

# Efecto del uso de anticuerpos policlonales IgY frente a bacterias cariogénicas en la formación del biofilm

## *Effect of the use of polyclonal IgY antibodies against cariogenic bacteria on the formation of biofilm*

MARTÍNEZ CADILLO ELBA ESTEFANÍA<sup>1</sup>, CHÁVEZ ALVARADO, EDITH ROSARIO<sup>2</sup>, MOROMI NAKATA, HILDA<sup>3</sup>, MSc. Blgo. BONILLA FERREYRA, CÉSAR AUGUSTO<sup>4</sup>, RAMOS PERFECTO, DONALD<sup>5</sup>, MENDOZA FERNÁNDEZ, JULIO CÉSAR<sup>6</sup>, ESTRADA MARTINEZ, MAGGIE ANDREA<sup>7</sup>.

- 
- 1 Bióloga. Docente asociada del Departamento de Ciencias Básicas de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos Diploma en Docencia Universitaria
  - 2 Cirujano Dentista .Docente contratado del Departamento de Ciencias Básicas de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. E-mail:edithodonto@hotmail.com
  - 3 Bióloga. Mg. en Administración de Educación Universitaria. Docente principal del Departamento de Ciencias Básicas de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Email: hmnbio@hotmail.com
  - 4 Blgo. Magíster en Ciencias mención en Bioquímica. Especialista en el área de Venenos y antivenenos. Instituto Nacional de Salud. Docente asociado del Departamento de Ciencias Básicas de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. E-mail: bonicesar@yahoo.es
  - 5 Cirujano Dentista. Mg en Microbiología. Docente auxiliar del Departamento de Ciencias Básicas de Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. E-mail: dramos\_37@hotmail.com
  - 6 Biólogo. Egresado de la Maestría en Biología Molecular Facultad de Ciencias Biológicas - UNMSM. E-mail: sfexryu@hotmail.com
  - 7 Estudiante de pregrado de la Facultad de Odontología UNMSM. E-mail: maggiestrada@hotmail.com

## Resumen

El objetivo del presente estudio buscó determinar el efecto del uso de anticuerpos policlonales IgY extraídos de yema de huevo de gallinas inmunizadas frente a las principales bacterias cariogénicas (*Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* y *Actinomyces viscosus*). Se logró purificar anticuerpos específicos para *S. mutans* y *A. viscosus* y se obtuvo un promedio de 100 mg de IgY por huevo, los cuales mostraron gran especificidad y reacción al ser enfrentadas con el antígeno correspondiente, mediante métodos de aglutinación. No se encontraron anticuerpos IgY para *Lactobacillus acidophilus*. La presencia de IgY anti *S. mutans* y anti *A. viscosus* redujo la formación de biofilm presentando 22% de bacterias adheridas, en comparación con el grupo control que presentó 78%. La utilización de anticuerpos policlonales IgY específicos para bacterias cariogénicas disminuye la formación de biofilm, alterando sus características. La obtención de anticuerpos específicos contra bacterias orales servirá de base para estudios in vivo orientados a la prevención de caries dental, ya que disminuirían y alterarían las características del biofilm dental.

**Palabras clave:** *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus*, IgY, biofilm.

## Abstract

The aim of this project was to determine the effect of the use of polyclonal antibodies IgY, which were obtained from egg yolk of hens immunized against the major cariogenic bacteria (*Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* and *Actinomyces viscosus*). It was able to purify specific antibodies for *S. mutans* and *A. viscosus*, obtaining an average of 100 mg of IgY from each egg, which showed high specificity and reaction when were faced against the corresponding antigen using the serological method of agglutination. There were not found antibodies for *Lactobacillus acidophilus*. The presence of IgY anti *S. mutans* and anti *A. viscosus* reduced biofilm formation by presenting 22% of bacteria adhesion in comparison with the control group which presented 78% of bacteria adhesion. The use of polyclonal Antibody IgY specific to cariogenic bacteria decreased biofilm formation by altering its characteristics. Obtaining specific antibodies against oral bacteria will form the basis for in vivo studies aimed at the prevention of dental caries so they would decrease and alter the characteristics of dental biofilm.

