



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DE LA IGY DE PALOMA Y
PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS A ESTE
ANTÍGENO EN NEUMONITIS POR
HIPERSENSIBILIDAD**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ARMANDO SEGURA GRIFALDO



**DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. ERASMO MARTÍNEZ CORDERO**

Cd. Universitaria, D.F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno
Segura
Grifaldo
Armando
28782353
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
306240728
2. Datos del tutor
M. en C.
Erasm
Martínez
Cordero
3. Datos del sinodal 1
Dra.
María Isabel
Soto
Cruz
4. Datos sinodal 2
Dr.
José Luis
Arreola
Ramírez
5. Datos sinodal 3
Dra.
Blanca Margarita
Bazán
Perkins
6. Datos sinodal 4
M. en C.
Iván Sammir
Aranda
Uribe
7. Datos del trabajo escrito
Estudio de la IgY de paloma y producción de anticuerpos a este antígeno en neumonitis
por hipersensibilidad
41 p
2014

*“El científico no estudia a la naturaleza por la utilidad que le pueda reportar;
la estudia por el gozo que le proporciona, y este gozo
se debe a la belleza que hay en ella...”*

Henri Poincaré

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Autoinmunidad en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias bajo la dirección del M. en C. Erasmo Martínez Cordero, con el apoyo técnico y académico por parte de la Q.F.B. Juana Arellano García.

Se contó con el apoyo económico para la realización de esta tesis del Programa de Becas de Inicio a la Investigación (PROBEI) en su convocatoria 2012.

Agradecimientos

Le doy las gracias de una manera muy especial a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por haberme permitido realizar mis estudios profesionales en sus aulas y así poder llevar con orgullo su nombre a todos los rincones del mundo.

A mi tutor Erasmo Martínez Cordero, así como al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, por permitirme realizar esta investigación en el laboratorio de autoinmunidad y proporcionarme los recursos necesarios para su realización. A la Q.F.B Juanita por todo el apoyo y paciencia en todo momento a lo largo de esta investigación.

A mi familia:

A mis padres, Juan y Victoria por su enorme apoyo en todo momento, no solamente en lo académico si no en todos los aspectos de mi vida, por haber creído en mí, gracias a sus enormes esfuerzos para lograr terminar mi carrera. Sin ustedes no hubiera sido posible nada de esto.

A mi hermano, Héctor, que al igual que mis padres siempre has estado junto a mí apoyándome en lo que sea, en las buenas y en las malas, pasando juntos desveladas, fríos, enojos, tristezas, alegrías, conciertos, además de compartir amigos, cumpleaños y hasta enfermedades, no puede haber un mejor hermano, gracias.

A todos mis tíos y tías que me brindaron su cariño incondicional, por aquellos libros que me obsequiaron, los cuales me hicieron fuerte en todo el transcurso de la carrera, sin ellos hubiera sido más difícil poder estar aquí.

A mis primillas, Brenda y Andrea, que más que eso son mis hermanas, gracias por darme una de las mejores infancias que pude haber tenido. A ti Brenda por defenderme de Héctor en todo momento y por hacerme ver que lo mío no era hacer casas (jaja) y a ti Andrea por todas aquéllas exploraciones extremas que hacíamos a todo lugar que íbamos y por capturar muchos lobos y dinosaurios en el edificio (XD), sigan igual de guapas que siempre.

Y por supuesto, a mi sobrino Diego, que su llegada nos llenó de felicidad a todos y nos ha regalado mucha alegría con el simple hecho de estar allí, y aunque sea muy pequeño aún, gracias por hacernos recordar que la vida sigue siendo bella y que hay que disfrutarla en todo momento.

A mis amigos:

Grecia, Fabiola, Marcos, Joel, por hacerme la vida más fácil y divertida, por todos esos destinos, espacios, convivencias, pero sobre todo esas risas que nunca nos dejan cuando nos juntamos, gracias por todo, sé que puedo contar con ustedes en cualquier momento.

Gracias Nancy, José Luis y Rodrigo, amigos desde tiempos inmemoriales (jajaja), por la gran paciencia que me han tenido por mi ausencia y por cada uno de los consejos que me han dado a lo largo de esta bonita amistad, en especial a pepito con sus sermones eucarísticos =P.

A Janette y Daniel, ¿qué hubiera pasado si no estuvieran en el INER?...la cepa de influenza A H1N1 no hubiera existido jajaja, gracias por hacer más amenas las horas ahí, con esas bromas, pizza y hamburguesas. A ti Janette, por tu dosis de “bullying” de cada día y permitirnos conocer “la casa de tu tío” en Puerto Vallarta (XD); y a ti amigo Daniel por hacer divertidas las salidas y darles ese toque especial en cada una de ellas (ej. tu amigo el pescador jajaja), todo esto recordando el asombroso viaje que tuvimos, espero que hayan más viajes de esos.

A mis amigos en el laboratorio de Autoinmunidad, Jenny e Iván, por las pláticas tan divertidas que tuvimos a lo largo de este tiempo. A Iván por toda la confianza que has depositado en mí, tus consejos, enseñanzas y a Jenny por tu grata compañía en las largas jornadas en el cuarto de cultivo, gracias por brindarme tu amistad.

En general le agradezco a cada una de esas personas que me han apoyado a lo largo de estos años, ya sean amigos o familiares, y que por alguna u otra razón no se encuentran cerca, gracias por su compañía y buenos momentos que pasamos juntos. Gracias.

“Sin una familia, el hombre, solo en el mundo, tiembla de frío”

André Maurois

“Amigos son aquellos extraños seres que nos preguntan cómo estamos y se esperan a oír la contestación”

Ed Cunningham

Abreviaturas

µg	Microgramos
µl	Microlitros
Ac	Anticuerpo
AgAv	Antígeno Aviario
AgAvT	Antígeno Aviario Total
BSA	Bovine Serum Albumin (Albúmina sérica bovina)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)
Galα1-3Gal	Galactosa Alfa 1-3 Galactosa
Galα1-4Gal	Galactosa Alfa 1-4 Galactosa
IgA	Inmunoglobulina Tipo A
IgG	Inmunoglobulina Tipo G
IgY	Inmunoglobulina Tipo Y
IQ	Inmunoquímicas
kDa	KiloDalton
Kg	Kilogramo
Km²	Kilómetro cuadrado
MP	Marcador de peso molecular
NH	Neumonitis por hipersensibilidad
nm	Nanómetros

OFD	Orto- fenilendiamina
PBS	Phosphate Buffered Saline (Amortiguador de Fosfatos Salinos)
pH	Potencial de Hidrógeno
RI	Respuesta Inmune
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecilsulfato Sódico)
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (Electroforesis con geles de poliacrilamida-SDS)
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
V	Volt
β-met	β-mercaptoetanol
γ	Gammaglobulinas (Abreviatura estricto para este estudio)

Índice

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. PALOMAS Y SOCIEDAD	2
1.2. CLASE AVES	3
1.3. CLASIFICACIÓN Y FILOGENIA.....	4
1.4. ORDEN COLUMBIFORMES.....	5
1.5. ENFERMEDADES ASOCIADAS A PALOMAS.....	8
1.6. NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD CAUSADA POR AVES	9
1.7. IGY DE PALOMA	11
1.7.1. <i>IgY una proteína altamente glicosilada</i>	15
2. JUSTIFICACIÓN	18
3. OBJETIVOS	18
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	18
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
4. MATERIAL Y MÉTODO	19
4.1. IGY E INMUNOGLOBULINAS TIPO G	19
4.2. MUESTRAS BIOLÓGICAS Y FUENTES DE OBTENCIÓN DE IGY'S E IGG'S	19
4.3. PURIFICACIÓN DE IGY DE PALOMA	20
4.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	21

4.5. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS (SDS-PAGE).....	22
4.6. ELECTROTRANSFERENCIA (BLOTTING).....	22
4.7. WESTERN BLOT.....	23
4.8. ANTICUERPO ANTI-IGY EN NH.....	24
4.9. ESTADÍSTICA.....	25
5. RESULTADOS.....	25
5.1. PURIFICACIÓN DE IGY DE HUEVO DE PALOMA A TRAVÉS DE KIT COMERCIAL	25
5.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	27
5.3 ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA DE LOS DIFERENTES TIPOS DE IGG'S.....	29
5.4 INMUNOBLOT.....	31
5.5 PRODUCCIÓN DE AC ANTI-IGY	33
6. DISCUSIÓN.....	34
7. CONCLUSIONES.....	38
8. BIBLIOGRAFÍA.....	39

Resumen

ANTECEDENTES. La relación paloma-humano ha jugado un papel importante en la historia humana, lamentablemente esto ha traído a su vez enfermedades respiratorias relacionadas al contacto continuo con estas aves como es la Neumonitis por Hipersensibilidad (NH). La IgY de paloma al ser una de las principales moléculas que podemos encontrar en la paloma y notar la falta de información sobre ella se decidió abordar el estudio de sus características inmunoquímicas e inmunogénicas para tener una mejor noción acerca de su participación como antígeno en NH.

OBJETIVOS. Purificar y obtener IgY de paloma y así evaluar sus características inmunoquímicas. Estudiar si diferentes fuentes de IgY de paloma son reconocidas por anticuerpos (Ac) especies-específicos e identificar la producción de Ac anti-IgY de paloma en sueros de pacientes con NH.

MÉTODO. La obtención de IgY de paloma se realizó con la utilización de un método comercial para la purificación de IgY de gallina, se verificó su presencia y pureza por medio de electroforesis (SDS-PAGE) y se midió su concentración al igual que las demás muestras utilizando el método de Bradford. Para evaluar la actividad del Ac anti-IgY de paloma especie específico se corrieron en electroforesis para posteriormente realizar Western Blot. Por último se evaluó la producción de Ac anti-IgY de paloma en sueros de pacientes con NH por medio de ELISA.

