



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO DE TIRULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO  
DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE IgY AVIARES CONTRA  
*Leishmania mexicana*”**

**ESPÍN ARROBA, STEPHANIE LIZETHE**

**DIRECTORA: TORRES ARIAS, MARBEL Ph.D.**

**SANGOLQUÍ**

**2019**



**ESPE**

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación "**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE IgY AVIARES CONTRA *Leishmania mexicana***" realizado por la señorita **Espín Arroba, Stephanie Lizethe**, ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 28 junio 2019

**Marbel Torres Arias Ph.D.**

C.I.: 1802949154



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD**

Yo, *Espín Arroba, Stephanie Lizethe*, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: *“Obtención y caracterización de IgY aviares contra Leishmania mexicana”*, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 28 junio 2019

*Stephanie Espín A.*

**Stephanie Lizethe Espín Arroba**

C.I.: 1721714952





**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN**

*Yo, Espín Arroba, Stephanie Lizethe, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación "Obtención y caracterización de IgY aviares contra Leishmania mexicana" en el repositorio institucional cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.*

Sangolquí, 28 junio 2019

**Stephanie Lizethe Espín Arroba**

C.I.: 1721714952

## DEDICATORIA

A Pauli, Frank y Gabriel. Todo esfuerzo, toda lucha y cada felicidad serán eternamente para ustedes.

*Stephanie Lizeth Espín Arroba*

## AGRADECIMIENTOS

Por cada sueño y esfuerzo puesto en mí, quiero agradecer a mis padres, Paulina y Franklin, por no dejarme sola y traerme hasta aquí. Gracias infinitas y mucha vida a quienes dedicaron las suyas a mí. A mi hermano Gabriel, por cuidarme, por compartir tus sueños y locuras conmigo.

A toda mi familia que estuvo pendiente: Rosa, Heriberto y Luis, porque han esperado esto tanto como yo, hoy por fin hemos llegado. A Xavier, Paola y Christian, gracias por enseñarme que siempre que estudie mucho, algo bueno vendrá después. A Nicolás y Paula por sus sonrisas.

A la Alma Mater, el Laboratorio de Inmunología y Virología, por enseñarme el trabajo duro y sobre todo la paciencia, por inculcar en mí la dedicación y la entrega, porque no importa la hora y el cansancio siempre se podrá ensayar una vez más. Gracias por mi tema de titulación, he aquí todo mi esfuerzo y más.

Al Ing. Mario Ortiz, por permitir el uso del galpón avícola de las instalaciones del IASA I.

A Marbel Torres, por su paciencia y por permitirme trabajar con ella, gracias Doc, por ser un ente inspirador. A Ligia Ayala que ha estado pendiente de todo esto.

También a la gente que fui conociendo en este camino, a mis amigos: Daniel, Andrés, Carlos, Anahí, Michell, Fernanda, Andrea y Carolina. Gracias por sus risas, por su ayuda y por cada locura. A los chicos del laboratorio, por apoyarnos entre todos a Sebastián, Andrea, Luis, Juan, Karla, Fernanda, Alex, Mishell, Ariana y Marco.

Y a la fuerza motora del universo que suelo llamar Dios, ¡Gracias!

*Stephanie Lizethe Espín Arroba*

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>CERTIFICACIÓN .....</b>	<b>i</b>
<b>AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD .....</b>	<b>ii</b>
<b>AUTORIZACIÓN .....</b>	<b>iii</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>v</b>
<b>INDICE DE CONTENIDOS.....</b>	<b>vi</b>
<b>INDICE DE TABLAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>INDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xvi</b>
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Antecedentes .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Justificación del problema.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Objetivos de la investigación.....</b>	<b>10</b>
1.3.1. Objetivo general.....	10
1.3.2. Objetivos específicos .....	10
<b>CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. <i>Leishmania mexicana</i>:.....</b>	<b>11</b>
2.1.1. Manifestación clínica.....	14
2.1.2. Situación actual en el Ecuador .....	15

2.1.3.	Tratamientos y prospecto terapéutico .....	18
<b>2.2.</b>	<b>Inmunoglobulinas Y</b> .....	<b>20</b>
2.2.1.	Historia y relación evolutiva .....	20
2.2.2.	Estructura proteica y caracterización .....	22
2.2.3.	Respuesta innata y adaptativa en aves .....	24
2.2.4.	Maduración de ovocitos y transferencia de anticuerpos .....	29
<b>2.3.</b>	<b>Tecnología IgY</b> .....	<b>32</b>
2.3.1.	Inoculación de las aves .....	32
2.3.2.	Procesamiento de muestras para la obtención de inmunoglobulinas .....	34
2.3.3.	Purificación de anticuerpos por métodos cromatográficos .....	35
2.3.4.	Aplicaciones y herramientas tecnológicas .....	38
<b>CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....		<b>40</b>
<b>3.1.</b>	<b>Inoculación de gallinas Lohmann Brown con antígeno de <i>Leishmania mexicana</i></b> ...	<b>40</b>
3.1.1.	Obtención de inóculo de <i>Leishmania mexicana</i> inactivada .....	40
3.1.2.	Manejo de modelo <i>In vivo</i> para inoculación de antígeno .....	40
<b>3.2.</b>	<b>Obtención y purificación de inmunoglobulinas policlonales aviares tipo IgY</b>	
	<b>a partir de yemas de huevos de gallinas inmunizadas</b> .....	<b>41</b>
3.2.1.	Deslipidación y precipitación de proteínas totales .....	41
3.2.2.	Purificación de anticuerpos aviares tipo IgY por columna de afinidad. ....	42
3.2.3.	Cuantificación de proteínas por BCA .....	43
<b>3.3.</b>	<b>Caracterización de inmunoglobulinas IgY aviares</b> .....	<b>43</b>
3.3.1.	Western Blot para proteínas IgY y muestras de parásito de <i>Leishmania</i> .....	43
3.3.2.	ELISA indirecto cualitativo para parásitos de <i>Leishmania</i> y pruebas cruzadas. ....	45



<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1. Inoculación de gallinas Lohmann Brown con antígeno de <i>Leishmania mexicana</i> ...</b>	<b>47</b>
<b>4.2. Obtención y purificación de inmunoglobulinas policlonales aviares tipo IgY         a partir de yemas de huevos de gallinas inmunizadas. ....</b>	<b>48</b>
<b>4.3. Caracterización de inmunoglobulinas IgY mediante Western Blot .....</b>	<b>51</b>
4.3.1. Estructura de inmunoglobulinas IgY aviares por Western Blot directo .....	51
4.3.2. Western Blot indirecto para tres especies de <i>Leishmania</i> . ....	52
4.3.3. ELISA indirecto para inmunodetección cualitativa de <i>L. mexicana</i> . ....	54
4.3.4. ELISA para inmunodetección cualitativa de otras especies de <i>Leishmania</i> .....	59
4.3.5. Pruebas cruzadas con bacterias mediante prueba ELISA indirecto. ....	62
<b>CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>64</b>
<b>5.1. Inoculación de gallinas Lohmann Brown con antígeno parasitario .....</b>	<b>64</b>
<b>5.2. Obtención y purificación de inmunoglobulinas aviares tipo IgY anti <i>L. mexicana</i> .</b>	<b>67</b>
<b>5.3. Caracterización de IgY aviares anti <i>Leishmania mexicana</i> .....</b>	<b>70</b>
5.3.1. Inmunoglobulinas aviares IgY .....	70
5.3.2. Afinidad para <i>L. mexicana, braziliensis e infantum</i> con IgY anti <i>Leishmania mexicana</i> por medio de western blot. ....	71
5.3.3. Reconocimiento de IgY anti <i>Leishmania mexicana</i> en pruebas ELISA. ....	73
<b>CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>76</b>
<b>CAPÍTULO 7. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>78</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>79</b>

**INDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1</b> <i>Plan de inoculación aplicado en el modelo de gallinas Lohmann Brown</i> .....	41
<b>Tabla 2</b> <i>Condiciones para pruebas ELISA para antígeno e IgY anti L. mexicana</i> .....	46
<b>Tabla 3</b> <i>Huevos procesados para la precipitación y purificación de IgY anti Leishmania</i> .....	48
<b>Tabla 4</b> <i>Análisis de pesos moleculares correspondientes a las bandas detectadas por IgY anti L. mexicana en Western Blot.</i> .....	54
<b>Tabla 5</b> <i>Resultado comparaciones múltiples en ELISA para detección de IgY anti L. mexicana con su antígeno.</i> .....	56
<b>Tabla 6</b> <i>Resultado comparaciones múltiples en Elisa para IgY anti L. mexicana en diferentes diluciones.</i> .....	59
<b>Tabla 7</b> <i>Resultados comparaciones múltiples en ELISA de IgY anti L. mexicana con otras especies de Leishmania.</i> .....	61

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Protocolos tradicionales para obtención de anticuerpos policlonales en mamíferos pequeños a partir de suero sanguíneo.....	1
<b>Figura 2.</b> Principio y prospecto aplicativo de la producción de anticuerpos IgY en gallinas. ....	3
<b>Figura 3.</b> Pruebas de flujo lateral utilizando nanopartículas conjugadas con anticuerpos.....	4
<b>Figura 4.</b> Ciclo de desarrollo y proliferación de <i>Leishmania</i> mediada por vectores, hacia sus huéspedes y reservorios. ....	13
<b>Figura 5.</b> Sitios geográficos de riesgo para <i>Leishmania</i> cutánea .....	16
<b>Figura 6.</b> Estructura de una inmunoglobulina aviar de tipo IgY.....	23
<b>Figura 7.</b> Órganos linfoides aviares, Timo y la Bursa de Fabricio. ....	25
<b>Figura 8.</b> Sistema de activación de la inmunidad adaptativa mediados por linfocitos CD4 helper y las APC.....	27
<b>Figura 9.</b> Activación de células B independiente de células CD4 para la producción de IgM. ....	27
<b>Figura 10.</b> Activación de linfocitos B para la expansión clonal para la producción de IgY.....	28
<b>Figura 11.</b> Oviducto aviar y conformación de un huevo completo.....	30
<b>Figura 12.</b> Folículo ovárico aviar y transporte materno de anticuerpos por selección. ....	31
<b>Figura 13.</b> Proceso de la cromatografía líquida por afinidad con elución de proteínas. ....	37
<b>Figura 14.</b> Contabilización de huevos obtenidos durante la fase de inoculación In vivo. ....	47
<b>Figura 15.</b> Concentración de proteína IgY en mg/mL clasificada por semana .....	49
<b>Figura 16.</b> SDS page y Membrada de nitrocelulosa de proteínas IgY anti <i>L. mexicana</i> . ....	51
<b>Figura 17.</b> Western Blot revelado por quimioluminiscencia para IgY anti <i>L. mexicana</i> .....	52
<b>Figura 18.</b> Western Blot revelado por quimioluminiscencia para proteínas parasitarias de <i>L. mexicana</i> , <i>L. braziliensis</i> y <i>L. infantum</i> . ....	53

<b>Figura 19.</b> ELISA indirecto con dilución máxima y mínima de IgY anti <i>L. mexicana</i> para su antígeno. ....	58
<b>Figura 20.</b> ELISA de IgY anti <i>L. mexicana</i> , con otras especies de Leishmania: <i>braziliensis e infantum</i> . ....	60
<b>Figura 21.</b> ELISA indirecto para pruebas cruzadas con IgY anti <i>Leishmania mexicana</i> para antígeno bacteriano .....	62

