tres pasos básicos: lavado, solubilización y renaturalización (13, 15). El curso de la purificación se pudo visualizar mediante SDS PAGE (Figura 1). Se obtuvo una purificación parcial de la proteína (Figura 1 DIS), la cual en su mayoría se encuentra en la fracción insoluble de la purificación, teniendo en

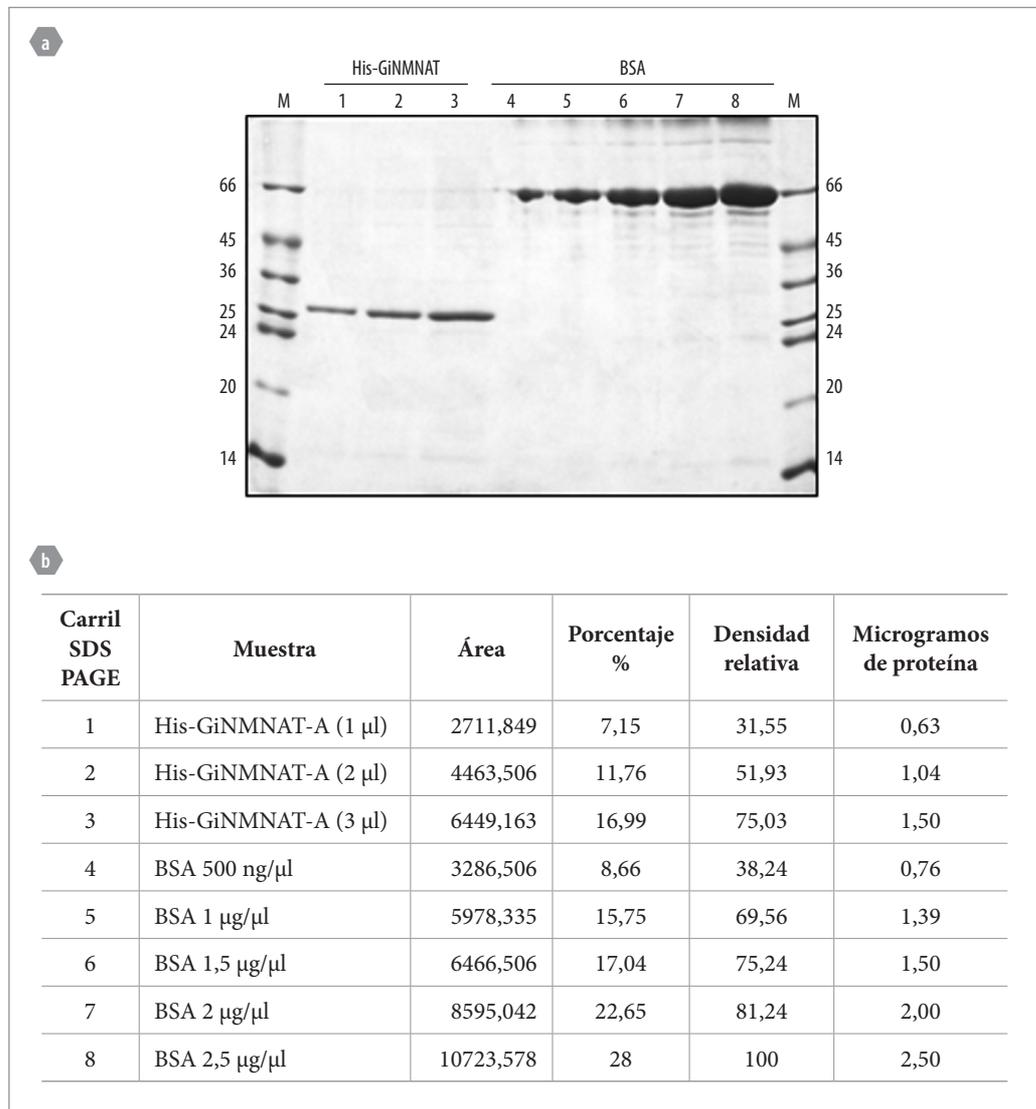


Figura 2. Cuantificación por densitometría en gel SDS PAGE de la proteína His-GiNMNAT purificada. **a.** Gel SDS PAGE 12%: M: marcador de bajo peso molecular (kDa); 1: GiNMNAT (0,125 µl); 2: GiNMNAT (0,25 µl); 3: por densitometría GiNMNAT (0,5 µl); 4: BSA (2 µg/µl); 5: BSA (4 µg/µl); 6: BSA (6 µg/µl); 7: BSA (8 µg/µl); 8: BSA (10 µg/µl) teñido en Coomassie R. **b.** Tabla de datos densitométricos (18).