RESULTADOS. Al purificar IgY se obtuvieron dos bandas correspondientes a cadenas pesadas y ligeras obteniendo una concentración de 1.58 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. El Ac anti-IgY de paloma solo detectó componentes derivados de la paloma (AgAvT, γ de paloma e IgY de paloma) y se detectó que en pacientes con NH presentan una producción significativa ($p=0.05$) de Ac. anti-IgY de paloma con respecto a pacientes sanos.

CONCLUSIONES. Se logró la purificación de IgY de paloma comercial mediante un método comercial no específico para esta inmunoglobulina y se pudo determinar la acción específica del Ac anti-IgY de paloma. Se detectó la producción de Ac anti-IgY en sueros de pacientes con NH permitiéndonos proponer a la IgY como antígeno causal en NH.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Palomas y sociedad

La asociación de las palomas con la vida humana ha sido muy estrecha. Desde la antigüedad estas aves han sido utilizadas, en algunas instancias como alimento, posteriormente como mascotas, e incluso criadas con varios fines.

Las palomas son probablemente el primer ave que fue domesticada por la humanidad, no se conoce con certeza cuando estas aves fueron puestas en cautiverio pero fue mucho tiempo antes de que algunos grupos étnicos las plasmaran tanto en pinturas rupestres, como en algunos manuscritos antiguos (Vriends, Erskine, & Erskine, 2005). Probablemente las cruzadas ayudaron a difundir la crianza de las palomas. Con los viajes, que se incrementaron gradualmente desde el siglo XVII con Arabia y Persia muchos de los criadores de paloma migraron a Europa, lo que derivó en la especialización de esta ocupación. Además, los marinos holandeses e ingleses llevaron de Asia a Europa criadores de estas aves, según escritos que datan del siglo diecisiete. Por otro lado, las palomas han jugado un papel importante durante las guerras, y es muy conocido que en la Segunda Guerra Mundial las fuerzas militares ocuparon a estas aves para mandar mensajes estratégicos sin ser detectadas. Finalmente, en épocas más recientes, las palomas han sido usadas como animales de laboratorio por los investigadores debido a que son fáciles de mantener (Vriends et al., 2005).

1.2. Clase Aves

Las aves, al ser tetrápodos, comparten características con peces, anfibios, reptiles y mamíferos. Junto a los mamíferos ocupan lo más alto de la escala evolutiva compartiendo la principal función que los caracteriza: la regulación de la temperatura, que por lo general es más alta con relación a la temperatura atmosférica, lo que peces, anfibios y reptiles no pueden hacer. Son vertebrados bípedos con una gran diversidad de formas, se distinguen por su característica única, sus plumas, las cuáles son modificaciones de la piel y sirven para mantener el vuelo y regular la temperatura. Todas las aves presentan pico, un atributo fácil de distinguir para su reconocimiento, el pico varia en su forma y función dependiendo de la especie que se traté pero siempre sin dientes y cubierto por una capa córnea (Austin Jr., 1961)(Gill, 1995).

Las aves están estrechamente relacionadas con su ancestro inmediato, los reptiles. Su esqueleto está altamente modificado para el vuelo pero retienen características reptilianas como el paladar secundario, presencia de un cóndilo occipital, escamas en las extremidades inferiores, huevos cleidoicos, entre otros. Su evolución de un antecesor reptiliano comenzó durante el Mesozoico (probablemente temprano), hace 150 millones de años a partir de un dinosaurio pequeño, *Deinonychus antirrhopus*. Se sabe que la primer ave con todas las características actuales surgió en el jurásico hace 130 millones de años, gracias al descubrimiento del fósil *Archaeopteryx* (Gill, 1995) (Austin, 1961).

1.3. Clasificación y filogenia

El proceso de clasificar y nombrar a las diferentes especies de aves se ha realizado desde tiempos antiguos, consta en incluir especies similares dentro de taxos diagnóstico y unir estos taxos en base a su secuencia evolutiva. El principio fundamental de la filogenia es encontrar el ancestro común para todas las especies ya que los procesos evolutivos principalmente son procesos de ramificación, esto quiere decir que una especie puede generar dos o más especies, y conociendo su historia evolutiva se pueden agrupar a los organismos en un árbol filogenético (Gill, 1995).

La Clase Aves está comprendida por dos subclases: (1) Subclase *Archeornithes*, en la cual todos sus representantes están extintos, y (2) Subclase *Neornithes* que cuenta con dos superórdenes: (a) *Paleognathae* que comprende a todas las grandes aves terrestres no voladoras (Ratites y Tinamous), como el avestruz, casuarios, kiwis y (b) *Neognathae* que incluye a todas las aves modernas voladoras (Ver fig. 1). La clasificación completa de las aves vivas está comprendida, en un arreglo jerárquico, de 29 órdenes y 187 familias, que incluyen 2029 géneros y aproximadamente 9600 especies (Gill, 1995).

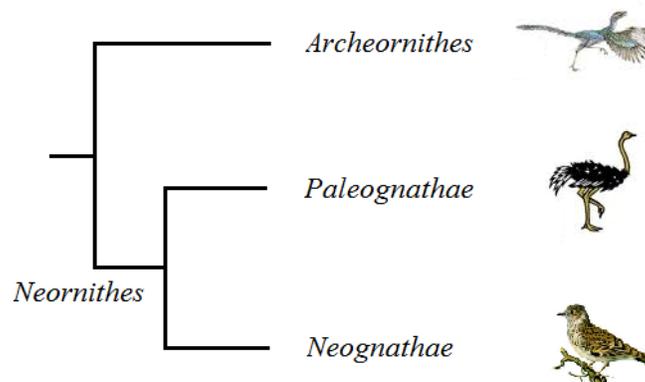


Fig. 1. Árbol filogenético de las aves.

La variedad de aves es el gran resultado de millones de años de evolución y adaptación de estos vertebrados a un sin número de condiciones ambientales, habiendo grandes diferencias entre especies, como por ejemplo en el peso, ya que puede haber aves cuyo peso es solo de 2 gramos (colibrí) así como aves que llegan a pesar hasta 100 Kg (avestruz) u otras aves que han perdido la capacidad de volar como es el caso en los pingüinos que ocupan sus alas para nadar o del Kiwis que las perdió por sus hábitos alimenticios. (Austin, 1961).

Es por ello que debemos indagar en la historia natural y social de la paloma para poder entender los fundamentos de este trabajo y así comprender el impacto que puede tener nuestro estudio.

1.4. Orden Columbiformes

El orden al que pertenecen las palomas es el *Columbidae*, y una de sus características es que se encuentra en prácticamente todo el mundo, tienen una gran diversidad de formas, tamaños, colores y hábitats. Tiene un cuerpo generalmente robusto con un cuello muy corto y cabeza pequeña. Muchas de las palomas subsisten solamente de una dieta vegetariana, alimentándose de semillas, granos y frutas, mientras otras solo se alimentan de insectos como lombrices y grillos. Usualmente todas las palomas llegan a poner entre 1 y 3 huevos, frecuentemente 2 (Austin, 1961).

Una característica de las palomas es que secretan una sustancia conocida como “leche de paloma”, la cual es producida durante el periodo de incubación para estar lista en el momento en que la cría nace, los padres regurgitan este alimento para poder alimentarlo. (Austin, 1961).

El género *Columbia* está conformado por más de 50 especies de palomas como *C. rupestris*, *C. leuconota*, *C. albitorques*, entre otras (Ver Fig. 2) (Johnston & Janiga, 1995). Por motivos de investigación *Columbia livia* mejor conocida como paloma común o paloma doméstica es nuestro objetivo de estudio.



Fig. 2. Representación de diversas especies del género *Columba*

Las palomas (*Columba livia*) son una de las especies más numerosas que se pueden encontrar en las ciudades de todo el mundo como es el caso de México, New York, China, Londres, por mencionar algunas (Ver Fig. 3). Se ha visto que estas aves anidan principalmente en las partes más viejas de las comunidades como el centro y torres de iglesias pero también se han visto en museos, teatros, estaciones de ferrocarril y de autobuses, áticos, bajo techos de casas viejas, fábricas o puentes, en suma, prácticamente en todas partes (Čanádý & Mošanský, 2013). Están altamente adaptadas a las condiciones

que se encuentran en las zonas urbanas, debido a que el relieve que proporcionan los edificios es muy parecido a los cañones en donde habitaban naturalmente, las palomas en un principio se asentaron en las ciudades debido a que era un lugar ideal para el anidamiento de las nuevas crías, y al haber abundante comida de fácil acceso y la falta de depredadores naturales hicieron que las palomas se establecieran en estos lugares con gran facilidad (Rose, Nagel, & Haag-Wackernagel, 2006). Sin embargo, la reducción de estos factores naturales han hecho que la densidad poblacional de las palomas se incremente considerablemente llegando a las cifras de 300 o 400 aves por Km² provocando daños a las estructuras de los edificios, monumentos y principalmente problemas de salud (Amoruso, Fabbris, Mazza, & Caravello, 2013).



Fig. 3. Paloma doméstica, *Columba livia*.

Cuando las palomas están en cautiverio, es común encontrarlas en ambientes altamente sucios. Estas condiciones pueden depender de diferentes factores que se encuentran en el mantenimiento de los palomares facilitando que los productos derivados tanto de las palomas como de los corrales sean fuente de componentes orgánicos, con distintas capacidades antigénicas, así como contenido de una diversidad de agentes

infecciosos. El excremento de las aves conocido como guano, plumones (Bloom), y suciedad derivada de los granos de comida han sido mencionadas entre los compuestos aviarios mejor conocidas y estudiadas respecto a la presencia de antígenos o microorganismos relacionados con distintas enfermedades humanas (McSharry, Anderson, & Boyd, 2000).