## LISTADO DE ABREVIATURAS

**ABTS:** 2,2'-Azino biz (3 etilbensotiazilna 6 – ácido sulfónico) sal diamonio

**AM:** Antimoniato de Meglúmina

**APC:** Célula presentadora de antígenos (Por sus siglas en Inglés: Antigen presenting cell)

**Au:** Oro

**CDR:** regiones determinantes complementarias (Por sus siglas en inglés: Complementary determining regions)

**Células NK:** Células asesinas naturales (Por sus siglas en inglés: natural Killer)

**CH:** Cadena pesada (Por sus siglas en inglés: Heavy chain)

**CL:** Cadena ligera (Por sus siglas en inglés: Light chain)

**CpG OND:** Oligodeoxinucleotidos con C guanidina fosfato

**DNA:** Ácido desoxiribonucleico (Por sus siglas en inglés: Desoxiribonucleid acid)

**ELISA:** Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (Por sus siglas en inglés: Enzyme linked immunosorbent assay)

**EPS:** Extracto parasitario sonificado

**Fab:** Fracción de unión al antígeno (Por sus siglas en inglés: Antigen binding fraction)

**Fc:** Fracción cristalizable

**G:** Gallina

**HRP:** Peroxidasa de rábano (Por sus siglas en inglés: Horseradish peroxidase)

**ICLTc:** Índice Incidencia – Casos por trienio de leishmaniasis cutánea

**Ig:** Inmunoglobulina

**IgE:** Inmunoglobulina E

**IgG RAC – HRP:** Anticuerpo IgG conejo anti gallina conjugado a peroxidasa (Por sus siglas en inglés: Rabbit anti chicken – horseradish peroxidase)

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IgM:** Inmunoglobulina M

**IgY:** Inmunoglobulina Y

**LC:** Leishmania cutánea

**LM:** Leishmania mucosa

**LPS:** Lipopolisacáridos

**LV:** Leishmania visceral

**mg/mL:** Miligramos por mililitros

**MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad (Por sus siglas en Inglés: Major histocompatibility complex)

**mL:** Mililitro

**MSP:** Ministerio de salud pública

**NC:** Nitrocelulosa

**NO:** Óxido de Nitrógeno

**OD:** Densidad óptica (Por sus siglas en Inglés: Optical density)

**OPS:** Organización Panamericana de Salud

**PAMP:** Patrones moleculares asociados a patógenos (Por sus siglas en inglés: Pathogen associated molecular patterns)

**PB:** Buffer fosfato (Por sus siglas en inglés: Phosphate Buffer)

**PD:** Promastigote desnaturalizado

**PEG:** Polietilenglicol



**PM:** Proteína de membrana

**PRR:** receptores de reconocimiento de patrones (por sus siglas en Inglés: Patern recognition receptors)

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno (Por sus siglas en inglés: Reactive Oxigen Species)

**RPM:** Revoluciones por minuto

**S:** Semana

**TBS:** Tris salino buffer (Por sus siglas en inglés: Tris buffered saline)

**TTBS:** Tris salino buffer con Tween 20 (Por sus siglas en inglés: Tween 20 – Tris buffered saline)

**WHO:** Organización mundial de la salud (Por sus siglas en inglés: World health organization)

**µg/mL:** Microgramo por mililitro

**µg:** Microgramo

**µL:** Microlitro

## RESUMEN

Los IgY aviares son anticuerpos policlonales resultantes de la respuesta inmunológica adaptativa. Con varios prospectos aplicativos, los IgY se consideran como biomoléculas versátiles, pudiéndolas usar como biomedicamentos alternos y herramientas de inmunodiagnóstico. Al poderse modular, se pueden generar para potencializar el reconocimiento de patógenos de relevancia clínica, como la *Leishmania mexicana*. En esta investigación se produjeron IgY anti *Leishmania mexicana*, comenzando con la inoculación de promastigote inactivado por vía intramuscular en diferentes periodos de inoculación en gallinas Lohmann Brown. El 24% de los huevos resultantes fueron tratados hasta la obtención de IgY anti *L. mexicana* por precipitación con Sulfato de Amonio y purificación por cromatografía de afinidad. Se obtuvo inmunoglobulinas de 175 kDa con estructuras completas, en concentración promedio máxima de 6.3 mg/mL por yema. Estos IgY fueron específicos para el reconocimiento del parásito objetivo, reconociendo proteínas estructurales y virales como la GP63 por protocolos de Western Blot, y detectando concentraciones mínimas y máximas de 5 y 50 µg/mL de parásito con dilución máxima de anticuerpos hasta de 1:2000 en protocolos de ELISA. La capacidad de inmunoreconocimiento de los IgY se propone como solución a la necesidad de anticuerpos anti *L. mexicana* que se requieren para diagnóstico e inmunoterapias.

### **PALABRAS CLAVE:**

- **INMUNOGLOBULINAS POLICLONALES**
- **WESTERN BLOT Y ELISA**
- **TECNOLOGÍA IGY**

## ABSTRACT

Avian IgYs are polyclonal antibodies resulting from humoral adaptive immune response. With many application perspectives, IgYs are considered as the most versatile biomolecule, being able to use as alternative biomedicine and as diagnostic tool. Being inducible, this antibodies could be produced to potentiate the recognition of relevant clinical pathogen like *Leishmania mexicana*. In this investigation IgYs anti *Leishmania mexicana* were obtained from the inoculation of inactivated promastigote through intramuscular route in Lohmann brown hens in different inoculation periods. From all the resulting eggs, 24% off all, with aleatory selection, were processed until precipitation with Ammonium Sulfate and affinity chromatography purification to obtain IgY. The resulting Immunoglobulin weight's was 175 kDa with complete structure, with a maximum concentration of 6.3 mg/mL per yolk. These IgYs have specific recognition of their target parasite, detecting structural and viral proteins as GP63 in Western Blot, also identifying a minimum and a maximal parasite antigen concentration of 5 and 50 µg/mL with maximal antibody dilution of 1:2000 in ELISA. The avidity of immunodetection mediated from the IgYs, propose this as solution to the necessity of antibodies anti *L. mexicana* for diagnostics and immunotherapy research.

### KEY WORDS

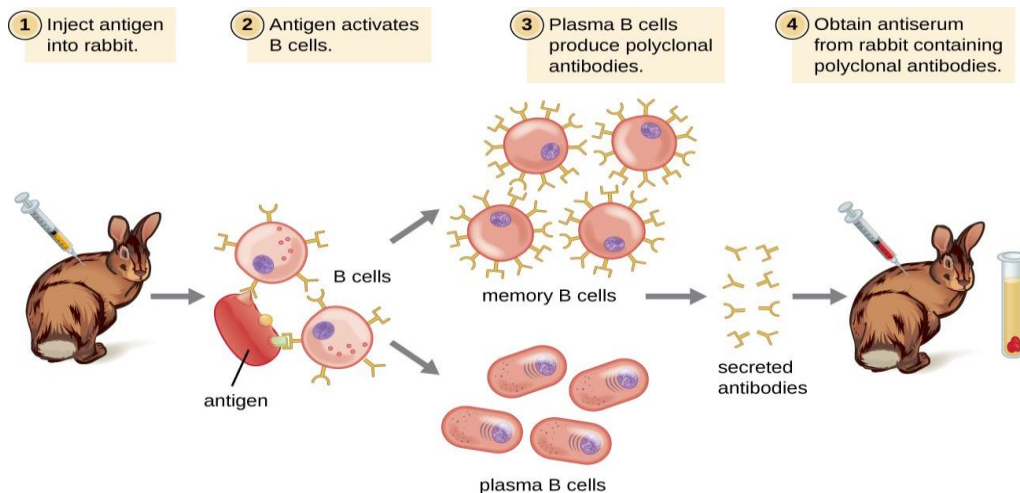
- **POLYCLONAL ANTIBODIES**
- **WESTERN BLOT AND ELISA**
- **IGY TECHNOLOGY**

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

Los anticuerpos son proteínas básicas en el desarrollo e investigación de nuevas drogas terapéuticas así como de técnicas diagnósticas de rutina relacionadas con la citometría de flujo, la inmunohistoquímica, el Western Blot y el ELISA (Acharya, Quinlan, & Neumeister, 2017).

Desde hace décadas, se generan anticuerpos policlonales de forma industrial, basándose en la inoculación de antígenos específicos en animales mamíferos para tener una fuente de inmunoglobulinas, que son capaces de unirse y detectar el antígeno inoculado, este proceso tradicional se describe en la **Figura 1** (Bradbury & Plückthun, 2015). Este método ha permitido obtener diversos anticuerpos para áreas farmacéuticas o vinculadas con la investigación. Este proceso es completamente dependiente del estímulo inmunológico de un animal, que resulta impredecible y varía respecto a la genética del animal en el que se aplique (Acharya et al., 2017).



**Figura 1.** Protocolos tradicionales para obtención de anticuerpos policlonales en mamíferos pequeños a partir de suero sanguíneo.

Fuente: (OpenStax, 2018b)

Un anticuerpo de tipo policlonal se encuentra dentro de una mezcla de varios anticuerpos, donde todos tienen la capacidad de reconocer diferentes epítopes, esta característica resulta eficaz para antígenos heterogéneos, escasos, poco detectables o antígenos sumamente tóxicos los cuales se precise detener y neutralizar rápidamente (Acharya et al., 2017) .

Los anticuerpos se han considerado como biofarmacéuticos innovadores con mayor efectividad, empleados para tratar enfermedades letales como cáncer, enfermedades huérfanas y como alternativa bioterapéutica. Para la generación de los anticuerpos, se debe considerar: el antígeno objetivo, la capacidad de detección desde varios epítopes, y su función (Beck, Wurch, Bailly, & Corvaia, 2010).

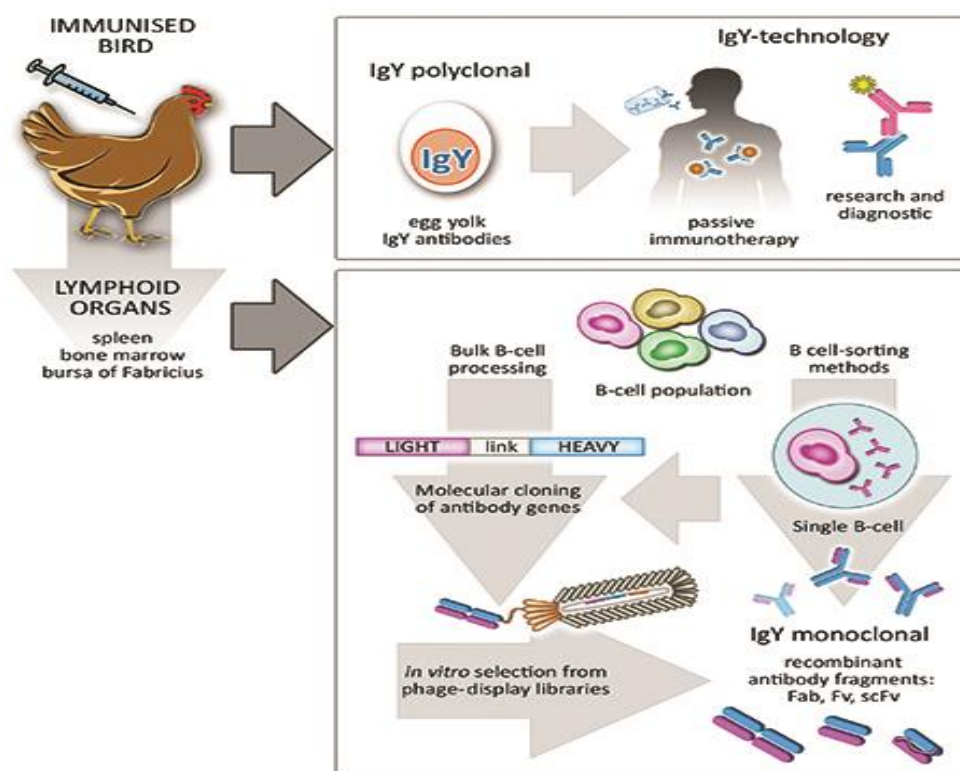
Las tecnologías clásicas de obtención de anticuerpos han resultado efectivas, pero conllevan varias desventajas productivas, relacionadas con el costo, la reactividad cruzada y diferencias entre metodologías de producción y purificación (Harley & Vieira-Pires, 2016). En el año 1996 el Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos, menciona una metodología alterna de producción de anticuerpos denominada Tecnología IgY (Schade et al., 2005).