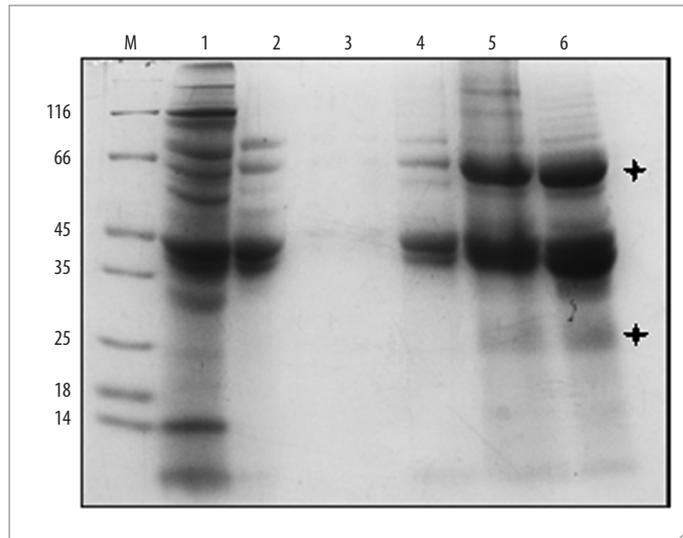


Figura 3. Electroforesis de la deslipidación de la yema. M: marcador de bajo peso molecular (kDa); 1: proteínas totales de la yema; 2: proteínas hidrosolubles de la yema; 3: sobrenadante luego de la precipitación con sulfato de amonio; 4: precipitado con sulfato de amonio; 5: proteínas precipitadas solubilizadas en PBS; 6: proteínas finales luego de la diálisis en PBS diluido 100 veces. SDS PAGE 12%. Azul de Coomassie. * Cadenas pesada y liviana de las IgYs.

cuenta lo anterior se cuantifico a través de densitometría en gel como se describió previamente, obteniéndose 1,26 mg de His-GiNMNAT a una concentración 630 ng/μl (Figura 2).

Los anticuerpos IgY de las gallinas son transferidos desde el suero durante la maduración de la yema en el oviducto por un mecanismo similar a la transferencia placentaria que ocurre en mamíferos; allí se almacenan en grandes proporciones como un mecanismo de protección al embrión

(14, 16). Ya que es posible mantener IgY activos en la yema de huevo por varios meses si se sigue una inmunización periódica se recolectaron la mayor cantidad de huevos posibles durante dos meses (24).

La yema de huevo se compone fundamentalmente de gránulos formados por fosfovitas y lipoproteínas, dispersas en una fracción soluble que contiene livetinas y LDL (23-25). Inicialmente la separación por solubilidad, mediante dilución en agua de la yema a pH 5,0, facilitó la aglomeración de los gránulos lipídicos insolubles (deslipidación) (25), favoreciendo su posterior separación de las proteínas del plasma, entre ellas las livetinas (de 45 kDa dentro de las cuales se encuentran las IgYs) mediante centrifugación o filtración (26); ello permitió la aparición de sobrenadantes traslúcidos. Puesto que las IgYs son proteínas solubles, es posible recurrir a la precipitación por *salting out*; en este caso la adición de sulfato de amonio a una saturación del 60% ha mostrado ser óptima para la separación de las globulinas, favoreciendo un alto porcentaje de recuperación ($\approx 89\%$) (Figura 3) (4, 16).

El proceso de purificación por dilución en agua para uno de los huevos purificados, es seguido mediante SDS-PAGE (Figura 3). Al ajustar el pH y centrifugar la yema es posible visualizar las livetinas (Figura 3 carril 2), en los carriles 4 y 5 se observa el pellet de proteínas luego de la precipitación con sulfato de amonio, donde se evidencia la presencia de diversas globinas, la eficiencia de la precipitación es clara al verificar la ausencia de proteínas en la fracción soluble resultante del tratamiento con sulfato de amonio (carril 3). También se observa la desaparición de otras proteínas, junto con la concentración de las IgYs conforme se lleva a cabo la purificación. En el carril 6 es de resaltar la presencia de dos bandas de 30 y 65 kDa, que corresponden a los pesos moleculares esperados para las cadenas liviana y pesada de las inmunoglobulinas IgYs reportados previamente. Es posible evidenciar también, dentro del perfil electroforético otras proteínas. La banda de 45 kDa presumiblemente represente a las β -livetinas (proteínas similares a γ -livetinas, compuestas principalmente de IgYs), que por su peso se cree que pertenezcan a un grupo más específico, el de las α -2-glicoproteínas (24). Por su parte la banda de 38 kDa se atribuye a la fracción de α -fosvitinas (16, 24).