1.5. Enfermedades asociadas a palomas

Como lo habíamos mencionado anteriormente, la crianza de palomas es una ocupación con una gran historia pero está íntimamente asociada al desarrollo de diversos procesos patológicos en la especie humana, como infecciones y enfermedades causadas por hipersensibilidad.

Hay una serie de enfermedades que han sido asociadas a la exposición de las palomas como son Neumonitis por Hipersensibilidad (NH), asma, ornitosis, inflamación de los pulmones por inhalación de irritantes derivados de las plumas. La primera descripción de NH secundaria a estas aves fue documentada en 1965, sin embargo Charles Reed y colegas dieron el primer reporte clínico y serológico probando la asociación de la enfermedad con las palomas por provocar síntomas en un sujeto después de tener contacto con ellas en un ambiente controlado (McSharry, Anderson, & Boyd, 2000). A partir de entonces, la NH está clasificada dentro de un grupo de alteraciones respiratorias que pueden tener diferentes causas, como el bagazo o pulmón del granjero, así como las neumonitis secundarias a partículas derivadas de hongos, bacterias y glicoproteínas de animales, entre otras (McSharry et al., 2000).

1.6. Neumonitis por Hipersensibilidad causada por aves

La NH es una enfermedad pulmonar mediada por el sistema inmune en la cual se ha propuesto que la inhalación repetida de uno o más antígenos, cuyas características no han sido identificadas del todo, provocan una reacción inflamatoria en ocasiones de tipo granulomatoso en los bronquios distales y alveolos (Bourke et al., 2001).

Este padecimiento, denominado también enfermedad del criador de palomas o alveolitis alérgica extrínseca es uno de los procesos patológicos más frecuentes dentro del grupo de afectación pulmonar debido a productos orgánicos. La sensibilización y contacto subsecuente con estas aves, son requisitos indispensables en la hipersensibilidad a productos de la paloma o derivados de los compuestos en contacto con dichos productos, como secreciones, plumaje, excretas, entre otros. Por ello, es interesante mencionar que se ha observado que hay un periodo estacional, de junio a septiembre, en donde el criador de palomas experimenta mayores niveles de exposición al Antígeno Aviario (AgAv), debido a que hay un incremento en la cantidad de Bloom en las palomas las cuales se preparan para las condiciones ambientales adversas después de este periodo (McSharry et al., 2000).

Tradicionalmente la NH se ha clasificado de tres formas, aguda, subaguda y crónica. En la forma aguda puede haber manifestación de episodios de falta de aliento o disnea, tos con fiebre, escalofrío y mareo (Bourke et al., 2001) además de dolor muscular, lo que se conoce como malestar general. En la forma crónica hay desarrollo de disnea o falta de aliento recurrente y con frecuencia fibrosis pulmonar y en muchas ocasiones los pacientes no presentan síntomas o estos no se detectan en la fase aguda. La forma subaguda, es

muy similar a la forma crónica en cuanto al desarrollo de disnea pero también tienen episodios discretos de síntomas agudos después de exposición al antígeno (Bourke et al., 2001).

La gran diversidad de antígenos que pueden provocar la enfermedad ha sugerido que los factores que inciden en su aparición son específicos y no específicos. Entre los factores no específicos podemos encontrar a las propiedades de las partículas que pueden ser transportadas por el aire y son inhaladas, ya que generalmente se encuentran en el orden de 1 a 3 micras de diámetro. En este rango se encuentra el Bloom de las palomas el cual está compuesto de gránulos de queratina de alrededor de una micra permitiendo ser un vehículo idóneo para el antígeno, además que por sus características, puede actuar como un adyuvante o irritante (McSharry et al., 2000). Otro factor, quizá uno de los más relevantes, es el tipo de ave involucrada en desarrollo de NH ya que es interesante observar que los casos de NH han sido descritos en personas que han tenido contacto con aves que como grupo son conocidas como “aves de fantasía” que incluye no solo a las palomas, sino a periquitos (*Melopsittac usundulatus*), y tortolitas entre otras, caracterizadas todas ellas por tener una alta producción de Bloom y pertenecer al mismo suborden.

Los factores específicos, que son los más importantes para este estudio incluyen principalmente los antígenos que pueden ocasionar la hipersensibilidad debido a que la inmunogenicidad que presentan estas moléculas puede estar relacionada directamente con la enfermedad. La naturaleza y características del antígeno potencialmente implicados en el desarrollo de la NH aún son motivo de amplios estudios, puede provenir de distintas

fuentes; en estudios experimentales se ha extraído del excremento de las palomas, plumas, suero, yema y clara del huevo así como de la pared intestinal. En todos estos productos se encuentra una rica mezcla de proteínas solubles, glicoproteínas, polisacáridos y fragmentos de proteínas, e incluso algunos componentes mejor caracterizados como la mucina e IgA (McSharry et al., 2000), algunos de los cuales han sido propuesto como los principales antígenos causales de la enfermedad.

1.7. IgY de paloma

La producción de inmunoglobulinas en las aves tiene un origen diferente al de los mamíferos, las células B que son las productoras de dichas inmunoglobulinas se generan en la Bolsa de Fabricio (Ver Fig. 4). Este órgano único en las aves, es un diverticulum dorsal derivado del proctodeo de la cloaca que aparece a los 3 o 5 días del desarrollo embrionario, tiene un ciclo funcional parecido al timo en mamíferos que puede ser dividido en tres fases: 1) presenta un rápido crecimiento en el lapso de 3 a 4 semanas, 2) un periodo de “meseta” entre la semana 5 y 6; y 3) una regresión funcional antes de llegar a la madurez sexual (*Sturkie, 1999*).

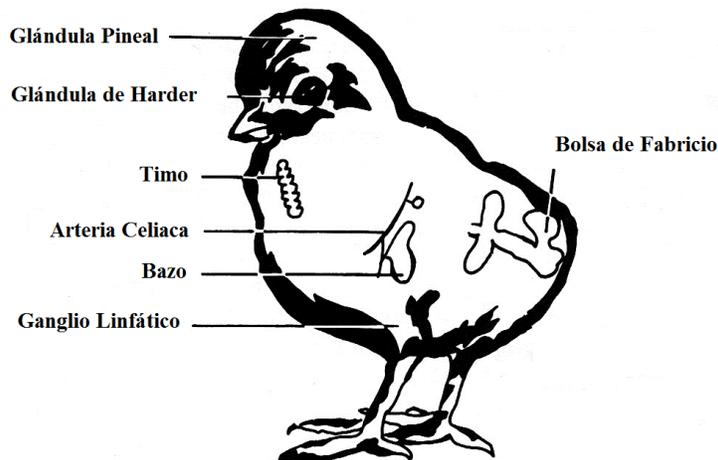


Fig. 4. Posición gráfica de la zona en donde se encuentra la bolsa de Fabricio (Tomada de Sturkie,1999).

En aves existen tres tipos de isotipos de inmunoglobulinas: IgA, IgM e IgY, siendo la IgY la forma predominante en el suero de paloma, no obstante también se puede encontrar en yema de huevo, excreciones y secreciones de la paloma (Suzuki, Khoo, Chen, Chen, & Lee, 2003). Al igual que en mamíferos, las aves producen anticuerpos contra diferentes antígenos los cuales son transferidos a su descendencia; como no se ha encontrado evidencia de la presencia de IgM e IgA en la yema, la IgY es el anticuerpo con mayor presencia en el huevo la cuál es depositada a través del epitelio folicular del ovario durante la oogénesis (Gutierrez, 2009).

El peso molecular de la IgY completa es 180 KiloDaltones (KDa) (Tizard, 2002), mientras que las cadenas pesadas tienen un peso molecular de 67 KDa y las cadenas ligeras de 27 KDa (Suzuki et al., 2003). Esta inmunoglobulina de aves tiene cadenas pesadas extensas, alto contenido de carbohidratos (2.2% con respecto al 1.1% en IgG) y un punto isoeléctrico más bajo (6.7 ± 0.9) que el reportado en IgG de mamíferos (7.3 ± 1.2) (Para ver más diferencias vaya a la tabla 1); estas diferencias fueron reportadas por Leslie

y Clem en 1969 y sugirieron que este tipo de IgG, denominación aplicada al mamífero, era lo suficientemente diferente para tener su propia nomenclatura y propusieron llamarla IgY (Leslie, Ph, & Clem, 1969), pero no fue hasta que se analizaron las secuencias de aminoácidos y su filogenia que se observó que la inmunoglobulina aviaria tuvo una evolución diferente a la IgG por lo que el término de IgY fue aceptado (Tizard, 2002).

Al igual que en las inmunoglobulinas de mamíferos, cuyo estudio ha aportado el mayor conocimiento sobre las características inmunoquímicas (IQ) de la IgG, la IgY consta de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las cadenas pesadas, que son llamadas cadenas upsilon (υ), usualmente contienen un dominio variable (V) y cuatro dominios constantes (C1 a C4) a diferencia de la IgG de mamífero la cual está constituida solo por un dominio variable y 3 dominios constantes (C1 a C3), esta diferencia se debe a que la IgG de mamífero tiene una región bisagra entre el dominio C1 y C2, mientras que en la IgY no está presente (Ver Fig. 5) (Tizard, 2002) (Kindt, Goldsby, Osborne, & Kuby, 2007). Hay estudios comparativos entre la IgY y la IgG de mamífero en donde han encontrado que los dominios C2 y C3 de la IgG se encuentran cercanamente relacionados con los dominios C3 y C4 de la IgY, mientras que el equivalente de C2 ésta ausente, lo que ha hecho pensar que probablemente se convirtió en lo que ahora conocemos como la región bisagra en la IgG de mamífero (Katharine, 1994).