La tecnología IgY se basa en los protocolos tradicionales, exceptuando el uso de animales mamíferos, pero emplea aves de corral, como gallinas ponedoras. La respuesta post inoculación de las aves es generar anticuerpos homólogos a los IgG, conocidos como IgY (Müller, Schubert, Zajac, Dyck, & Oelkrug, 2015), que son concentrados en yemas de huevo por medio de transferencia maternal de inmunoglobulinas como lo describe Klemperer en 1893 (Schade et al., 2005)

Esta técnica se presenta como una alternativa menos invasiva y dolorosa para los animales productores (Esmailnejad, Abdi-Hachesoo, Nasab, & Shakoori, 2019). Además de tener mayor

prospecto terapéutico en el área biomédica y biotecnológica, los IgYs tienen gran potencial para ser utilizados en la elaboración de anticuerpos recombinantes, utilizando sus características bioquímicas únicas que potencializan su eficacia (Harley & Vieira-Pires, 2016). También en el área diagnóstica, los IgYs han sido diseñados para ser utilizados en inmunocitoquímica, inmunohistoquímica y Western Blots (Sun et al., 2015).

Como se indica en la figura 2, las aplicaciones de los anticuerpos es enfocada en la inmunización pasiva por administración oral (Müller et al., 2015) y varios anticuerpos pueden ser purificados por medio de Fago Display (Khan et al., 2017) y obtener características de anticuerpos monoclonales.



**Figura 2.** Principio y prospecto aplicativo de la producción de anticuerpos IgY en gallinas.

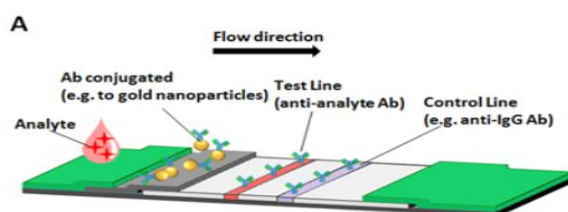
Fuente: (Harley & Vieira-Pires, 2016)



En el Ecuador se han reportado IgYs para bacterias, dirigidas al campo clínico principalmente veterinario. Es el caso de IgYs producidos para *Salmonella spp.* (Gordon, y otros, 2016) y también IgYs para detección de mastitis en bovinos por el antígeno de *Staphylococcus* (Montenegro, 2016). En el Brasil y Perú, se han generado IgYs anti *Trypanosona cruzi*, parásito del mismo orden de *Leishmania* (Grando et al., 2017; Málaga-Machaca et al., 2017)

En el área terapéutica, los anticuerpos pueden ser aplicados de forma tópica, oral, e incluso de forma profiláctica (Spillner et al., 2012). Considerando estas características, se propone a los IgY policlonales como una biomolécula, capaz de detectar con especificidad *Leishmania mexicana*, además las terapias más actuales para este parásito, mencionan el requerimiento de anticuerpos que tengan esta capacidad de detección.

Por ejemplo, se describe como técnica diagnóstica las nanopartículas marcadas con Au unidas con anticuerpos anti *Leishmania* para inmunoensayos de flujo lateral (**Figura 3**) (Gedda, Singh, Srivastava, & Sundar, 2019), también se habla de nanoesferas y nanopartículas recubiertas con IgYs, dirigidas a macrófagos infectados que liberen selectivamente drogas antiparasitarias (Gedda et al., 2019). Los anticuerpos también se pueden emplear a manera de inmunomoduladores, para activar la maduración de linfocitos y estimular respuestas inmunológicas (Taslimi, Zahedifard, & Rafati, 2018) con la finalidad de contrarrestar la proliferación sistémica de los parásitos.



**Figura 3.** Pruebas de flujo lateral utilizando nanopartículas conjugadas con anticuerpos  
Fuente: (Koczula & Gallotta, 2016)

## 1.2. Justificación del problema

El protozoo de *Leishmania*, es caracterizado como un parásito intracelular transmitido por vectores, produciendo tres tipos de leishmaniasis: cutánea, mucosa y visceral, siendo estas patologías de tipo endémicas en zonas geográficas tropicales y sub tropicales. (Kumar, 2019; Torres-Guerrero, Quintanilla-Cedillo, Ruiz-Esmenjaud, & Arenas, 2017). Se conoce que, la manifestación clínica más reportada es la leishmaniasis cutánea, con el 95% de casos a partir de un total aproximado de 12 millones de personas infectadas a nivel mundial (Franco-Paredes & Santos-Preciado, 2015; Nassif et al., 2017).

Según la OPS (2019), en sus reportes de infección para marzo del 2019 en el Continente Americano, 17 de 18 países reportaron leishmaniasis, principalmente cutánea. Ecuador ha presentado un incremento de los casos y sin olvidar los países con infecciones pre existentes como el país fronterizo, Colombia, y también Brasil (Nassif et al., 2017).

Al considerar que tiene un incremento poco controlado, la WHO ha categorizado la leishmaniasis como la enfermedad emergente más severa (de Vries, Reedijk, & Schallig, 2015), al confirmarse en el 2016, una proliferación activa en la transmisión de *Leishmania* (OPS, 2019). Este tipo de enfermedades influye directamente en una sección vulnerable de la población, principalmente en países en vías de desarrollo. Otros factores como el desplazamiento poblacional y crisis económicas, limitan los planes de prevención, diagnóstico y tratamiento oportuno (Torres-Guerrero et al., 2017).

La Leishmaniasis se encuentra dentro de la lista de enfermedades tropicales desatendidas (Franco-Paredes & Santos-Preciado, 2015). El Ministerio de Salud Pública del Ecuador (2014), reporta que la leishmaniasis es de tipo antropozoonótica y la clasifican en el grupo de enfermedades

transmitidas por vectores, junto con la Chicungunya, el Dengue y el Paludismo. También está clasificada junto con el Chagas, la Cisticercosis y la Malaria, todas ellas inhabilitantes y que afectan directamente a regiones de pobreza extrema, a poblaciones indígenas y no comunicadas (Franco-Paredes & Santos-Preciado, 2015). Después de la Malaria, la Leishmaniasis es la segunda enfermedad causada por parásitos, que desencadena en la muerte del individuo que contrae el protozooario (Kevric, Cappel, & Keeling, 2015)

En Ecuador se ha reportado en 22 provincias a nivel nacional, en zonas rurales de los valles interandinos, zonas amazónicas y la región costa (Hashiguchi et al., 2017). En el 2017 se establece una incidencia de la enfermedad de 100 mil habitantes, de los cuales la leishmaniasis es más común en hombres mayores a los 10 años de edad (WHO & OPS, 2018).

La transmisión depende tanto de los vectores como de los reservorios, para que el parásito complete efectivamente su ciclo de vida por su condición antropozoonótica, se hace énfasis en el incremento de animales mamíferos domésticos como reservorio de *Leishmania*, señalando a los perros como los principales y poniendo en riesgo a animales mamíferos silvestres como lobos y roedores (Kumar, 2019). Kevric et al. (2015) recalca la adaptación rápida de los vectores transmisores a nuevas condiciones climatológicas, a la deforestación y la urbanización.

Considerando el aumento de las cifras de infecciones positivas de importancia pública, se plantea el control y diagnóstico eficaz de *Leishmania*, además del desarrollo de vacunas que contrarresten la proliferación del parásito en personas y animales (Kumar, 2019). El control real, se agrava al no contar con suficientes datos nacionales que relacionen la prevalencia de la enfermedad, el diagnóstico y su tratamiento (Calvopiña, Loor, Lara, Zambrano, & Hashiguchi, 2012).

La exactitud del diagnóstico, es primordial para el tratamiento, sin embargo existe poco desarrollo relacionado con esta enfermedad, debido a la carencia de recursos destinados al control (de Vries et al., 2015). Existen descritos métodos estándar de observación directa, como pruebas microscópicas de sangre y tejidos, ensayos que reportan sensibilidad del 49 al 70% (Muñoz, y otros, 2018). Se aplican también pruebas inmunológicas basadas en serología, pero la parasitemia provoca nula respuesta humoral inmunológica, por lo cual existen escasos anticuerpos que revelen la presencia de *Leishmania* en el organismo (de Vries et al., 2015).

Al no contar con diagnósticos rápidos y específicos, se considera de necesidad primordial, el desarrollo de técnicas nuevas que mejoren la detección temprana y certera.

Para detecciones más precisas, se utilizan técnicas como la PCR, que en Ecuador ha reportado la identificación del 100% de casos positivos a partir de muestras de sangre, teniendo como dianas un gen del citocromo b y la región 18s ribosomal de *Leishmania*. (Muñoz, y otros, 2018). sin embargo la técnica aun no es completamente aplicable (Gedda et al., 2019) y varios targets genéticos como DNA ribosomal, DNA cinetoplasto o HSP, continúan en evaluación (de Vries et al., 2015). Además, para esta técnica diagnóstica se debe considerar los costos de aplicación y disponibilidad para las regiones más rurales donde la enfermedad es más prevalente (Gedda et al., 2019).

La problemática relacionada con la enfermedad no solo se enfoca en la cantidad de casos, la rápida propagación y el diagnóstico específico, sino también las terapias efectivas disponibles.

Los antimonios pentavalentes inhiben enzimas como la Tripanotona Reductasa, y la Topoisomerasa I que desactiva la transcripción y replicación (Vinaud & Junior, 2017) o inhiben rutas metabólicas relacionadas con la formación de ATP (An, Harman, Esen, & Celik, 2019),

fármacos como el Antimoniato de Meglumina o el Estibogluconato de sodio, han reportado efectos secundarios relacionados con cardiopatías, afecciones renales y hepáticas (Nassif et al., 2017). Miltefosina se aplica para control parasitario de *Leishmania* pero es una droga oncológica (Gedda et al., 2019). Anfoterisina B un antifúngico que provoca efectos adversos relacionados con nefrotoxicidad y miocarditis, y finalmente la Pentamidina que genera toxicidad gástrica y cardíaca e incluso resistencia (Gedda et al., 2019).

En ciertos pacientes, exposiciones consecutivas al parásito o lesiones que curan solas, no vuelven a generar cuadros clínicos de riesgo, por lo cual, no se han desarrollado o aplicado planes de vacunación (Thomaz-Soccol et al., 2018). Los indicios de inoculación, mencionan vacunas con *Leishmania* atenuada o *Leishmania* Knock Down con la que se tiene probabilidad de que el parásito recupere su capacidad patogénica, mencionan también vacunas con proteínas recombinantes, vacunas de DNA pero tienen la probabilidad de integrarse al genoma del portador (Thomaz-Soccol et al., 2018).

Finalmente las propuestas terapéuticas, se basan en la aplicación de anticuerpos anti parasitarios, que inhiban las infecciones dérmicas, que funcionen como profilácticos y permitan el desarrollo de técnicas de diagnósticas. (Thomaz-Soccol et al., 2018). Considerando estos objetivos, se podría generar anticuerpos policlonales aviares con afinidad parasitaria.