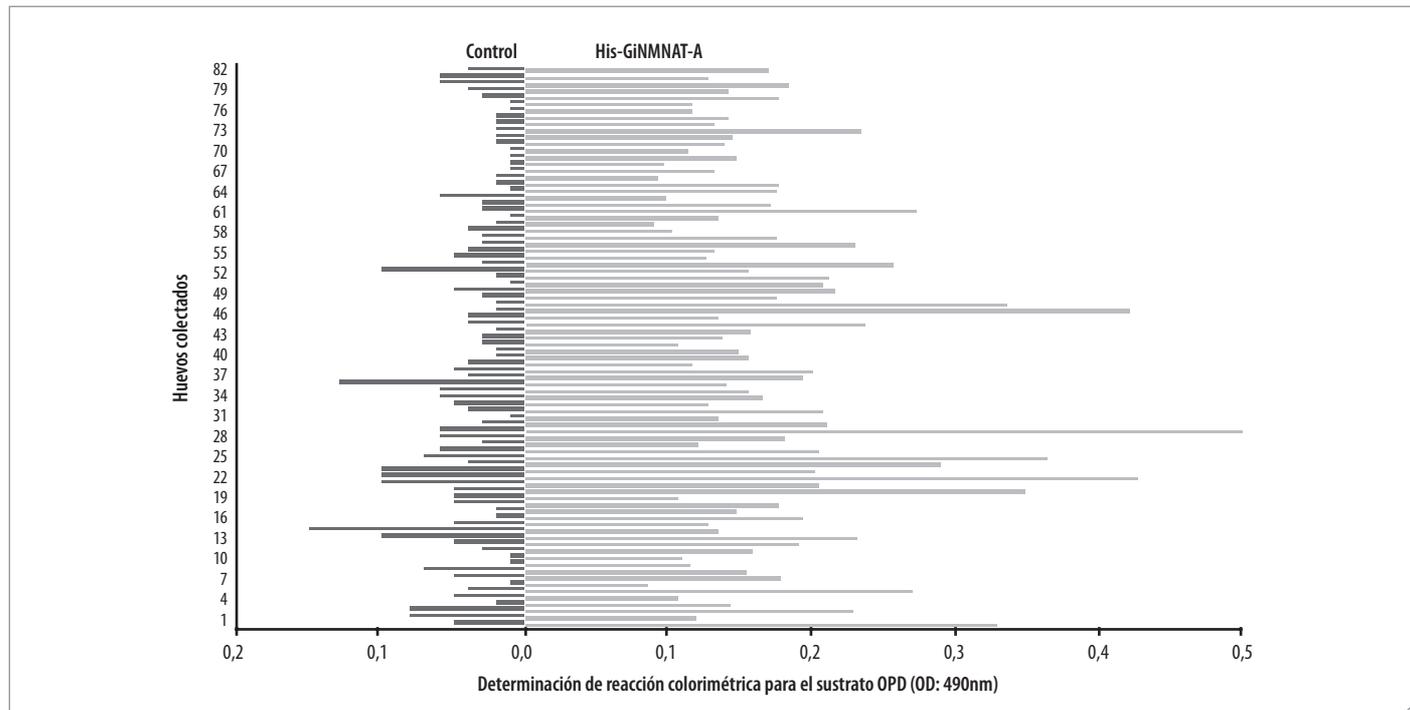


Figura 4. Evaluación de los niveles de IgY presentes en la fracción soluble de las yemas de los huevos analizados mediante ELISA. Gris oscuro: muestras provenientes de la gallina inoculada con adyuvante sin antígeno. Gris claro: muestras provenientes de la gallina inoculada con la His-GiNMNAT. Eje X: determinación de la reacción colorimétrica para el sustrato OPD a una densidad óptica de 490 nm (OD 490 nm); eje Y: número de huevos colectados.

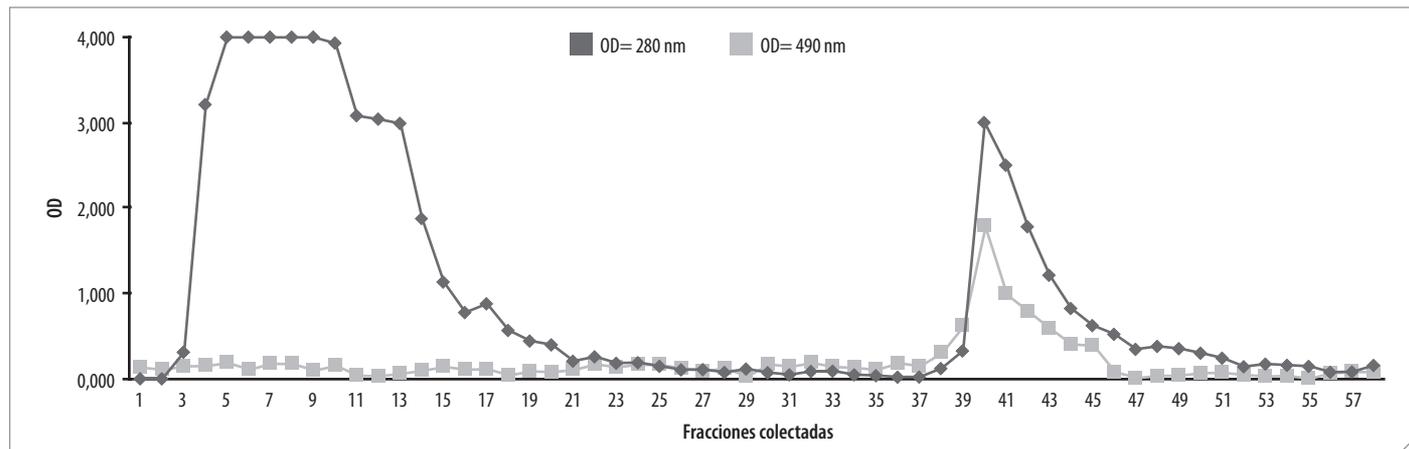


Figura 5. Purificación de las IgYs mediante resina de afinidad tiofilica. Gris oscuro: densidad óptica de las fracciones obtenidas a 280 nm. Gris claro: densidad óptica de las fracciones obtenidas a 490 nm (ELISA).

Los extractos obtenidos de las yemas colectadas después del proceso de deslipidación se evaluaron mediante ELISA con el objeto de identificar los huevos con mayor producción de anticuerpos. En la Figura 4 se resumen los resultados del ensayo de ELISA de los huevos colectados y procesados de ambos tratamientos (con y sin antígeno). A pesar de la irregularidad de la respuesta inmune es posible visualizar picos de mayor concentración de IgYs, posteriores a las inoculaciones. La ausencia de una tendencia regular en los datos no es inesperada, ya que el metabolismo de las aves se ve influenciado por condiciones fisiológicas y ambientales que no es posible controlar, lo cual determina oscilaciones en la producción de inmunoglobulinas en los diferentes momentos evaluados (22-27).