**Keywords:** *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus*, IgY, biofilm.

## Introducción

Para la prevención de caries dental se han desarrollado diversas estrategias, incluyendo estudios de vacunas contra esta enfermedad. La mayoría de ellos están especialmente dirigidos a la búsqueda de nuevas alternativas que disminuyan la actividad de las principales bacterias cariogénicas, centrándose en *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* y *Actinomyces*.

El biofilm dental es una comunidad de bacterias embebida en una matriz de polisacáridos adherida al diente, el cual condiciona a la aparición de caries dental y enfermedad periodontal.<sup>1</sup>

La tecnología Y (referida a la obtención de anticuerpos de yema de huevo IgY) es estudiada ampliamente en los distintos campos de la medicina humana y veterinaria para el tratamiento de enfermedades virales y producidas por bacterias.<sup>2</sup>

El uso de esta tecnología presenta grandes ventajas, ya que estos anticuerpos se pueden extraer de la yema de huevo de las gallinas en cantidades mayores a las obtenidas en mamíferos y preservando el bienestar animal. Además, se ha demostrado que presenta especificidad y afinidad similares e incluso mayores a la inmunoglobulina G.

La obtención de anticuerpos específicos contra bacterias orales servirá de base para estudios in vivo orientados a la prevención de caries dental ya que tendrán efecto en la formación y en las características del biofilm dental.<sup>10</sup>

La utilización de esta inmunoglobulina se presenta como una alternativa para el tratamiento profiláctico de la caries dental utilizándose en inmunización pasiva contra esta enfermedad.<sup>7</sup>

En nuestro país, no existen muchos estudios utilizando esta tecnología, por este motivo, el objetivo del presente estudio fue producir, aislar y purificar anticuerpos IgY específicos contra las bacterias *S. mutans*, *L. acidophilus* y *A. viscosus* y determinar su efecto en la formación de biofilm después de enfrentarlas con su respectivo antígeno.

## Materiales y método

El estudio es experimental y analítico. Se trabajó con gallinas de 17 semanas, las cuales fueron

mantenidas hasta la obtención de huevos que tenían cantidades de anticuerpos específicos adecuadas para la investigación. Se utilizaron las cepas de las siguientes bacterias: *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 y *Actinomyces viscosus* ATCC 15987

### \* Preparación del antígeno:

Las bacterias *S. mutans*, *Lactobacillus acidophilus* y *Actinomyces viscosus* fueron inactivadas después de tratarlas con formol al 0.5% por 24 h y ajustando su concentración a  $1 \times 10^8$  UFC por ml. Los antígenos se congelaron a  $-4$  °C hasta su utilización.

### \* Protocolo de inmunización:

Se inocularon  $0.5 \text{ ml} \times 10^9$  UFC de cada bacteria por vía intramuscular en gallinas de la raza Light Brown Leghorn utilizando adyuvante completo de Freund para la dosis inicial e incompleto para los siguientes refuerzos. Las inoculaciones se realizaron a intervalos de dos semanas (Fig. 1).

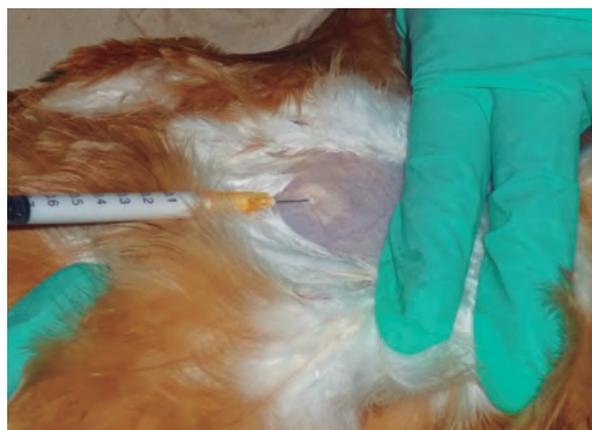


Figura 1. Inoculación de antígeno *S. mutans* con adyuvante vía intramuscular

Los huevos se recolectaron a partir de la primera semana de iniciado el protocolo de inmunización y se almacenaron en refrigeración hasta su procesamiento, se los clasificó por semana y por tipo de bacteria utilizada en las inmunizaciones.<sup>8,3</sup>

### \* Detección de anticuerpos:

Para este ensayo se utilizó el suero de las gallinas inmunizadas.  $50 \mu\text{L}$  de antígeno correspondiente a cada bacteria cariogénica. ( $0.5 \text{ ml} \times 10^9$  UFC) fueron enfrentados con  $50 \mu\text{L}$  de dilución de anticuerpos aislados, en placas excavadas para

observar aglutinación, usando como control anticuerpos de huevos pre inmunes.