Haciendo uso de la tecnología de IgY, que comprende en la obtención de anticuerpos de alta especificidad en modelos *In vivo*, a partir de la inoculación con un antígeno particular a gallinas ponedoras. Los animales levantan una respuesta inmunológica humoral, de esta señal, se generan anticuerpos en el suero sanguíneo y estos son transferidos a su nueva descendencia y almacenados en la yema de los huevos (Amro, Al-Qaisi, & Al-Razem, 2018). De esta forma, las

inmunoglobulinas aviares encontradas en huevos son de tipo A, M e Y, donde las IgY pueden ser moduladas e inducidas para detectar antígenos puntuales, además de ser las más abundantes y las únicas encontradas en yema (Pagliari, y otros, 2017).

Esta tecnología se ha presentado como alternativa a la producción de anticuerpos en mamíferos pequeños, al uso de menos animales y con tratamientos menos invasivos y más sencillos (Amro et al., 2018). Además, representa una mayor producción proteica de anticuerpos con pocas dosis de antígeno inoculado y considerando la distancia genética entre mamíferos y aves, el uso de los IgY en otras especies es completamente aplicable ya que no generan respuestas inflamatorias durante tratamientos inmunológicos (Esmailnejad et al., 2019).

La efectividad de las inoculaciones mantendrán los títulos altos de anticuerpos, así como mejorará la especificidad de los mismos durante largos periodos de tiempo (Müller et al., 2015). Los anticuerpos resultantes pueden ser empleados para controlar virus, parásitos y bacterias, como neutralizantes de toxinas y antígenos, inhibidores de enzimas bacterianas, anti adherentes bacterianos (Müller et al., 2015), activadores de leucocitos y estimulantes de maduración para linfocitos de tipo B (Lee, Syed, Choo, & Herng, 2017).

Del mismo modo se han diseñado IgY para parasitemias graves, como para *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma cruzi*, de los cuales, *T. cruzi* también es causal de una enfermedad desatendida, la enfermedad de Chagas (Málaga-Machaca et al., 2017), este parásito es genéticamente similar a la *Leishmania*, ya que pertenecen a la familia *Trypanosomatidae* (Grando et al., 2017).



Los anticuerpos aviares policlonales se han usado tanto en el área médica humana, como en el área veterinaria para animales domésticos y productores, como alternativa al uso de antibióticos para bacterias entéricas y bacterias resistentes, que afecta la calidad y cantidad del ganado y sus productos. Se han podido utilizar además como agentes neutralizantes de venenos de serpientes y escorpiones (Huang & Ahn, 2019).

Dado a las ventajas que presenta la producción de anticuerpos aviares, se propone el desarrollo y aplicación de la tecnología IgY para la obtención de inmunoglobulinas policlonales anti *Leishmania mexicana*, como propuesta diagnóstica mediante técnicas de ELISA y Western Blot, incluso como biomedicamentos disponibles frente a la creciente incidencia de casos reportados en el país.

### **1.3. Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Obtener inmunoglobulinas aviares IgY contra *Leishmania mexicana*.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Obtener antígeno de *Leishmania mexicana* e inocular en gallinas de raza Lohmann Brown.
- Obtener y purificar inmunoglobulinas aviares tipo IgY a partir de yemas de huevos de gallinas inmunizadas.
- Caracterizar inmunoglobulinas IgY mediante Western Blot y ELISA.

## CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Leishmania mexicana*

La *Leishmania* es un protozoo intracelular de la familia *Trypanosomatidae*, del orden *Trypanosomatida* del género *Leishmania* (Torres-Guerrero et al., 2017). Es parásito digenético, que presenta forma flagelar en su vector transmisor, denominado como promastigote, y cambia a su forma sin flagelo en su huésped mamífero como amastigote (Kumar, 2019).

*Leishmania* es transmitida por vectores, que para el hemisferio occidental, comprendiendo la región sur América, el vector responsable es la mosca de arena hembra del género *Lutzomia*. Mientras que para el hemisferio oriental el género del vector es conocido como *Phlebotomus* (Kevric et al., 2015).

El ciclo de infección de *Leishmania* comprende la fisión binaria de los promastigotes en el intestino de la mosca de arena, para luego ser liberados en el flujo sanguíneo del reservorio mamífero, donde los macrófagos fagocitan y almacenan *Leishmania* en forma de amastigote (Kevric et al., 2015; Sundar & Singh, 2018).

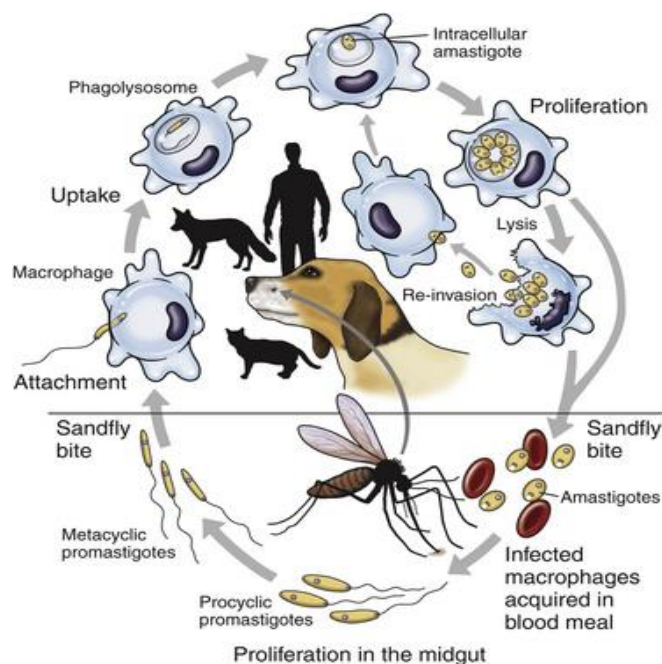
La transmisión de *Leishmania* es de tipo zoo antroponótica en un ciclo: transmisor - vector - huésped. En la región occidental como huéspedes y reservorios, reportaron a animales mamíferos como roedores pequeños y animales domésticos como los perros (Torres-Guerrero et al., 2017), que post infección, permanecen asintomáticos por el mecanismo evasor del parásito hacia el sistema inmunológico, permitiendo una proliferación activa de *Leishmania*, aumentando su concentración en él huésped (Courtenay, Peters, Rogers, & Bern, 2017).

En el ciclo de infección, la picadura de la mosca de arena en mamíferos libera un gel de proteofosfoglicanos que contiene promastigotes de *Leishmania*, esta sustancia del gel resulta inmunoestimuladora y desencadena el reclutamiento de los neutrófilos y macrófagos. Los Promastigotes invaden a los neutrófilos y actúan como caballos de Troya hacia los macrófagos y los infecta (Sundar & Singh, 2018).

Los promastigotes interactúan con los macrófagos mediante receptores, siendo la vía más efectiva los receptores de complemento CR3 y CR1, mediado por los LPS y metaloproteínas como la GP63, de esta forma los macrófagos los capturan y estos entran en un fagolisosoma inmaduro para proliferar (Podinovskaia & Descoteaux, 2015; Sundar & Singh, 2018). Dentro de los macrófagos se diferencia los promastigotes hacia amastigotes (Sundar & Singh, 2018).

Continuando con el ciclo, la mosca de arena genera una picadura en el portador, e ingesta sangre con amastigote hacia el aparato digestivo y estos sobreviven a las enzimas digestivas al ser encapsulados en una matriz peritrófica, donde cambian de morfología hasta promastigote nuevamente, y luego liberados en el intestino medio de la mosca y se dividen por fisión binaria y se mantienen adheridos a las microvellosidades del tejido mediado por los LPS, consecuentemente alcanzan su forma infectiva hasta promastigotes metacíclicos y se acumulan la válvula estomodeal (Sundar & Singh, 2018) junto con un gel de proteofosfoglicanos, que provoca la regurgitación en la mosca y con ello la liberación de parásito mientras la mosca se alimenta de otro huésped (Podinovskaia & Descoteaux, 2015) (**Figura 4**).

El cambio morfológico entre promastigote hacia amastigote, es mediado por el incremento de temperatura, pH y capturan Hierro (Podinovskaia & Descoteaux, 2015), dentro de vacuolas parasitoforas que no maduran en fagolisosomas, dentro de estas vacuolas proliferan en estadio amastigote hasta romper los macrófagos y liberarlos en el tejido (Sundar & Singh, 2018).



**Figura 4.** Ciclo de desarrollo y proliferación de *Leishmania* mediada por vectores, hacia sus huéspedes y reservorios.

Fuente: (Petersen, 2016)

Para asegurar la estancia del parásito en su hospedero, *Leishmania* tiene varios modelos de evasión del sistema inmunológico, el principal afectado es aquel desarrollado por los macrófagos. En el desarrollo de la inmunidad adaptativa, los macrófagos después de la fagocitosis de un antígeno, lo degradan en un fagolisosoma y lo presentan en el complejo mayor de histocompatibilidad, HCM II, para luego ser expuestos en la superficie celular para activar cascadas inmunológicas.

*Leishmania* tiene la capacidad de inactivar la maduración de los fagolisosomas evitando la degradación y presentación cruzada. Interactuando en este proceso proteínas parasitarias como el LPS y la GP63, que actúan directamente en la modulación de la VAMP8, encargada de la fusión de membranas en particular del ensamblaje del fagosoma. Lo que impide el procesamiento del antígeno, evitando la activación de los linfocitos T y de células dendríticas por el MHC II, inhabilitando por completo el sistema de reconocimiento y destrucción (Matte et al., 2016).

### **2.1.1. Manifestación clínica**

Post infección, los signos clínicos se presentan dependiendo de: la especie, la dosis de *Leishmania* transmitida y del estado inmunológico del huésped infectado. Cuando este logra controlar la proliferación de los promastigotes por los linfocitos T, la leishmaniasis cutánea, suele curarse de forma autónoma, pero en otros casos la proliferación es incontrolable y la parasitemia puede ser incurable (Kevric et al., 2015).

La leishmaniasis cutánea se caracteriza por manifestar lesiones y ulceraciones en el sitio de picadura. Se desarrolla desde pápulas, luego vesículas, y pústulas que rompen y generan la ulceración final con duración de entre 5 meses hasta 20 años. En el caso de no presentar segundas infecciones, las ulceraciones no suelen ser dolorosas, pero están relacionadas con cuadros febriles e inflamación (Torres-Guerrero et al., 2017).

Las lesiones pueden ser puntuales, satélites o incluso pueden expandirse a nivel de mucosa (de Vries et al., 2015). También existen variaciones en el cuadro clínico, como la leishmaniasis cutánea difusa donde hay baja reacción inmunológica de detección por los linfocitos T y mayor diseminación provocada por la alta cantidad de amastigotes fagocitados (Franco-Paredes & Santos-Preciado, 2015).

La mayoría de especies de *Leishmania* desencadenan leishmaniasis cutánea, pero depende la distribución y localización geográfica, determinando que *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. amazonensis* son las más comunes en América Latina (Franco-Paredes & Santos-Preciado, 2015; Kevric et al., 2015; Torres-Guerrero et al., 2017).

Otra manifestación, es la leishmaniasis mucocutánea, que destruye la mucosa nasofaríngea (Torres-Guerrero et al., 2017) generando complicaciones en boca, faringe y laringe, bloqueando las vías respiratorias y generando sangrados en el tejido afectado (Franco-Paredes & Santos-Preciado, 2015).