La respuesta inmune primaria al antígeno se caracteriza por producir anticuerpos de baja afinidad tras lo cual se generan células de memoria T y B (26-28). Gracias a la generación de procesos de memoria en el sistema inmune, en los refuerzos la presencia de una nueva estimulación antigénica genera una respuesta inmunológica más rápida, lo cual explica en parte el perfil obtenido (29). En la Figura 4 se pueden evidenciar picos de alta concentración de IgY; en este trabajo se escogió el huevo identificado con el número 30 para llevar a cabo la purificación total posterior a la solubilización. La Figura 4 también permite visualizar que la reacción de reconocimiento de las proteínas solubles obtenidas de la gallina inoculada (gris oscuro) es específica por el antígeno ya que está ausente en la gallina control inoculada solamente con adyuvante (gris claro).

Luego de determinar los picos de mayor producción de anticuerpos, se procedió a la purificación total de las IgY mediante cromatografía de afinidad tiofilica (Figura 5). Para ello, la fracción soluble del huevo 30 fue elegida por su elevado contenido de IgYs. La columna está constituida por esferas de agarosa químicamente unidas a 2-mercaptoetanol, y a su vez unidas a grupos divinilsulfona activados, que presentan una elevada afinidad por las inmunoglobulinas en presencia de sales liotrópicas (14, 17). Algunos autores (14, 16) describen el mecanismo de acción como la interacción entre el grupo tiol del 2-mercaptoetanol con regiones aromáticas de la proteína, principalmente residuos de triptófano y fenilalanina. No obstante, otros reportes refutan esta teoría y consideran que el mecanismo de acción está aún por determinar (17).

La Figura 5 muestra el perfil cromatográfico de la purificación por columna de afinidad tiofilica. En las primeras fracciones se eluyen proteínas que no presentan interacción con la resina; luego de eliminarlas se procede a la elución, donde se da un efecto inmediato de disociación de las uniones específicas de las proteínas con la resina y un consecuente aumento en la lectura a 280 nm (Figura 5). El pico más alto corresponde a la fracción obtenida en el momento de la aplicación del buffer de

elución (Figura 5, fracción 40) la cual, al ser visualizada mediante SDS PAGE (Figura 6 carril 5), muestra el patrón electroforético característico de las IgY (bandas de 30 y 65 kDa), por lo que se logra una adecuada purificación de IgYs mediante esta metodología.

La fracción 40 se empleó en experimentos posteriores, así como el anticuerpo IgY de huevo. Para determinar la cantidad de proteína IgY presente, se cuantificó una alícuota mediante el método de Bradford como se describe en la metodología. Se obtuvo una concentración de 7,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, que equivale a un total de 14,4 mg de IgY para el huevo 30. Esta cantidad se encuentra dentro de rango obtenido para IgY purificadas por dilución en agua y cromatografía tiofilica para otros antígenos (16) y para otros anticuerpos IgY purificados por esta metodología (30). Del total de IgYs obtenidas, se espera que entre un 2 a un 10% corres-

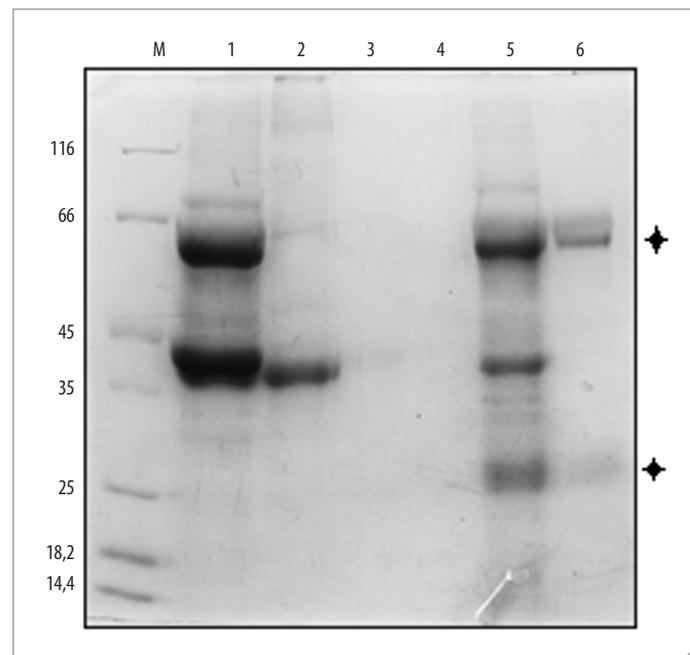
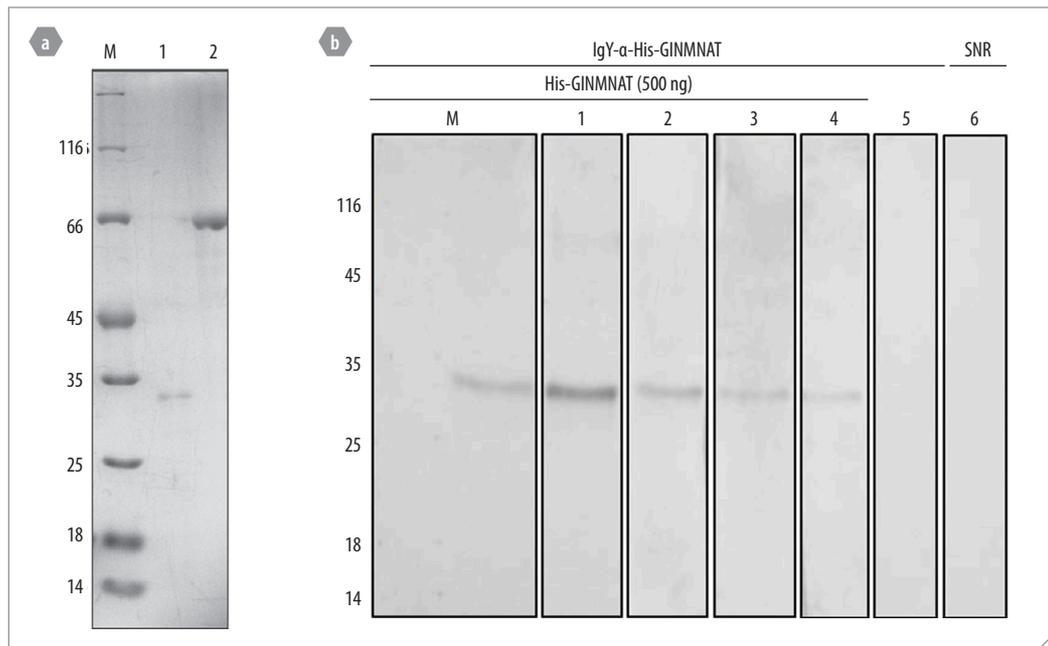