#### \* Aislamiento de IgY:

Los huevos recolectados por semanas de inmunización fueron procesados. La yema de huevo fue separada de la clara con ayuda de una jeringa, anotando el volumen obtenido (Fig. 2). La yema se diluyó con dos volúmenes de PBS pH 7.4 y se ajustó el pH con ácido acético al 60%<sup>5</sup>. Se agregó ácido caprílico por goteo (64 $\mu$ l/ml de dilución) a una velocidad de 600 $\mu$ l/min y se dejó en agitación por dos horas a temperatura ambiente. Luego se filtró con papel Whatman N° 1, se ajustó el pH a 7 con Tris 1M y se centrifugó a 5000 rpm por 30 minutos. Al sobrenadante obtenido se le agregó lentamente cristales de sulfato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.231g/ml de dilución) y se dejó en agitación lenta por una hora a 4 °C. Finalmente, se centrifugó a 5000 rpm durante 30 minutos, el precipitado se resuspendió en el mismo volumen de yema extraída y luego se realizó una diálisis contra PBS pH 7.4.<sup>8,3,4</sup>



Figura 2. Separación de la yema con ayuda de una jeringa

#### \* Formación de biofilm:

Se cultivó 0.1 ml de cada bacteria cariogénica (*S. mutans* y *Actinomyces viscosus*) en 3.8 ml de caldo BHI enfrentándolas con 0.5 ml de anticuerpo IgY (10 mg/ml) específico para cada bacteria. Los tubos se incubaron formando un ángulo de 30 oC para obtener una mayor superficie en la formación de biofilm, en condiciones de microaerofilia durante 18 horas. Al grupo control se reemplazó el anticuerpo por 0.5 ml de H<sub>2</sub>O destilada.

El biofilm formado por las bacterias adheridas a la superficie del tubo fueron desprendidas y resuspendidas en 5 ml de agua destilada. El caldo que contenía las bacterias no adheridas fue centrifugado y se resuspendió en 5ml de agua destilada. Se leyó la absorbancias en espectrofotómetro a 600 nm.<sup>3</sup>

Las absorbancias obtenidas se compararon con el grupo control al cual no se agregó anticuerpo.

#### Resultados

La metodología empleada logró recuperar anticuerpos de yema de huevo específicos para *Streptococcus mutans* y *Actinomyces viscosus*, y se obtuvo un promedio de 100 mg de IgY por huevo procesado, existiendo marcada aglutinación al ser enfrentados cada anticuerpo con su respectivo antígeno. No se observó aglutinación al enfrentar anticuerpos de yema de huevo anti *Lactobacillus acidophilus*; sin embargo, el suero extraído de gallinas inmunizadas con *Lactobacillus acidophilus* aglutinaba al ser enfrentado con el antígeno (Fig.3).

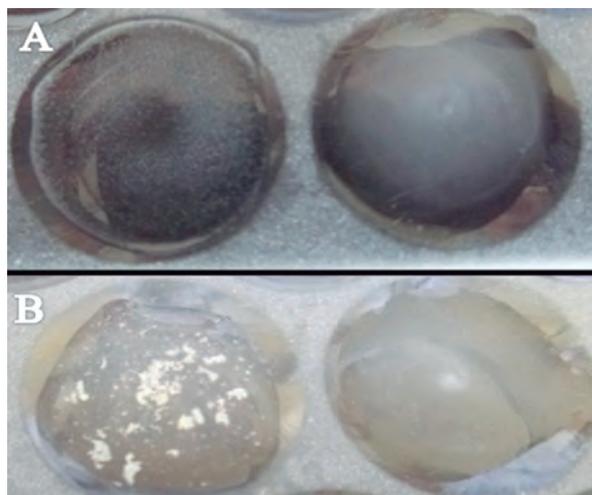


Figura 3. (A) Aglutinación al ser enfrentado IgY anti *Actinomyces viscosus* con su respectivo antígeno. A la derecha se observa que no ocurrió el mismo fenómeno al enfrentar *Actinomyces viscosus* con IgY extraído de gallinas pre inmunes. (B) Aglutinación al enfrentar suero de gallinas inmunizadas con *Lactobacillus acidophilus* con su respectivo antígeno. A la derecha no se aprecia aglutinación al enfrentar suero de gallinas preinmunes frente a *Lactobacillus acidophilus*.