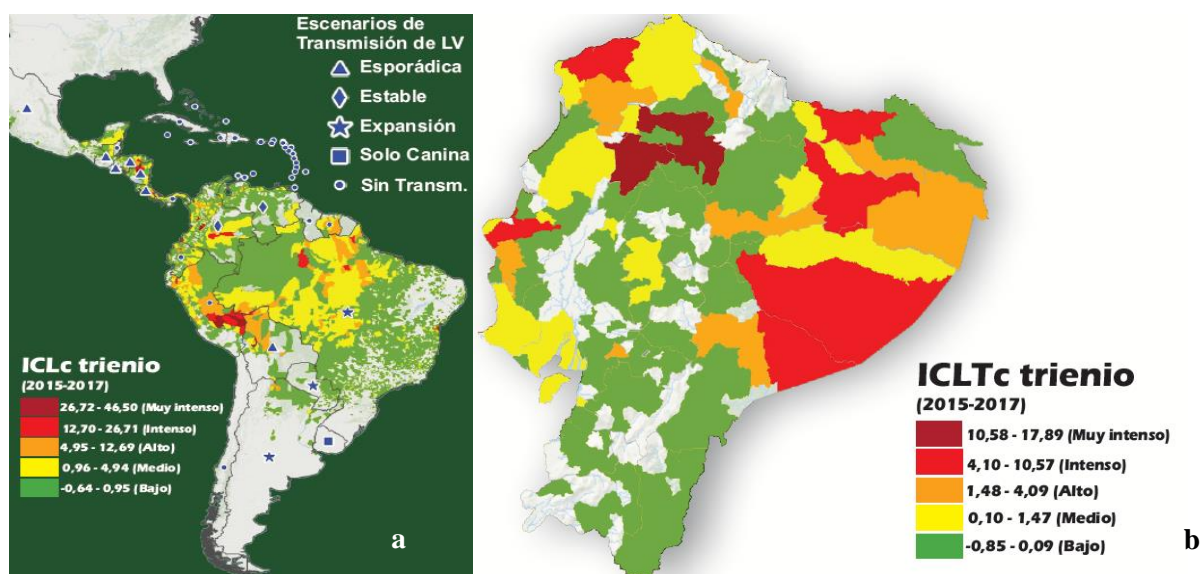
La leishmaniasis visceral, es el cuadro clínico más agresivo, en el cual se presentan cuadros de neutropenia, ictericia, trombocitopenia, hemorragias, disenterías (Franco-Paredes & Santos-Preciado, 2015), anemia, hepatomegalia, leucopenia, anorexia, fiebre, debilitamiento y sudoraciones (Torres-Guerrero et al., 2017). En el caso de no ser tratado, se considera como una patología letal. En la región oriental, es conocido como fiebre negra y es asociado principalmente con *L. infantum*, *L. amazonensis* y *L. tropica*, pero en pacientes inmunodeprimidos, *Leishmania mexicana* también puede desencadenar leishmaniasis visceral (Franco-Paredes & Santos-Preciado, 2015; Torres-Guerrero et al., 2017).

### **2.1.2. Situación actual en el Ecuador**

Para la distribución del parásito en América del Sur, según la WHO, existen 17 países para el año 2017 que presentan casos de Leishmaniasis, principalmente cutánea. Se reporta un valor indicativo, denominado trienio para establecer valores de relación entre la incidencia de cada tipo de leishmaniasis y la media de casos según el país (OPS, 2019). Un reporte mostrado en la **Figura 5a**, muestra al Ecuador con un estratificación de riesgo medio para leishmaniasis cutánea.



Para la región Sur Americana hasta el año 2017 se describe un promedio por año de 55 mil casos, con decaimiento de la incidencia para el 2015 y un aumento del mismo para el 2016 (WHO & OPS, 2018). La mayoría de casos reportados corresponden a Brasil, Colombia, Perú y Nicaragua, con aumento de la prevaencia en El Salvador, Argentina, México, Ecuador y Costa rica (OPS, 2019).



**Figura 5.** Sitios geográficos de riesgo para *Leishmania* cutánea  
Índice de casos e incidencia de Leishmaniasis cutánea en: a. Sur América y b. Ecuador  
Fuente: (WHO OPS, 2018; OPS, 2019)

En relación con los países mencionados, los rangos geográficos característicos para el desarrollo de *Leishmania*, es en altitud de entre 0 a 1500 msnm y una temperatura ambiental superior a los 20°C (Torres-Guerrero et al., 2017), concordando estos datos para los países tropicales mencionados. Particularmente en Ecuador, se ha podido encontrar *Leishmania* entre los 820 y 2500 msnm (Hashiguchi et al., 2018).

Las cifras en Ecuador hasta el 2017, fue de Leishmania cutánea en 22 provincias del país (Hashiguchi et al., 2017). Existiendo con mayor prevalencia en sitios rurales de la región costera, la pendiente Andina y la Amazonía, como indica la **Figura 5b** (WHO OPS, 2018).

La Leishmaniasis se conoce como una enfermedad infecciosa de notificación obligatoria, desde el 2005. Siendo Pichincha la provincia más afectada, continuando con Esmeraldas, Manabí, Morona, Orellana y Bolívar (Allende, Kennedy, & Delta, 2018). Manabí es la tercera provincia con aumento de la incidencia de casos, relacionados con los desastres naturales aquí ocurridos como el terremoto de abril del año 2016 y el fenómeno del niño, que en consecuencia aumentó la temperatura ambiental, las precipitaciones y el desplazamiento humano. Por otro lado, se reporta el desconocimiento del personal médico de la enfermedad, por lo que dificulta el diagnóstico y tratamiento (Allende et al., 2018)

Relacionando esta información, existen cuadros de leishmaniasis no reportados, por lo tanto la cifra final de infecciones no es oficial, indicándose hasta el 2014, 21.305 casos (Hashiguchi et al., 2017) y una incidencia anual de 1632 casos, la mayoría reportada con LC (1605 casos) y 27 LM (WHO & OPS, 2018).

El cuadro clínico relacionado con la leishmaniasis cutánea, es la presentación de estadios consecutivos que consta de úlceras, pápulas, nódulos, cicatrices y eritema con duraciones de hasta 5 años (Hashiguchi et al., 2017). También se ha encontrado leishmaniasis cutánea andina, que genera lesiones pequeñas en la piel con duración de dos años aproximadamente y cicatrices profundas y estriadas (Hashiguchi et al., 2017).

En cuanto al vector transmisor, en Ecuador se reporta cuatro especies de *Lutzomia* y como huéspedes y reservorios portadores positivos silvestres, se mencionan las ardillas rojas, cusumbos, osos hormigueros de oriente, perezosos de dos dedos, ratas y perros (Hashiguchi et al., 2017). De los reservorios mamíferos en América del sur, los perros son el más importantes para *Leishmania*, encontrándose en ellos, *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. tropica* y *L. major*. Concluyendo que en regiones con más prevalencia de canes, la probable exposición a la infección hacia humanos es mayor (Franco-Paredes & Santos-Preciado, 2015).

### **2.1.3. Tratamientos y prospecto terapéutico**

En cuanto al tratamiento, en Ecuador, como primera línea se utiliza Antimoniato de Meglumina (Glucatime) y como segunda línea, anfotericina B desoxicolato (Allende et al., 2018; WHO & OPS, 2018), pero la mayoría de pacientes abandona el tratamiento por los efectos secundarios que produce después de su uso. Dentro de las desventajas de la aplicación principalmente de los antimoniatos, se enlista las aplicaciones dolorosas, disfunción hepática, vómitos y principalmente la discontinuación del medicamento por el poco acceso y disponibilidad en los centros de salud (Hashiguchi et al., 2017).

El uso de antimoniato de meglumina (AM), es utilizado por 21 días continuos de forma intramuscular, en Ecuador se ha reportado una baja tasa de recuperación (80%), con probabilidades de reactivación de la parasitemia (15%) (Calvopiña et al., 2017). Incluso se relaciona con la alta toxicidad del medicamento y otros efectos secundarios como cuadros febriles, debilitamiento, dolor de cabeza y palpitaciones. Sin embargo, es el tratamiento recomendado por el Ministerio de Salud Pública del país (Calvopiña et al., 2017).

Concentraciones altas de antimoniatos, mayores a 21 mg/Kg, administrados intramuscularmente, han demostrado desencadenar reacciones adversas sistémicas, por lo cual se mantiene esta dosis como base. Tampoco se puede administrar a niños menores de dos años, mujeres embarazadas y a personas con problemas cardiacos, renales o hepáticos (Calvopiña et al., 2017).

Estudios relacionados con el uso de AM, mencionan la reducción de hemoglobina, urea, plaquetas y células inmunológicas como leucocitos, neutrófilos y linfocitos (An et al., 2019). La “Food and Drug Administration” (FDA) ha clasificado al AM como una droga tipo C, ligado a efectos adversos durante el desarrollo embrionario, desencadena daño en el DNA y posee efecto sobre órganos y tejido sanguíneo, renal, hepático y cardiaco. Además de reducir la expresión genética de genes anti apoptóticos, induciendo a la apoptosis celular en pruebas *In vitro* (Khosravi et al., 2019).

Estudios clínicos del 2018 con antimoniatos usados de forma independiente y en combinación con otros fármacos como el Tamoxifen, ambos reportaron un porcentaje de eficacia del 53% de 38 pacientes con leishmaniasis cutánea provocada por *Leishmania amazonensis*. Mientras que los efectos adversos reportados, se establecieron para el 87% de los pacientes, acotando síntomas como artralgia, mialgia, dolor de cabeza y angiodema. Sin embargo los autores no indican resultados satisfactorios de eficiencia post tratamiento y mencionan el requerimiento de tratamientos nuevos frente a los escasos y poco seguros tratamientos disponibles (Machado et al., 2018).

Además de la toxicidad y la baja eficacia, los tratamientos convencionales pueden desarrollar resistencia, como es el caso de la anfotericina B, un antimicrobiano y antifúngico con actividad anti *Leishmania*, que a su vez está ligado con toxicidad renal, cardiaca y hepática. Por otro lado la

anfoterisina B liposomal, ha mostrado una menor toxicidad sin embargo la producción resulta costosa y poco viable. Del mismo modo ocurre con la Miltefosina, que genera resistencia durante periodos largos de aplicación, adicionando teratogenicidad y toxicidad gástrica (Akbari, Oryan, & Hatam, 2017).

Los nuevos enfoques para la producción de nuevas drogas para leishmaniasis, centran sus objetivos en la producción a bajo costo, baja toxicidad, resistencia, mayor eficiencia y fácil administración, por ello se han planteado nanomedicinas a manera de transportadores para aumentar la biodisponibilidad y la entrega de drogas antileishmania a células específicas como los macrófagos. La micro encapsulación o el recubrimiento de nanopartículas con anticuerpos con dianas específicas se menciona como un método alternativo y reemplazar el uso de drogas anti Leishmania tradicionales (Gedda et al., 2019). Frente a esta posibilidad, se plantea la formulación de anticuerpos policlonales de amplio reconocimiento que posean como diana estratégica al parásito de Leishmania.

## **2.2. Inmunoglobulinas Y**

### **2.2.1. Historia y relación evolutiva**

Las inmunoglobulinas de tipo Y, son los anticuerpos de mayor concentración en sangre de aves (Ferreira Júnior et al., 2018). Descritos como anticuerpos maternos de transferencia en el año de 1893 por Felix Klemperer (Kaiser, 2014). Leslie y Clem en 1969 los reconocieron como IgG dada a su funcionalidad homóloga, pero en años posteriores fueron encontrados IgY en otros animales vertebrados no mamíferos, como reptiles (Zhang, Calvert, Sutton, & Doré, 2017).

Los IgY además de estar presentes en el suero sanguíneo, por mecanismos de transferencia y absorción, son localizados en las yemas de los huevos como mecanismo de refuerzo inmunológico para el desarrollo embrionario (Ferreira Júnior et al., 2018).