Figura 6. Perfil electroforético de la purificación de inmunoglobulinas aviares (IgYs) empleando resina de afinidad tiofilica. M: marcador de bajo peso molecular (kDa); 1: fracción 5 (proteínas no unidas); 2: fracción 13 (proteínas no unidas); 3: fracción 25 (proteínas no unidas); 4: fracción 29 (proteínas no unidas); 5: fracción 40 (elución de IgYs); 6: fracción 35 (proteínas eluidas). SDS-PAGE al 12%. Coomassie R-250.

Figura 7. Evaluación de IgY de huevo mediante *immunoblot* empleando 500 ng de proteína recombinante como antígeno. **a.** Gel SDS PAGE 12% M: marcador de bajo peso molecular (kDa); 1. His-GiNMNAT 500 ng; 2. BSA 500 ng. **b.** *Western Blot*. M: marcador de bajo peso molecular (kDa); 1. His-GiNMNAT / IgY 1:50; 2. His-GiNMNAT / IgY 1:100; 3. His-GiNMNAT / IgY 1:200; 4. His-GiNMNAT / IgY 1:500; 5. His-GiNMNAT / IgY 1:1000; 6. BSA [500 ng/μl] / IgY 1:50; 7. His-GiNMNAT / IgY 1:50 (no ilustrado). Revelado mediante el sistema peroxidasa de rábano (HRP).



pondan a IgY específicas contra el antígeno inoculado (25). Así, la metodología empleada para la purificación fue efectiva en la obtención de una gran cantidad de proteína IgY. La purificación de IgY puede llevarse a cabo mediante diversas metodologías; no obstante, para garantizar la eficiencia de un método, deben ser tenidos en cuenta tres factores determinantes: cantidad, pureza y actividad biológica de las inmunoglobulinas, además de los costos que involucre el proceso (16). El procedimiento utilizado en el presente trabajo se puede considerar como un método muy eficiente de obtención de anticuerpos a partir de la yema de huevo, considerando la relación costo/beneficio.

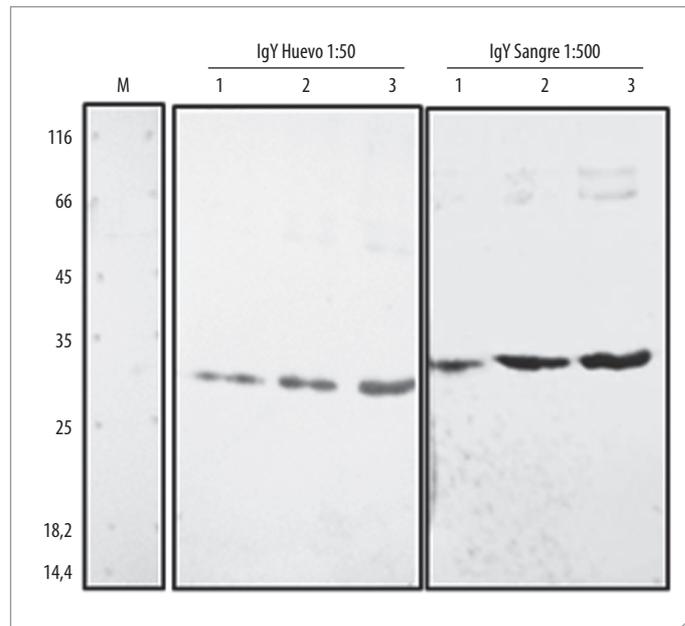


Figura 8. Evaluación de anticuerpos IgY sobre diferentes concentraciones de proteína recombinante mediante *immunoblot*: M: marcador de bajo peso molecular. 1. 15 ng His-GiNMNAT-A; 2. 30 ng His-GiNMNAT-A; 3. 60 ng His-GiNMNAT-A. IgY huevo: título 1:50 e IgY sangre: 1:500. Revelado mediante el sistema peroxidasa de rábano (HRP).