**Formación de Biofilm.** Luego de la incubación en el grupo experimental se encontró en las paredes de los tubos un biofilm fácilmente desprendible, no consistente, poco uniforme, que presentaba

mayor sedimento bacteriano en el fondo del tubo. El grupo control presentó un biofilm uniforme, las bacterias se encontraban fuertemente adheridas a las paredes del tubo y no se desprendían con facilidad (Fig. 4).

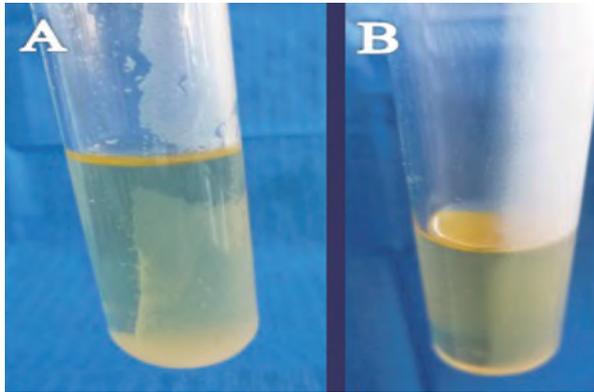


Figura 4. (A) Biofilm formado al incubar IgY *anti Streptococcus mutans* y *Actinomyces viscosus* con sus respectivos antígenos. (B) Tubo del grupo control

La cantidad de biofilm formado se determinó basándose en el porcentaje de bacterias adheridas y no adheridas a la superficie de cada tubo luego de la lectura de sus absorbancias. El grupo experimental que contenía los anticuerpos IgY específicos mostró una marcada reducción en la formación de biofilm, pues presentaba un 23.62% de bacterias adheridas. El grupo control presentó 78.17% de bacterias adheridas ( $p < 0.05$ ) (Fig. 5).

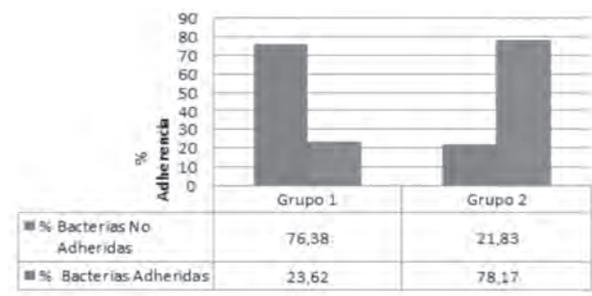


Figura 5. Porcentaje de bacterias adheridas que conforman el biofilm. El grupo 1 corresponde a tubos que contenían anticuerpos IgY *anti Streptococcus mutans* y *Actinomyces viscosus* y presentaban un mayor porcentaje de bacterias adheridas en comparación con el grupo 2 (grupo control).

## Discusión

Con la metodología empleada se logró recuperar gran cantidad de anticuerpos específicos de la yema de huevo, y se obtuvo un promedio de 100

mg por cada huevo tratado, cantidad similar a los hallados en otros estudios.<sup>2,8</sup>

La mayoría de estudios relacionados con el uso de anticuerpos policlonales de yema de huevo relacionado con bacterias orales se ha realizado utilizando *Streptococcus mutans* como antígeno.<sup>3,6-11</sup> En el presente estudio logramos producir anticuerpos contra *Actinomyces viscosus*, lo cual permitirá realizar estudios más específicos para conocer cómo actúan los anticuerpos IgY sobre esta bacteria.

El efecto in vitro de anticuerpos policlonales específicos para cada bacteria cariogénica demostró ser efectiva en la reducción de biofilm lo cual disminuirá su efecto cariogénico al alterar sus características en cavidad oral reduciendo la formación de placa dental.

Hatta<sup>6</sup>, Otake,<sup>9</sup> y Hamada<sup>5</sup> realizaron estudios en animales utilizando anticuerpos IgY específicos para *S. mutans* mediante inmunización pasiva que demostraron ser efectivos en la reducción de caries dental, lo cual sugiere que estos anticuerpos pueden ser utilizados en tratamientos preventivos. Es de gran importancia realizar nuevos estudios que busquen producir anticuerpos específicos contra las distintas bacterias orales y demostrar su efectividad al actuar de forma combinada. Ello contribuirá a la búsqueda de nuevas alternativas en la prevención.