Características de comparación	IgG	IgY
Animal	Mamífero	Aves, reptiles, anfibios
Obtención	Plasma de sangre	Yema de huevo
Peso molecular	Completa: 150 kDa Cadenas Ligeras: 22 kDa x2 Cadenas pesadas: 50 kDa x2	Completa: 180 kDa Cadenas ligeras: 27 kDa x2 Cadenas pesadas: 67 kDa x2
Diferencia básica estructural	Región bisagra flexible y región Fc corto	Sin bisagra y región Fc extenso
Respuesta inmune a antígenos de mamíferos	Efecto negativo por homología filogenética	Realzado por diferencias filogenéticas
Estabilidad	Buena, estable en pH 3-10	Buena, estable en pH 4-9
Hidrofobicidad	Menos hidrofóbico que la IgY	Región Fc es hidrofóbica
Productividad	Limitada en cantidad si son ocupados ratones y conejos como reservorios	Alta con grandes cantidades y duración prolongada

Tabla 1. Diferencias entre IgY e IgG de mamífero (Zhang, 2003).

Debido a que la región bisagra confiere flexibilidad a las inmunoglobulinas, en la IgY, al no poseerla, disminuye notablemente. Entre los dominios C1-C2 y C3-C4 residuos de prolina y glicina tienen la capacidad de conferir flexibilidad aunque muy limitada, lo cual trae implicaciones importantes en sus propiedades funcionales (Gutierrez, 2009).

La IgM se encuentra distribuida universalmente en todos los vertebrados y por lo tanto es fácil pensar que es el ancestro de todas las inmunoglobulinas pero hay evidencia de que las moléculas de IgY es el ancestro común de la IgG e IgE en base a su estructura y función (Ver Fig. 5) (Warr, Magor, & Higgins, 1995).

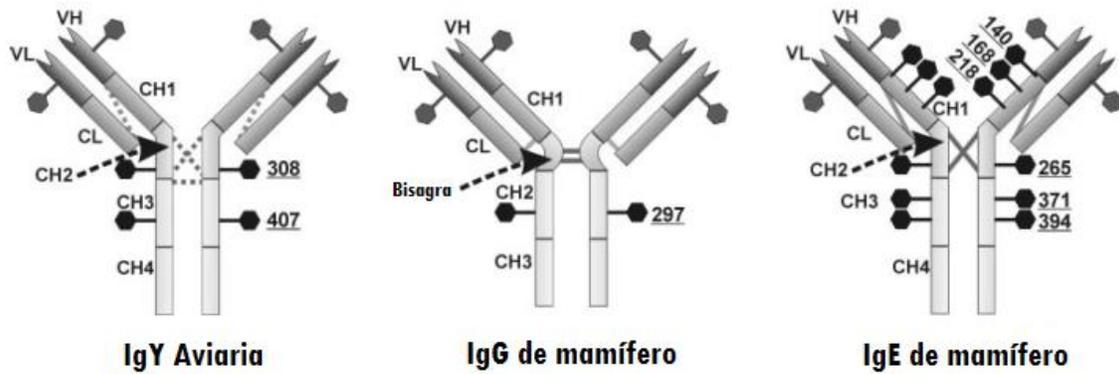


Fig. 5. Modelo comparativo de la estructura de una inmunoglobulina Y aviar, IgG e IgE de mamífero (Suzuki & Lee, 2004).

Con respecto a la actividad como anticuerpo, la IgY cuenta con las dos funciones que típicamente se encuentran por separado en la IgG y en la IgE. Similar a la IgG, la IgY, como lo habíamos mencionado anteriormente, es el principal anticuerpo presente en el suero y por lo tanto el principal mecanismo de defensa contra infecciones sistémicas, sin embargo, similar a la IgE, la IgY posee la habilidad para mediar reacciones anafilácticas (Warr et al., 1995).

1.7.1. IgY una proteína altamente glicosilada

Los glicanos son moléculas de oligo o polisacáridos que por lo general se encuentran ligadas a proteínas o lípidos formando los llamados glicoconjuntos, ya sea glicoproteínas o glicolípidos (Springer & Gagneux, 2013). La diversidad de glicanos es a menudo encontrado de manera especie específica y muchas de las cadenas de carbohidratos pueden llegar a ser fuertes antígenos en animales que no expresan la misma estructura, lo que sugiere que pueden ser una forma de reconocimiento de lo extraño, como por ejemplo, en infecciones de virus, bacterias y parásitos. Esto es sugerido debido a que

muchas de las primeras etapas de invasión de patógenos se dan por el reconocimiento de los glicanos específicos en alguna de su estructura a través de receptores que expresan de manera diferencial los hospederos. En otros casos, en muchos patógenos la evolución ha provocado cambios estructurales en sus glicanos lo cual les ha permitido evadir la respuesta inmune de sus hospederos (Suzuki, Laskowski, & Lee, 2004).

Una de las características de la IgY de paloma es el tipo de glicosilación Gal α 1-4Gal (Galactosa Alfa 1-4 Galactosa), al referirnos a este tipo de glicosilación en proteínas se ha considerado un patrón muy inusual en la naturaleza. En mamíferos por lo general este tipo de glicosilación se encuentra principalmente en glicolípidos presentes en la membrana de células sanguíneas como el antígeno P1, así como en células endoteliales y epiteliales pero raramente en glicoproteínas (Suzuki et al., 2003). El significado biológico del tipo de glicosilación en las palomas y en general en todas las aves es aún desconocida y no solamente es exclusivo de las aves, en la naturaleza se encuentran una infinidad de glicanos cuyas funciones biológicas todavía se desconocen, aunque se piensa que por su gran diversidad y diferencias entre especies pueden ser utilizados como elementos de defensa biológica reconociendo en particular componentes no propios del organismo. Además, esto parece ser el resultado acumulativo durante el curso de la evolución de los animales por medio de las interacciones que se han presentado entre el huésped y el hospedero (Suzuki et al., 2003); resulta interesante que la investigación de oligosacáridos especie-específicos es importante para entender como los glicanos se han diversificado durante el curso de la evolución y la propia diversificación de los animales (Suzuki et al., 2004).

La presencia de Gal α 1-4Gal puede cambiar entre unas y otras aves. Recientemente, algunos estudios han demostrado que las palomas presentan una glicosilación Gal α 1-4Gal expresada en glicoproteínas de huevo y suero, sin embargo esta glicosilación ha sido raramente encontrada entre los vertebrados, inclusive entre las mismas aves, pero esto no es un caso aislado, también ha sucedido en mamíferos, los residuos Gal α 1-3Gal (Galactosa alfa 1-3 Galactosa), característico en proteínas de la mayoría de mamíferos, no está presente en humanos, simios y monos del viejo mundo (Catarrinidos) (Suzuki et al., 2004).

Se ha demostrado que la expresión de Gal α 1-4Gal solo está presente en el superorden *Neornithes*, pero no es una generalidad, en el orden Galliforme (pollos, pavos, codorniz y faisanes) y en Anseriforme (patos y gansos) no se encuentra expresada esta glicosilación mientras que en el orden Columbiforme (palomas y tórtolas), Psittaciforme (periquitos y cacatúas) y Apodiforme (vencejos) son los únicos órdenes donde podemos encontrar ampliamente distribuida la glicosilación Gal α 1-4Gal (Suzuki et al., 2004).

Para tratar de explicar esta diferencia en la expresión de Gal α 1-4Gal entre las aves se han propuesto dos modelos hipotéticos que aún están pendientes de estudiar. El primero de ellos menciona que el ancestro común de todo el linaje de las aves modernas podía expresar Gal α 1-4Gal, pero esta característica se perdió en los grupos *Ratitae/Galloanserae* para después diversificarse. En el segundo modelo, se considera que el ancestro común de las aves modernas no tenía la habilidad de expresar Gal α 1-4Gal, pero esto fue adquirido de alguna manera solo en las Neoaves (Suzuki et al., 2004).

2. JUSTIFICACIÓN

Las inmunoglobulinas de paloma, entre ellas la IgY, han sido estudiadas como uno de los posibles inmunógenos asociados con una respuesta inmune contra antígenos especie-específicos en la NH secundaria a la exposición de este tipo de aves. Algunos investigadores han reportado la presencia de anticuerpos contra la fracción gamma-globulina obtenida del suero de paloma, y la presencia de respuesta celular usando IgY. Esto indica que uno de los AgAv, que incluye a esta inmunoglobulina en forma aislada o en conjunto con otros inmunógenos, puede constituir un factor importante asociado al desarrollo de la enfermedad (McSharry et al., 2000). Por ello, este trabajo en el que se estudian algunas características Inmunoquímicas e inmunogénicas de la IgY permitirá tener una mejor noción acerca de su participación como AgAv en NH.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

- Evaluar las características inmunoquímicas e inmunogénicas de IgY de paloma y su posible participación como antígeno en Neumonitis por Hipersensibilidad.

3.2. Objetivos particulares

- Purificar IgY de paloma y evaluar sus principales características inmunoquímicas.
- Estudiar si diferentes fuentes de IgY de paloma son reconocidas por anticuerpos especie-específicos.
- Identificar la producción de anticuerpos anti-IgY de paloma en sueros de pacientes con Neumonitis por Hipersensibilidad.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. IgY e inmunoglobulinas tipo G

En este estudio se utilizaron IgY e IgGs, la primera proveniente de muestras biológicas de paloma y las segundas de diferentes mamíferos, en especial las inmunoglobulinas disponibles en un laboratorio dedicado a la inmunología general. Esto tuvo la intención de implementar, optimizar, o adecuar la metodología que permitiera evaluar las características IQ de la IgY de paloma.