Evaluación del título del IgY sobre la proteína recombinante

Para caracterizar el anticuerpo purificado se realizó la determinación del título mediante un ensayo de *immunoblot* en el cual se empleó como antígeno la proteína recombinante His-GiNMNAT (500 ng) purificada previamente desde los cuerpos de inclusión. La proteína para estos ensayos corresponde a la misma empleada para la inmunización de las gallinas. La Figura 7 muestra los resultados *immunoblot* al usar diferentes títulos del anticuerpo obtenido de huevo IgY-α-GiNMNAT (1:1000 – 7,22 ng/μl, 1:500 – 14,44 ng/μl, 1:200 – 36,10 ng/μl, 1:100 – 72,20 ng/μl y 1:50 – 144,40 ng/μl). Se evidencia reconocimiento de la proteína recombinante de 31 kDa desde 1:1000. También es clara la ausencia de reconocimiento de otras proteínas como BSA, que estaban presentes en las mismas cantidades y fueron tratadas con los mismos títulos, tanto como la ausencia de reconocimiento de las IgYs purificadas de las gallinas no inoculadas con el antígeno His-GiNMNAT empleando los mismos títulos.

Los títulos escogidos se probaron de acuerdo a ensayos estandarizados previamente para otros anticuerpos aviares obtenidos y purificados (16). Los títulos reportados para IgY varían de acuerdo con la cantidad de antígeno, el método de purificación utilizado y la cantidad de inoculaciones realizadas, por lo que no es posible comparar directamente el título obtenido con los reportados (16). Sin embargo, el título del anticuerpo obtenido concuerda con el registrado para antígenos similares de parásitos como *Leishmania spp.* (16).

Las NMNAT son enzimas de baja expresión en algunos organismos y/o tejidos celulares (3), por lo que es importante estandarizar el reconocimiento de cantidades muy bajas de proteína recombinante. Se realizó un ensayo de *immunoblot* sobre diferentes cantidades de His-GiNMNAT para determinar la cantidad mínima capaz de ser reconocida por los anticuerpos obtenidos. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 8. En adición, se muestra la detección de la proteína recombinante con una señal fuerte, incluso sobre cantidades tan reducidas como 15 ng. Se reconocen también algunas inespecificidades de mayor peso molecular la cuales corresponden a impurezas del antígeno que contiene cantidades bajas de otras proteínas de *E. coli* presentes en los cuerpos de inclusión; es de esperar que se produzcan anticuerpos contra estas proteínas contaminantes y, por tanto, una detección de las mismas empleando concentraciones elevadas de anticuerpos como en este ensayo.

De manera paralela, un mes después de la segunda inoculación, y para tener una fuente adicional de IgYs, se decidió tomar una muestra de sangre de 5 ml de la gallina de la cual se obtuvieron los huevos. Se evaluó el título del suero obtenido de forma similar a las IgYs de huevo sobre proteína recombinante (resultados no mostrados), obteniéndose un título de (1:500) para la detección de cantidades tan bajas como 15 ng de proteína recombinante (Figura 8). Los IgYs obtenidos del suero son igualmente eficientes en el reconocimiento de la proteína recombinante, constituyendo una fuente adicional de anticuerpo. Las IgYs de séricas no requieren una purificación posterior pero su disponibilidad es limitada debido a que se presentan en un volumen menor y su extracción involucra un proceso invasivo en el animal; ello fue contrario a lo observado en la obtención de IgYs de huevo.

El anticuerpo IgY- α GiNMNAT purificado mediante afinidad sobre membranas de nitrocelulosa

Cuando el anticuerpo IgY se emplea en altas concentraciones detecta, además de la proteína His-GiNMNAT de 31 kDa, una banda de alto peso molecular (\approx 66 kDa); aprovechando la gran cantidad de anticuerpo IgY de huevo disponible, se abordó una estrategia adicional de purificación por afinidad al antígeno, previamente transferido e inmovilizado sobre membranas de nitrocelulosa, como se describe en la metodología. Los anticuerpos así purificados, fueron empleados para el reconocimiento de la proteína recombinante por *immunoblot*. La Figura 9 muestra la eficiencia del proceso de purificación en la eliminación de reconocimiento de proteínas inespecíficas de alto peso molecular en comparación con el anticuerpo inicial previamente purificado por afinidad tiofílica en título (1/50). Mediante el anterior proceso de purificación se logró la obtención de un anticuerpo IgY- α GiNMNAT de alta especificidad por la proteína recombinante His-GiNMNAT.

Este artículo describe una técnica para la obtención y purificación de IgYs a partir yemas de huevo cuya utilidad es extensa, ya que permite la obtención grandes cantidades de anticuerpos que pueden ser empleados para estudios diversos. El hecho de que las aves se encuentren filogenéticamente más distantes de los mamíferos hace ideal esta metodología para la obtención de anticuerpos contra antígenos de mamíferos sin lugar a reacciones cruzadas y con una alta especificidad. Además evita reacciones indeseadas con el sistema complemento u otros componentes del sistema inmune (16). Teniendo en cuenta lo anterior, para el caso particular de *Giardia intestinalis* –patógeno frecuente de mamíferos como conejos o ratones–, sus antígenos no constituyen buenos inmunógenos para la obtención de anticuerpos en estos modelos. Por ello es ventajoso para el estudio de la GiNMNAT-A emplear modelos aviares para la obtención de anticuerpos específicos

La NMNAT está presente en todos los organismos vivos conocidos hasta el momento, ya que cataliza el paso clave de la síntesis del NAD⁺ (2). La obtención de anticuerpos IgYs- α His-GiNMNAT-A descrita en este artículo permitirá desarrollar estudios funcionales y celulares detallados en *Giardia intestinalis*. Adicionalmente, los anticuerpos desarrollados evidencian detección de proteínas NMNAT recombinantes obtenidas y purificadas de otros protozoarios, pero no de alguna proveniente de mamíferos (resultados no mostrados), lo cual demuestra que la herramienta inmunológica obtenida constituye una estrategia eficiente para el desarrollo de estudios acerca de la síntesis del NAD⁺ en parásitos protozoos.