Los anticuerpos tienen un amplio espectro de especificidad y capacidad de unión a antígenos, así como mediar la presentación y procesamiento de linfocitos B y las células dendríticas, también depuran de compuestos exógenos, restos celulares y catabólicos (Kaiser, 2014).

En aves, se encuentran tres isotipos de anticuerpos: IgA, IgM e IgY. En las gallinas, estos anticuerpos son formados por linfocitos tipo B en la Bursa de Fabricio y solo los IgY pueden ser transferidos desde la sangre de la progenitora hasta ovocitos maduros (Ferreira Júnior et al., 2018; Atsushi Murai, 2013). Durante las diversas respuestas inmunológicas, los IgM son resultado de la respuesta humoral primaria, mientras que los IgY se forman durante respuesta secundaria. Los IgA son responsables de la primera línea de defensa, localizados principalmente en mucosa (Kaiser, 2014). Consecuentemente a los IgY se han denominado como anticuerpos aviares responsables de la activación y desarrollo de la respuesta inmunológica adaptativa humoral, frente a la exposición consecutiva de un antígeno (Ferreira Júnior et al., 2018).

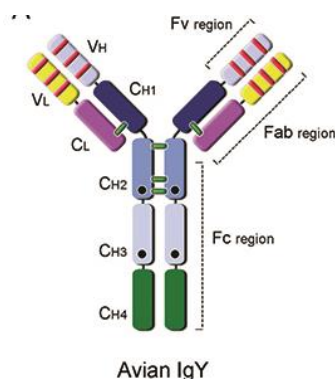
Según evidencia filogenética, los IgY son ancestros evolutivos de los anticuerpos de mamíferos IgG e IgE. La diferenciación de anticuerpos comienza con los IgM como ancestro inicial, del cual a partir de una duplicación de genes, dieron paso a la formación de los IgA. Mientras que los IgY tienen una estructura mixta entre IgM e IgA en sus cadenas pesadas. Posteriormente, según estudios de convergencia evolutiva, se identifica los IgG e IgE que parten desde los IgY, y los diferencia entre ellos el apareamiento en su estructura una forma de bisagra característica de los anticuerpos de mamíferos (Zhang et al., 2017).

### 2.2.2. Estructura proteica y caracterización

Las inmunoglobulinas tipo Y son glicoproteínas monómeras solubles en forma de Y, que presentan una región cristalizable denominada Fc y una región de unión al antígeno denominada Fab. En la región Fc se encuentran las cadenas pesadas (CH) con cinco dominios altamente conservados de cisteína y triptófano C<sub>v</sub>1-4, de los cuales los dos últimos dominios conservados, C<sub>v</sub>3-4 tienen relación estructural con los IgG e IgE respectivamente (Hartle, Magor, Gobel, & Davison, 2014; Zhang et al., 2017)

En Fab, se encuentran las cadenas ligeras (CL) y la región variante ligera y pesada (VL, VH) por las cuales el anticuerpo será capaz de unirse a los antígenos. Entre las cadenas pesadas y ligeras, se forman puentes disulfuro que mantiene unidas las estructuras, ya que los IgY carecen de la estructura de bisagra (Ratcliffe & Hartle, 2014) (**Figura 6**).

En cuanto al peso molecular, se conoce son de entre 165 y 206 kDa (Kaiser, 2014), de los cuales, las CH tiene un peso promedio de entre 70 y 50 kDa, mientras que las CL tienen un peso de entre 37 y 25 kDa (Grando et al., 2017), siendo los IgY los anticuerpos más livianos en el suero sanguíneo de las aves, pero es ligeramente más pesado que los IgG mamíferos (Spillner et al., 2012).



**Figura 6.** Estructura de una inmunoglobulina aviar de tipo IgY.  
Fuente: (Harley & Vieira-Pires, 2016)

En el suero sanguíneo de las aves, los IgY se encuentran en una concentración de entre 5 y 15 mg/mL, mientras que durante la transferencia hacia los ovocitos maduros, se puede encontrar entre 5 y 25 mg/mL (Gaetani, Ambrosi, Ugo, & Moretto, 2017). En total, Los IgY comprenden un 75% del total de todos los anticuerpos circundantes (Müller et al., 2015).

La funcionalidad de los anticuerpos depende de la estructura, determinando que, la región variable Fab es la mediadora del reconocimiento y unión al antígeno, mientras mayor maduración haya en la producción de los anticuerpos, mayor será la capacidad de afinidad. La región Fc de los anticuerpos está involucrada con la modulación e interacción con células inmunológicas (Beck et al., 2010).

Considerando la estabilidad de los IgY, mantienen su estructura y su actividad en rangos de pH de entre 4 y 9, en temperaturas mayores de 65°C, e incluso pueden mantenerse estables por 3 meses en temperaturas menores a 50°C (Müller et al., 2015). la resistencia térmica y otros aspectos fisicoquímicos de los IgY son atribuidos por su capacidad de glicosilarse, estos sitios de glicosilación se encuentran en la región Fc e intervienen en procesos fisiológicos (Spillner et al., 2012).

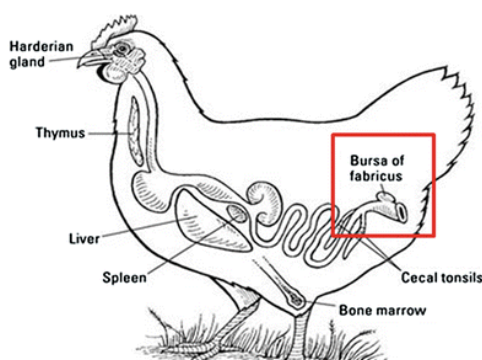


La funcionalidad de los IgY está ligado principalmente a la neutralización de antígenos, al igual que su estructura homóloga los IgG (Lee, Atif, Tan, & Leow, 2017), promueve la opsonización de los antígenos y las reacciones anafilácticas, puede unirse a monocitos y linfocitos con la capacidad de activar o inhibir receptores celulares del mismo modo en el que interactúa con los receptores Fc en células como lo linfocitos B, macrófagos, monocitos y células NK (Spillner et al., 2012).

### **2.2.3. Respuesta innata y adaptativa en aves**

#### **2.2.3.1. Órganos linfoides primarios**

El timo y la Bursa de Fabricio, son tejido linfoide hematopoyético, que genera células maduras como los linfocitos T y B respectivamente. El timo es una estructura lobular localizada en ambos lados del cuello de las aves rodeada de venas y capilares arteriales, posee una zona subscapular, donde se genera la proliferación de los linfocitos T inmaduros, que migran luego de su maduración. La Bursa de Fabricio, se ubica entre la cloaca y el sacro de las gallinas, que posee epitelio plegado a manera de folículos. Este órgano linfoide se encuentra rodeado de una capa muscular y es activa durante la maduración sexual, se atrofia y pierde su actividad a los 6 o 7 meses de vida (Oláh, Nagy, & Verdelde, 2014). Durante su actividad linfoidea activa, es encargada del desarrollo y a formación de los linfocitos B los cuales se encargan de la diversificación de inmunoglobulinas (Spillner et al., 2012).



**Figura 7.** Órganos linfoides aviares, Timo y la Bursa de Fabricio.  
Fuente: (Ribatti, 2015)

### 2.2.3.2. Respuesta innata

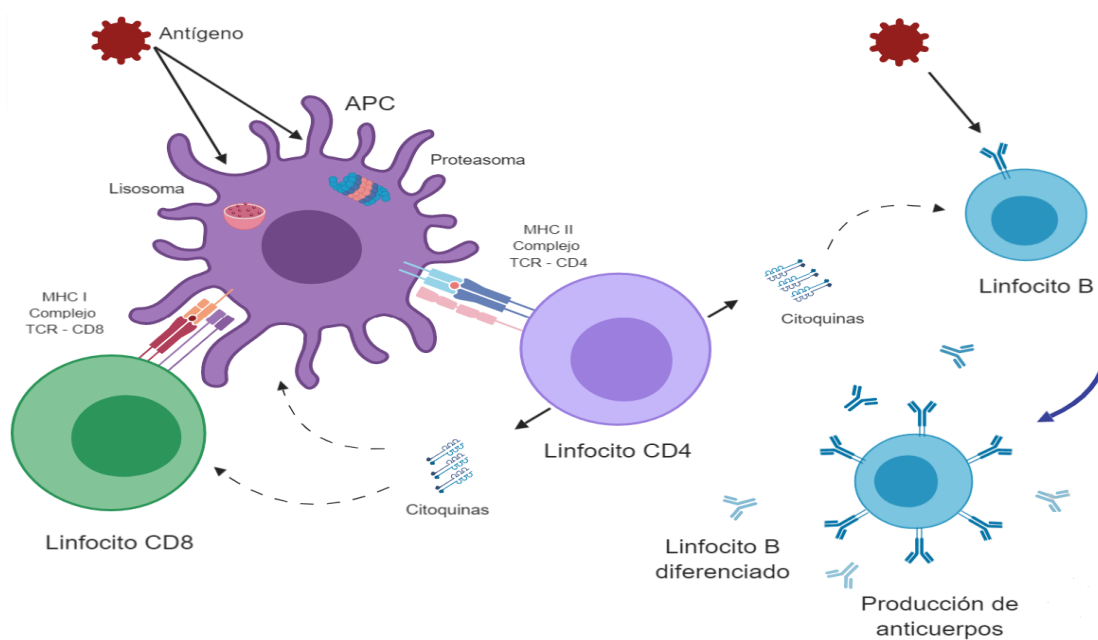
La respuesta innata es caracterizada por activarse de forma rápida, gracias a la alta frecuencia de reconocimiento mediado por receptores celulares, que en contra parte, tienen baja discriminación de antígenos. Actúa como barrera constitutiva estando cubierta de sustancias antibacterianas que son inducibles y varían en su composición cuando entran en contacto con un patógeno (Juul-Madsen, Viertlböeck, Härtle, Smith, & Göbel, 2014). El sistema de complemento también es parte de la respuesta innata, que consta de proteínas que se activan con el reconocimiento de microorganismos, estimulando la fagocitosis, activando procesos inflamatorios, la eliminación de células target y finalmente activa la respuesta de linfocitos T y B (Juul-Madsen et al., 2014). Las células involucradas en este proceso son principalmente granulocitos, monocitos, macrófagos, células NK y trombocitos (Juul-Madsen et al., 2014).

El reconocimiento de un antígeno se por medio de receptores PRRs que detectan PAMPs, la detección mediada por los receptores es estimulada por los adyuvantes. (Juul-Madsen et al., 2014).

### 2.2.3.3. Respuesta Adaptativa

La inmunidad adaptativa se activa de forma más eficiente al segundo contacto con los antígenos, provocado por la memoria inmunológica. Esta capacidad de detección, mejora por los clones celulares activados previamente en la respuesta innata y porque se aumenta la frecuencia de células específicas de reconocimiento (Kaiser, 2014).