4.2. Muestras biológicas y fuentes de obtención de IgY's e IgG's

Todas las muestras incluidas en el trabajo provinieron de fuentes comerciales accesibles, o del banco de muestras con el que cuenta el Laboratorio de Autoinmunidad y cuyo estudio ha sido reportado o publicado previamente. Las muestras que se utilizaron fueron las siguientes: diferentes componentes provenientes de la paloma como es

Antígeno Aviario Total (AgAVT), que en este caso fue plasma total de estas aves, gamma-globulinas (γ) totales de paloma recuperada de plasma de paloma e IgY purificada a partir de yema de huevo de esta ave. En el caso de los mamíferos, se incluyeron IgG purificadas de: humano, cobayo, ratón, conejo, borrego y cerdo. Además se tuvo acceso a IgY de avestruz, que preferimos sobre la IgY de pollo debido a que sus características IQ han sido comparadas por otros autores con IgY de paloma.

El anticuerpo anti-IgY de paloma fue obtenido de una fuente comercial (Rabbit anti-Pigeon IgG (H & L) antibody (Biotin), antibody-online INC.) y está dirigido contra cadenas pesadas y cadenas ligeras de esta inmunoglobulina.

4.3. Purificación de IgY de paloma

La purificación de IgY de paloma se realizó usando huevos de paloma (donados generosamente por la Dra. Lucía Rangel Porta, Jefe del Departamento de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM) los cuales fueron trasladados a temperatura ambiente hasta nuestro laboratorio, y se conservaron a una temperatura de 4°C por no más de 15 días en caso de no utilizarlos inmediatamente.

La recuperación de IgY de paloma se obtuvo por medio de un Kit comercial para purificación de IgY diseñado originalmente para trabajar con muestras de gallina (Pierce Chicken IgY Purification Kit, Thermo Scientific). Para ello, se realizaron experimentos previos que permitieron observar la factibilidad de usar el procedimiento de obtención en huevos de paloma.

El procedimiento se realizó bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar clase II. Se limpiaron los huevos con agua y etanol al 70%, se retiró la mayor

cantidad de clara de la yema de huevo y se lavó con agua estéril para evitar contaminación con albúmina. Posteriormente se rompió el saco vitelino y se recuperó la yema evitando que el saco se cayera y quedará incluido en la preparación de la yema. Se midió el volumen obtenido y se adicionó 5 veces el volumen que se obtuvo de solución de deslipidación de yema y se agitó toda la noche a 4 °C. Luego, se centrifugó a 13,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 min. y se recuperó el sobrenadante; nuevamente se midió el volumen obtenido y se le colocó un volumen igual de solución de precipitación de IgY, y posteriormente se agitó toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se centrifugó a 10,000 rpm. por 20 min., se desechó el sobrenadante y el paquete obtenido fue nuestra fuente de partida de la IgY purificada. El paquete (IgY purificada) se resuspendió en amortiguador de fosfatos salino 0.1 M pH 7.2 (PBS 1x) que fue preparado y almacenado en condiciones que permitieran tenerlo libre de pirógenos, en un volumen igual al volumen inicial de yema finalmente se conservó a 4 °C hasta su uso en los experimentos posteriores.

4.4. Cuantificación de proteínas

La concentración total de proteínas de todas las muestras fue determinada mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), para lo cual se preparó una curva cuantitativa conocida con Albúmina Sérica Bovina (BSA) fracción V (Sigma Co, USA), teniendo la concentración inicial de 0 hasta llegar a 10 µg/µl. Esto se realizó en un formato de microensayo, usando una caja de poliestireno de 96 pozos. Se colocó 1 µl de cada concentración de la curva patrón así como 1 µl de las muestras estudiadas. Posteriormente a cada pozo se le agregó 180 µl de reactivo de Bradford (1:5) y se incubo

durante 5 min. Los resultados se registraron en unidades de densidad óptica (UDO) a 592 nm usando un lector de micro-ELISA (Labsystem, Finland).

4.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

Para evaluar las características IQ de las muestras estudiadas se utilizó el método de electroforesis en geles de poliacrilamida con una concentración del 10% en el gel separador y del 5% en el gel concentrador. Para la corrida se utilizó el amortiguador desnaturizante Tris-glicina (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS) pH 8.3. Las muestras se diluyeron en PBS 1x con buffer de carga 2x (25% Tris 0.5 M pH 6.8, 20% Glicerol, 40% SDS-10%, 5% Azul de Bromofenol, 10% β -met) ajustando la concentración de cada inmunoglobulina a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, se hirvieron por 5 min. y se cargó una cantidad de 10 a 15 μl por pozo. En cada electroforesis se utilizó un marcador de peso molecular comercial (Precision Plus Protein Unstained Standards BioRad, USA). La corrida se llevó a cabo en una cámara electroforética (Mini Protean System, BioRad, USA) durante 2 hr. 30 min. con un voltaje constante de 100 Volts (V) en baño de hielo. Para detectar la presencia de proteínas se utilizó una tinción de Azul Coomassie al 5% diluido en alcohol/ácido acético.

4.6. Electrotransferencia (blotting).

Una vez que las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10% por SDS-PAGE, se continuó con la transferencia de sus componentes usando una membrana de nitrocelulosa (Mini Protean System, BioRad, USA).

Previo a la electrotransferencia se hidrataron con amortiguador de transferencia los componentes para un sándwich (1 membrana de nitrocelulosa, 6 hojas de papel filtro, 2

piezas de papel filtro para transferencia y 2 esponjas). Al término de la corrida se realizó la tinción de la membrana de nitrocelulosa con rojo de Ponceau 0.2 % por 10 minutos, se retiró el exceso con agua y posteriormente se secó con papel filtro.

4.7. Western blot

Posterior a la transferencia se destiño la membrana previamente incubada con rojo de Ponceau, para ello se sumergió en NaOH 0.1M durante 2 min. y se realizó un lavado con PBS Tween 0.1%, después se incubó con Tritón 1% durante 15 min. y finalmente se hizo otro lavado con PBS Tween 0.1%.

Para iniciar el procedimiento de Western Blot, se bloqueó la membrana de nitrocelulosa conteniendo las proteínas electrotransferidas con leche descremada al 3% diluida en PBS 1x durante toda la noche. Se incubó con una dilución óptima del anticuerpo comercial anti-IgY de paloma por 1 hr. a 37 °C protegido de la luz (En el caso de la IgY purificada de paloma, se incubó con el anticuerpo en 1:15,000 en leche descremada 3% PBS 1x, mientras que para el AgAvT y las demás proteínas fueron incubadas en 1:5000, siguiendo las condiciones de optimización establecidas en experimentos previos al experimento definitivo). La membrana se lavó 5 veces con PBS Tween 0.1% durante 5 min. Posteriormente se incubó en Streptactin (Precision Protein Streptactin-HPR conjugate, BioRad) en una dilución 1:20,000 1 hr. a 37°C cubierto de la luz y se realizaron 5 lavados en PBS 1x. Al terminar se realizó el revelado de la membrana por quimioluminiscencia, se incubó en solución de revelado (LumiGlo, Cell Signaling Technology, USA) durante 1 min. , se quitó el exceso y se preparó la membrana en un protector de acetato para su exposición que se realizó durante 2 min. en oscuridad y finalmente se reveló.

Para finalizar se volvió a lavar en agua, todo este proceso tuvo una duración de 2 min. en cada paso, además, desde la exposición de la placa hasta el final todos los pasos se realizaron en cuarto oscuro, las incubaciones y los lavados se hicieron cubriendo la membrana de la luz ya que los anticuerpos son fotosensibles.

4.8. Anticuerpo anti-IgY en NH

En la fase de aplicación práctica del estudio se decidió identificar la presencia de Ac anti-IgY de paloma. Se obtuvieron muestras de 16 pacientes con NH secundaria al contacto con palomas, y 16 sujetos sanos expuestos a estas aves sin la enfermedad. Una vez obtenidos los plasmas seleccionados para el estudio se realizaron las determinaciones de anticuerpo mediante el Ensayo por Inmunoabsorbancia ligado a Enzima (ELISA) para comparar cuantitativamente la Respuesta Inmune (RI) humoral. Cada suero se estudió por duplicado y se incluyeron controles positivos y negativos. Los resultados fueron confirmados por Western Blot o inmunotransferencia. Para realizar el ELISA, se usaron los Antígenos (Ag) purificados (20 $\mu\text{g/ml}$) y fueron inmovilizados en placas de poliestireno (Costar, USA) con amortiguador de carbonatos por 3 horas. Después de adicionar BSA fracción V al 1% (Sigma Co., USA) se incubaron por 2 horas. Se realizaron 5 lavados y los sueros fueron diluidos en ASF-T al 0.05% e incubados por 1 hora a 37 °C. La unión específica de las diferentes clases de inmunoglobulinas fue detectada agregando una dilución óptima de anticuerpo secundarios conjugados con peroxidasa (Sigma Co., USA) (fragmentos F(ab')_2) contra las inmunoglobulinas estudiadas. La Orto-fenilendiamina (OFD) fue preparada en amortiguador de citratos (0.1 M pH 5) y peróxido de hidrógeno para usarla como sustrato. Al final se detuvo la reacción con 50 μl de H_2SO_4 (2.5 N). Los

resultados se registraron en unidades de densidad óptica (UDO) a 492 nm usando un lector de micro-ELISA (Labsystem, Finland). Los valores de referencia fueron obtenidos a partir de muestras provenientes de un grupo de controles sanos. La especificidad de las pruebas de ELISA para la detección fue confirmada mediante procedimientos de competencia.