Conclusión

Los cuerpos de inclusión obtenidos de la sobreexpresión de proteínas recombinantes –como His-GiNMNAT en sistemas heterólogos como *E. coli*–, constituyen una herramienta de utilidad para la obtención de an-

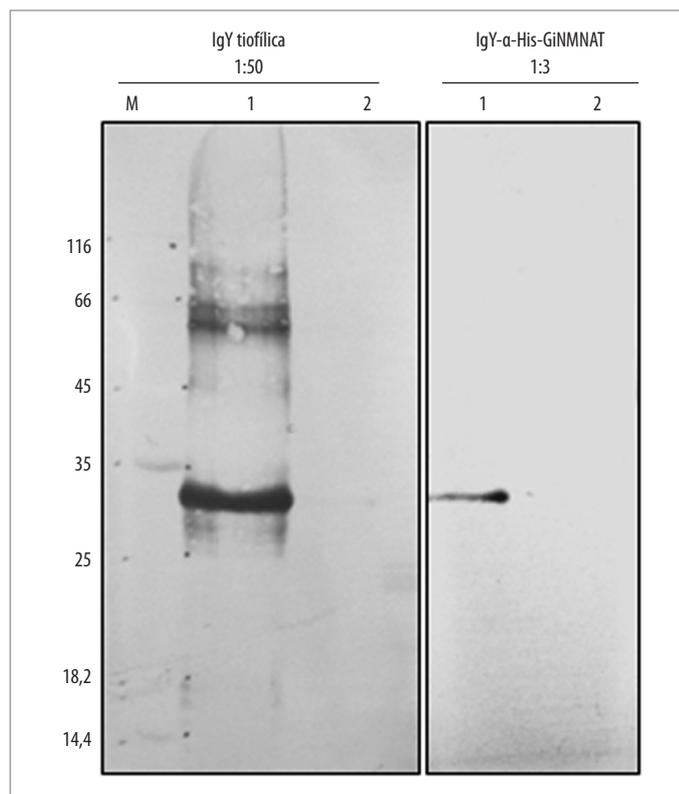


Figura 9. Reconocimiento de las GiNMNAT con anticuerpo IgY de huevo purificado mediante cromatografía tiofílica y purificado adicionalmente por afinidad al antígeno. M: marcador de bajo peso molecular (kDa); 1: His-GiNMNAT (+), 2: albúmina de suero bovino (BSA) (–). *Immunoblot* revelado a través del sistema peroxidasa de rábano (HRP).

ticuerpos policlonales. Además, pueden ser empleados como antígenos eficientes para conseguir una alta producción de anticuerpos, aprovechando un subproducto de la sobreexpresión de proteínas.

Se implementó y estandarizó un método para la producción y purificación de grandes cantidades de anticuerpos policlonales aviares (IgYs), a partir de la yema de huevo y empleando cuerpos de inclusión como antígeno. Se obtuvieron IgYs, tanto de yema de huevo como de plasma sanguíneo de las gallinas inoculadas, con capacidad para reconocer la proteína recombinante His-GiNMNAT. Adicionalmente, se probó un método para mejorar la especificidad del anticuerpo mediante una segunda purificación por afinidad al antígeno inmovilizado en membranas de nitrocelulosa, con la cual se obtuvo un reconocimiento específico de la proteína recombinante de 31 kDa.

Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Nacional de Colombia, especialmente al Proyecto de Estudiante Auxiliar No. 17807/2063 y al proyecto de la DIB 14365.

Referencias

- Morrison, G.; McArthur, G.; Gillin, F.; Aley, S.; Adam, R.; Olsen, G.; Sogin, M. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*. 2007. **317**(5846): 1921–1926.