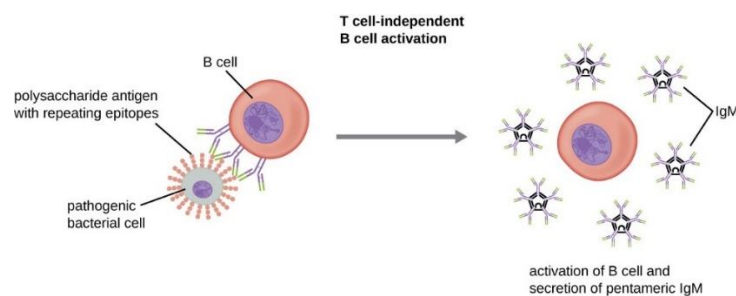
Para el desarrollo de este sistema, la presentación de antígenos activa la respuesta inmunológica, comenzando con el procesamiento del antígeno de forma exógena o endógena. De forma endógena el antígeno es desnaturalizando en el proteasoma y los péptidos resultantes son expuestos en APCs junto con el complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC I). Los antígenos expresados activan linfocitos T por el reconocimiento con receptores de tipo TCR, desencadenando la proliferación de linfocitos CD8+ citotóxicos para destruir patógenos intracelulares. En el procesamiento exógeno, comprende la internalización del antígeno, siendo fagocitado por macrófagos y digeridos en fagolisosomas con proteasas ácidas para su fragmentación. Los fagolisosomas almacenarán y conectarán con vesículas que contienen moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II). Este complejo antígeno-MHC II será expresado en la membrana celular ya sea de los macrófagos o en células dendríticas, para luego ser reconocidos por Linfocitos T helper de tipo CD4+ (Ratcliffe & Hartle, 2014) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Sistema de activación de la inmunidad adaptativa mediado por linfocitos CD4 helper y las APC.

Fuente: (Ferreira Júnior et al., 2018).

De manera simultánea los linfocitos B son activados hasta la expansión clonal por dos señales. La primera, independiente de Linfocitos T helper, y es mediada por los linfocitos B maduros por los receptores BCR que identifican el antígeno, receptores tipo Toll y señales PAMPs. Este proceso genera la producción de IgM encargados de la respuesta innata (Abbas, Lichtman, & Pober, 2000) (**Figura 9**).

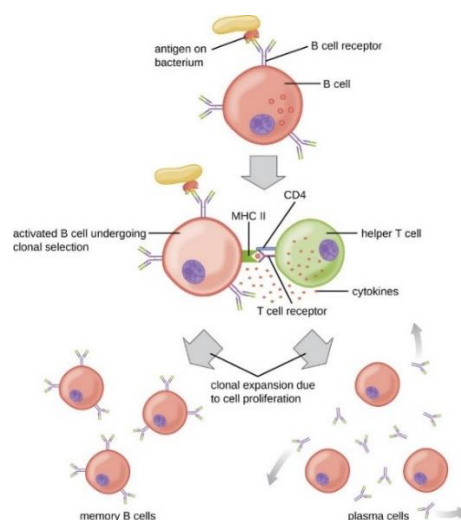


**Figura 9.** Activación de células B independiente de células CD4 para la producción de IgM.

Fuente: (OpenStax, 2018a)

En cuanto a la segunda señal, los linfocitos B, interactúan con el antígeno por medio de sus BCR y son procesados y presentados al MHC II, exponiendo en la superficie celular péptidos de antígeno. Luego le corresponde a la interacción de estos Linfocitos B con los linfocitos CD4+ helper, a través de la expresión del péptido por el MHC II, por medio del ligando de unión CD40L respectivamente (Ratcliffe & Hartle, 2014). (**Figura 10**)

La los linfocitos helper inducen a la maduración y al cambio de clase que permite la producción de los diferentes isotipos de anticuerpos. Una vez que el linfocito B fue activado, se inicia su proliferación y la diferenciación como célula plasmática productora de anticuerpos, durante la diferenciación el linfocito B pierde su receptor BCR y sintetiza anticuerpos liberándolos en el plasma. Cuando las células han proliferado y generado suficientes células de memoria, se produce el “class switching” que corresponde a la orden moduladora para producir una clase diferente de anticuerpo de IgM a IgY correspondiente a la respuesta innata y adaptativa respectivamente (Kaspers, 2014).



**Figura 10.** Activación de linfocitos B para la expansión clonal para la producción de IgY.

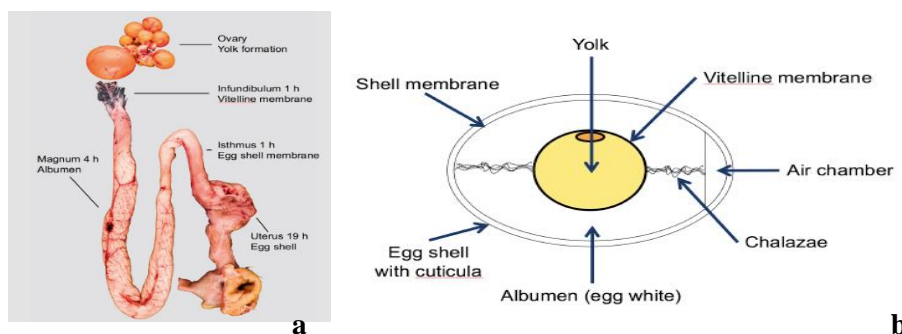
Fuente: (OpenStax, 2018a).

#### **2.2.4. Maduración de ovocitos y transferencia de anticuerpos**

Durante la madurez reproductiva de la gallina, en los ovarios aun inmaduros, se desarrollan los folículos, que dentro de estos, se encuentran los ovocitos y representa a la yema de los huevos futuros. Los ovarios alcanzan su madurez, durante la semana 17 y 25 de vida, lo que permite la ovulación y liberación de un ovocito maduro hasta el oviducto (Wigley, barrow, & Schat, 2014).

El oviducto consiste de una estructura tubular que conecta el ovario y la cloaca de la gallina, en esta estructura se generan las capas que recubren al ovocito maduro y proveen la estructura del huevo como tal (Wigley et al., 2014).

El ciclo para la formación de un huevo completo, se produce cada 24 horas desde la ovulación hasta la ovoposición (**Figura 11a**). La formación en el tracto reproductivo comienza con la liberación del óvulo hacia el infundíbulo, donde se constituye la membrana vitelina y la primera capa de albumen, luego pasa hacia el mágnium para la formación completa del albumen, luego hacia el Istmo y formar aquí las primeras membranas del cascarón, para que en el útero se complete la cascara como paso final y se libere un huevo entero (**Figura 11b**) y el ciclo se repita nuevamente (Kaspers, 2016).



**Figura 11.** Oviducto aviar y conformación de un huevo completo.

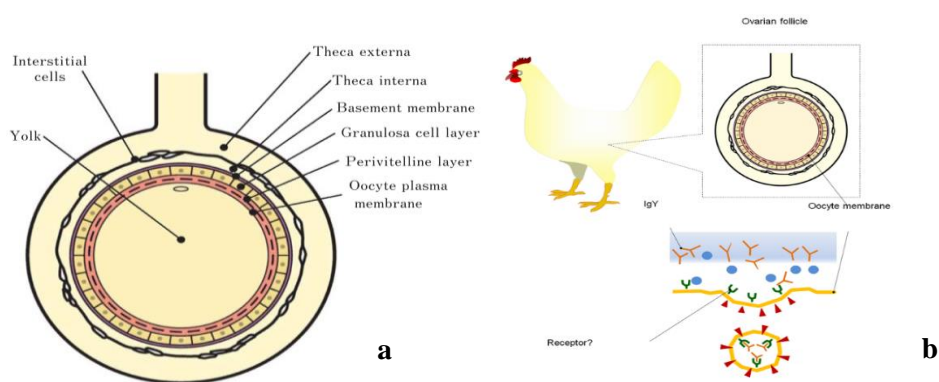
- a. Estructura del aparato reproductivo de gallina donde se desarrolla el ovocito liberado.
- b. Componentes estructurales de un huevo de gallina.

Fuente: (Kaspers, 2016)

Por otro lado, el mecanismo de transferencia de IgY es análogo a la transmisión de anticuerpos a través de la placenta en los mamíferos. En el cual, los anticuerpos son selectivamente trasladados desde el suero de la sangre hasta la yema del embrión (Müller et al., 2015), Los únicos anticuerpos encontrados en la yema son aquellos generados por respuestas tardías humorales, es decir los IgY. Mientras que IgM e IgA, se encuentran en el albumen (Lee et al., 2017).

La transferencia de inmunoglobulinas, comienza en la estructura ovárica folicular (**Figura 12a**) a los cinco o seis días post inoculación y activación de la respuesta adaptativa humoral (Schijns, Zande, Lupiani, & Reddy, 2014). A través de la theca, los precursores de yema son entregados desde el plasma sanguíneo hasta el ovocito maduro, pasando a través de la membrana basal, las células granulosas, la capa pre vitelina y por endocitosis de la membrana plasmática hacia la yema (Atsushi Murai, 2013). Por medio de este proceso son entregados precursores de lipoproteínas de baja densidad (VLDL) y vitelogenina (VTGG) (Atsushi Murai, 2013).

Por otro lado, la transferencia vertical de inmunoglobulinas ocurre en dos etapas. La primera de ellas involucra en la estructura folicular (Agrawal, Hirpurkar, Sannat, & Gupta, 2016), donde se sostiene la teoría de la presencia de un receptor de IgY, denominado FcRY, que es similar al receptor FcRn en la placenta para el transporte de IgG en mamíferos. Este receptor transfiere selectivamente los anticuerpos por medio de translocación y endocitosis a través de las membranas de los capilares sanguíneos hasta los folículos ováricos, específicamente a través de la membrana plasmática del ovocito (**Figura 12b**) (Ferreira Júnior et al., 2018; Atsushi Murai, 2013).



**Figura 12.** Folículo ovárico aviar y transporte materno de anticuerpos por selección.

- a. Estructura de un folículo ovárico maduro de gallina.
- b. Teoría de la translocación de IgY maternos desde el plasma sanguíneo hasta el ovocito maduro por medio de receptores de membrana.

Fuente: (Atsuchi Murai, 2013).

La segunda etapa corresponde al transporte de anticuerpos durante el desarrollo final de los huevos a través del oviducto de la gallina, durante el desarrollo del albumen, hacia la clara de los huevos, son transferidos anticuerpos IgM e IgA (Ferreira Júnior et al., 2018).



## 2.3. Tecnología IgY

### 2.3.1. Inoculación de las aves

Este tipo de metodología, se enfoca en la eficiencia productiva de anticuerpos que una gallina a través de sus huevos y mediante del desarrollo de su respuesta inmunológica humoral puede generar (Kaiser, 2014). La producción de anticuerpos policlonales aviáres, se aplica basándose en tres aspectos fisiológicos de las gallinas:

- La respuesta inmunológica adaptativa, que al modularla, produce suficientes anticuerpos específicos para un antígeno particular (Müller et al., 2015).
- Los anticuerpos policlonales IgY pueden producirse y mantenerse en un título constante, según la ruta y la dosis de inoculaciones constantes (Montini et al., 2018)
- La respuesta fisiológica natural de la gallina, asegura una producción constante de huevos durante su vida reproductiva, lo que afirma una fuente continua de anticuerpos (Esmailnejad et al., 2019).

Alrededor de estos tres puntos, se define aspectos de influencia para la producción de IgY, que varían según la ruta de inoculación, la dosis del antígeno y la exposición (Montini et al., 2018).

Las rutas de inoculación suelen ser: intramuscular, intradérmica o subcutánea, siendo la ruta intramuscular la más común, pero la vía subcutánea genera anticuerpos de forma más rápida. La ruta seleccionada dependerá del tipo de antígeno que será suministrado y el adyuvante dispuesto a usar (Montini et al., 2018).

En cuanto a la concentración de antígeno, se menciona que dosis bajas consecutivas pueden ser suficientes para levantar una reacción inmunológica, pero la concentración del antígeno actuará de forma efectiva siempre y cuando esté acompañada de un adyuvante (Montini et al., 2018), para el uso estándar de esta técnica, el adyuvante de Freud completo o incompleto, regulará la liberación del antígeno hacia el organismo del animal inoculado, y generará una reacción inmunoestimuladora (Marcq, Marlier, & Beckers, 2015).