4.9. Estadística

El análisis estadístico para comparar la presencia de Ac anti-IgY de paloma, sus niveles y la reactividad contra las diferentes antígenos purificados, así como los resultados de los distintos grupos de muestras biológicas incluyen la prueba no paramétrica U de Mann Whithney para variables continuas (SPSS Statistic 17.0).

5. RESULTADOS

5.1. Purificación de IgY de huevo de paloma a través de Kit comercial

La IgY se purificó a partir de huevo de paloma. Después del proceso de purificación, se lograron recuperar cantidades razonables en diferentes lotes (3.2 mg/ml a 5.4 mg/ml de yema de huevo de paloma), además fue posible obtener un grado de pureza adecuado para nuestros experimentos posteriores. Esto mediante la determinación de la concentración proteica y por medio de la electroforesis correspondiente, la cual permitió verificar la presencia y grado de pureza de nuestra proteína en diferentes lotes representativos de IgY.

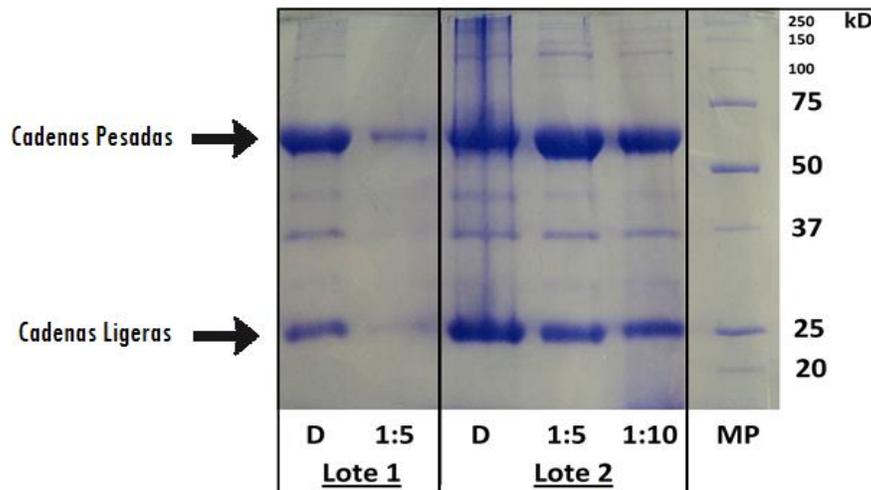


Fig. 6. SDS-PAGE teñido con Azul Coomassie usando IgY purificada con Kit comercial en la cual fueron empleadas diferentes diluciones.

Al observar cada uno de los lotes (Ver Fig.6) es notoria la diferencia de patrones de tinción, unos más intensos que otros pero con una homogeneidad en la presencia de bandas. En cada uno de ellos se destacan dos bandas, la banda superior con mayor tinción asumimos que corresponden a las cadenas pesadas de la IgY, ya que con referencia del marcador de peso molecular, se encuentran ubicadas en un peso cercano a los 67 kDa mientras que las bandas con mayor tinción en la parte inferior corresponden a las cadenas ligeras que presentan un peso cercano a los 25 kDa.

Es evidente la diferencia de concentración entre lotes, es notorio que en los lotes 1 hay una menor tinción de Azul Coomassie indicándonos una menor presencia de IgY que en el lote 2, en donde hay una mayor tinción, tanto en la muestra directa como en la dilución.

Con respecto a la pureza obtenida se observa que en cada uno de los lotes están presentes los componentes que conforman a la IgY pero se observan dos bandas adicionales entre los pesos moleculares de 37 a 50 kDa, no obstante el grado de enriquecimiento de IgY fue adecuado para nuestros experimentos posteriores, considerando que los principales componentes, las cadenas pesadas y las cadenas ligeras, son claramente discernibles. Con base en observaciones de enriquecimiento de estas bandas se decidió que lote 2 se utilizaría en la realización del Western Blot debido a la cantidad de proteína obtenida.

5.2. Cuantificación de proteínas

Para continuar con el estudio se realizó una nueva determinación de la concentración de proteínas totales en nuestra IgY purificada y en las muestras biológicas las cuáles se mantenían almacenadas en el banco de muestras del laboratorio que fueron motivo de evaluación en el trabajo. El método de Bradford utilizado en el grupo de muestras estudiadas reveló los siguientes resultados:

Muestra	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
AgAvT	44.00
γ paloma	6.00
IgY Paloma	1.58
IgG Avestruz	5.00
IgG Cobayo	10.70
IgG Humana	5.00
IgG Ratón	2.50
IgG Rata	2.00
IgG Conejo	5.00
IgG Borrego	39.11
IgG Cerdo	3.86

Tabla 2. Concentraciones de las muestras de IgY e IgG obtenidas por método de Bradford.

El AgAv total presentó la mayor concentración (44 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) con respecto a las otras muestras, esto fue debido a que el suero de paloma, fuente de este antígeno, está conformado por una gran diversidad de moléculas; las otras muestras se encuentran purificadas, esto es que están conformadas por un solo tipo de molécula.

Con respecto a la IgY, ésta presentó la concentración más baja (1.58 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y aunque la diferencia sea muy marcada respecto a otras IgG's la concentración obtenida fue aceptable y útil para realizar los ensayos contemplados en este trabajo.

5.3 Electroforesis y transferencia de los diferentes tipos de IgG's

La tinción de Coomassie realizada al gel de poliacrilamida con las 12 muestras (Fig. 7) confirma la presencia de cada una de ellas y sus componentes, particularmente las cadenas pesadas y cadenas ligeras de las inmunoglobulinas.

Podemos observar que en cada IgG se presentan principalmente dos bandas muy bien definidas, las primeras ubicadas en la región superior entre el rango de 40 a 70 kDa, y otras localizadas en la parte inferior en un rango de 15 a 25 kDa. Es de importancia mencionar que la IgG humana y la de ratón presentaron una menor tinción que las demás inmunoglobulinas a pesar de tener la misma concentración que las demás. Con respecto al grado de pureza de cada una de las muestras, se encontró que fue satisfactorio ya que no presentaron un intenso bandeó adicional, aunque en algunas se llega a presentar cierto bandeó por contaminantes comunes como la albúmina.

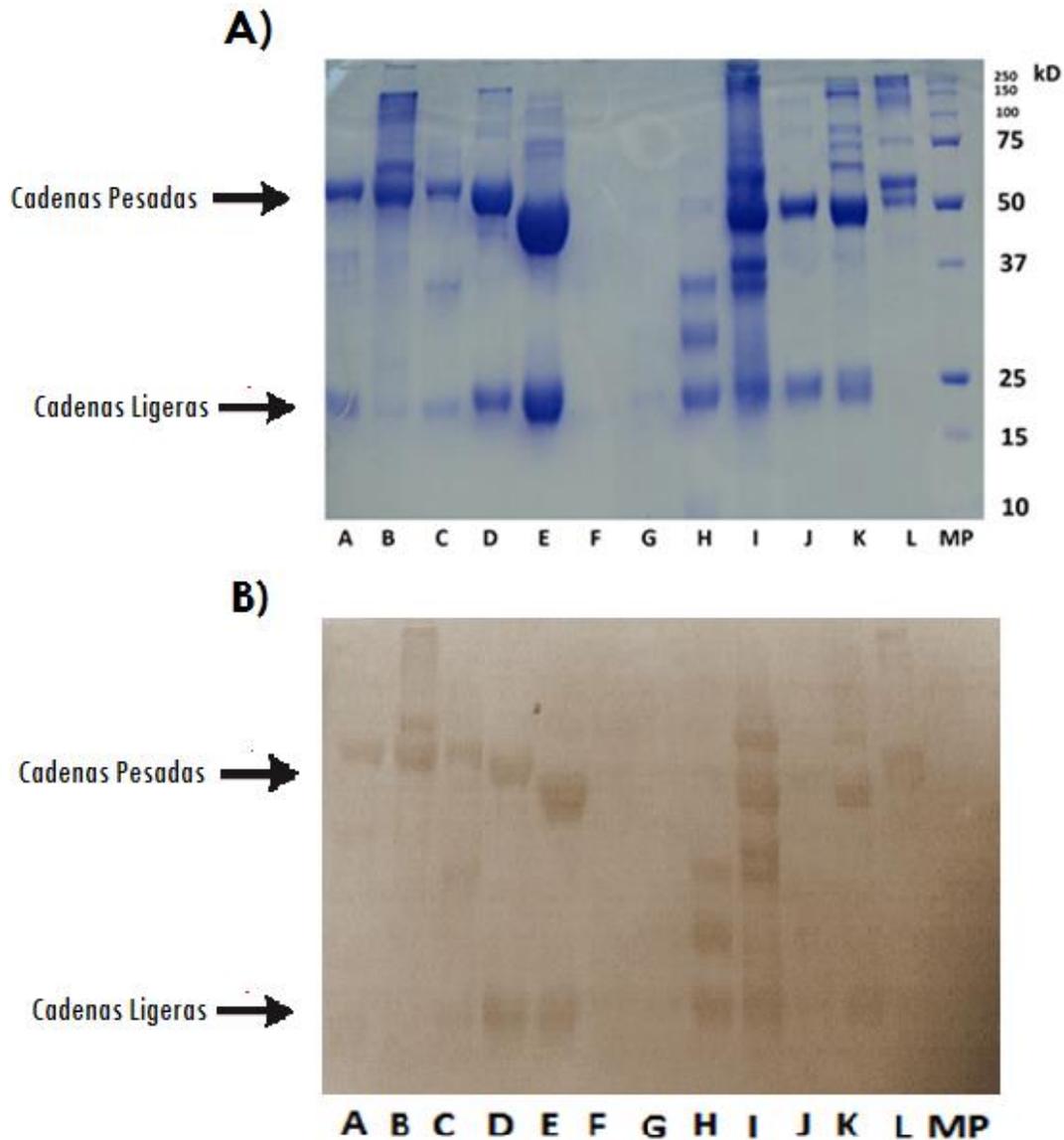


Fig. 7. **A)** SDS-PAGE teñido con Azul Coomassie. **B)** Membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau correspondiente a la electrotransferencias.