2. Berger, F.; Ramírez-Hernández, M.; Ziegler, M. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem. Sci.* 2004. **29**(3): 111–118.
3. Chiarugi, A.; Dölle, C.; Felici, R.; Ziegler, M. The NAD metabolome—a key determinant of cancer cell biology. *Nat. Rev. Cancer.* 2012. **12**(11): 741–752.
4. Lau, C. Functional Characterisation of Three Human Nicotinamide Mononucleotide Adenyltransferases. Dissertation for the degree philosophiae doctor. University of Bergen. 2008. Disponible: https://bora.uib.no/bitstream/handle/1956/3283/Ph._Thesis_CorinnaLau.pdf?sequence=1 [consultado el 10 de diciembre de 2011].
5. Neme, R.; Ramírez-Hernández, M. Aproximación bioinformática y bioquímica al metabolismo del dinucleótido de nicotinamida (NAD⁺) en *Leishmania braziliensis*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. 2008.
6. Jayaram, H.; Kusumanchi, P.; Yalowitz, J. NMNAT expression and its relation to NAD metabolism. *Curr. Med. Chem.* 2011. **18**(13): 1962–1972.
7. Garavaglia, S.; D'Angelo, I.; Emanuelli, M.; Carnevali, F.; Pierella, F.; Magni, G.; Rizzi, M. Structure of human NMN adenyltransferase. A key nuclear enzyme for NAD homeostasis. *J. Biol. Chem.* 2002. **277**: 8524–8530.
8. Lee, H. Physiological Functions of Cyclic ADP-Ribose and NAADP as Calcium Messengers. 2001. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001. **41**: 317–345.
9. Koch-Nolte, F.; Fischer, S.; Haaga, F.; Ziegler, M. Compartmentation of NAD⁺-dependent signalling. *FEBS Lett.* 2011. **585**(11): 1651–1656.
10. Manning, G.; Reiner, D.; Lauwaet, T.; Dacre, M.; Smith, A.; Zhai, Y.; Svard, S.; Gillin, F. The minimal kinome of *Giardia lamblia* illuminates early kinase evolution and unique parasite biology. *Genome Biol.* 2011; **12** (7):66–72.
11. Denu, J. Vitamins and aging: pathways to NAD⁺ synthesis. *Cell.* 2007. **129**(3): 453–454.
12. Buitrago, J.; Ramírez-Hernández M. Aproximación al estudio del metabolismo del dinucleótido de nicotinamida adenina en *Giardia lamblia*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. 2007.
13. Ramírez-Vargas, E.; Ramírez-Hernández, M. Evaluación del candidato a de la proteína NMNAT mediante herramientas bioquímicas. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. 2010.
14. Bustos-Parra, V.; Ramírez-Hernández, M. Evaluación del candidato B de la proteína NMNAT de *Giardia lamblia* mediante herramientas bioinformáticas y bioquímicas. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. 2007.
15. Singh, S.; Amulya, K. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* 2005. **99**(4): 303–310.
16. Contreras, L.; Ramírez-Hernández, M. H. Aproximación al Metabolismo del Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina (NAD⁺) en *Leishmania*. *Rev. Asoc. Col. Cienc. (Col.)* 2010. **22**: 97–108.
17. Pinto, J.; Barco, M.; Afanador, M. C.; Merchán, A. M.; Montañez, M. F.; Andrade, F.; Torres, O. Obtención de anticuerpos policlonales IgY antiparvovirus canino a partir de yema de huevo de gallina. *Universitas Scientiarum.* 2005. **10**(1): 37–43.
18. Starr, T. Quantification of protein bands using densitometry. 2013. Disponible en: http://www1.med.umn.edu/starrlab/prod/groups/med/@pub/@med/@starrlab/documents/content/med_content_370494.html. [Consultado el 4 de mayo de 2013].
19. Akita, M.; Nakay, E. Immunoglobulins from Egg Yolk : Isolation and Purification. *J. Food Sci.* 1992. **57**(3): 8058–8070.
20. Barroso, P.; Murcia, H.; Vega, N.; Pérez, G. Obtención y purificación de IgY dirigidas contra la lectina de *Salvia bogotensis*. *Biomédica* 2005. **4**: 496–510.
21. García, D.; Nicholls, R.; Arévalo, A.; Torres O.; Duque, S. Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales IgY desarrollados en gallina, dirigidos contra aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis*. *Biomédica*. 2005. **25**: 451–463.
22. Sánchez-Lancheros, D.; Ramírez-Hernández M. Desarrollo de una herramienta inmunológica para el estudio de la Nicotinamida Mononucleotido AdenililTransferasa (NMNAT) en *Leishmania braziliensis*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. 2011.
23. Fang, L. Antibody Purification from Immunoblotting. 2012. Disponible: <http://www.bio-protocol.org/wenzhang.aspx?id=133>. [Consultado el 18 de abril de 2013].
24. Rica, F. Métodos inmunológicos. 2007. Disponible. http://medicina.ens.uabc.mx/manuales_laboratorio/LIM-N3-004.pdf. [Consultado el 06 de junio de 2013].
25. Huopalahti, R.; López-Fandiño, R.; Anton, M.; Schade, R. Bioactive Egg Compounds. 1a. ed. Berlín-Heidelberg: Springer Verlag. 298 p. 2007. DOI 10.1007/978-3-540-37885-3.
26. Harlow, E.; Lane D. Antibodies: A Laboratory Manual. 1st. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 726 p. 1988.
27. Levy, J.; Ibrahim, A.; Shirai, T.; Otha, K.; Nagasawa, R.; Yoshida, H.; Estesii, J.; Gardenerii, M. Dietary fat affects immune response, production of antiviral factors, and immune complex disease in NZB/NZW mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1982. **79**: 1974–1978.
28. Dubovi, E. J.; MacLachlan N. J. Fenner's Veterinary Virology. Fourth edition. Boston: Academic Press. p. 283. 2010.
29. Paul, W. E. Fundamental Immunology. 5th. edition. New York: Lippincott Williams & Wilkins. p. 1502. 2003.
30. Howard, G. C.; Kaser, M. R. Making and Using Antibodies: A Practical Handbook. 2nd edition. Boca Raton (FL, USA): CRC Press-Taylor & Francis Group. 2013.
31. Reyes-Montaño, E.; Lareo, L.; Pérez, G. Production and purification of IgY antibodies as a novel tool to purify the NR1 subunit of NMDA receptor. *Rev. Colomb. Quim.* 2012. **41**(1): 31–45.

Article citation:

Moreno-González, P. A.; Díaz, G.; Ramírez-Hernández, M. H. Producción y purificación de anticuerpos aviares (IgYs) a partir de cuerpos de inclusión de una proteína recombinante central en el metabolismo del NAD⁺. *Rev Colomb Quim.* 2013. **42**(2): 12–20.