## Conclusiones

1. *Streptococcus mutans* y *Actinomyces viscosus* demostraron tener alta capacidad antigénica al lograr estimular el sistema inmunológico de gallinas inmunizadas, que produjo gran cantidad de anticuerpos específicos (IgY) y fue transferida a los huevos.
2. En el suero de gallinas inmunizadas con *Lactobacillus acidophilus* se observó marcada aglutinación. Estos anticuerpos no se encontraron en la yema de huevo ya que no produjo ninguna reacción, lo cual sugiere que existen otros anticuerpos no presentes en la yema de huevo que reconocería esta bacteria.
3. Es de gran importancia realizar nuevos estudios que busquen producir anticuerpos específicos contra las distintas bacterias orales y

demostrar su efectividad al actuar de forma combinada. Ello contribuirá a la búsqueda de nuevas alternativas en la prevención de caries dental y de otras enfermedades orales.

4. Con la metodología empleada se recuperó gran cantidad de anticuerpos específicos de la yema de huevo y se obtuvo un promedio de 100 mg por cada huevo tratado, cantidad similar a los hallados en otros estudios.<sup>8,3</sup>
5. La mayoría de estudios referidos al uso de anticuerpos policlonales de yema de huevo relacionado con bacterias orales se ha realizado utilizando *Streptococcus mutans* como antígeno.<sup>3,11</sup> En el presente estudio logramos producir anticuerpos contra *Actinomyces viscosus*, lo cual permitirá realizar estudios más específicos para conocer cómo actúan los anticuerpos IgY sobre esta bacteria.

#### Agradecimiento

A las señoritas Violeta Chavesta V. y Elena Aquino A., por su colaboración durante la ejecución de la investigación.

Al doctor Siever Morales Cauti en la orientación en el protocolo de manejo de aves.

#### Referencias bibliográficas

1. Bowen W, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*- Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. *Caries Res.* 2011; 45:69–86
2. Chacana P, Terzolo H, Gutierrez E, Schade R. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina: biología, propiedades y su aplicación en medicina humana y veterinaria. *Rev. Med. Vet.* 2004; 85 (5):179-189
3. Chávez E. Adherencia del *Streptococcus mutans* después del uso de IgY extraída de yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas. Tesis para obtener el título de Cirujano Dentista. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2009
4. Guang – Ping R, Li M, Xiao – Jing M, Min – Jie M, Xiao - Ning W, Ying L et al. Quantification of antibody (IgY) titers in hen eggs following immunization and their use in detecting cell surface molecules on nitrocellulose membranes. *J Immunoassay Immunochem.* 2007; 28: 35 – 45
5. Hamada S, Horikoshi T, Minami T, Kawabata S, Hiraoka J, Fujiwara T et al. Oral passive immunization against dental caries in rats by use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 1991 Nov; 59(11):4161-7
6. Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, Kim M, Yanamoto T; Otake S et al. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 1997; 31(4):268-274
7. Krüger C, Pearson S, Kodama Y, Vacca S, Bowen W.; Hammarstrom L. The effects of egg - derived antibodies to glucosyltransferases on dental caries in rats. *Caries Res.* 2004 Ene-Feb; 38 (1): 9-4
8. Mendoza J. Producción de anticuerpos policlonales IgY en huevos de gallinas inmunizadas contra el veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* (Jergón) [Tesis Bachiller] Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos;
9. Otake S, Nishihara Y, Makimura M, Hatta H, Kim M, Yanamoto T et al. Protection of rats against dental caries by passive immunization with hen-egg-yolk antibody (IgY). *J Dent Res.* 1991 Mar; 70(3):162-6
10. Qian Z, Ming W, Zhuan B, Wen X. The effect of specific anti -*S. mutans* IgY on dental caries in vitro. *Chin J Dent Res.* 2002; 5 (3):36-40
11. Smith D, King W, Godiska R. Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to *Streptococcus mutans* glucan binding protein B can confer protection against experimental dental caries. *Infect Immun.* 2001 May; 69(5):3135-42