Carriles: A) IgY paloma, B) AgAv, C) γ paloma, D) IgY avestruz, E) IgG Cobayo, F) IgG Humana, G) IgG Ratón, H) IgG Rata, I) IgG Conejo, J) IgG Borrego, K) IgG Cerdo, L) Ovoalbúmina, y MP) Marcador de peso Molecular.

Es interesante ver que los componentes de la paloma (IgY, AgAv, y γ paloma) así como la IgY de avestruz, sin importar la diferencia de especies con respecto a estas últimas y diferentes fuentes de donde fueron obtenidas, presentan un peso molecular muy similar en sus bandas correspondientes a las cadenas pesadas y cadenas ligeras.

También se aprecia, que con las IgG's de mamíferos así como la ovoalbúmina, el peso de las cadenas pesadas cambia entre especies más que en las cadenas ligeras.

Al tener la certeza de la presencia de 9 de las 11 IgG's y de las IgY's mediante la SDS-PAGE, se realizó la electrotransferencia la cual reveló la presencia de las proteínas en la membrana de nitrocelulosa usando la tinción con rojo de Ponceau. En ella se pueden observar con claridad las cadenas pesadas y cadenas ligeras de cada una de las IgG's e IgY's. Además, debemos señalar que al realizar la transferencia y tinción correspondiente no se logra observar el marcador de peso molecular como es esperado, debido a que por la forma en que es conjugado directamente a biotina, este solo es identificado hasta el momento del revelado.

5.4 Inmunoblot

El reconocimiento del anticuerpo anti-IgY adquirido de una fuente comercial y cuya especificidad se limita a la IgY de paloma fue positivo sólo y exclusivamente para 3 de las 12 muestras presentes en el inmunoblot. Las muestras detectadas corresponden a la IgY de paloma, AgAv y γ de paloma (Ver Fig. 8). Para el resto de las IgG's los resultados de la reacción antígeno-anticuerpo fueron totalmente negativos, en términos del reconocimiento especie específico.

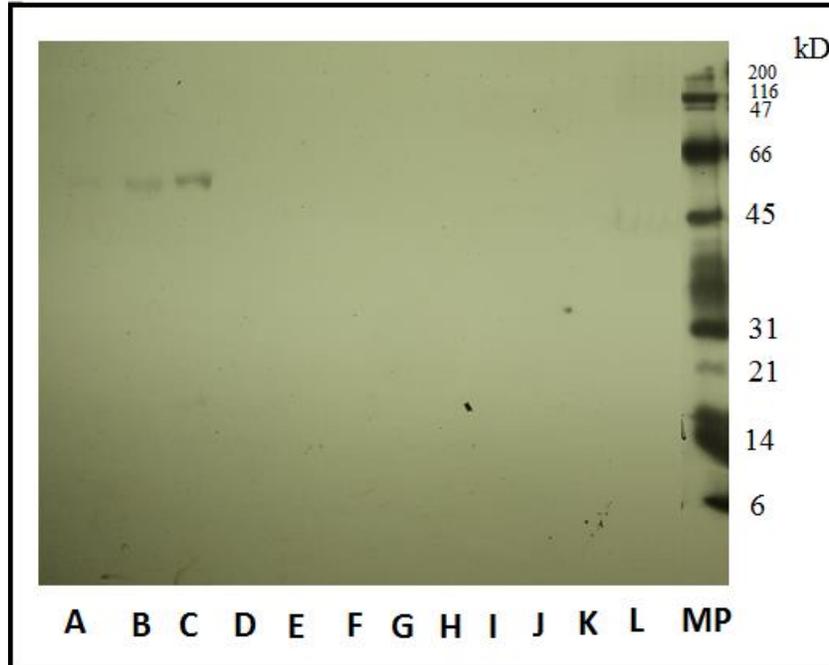


Fig. 8. A) IgY paloma, B) AgAv, C) γ paloma, D) IgG avestruz, E) IgG Cobayo, F) IgG Humana, G) IgG Ratón, H) IgG Rata, I) IgG Conejo, J) IgG Borrego, K) IgG Cerdo, L) Ovoalbúmina, MP) Marcador de peso Molecular.

Las bandas reconocidas se encuentran en un peso molecular aproximado de 60 a 65 kDa con respecto al marcador de peso molecular. Al observar la figura 8 se nota que de izquierda a derecha la intensidad de reconocimiento va siendo mayor, empezando por la menor que es IgY y terminando con la mayor que son las γ de paloma. Es de importancia mencionar que a pesar de que entre los antígenos se incluyó ovoalbúmina de pollo no fue reconocida en ninguna de sus fracciones estructurales por el anticuerpo comercial anti-IgY de paloma. Es conveniente señalar que en el trabajo no se utilizaron anticuerpos contra las diferentes IgG's de mamíferos, en el entendido de que este no era uno de nuestros objetivos, y además la posibilidad de encontrar reacción cruzada entre inmunoglobulinas pertenecientes a este grupo es alta (Paul, 2012). Además, los resultados dependen del

tipo de anticuerpo, su preparación y otros factores que quedan fuera de los límites de este estudio.

5.5 Producción de Ac anti-IgY

El análisis de los sueros de los pacientes con NH por medio de ELISA (Fig. 9) demostró que los anticuerpos anti-IgY de paloma, usando como fuente de antígeno gamma-globulinas de esta ave, tuvo valores elevados respecto a los contactos sanos (10/16 vs 2/16, $p < 0.03$). Al realizar el análisis estadístico de los datos, son significativamente diferentes.

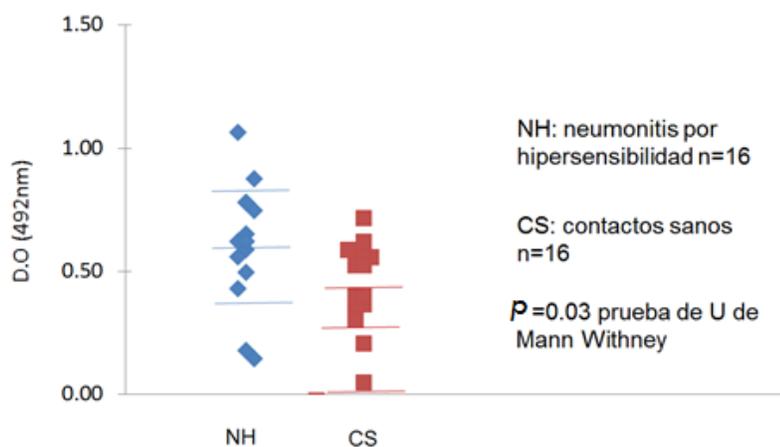


Figura 9. Niveles de producción de Ac de tipo IgG en pacientes con NH y contactos sanos (Expuestos a palomas pero sin presentar síntomas). Cada punto de la gráfica representa a cada sujeto estudiado. Las líneas horizontales indican: media +/- DE.

6. DISCUSIÓN

El estudio de la IgY, en particular la de paloma, ha sido abordado a través de diversas vertientes. En este trabajo se evaluaron algunas características IQ y parte de su comportamiento como antígeno e inmunógeno en NH, en el contexto de una línea de investigación que se ha desarrollado por varios años en el Laboratorio sede de este trabajo. Entre los posibles factores de inducción de una RI al contacto con palomas se detectó a las gammaglobulinas de paloma entre los componentes que podrían explicar la presencia de anticuerpo contra AgAv en NH, y por ello el interés en abundar en su estudio.

La IgY pudo ser obtenida mediante un procedimiento de purificación diseñado originalmente para IgY de gallina, y esto fue posible después de haber evaluado y seleccionado este método dentro de distintas alternativas experimentales. De hecho en un primer trabajo también se lograron separar gamma-globulinas de paloma a partir de plasma de esta ave mediante una técnica de cromatografía de afinidad con proteína G; el objetivo en este estudio fue contar con IgY purificada, lo que se logró usando yema de huevos de paloma apegándose a lo recomendado en el procedimiento de obtención de IgY.

Al contar con una fuente idónea, apropiada y prácticamente indefinida de IgY de paloma, como lo es la yema de huevo, se logró avanzar en este estudio y se podrá ampliar la línea de trabajo de la que deriva esta tesis. Evaluamos algunas de sus propiedades IQ y

fue posible utilizarla como blanco de anticuerpos específicos contra este tipo de glicoproteína.

Además con lo demostrado en el ensayo de Western Blot nos facilitó el uso de gamma-globulinas de paloma como Ag debido al reconocimiento similar del anticuerpo anti-IgY de paloma a los diferentes componentes de esta ave permitiéndonos evaluar la RI en muestras con anticuerpo contra AgAvT provenientes de pacientes con NH.

La información de la preparación de IgY es escasa y por tanto se procedió a uniformar la edad de los huevos y tener cuidado en los pasos de obtención de la muestra biológica, su almacenamiento, manejo y seguimiento estricto de los pasos de purificación; aun teniendo en cuenta estos criterios, se observaron diferencias en la eficiencia de purificación y rendimiento en diferentes lotes de IgY.

Debido a que no contamos con una IgY de referencia o estándar para demostrar la presencia y pureza de nuestra inmunoglobulina se consideró suficientemente confiable el análisis de dos grupos de bandas bien definidas, las bandas superiores con un peso de 67 kDa correspondientes a las cadenas pesadas y las bandas inferiores con un peso de 27 kDa consistentes con las características de las cadenas ligeras de IgY de paloma de acuerdo a trabajos previos (Suzuki et al., 2003). La presencia de una serie de bandas de menor intensidad ubicadas entre las cadenas pesadas y ligeras fueron interpretadas como impurezas, lo que es esperado en cualquier método de aislamiento de proteínas. Si bien no se conoce con certeza de que clase de impurezas se trate, un estudio anterior sugiere que estos contaminante son fragmentos C-terminales de la proteína vitellogenina II que

cuenta con un peso molecular de 35 kDa y que se encuentra solamente en yema de huevo (Klimentzou et al., 2006).

Las inmunoglobulinas presentan dos componentes principales que las conforman, cadenas pesadas y cadenas ligeras, cuyas diferencias en términos estructurales, cambios postraduccionales, peso molecular, entre otras, se deben a la divergencia que ha ocurrido entre cada una de las especies a la que pertenecen. Por ejemplo, se sabe que la rama evolutiva del avestruz (Ratnines) surgió hace 90 millones de años, mucho tiempo antes de que apareciera el orden de las palomas, lo que provocó que la IgY evolucionará de un modo diferente a como lo hizo la IgY de avestruz, pero al pertenecer a la misma clase, y por lo tanto comparten un ancestro en común, la IgY de paloma y avestruz conserva similitudes entre ellas. En el caso entre aves y mamíferos esto mismo ha ocurrido, pero al tratarse de dos clases distintas las diferencias estructurales de las inmunoglobulinas se ha hecho más evidente debido a los procesos evolutivos que sufrieron.

Respecto al uso de IgY como blanco de anticuerpos específicos, observamos que en el inmunoblot hubo un reconocimiento único de la inmunoglobulina de paloma con anticuerpos comerciales, incluso sin reacción cruzada contra la IgY de avestruz. Esto es interesante considerando que la estructura, peso de las cadenas pesadas (70 kDa) y de las cadenas ligeras (30 kDa) (Patrick Eberechi, 2012) son similares a la IgY de paloma pero no así su comportamiento inmunogénico, al menos en este estudio. Con respecto a las diferencias en el reconocimiento del anticuerpo comercial anti-IgY de paloma a los distintos componentes de esta ave (IgY, AgAv, γ de paloma), aumentando de izquierda a

derecha, es posible que se deba a motivos de enriquecimiento de la propia IgY de paloma, siendo el caso de las y la que contiene mayor cantidad de moléculas de IgY.

Cuando se estudió la posible unión del Anticuerpo anti-IgY de paloma, usando las IgG's de mamífero era mucho más predecible la falta de reconocimiento por parte de un anticuerpo dirigido contra inmunoglobulinas de otra especie.

La producción de una respuesta inmune específica contra la IgY de paloma por parte de los pacientes con NH es quizá uno de los resultados más importantes en nuestro trabajo. Observar una mayor producción de anticuerpo anti-IgY en pacientes con NH y la baja producción de este anticuerpo en contactos sanos (pacientes con NH pero sin presentar los síntomas) es un indicativo de que la IgY de paloma puede jugar un papel más importante en el desarrollo de la enfermedad.

Por otra parte, como lo hemos mencionado, existe una gran diversidad de antígenos que han sido considerados como posibles causantes de la enfermedad, con los resultados obtenidos en este trabajo podemos tener más indicios que uno de ellos, la IgY, produce una respuesta inmune y que además los individuos que la presentan tienen una sintomatología característica de NH.

El siguiente paso a seguir con esta línea de investigación, y debido al escaso conocimiento que se tiene de la IgY de paloma en el ámbito científico, es seguir indagando sobre las características fisicoquímicas e inmunogénicas que la hacen diferente a otras proteínas.

7. CONCLUSIONES

- Se logró la purificación de IgY de paloma por medio de un método de precipitación comercial para inmunoglobulinas de otra ave obteniendo un rendimiento y concentración satisfactoria para la realización de nuevos estudios.
- Por medio de la electroforesis se logró observar que la IgY de paloma tiene cadenas pesadas y cadenas ligeras cuyos pesos moleculares son diferentes a las de IgG's de mamíferos.
- Estas diferencias fueron lo suficientemente distintivas para que el anticuerpo comercial anti-IgY de paloma detectara solamente antígenos de esta especie.
- La discriminación del anticuerpo anti-IgY de paloma respecto a la IgY de avestruz nos hace inferir que las modificaciones postraduccionales tales como la glicosilación o diferencias en secuencias de aminoácidos pueden jugar un papel más importante en el reconocimiento de la proteína.
- La producción de Anticuerpo anti-IgY de paloma en el estudio demostró la activación de una respuesta inmune especie-específica. Las IgY de aves e IgG de mamíferos presentan una gran similitud IQ pero difieren en sus propiedades inmunogénicas.
- El aumento en la producción de anticuerpo anti-IgY de paloma en pacientes con NH, con respecto a los contactos sanos, nos permite proponer a la IgY de paloma como un marcador y un posible antígeno causal en NH.

8. Bibliografía

- Amoruso, I., Fabbris, L., Mazza, M., & Caravello, G. (2013). Estimation of Feral Pigeon (*Columba livia*) population size using a novel Superimposed Urban Strata (SUS) method. *Urban Ecosystems*. doi:10.1007/s11252-013-0323-2
- Austin Jr., O. (1961). *Birds of the World* (1° ed.). New York, USA: Golden Press.
- Bourke, S. J., Dalphin, J. C., Boyd, G., McSharry, C., Baldwin, C. I., & Calvert, J. E. (2001). Hypersensitivity pneumonitis: current concepts. *The European Respiratory Journal. Supplement*, 32, 81s–92s. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11816827>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>
- Čanády, A., & Mošanský, L. (2013). Population size and plumage polymorphism of feral pigeon (*Columba livia* forma urbana) from urban environment of Košice city (Slovakia). *Zoology and Ecology*, 23(2), 104–110. doi:10.1080/21658005.2013.797149
- Gill, F. B. (1995). *Ornithology* (2° ed., p. 763). New York, USA: W. H. Freeman.
- Gutierrez, H. (2009). Importancia de las inmunoglobulinas aviares y sus aplicaciones en inmunoensayos. *Revista TEORÍA Y PRAXIS INVESTIGATIVA*, (2), 19–26.
- Johnston, R. F., & Janiga, M. (1995). *Feral Pigeons* (p. 320). Oxford University Press. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=whScRZEmRI4C&pgis=1>
- Katharine, E. (1994). One Gene Encodes the Heavy Chains for Three Different. *The Journal Immunology*.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., & Kuby, J. (2007). *Kuby Immunology* (p. 574). W. H. Freeman.
- Klimentzou, P., Paravatou-Petsotas, M., Zikos, C., Beck, A., Skopeliti, M., Czarnecki, J., ... Evangelatos, G. P. (2006). Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly immunogenic polypeptide prothymosin alpha. *Peptides*, 27(1), 183–93. doi:10.1016/j.peptides.2005.07.002.

-
- Leslie, B. Y. G. A., Ph, D., & Clem, L. W. (1969). PHYLOGENY OF IMMUNOGLOBULIN STRUCTURE AND FUNCTION*, 1337–1352.
- McSharry, C., Anderson, K., & Boyd, G. (2000). A review of antigen diversity causing lung disease among pigeon breeders. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 30(9), 1221–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10971467>
- Patrick Eberechi, A. (2012). Purification of Immunoglobulin Y (IgY) from the Ostrich (*Struthio camelus*) by Staphylococcal Protein A (SpA) Affinity Chromatography. *Journal of Chromatography & Separation Techniques*. Retrieved from <http://www.omicsonline.org/2157-7064/2157-7064-3-127.php?aid=7428>
- Paul, W. E. (2012). *Fundamental Immunology* (7^o edición., p. 1283). Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Rose, E., Nagel, P., & Haag-Wackernagel, D. (2006). Spatio-temporal use of the urban habitat by feral pigeons (*Columba livia*). *Behavioral Ecology and ...*. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/s00265-006-0162-8>
- Springer, S. a, & Gagneux, P. (2013). Glycan evolution in response to collaboration, conflict, and constraint. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(10), 6904–11. doi:10.1074/jbc.R112.424523
- Sturkie's Avian Physiology (Google eBook)*. (1999) (p. 704). Academic Press. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=503tcsrsv0C&pgis=1>
- Suzuki, N., Khoo, K.-H., Chen, C.-M., Chen, H.-C., & Lee, Y. C. (2003). N-glycan structures of pigeon IgG: a major serum glycoprotein containing Gal α 1-4 Gal termini.. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46293–306. doi:10.1074/jbc.M307132200
- Suzuki, N., Laskowski, M., & Lee, Y. C. (2004). Phylogenetic expression of Gal α 1-4Gal on avian glycoproteins: glycan differentiation inscribed in the early history of modern birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(24), 9023–9028. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=428466&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

-
- Suzuki, N., & Lee, Y. C. (2004). Site-specific N-glycosylation of chicken serum IgG. *Glycobiology*, 14(3), 275–92. doi:10.1093/glycob/cwh031
- Tizard, I. (2002). The avian antibody response. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 11(1), 2–14. doi:10.1053/saep.2002.28216
- Vriends, M. M., Erskine, T., & Erskine, T. E. (2005). *Pigeons* (p. 95). Barron's Educational Series. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=AaIFeOLVnwoC&pgis=1>
- Warr, G., Magor, K., & Higgins, D. (1995). IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167569995800085>
- Zhang, W.-W. (2003). The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. *Drug Discovery Today*, 8(8), 364–371. doi:10.1016/S1359-6446(03)02655-2