El adyuvante incrementa la inmunogenicidad de un antígeno al interactuar con los receptores PRR de manera indirecta y de forma directa con los PAMPs, para que respectivamente se activen células inmunológicas y se estimule la producción de citoquinas y quimioquinas (Apostólico, Lunardelli, Coirada, Boscardin, & Rosa, 2016).

Los adyuvantes más utilizados suelen ser mezclas complejas como: soluciones acuosas y oleosas, con saponinas o con sales de aluminio. Dependiendo de su composición activarán de forma distinta la reacción inmunológica, por ejemplo, las sales de aluminio interactúan con compuestos lipídicos de la membrana celular de las células dendríticas, que las activa y aumenta la interacción con los linfocitos T CD4+ (Schijns et al., 2014).

Por otro lado, el adyuvante de Freund, se clasifica dentro de los adyuvantes en forma de emulsión, y que puede ser: completo y contener componentes de micobacterium inactivado o incompleto conformándose por una emulsión oleosa. Este adyuvante estimula la respuesta inmunológica innata local, promoviendo la fagocitosis por células APC, la infiltración de leucocitos, la producción de citoquinas y el incremento de anticuerpos (Apostólico et al., 2016; McKee & Murrack, 2017).

En cuanto a la frecuencia de inoculación, la exposición consecutiva al antígeno afianzará la respuesta inmunológica humoral, y para asegurar el proceso se recomienda inoculaciones consecutivas en intervalos de 14 días o una vez a la semana durante siete semanas sucesivas, con la finalidad de desarrollar la memoria inmunológica (Schade et al., 2005).

### **2.3.2. Procesamiento de muestras para la obtención de inmunoglobulinas**

Se recogen los huevos y se procesan para la extracción de IgY, enfocándose en procesos económicos, efectivos, de bajo impacto ambiental y que aseguren una obtención máxima de anticuerpos (Schade et al., 2005).

Se debe considerar la composición de la yema, para utilizar eficazmente la porción que contenga los IgY y mantenerlos estables durante su extracción. La yema se compone de 36% de grasa, 17% de proteína como  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  livetina y 46% agua. En la fracción proteica, las  $\gamma$  livetinas, corresponden al 47% y en esta fracción se encuentran las IgY. Finalmente el 1% corresponde a carotenoides y compuestos inorgánicos (Kaspers, 2016).

El primer paso para la extracción de IgY corresponde a la remoción de la fracción lipídica, en el que se puede emplear pectina, solventes orgánicos como el cloroformo en solución y con centrifugación se separan las proteínas solubles y precipita los lípidos de manera efectiva (Júnior, Santos, Bassi, Bittar, & Bittar, 2017). Se continúa con la precipitación de proteínas, el cual puede generarse con PEG 6000 en concentraciones que aumentan progresivamente, e incluso puede ser utilizado para la separación de lípidos como primer paso. La precipitación con PEG se determina como método estándar ya que mantiene la especificidad y altos títulos de anticuerpos (Júnior et al., 2017). También se utilizan procesos combinados Precipitación-Purificación, que utiliza sales como sulfato de amonio o de sodio (Lee et al., 2017).

La precipitación de proteínas con sales de sulfato, consiste en reducir la solubilidad de una proteína al aumentar la concentración de sal usando soluciones saturadas, este proceso se conoce como “Salting out”, en el cual por un proceso de solvatación, la proteína interactúa con un cosolvente en este caso la sal, la misma que aumenta la tensión superficial del agua e incrementa la reacción de hidrofobicidad entre el agua y la proteína, plegándose junto a la sal, para reducir su tamaño y el contacto con el agua y finalmente precipitarse. El uso de la sal de sulfato permite la concentración, purificación, plegamiento y estabilidad de proteínas (Wingfield, 2016) y es considerado como el método más eficiente de purificación para grandes escalas (Júnior et al., 2017).

### **2.3.3. Purificación de anticuerpos por métodos cromatográficos**

A continuación de la precipitación, se añade el proceso de purificación que puede comprender diversos tipos de cromatografía como por intercambio iónico o afinidad (Spillner et al., 2012). Incluso pueden llevarse a cabo, purificaciones Líquido-Líquido, donde los anticuerpos pueden transferirse desde una solución acuosa hasta soluciones más hidrofóbicas combinadas con PEG (Gagnon, 2012).

Para la purificación de anticuerpos se describen técnicas como la cromatografía de intercambio iónico, ya sea aniónico o catiónico, los anticuerpos se unen a una matriz sólida por medio de variaciones de pH mediado por el intercambio de iones, para esto, consideran el punto isoeléctrico de la proteína de interés y el pH óptimo de unión, lo que permite anclar proteínas de forma selectiva, que luego son eluidas al cambiar nuevamente el pH para que vuelvan a su estado neutro. Este proceso se utiliza ampliamente para la purificación de IgG (Gagnon, 2012).

Se emplea también cromatografías de interacción hidrofóbica o cromatografías con metales inmóviles donde los anticuerpos se anclan a los metales por un clúster de histidina de la cadena pesada, generalmente uniéndose a cobalto o zinc. La cromatografía de modo mixto, combina mecanismos químicos para la purificación de anticuerpos, juntando por ejemplo protocolos como la cromatografía de intercambio iónico, junto con la interacción de metales. (Gagnon, 2012). La cromatografía tiofílica se describe como modo mixto de purificación, combinando la afinidad y la hidrofobicidad (Gagnon, 2012)

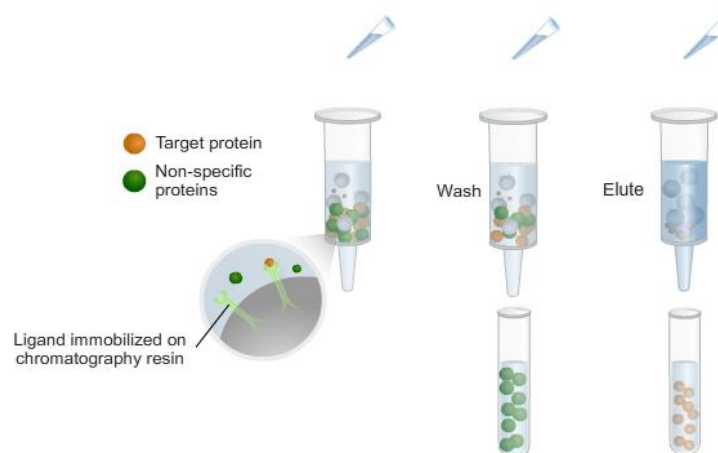
La cromatografía por afinidad se conoce como la técnica de purificación de cromatografía líquida para anticuerpos con mayor selectividad, ya que emplea la unión específica y reversible entre una proteína y un ligando (Arora, Saxena, & Ayyar, 2017). Esta interacción se basa en reacciones biológicas y químicas, lo que permite incrementar la selectividad del proceso (Hage & Matsuda, 2015)

Dentro de los componentes de una columna de cromatografía de afinidad, se describe:

- Ligando de interacción: Se conocen como los agentes mediadores de la selección de proteínas target, pueden ser ligandos bioespecíficos (Proteínas bacterianas A o G(*Staphylococcus aureus*), L (*Petostreptococcus magnus*), lectinas o anticuerpos), pseudo bioespecíficos (Ligando tiofílico o hidroxapatita) o sintéticos (Amalgamas de amino ácidos) (Arora et al., 2017).
- Matriz sólida: Es un sistema de soporte el cual lleva inmovilizado los ligandos de interacción, deben constituirse de materiales que no generen absorción y no se diluyan fácilmente, además debe tener un área superficial considerable, distribuida de forma homogénea para permitir las reacciones de unión y el paso de solutos. (Arora et al., 2017).

Las columnas HiTrap de cromatografía de afinidad se caracterizan por tener como ligando pseudo bioespecífico, la 2-mercaptopiridina, que utiliza uniones no covalentes para la retención temporal de una inmunoglobulina, en este proceso se genera una reacción tiofílica de adsorción (GE, 2014). Esta reacción es mediada por la capacidad de las inmunoglobulinas a unirse a grupos tioeter o sulfonados del ligando (Arora et al., 2017). Mientras que la sal genera una interacción hidrofóbica e hidrofílica entre el ligando para la aceptación del anticuerpo (GE-Healthcare, 2017).

El proceso de unión de anticuerpo con el ligando, elución con buffer sin sales, recuperación y limpieza se encuentran descritos en la Figura 13.



**Figura 13.** Proceso de la cromatografía líquida por afinidad con elución de proteínas.

Fuente: (ThermoFisher-Scientific, 2009b)

#### **2.3.4. Aplicaciones y herramientas tecnológicas**

Los huevos de gallina representan una herramienta para el campo médico humano y veterinario, para el área farmacéutica y la biotecnología, al ser estos una fuente de compuestos bioactivos, uno de los más importantes: los anticuerpos aviares (Lesnierowski & Stangierski, 2018).

Los IgY son los biocompuestos de mayor prospecto terapéutico, ya que se plantea trabajar con ellos en el control de bacterianas en alimentos, patógenas gastrointestinales y respiratoria y además poderse utilizar para el control de enfermedades de mayor gravedad como las neurodegenerativas, por ello se plantea que estos anticuerpos sean una alternativa farmacológica (Lesnierowski & Stangierski, 2018).

La distancia evolutiva entre mamíferos y aves, le confiere características distintas, principalmente de autotolerancia, por lo que los IgY no interacciona con componentes inmunológicos de los mamíferos (Spillner et al., 2012), como por ejemplo: Los IgY no activan el sistema de complemento y tampoco se unen a proteínas de estructura celular como factores reumatoides, reduciendo la probabilidad de reacciones cruzadas e inflamatorias (Müller et al., 2015).

Por ello, se presenta a la inmunoterapia como una de las principales herramientas prometedoras (Gaetani et al., 2017; Spillner et al., 2012), enfocándose por ejemplo en la inmunización pasiva de forma oral, ya que los anticuerpos soportan condiciones extremas como las encontradas en el sistema digestivo (Müller et al., 2015), con esta característica pueden ser usados como enriquecedores de alimentos como tanto como herramienta profiláctica, como para aplicarlos como conservantes anti bacterianos (Gaetani et al., 2017).

La inmunización pasiva también puede ser ampliada en el área ganadera, para controlar patógenos entéricos (Zhang et al., 2017), reduciendo el uso de antibióticos como profilácticos o como inductores de crecimiento (Li, Wang, Zhen, Li, & Xu, 2015), los IgY pueden emplearse para infecciones bacterias, virales (Kollberg, 2015) e incluso parasitaria (Grando et al., 2017; Júnior et al., 2017), esta aplicación puede reducir la creciente resistencia a los antibióticos tradicionales (Kollberg, 2015). Las propiedades biológicas de los IgY les permite bloquear e inhibir toxinas no solo de patógenos sino incluso de venenos, de tal manera que se consideran como medicamentos alternos superiores a los medicamentos sintéticos tradicionales (Spillner et al., 2012).

En pruebas diagnósticas también han utilizado IgY, principalmente, las inmunológicas como: ELISA, Western Blot, inmunohistoquímica e inmunoprecipitación, usando IgY como anticuerpos de marcaje (Lesnierowski & Stangierski, 2018), también en pruebas que utilicen nanopartículas, donde los IgY se encuentren acoplados (Spillner et al., 2012).

Pueden los IgY, ser empleados en forma policlonal o monoclonal, haciendo énfasis la probabilidad de fragmentarlos y mejorar sus características bioquímicas, además gracias a su composición genética más sencilla, a diferencia de los anticuerpos mamíferos, se posibilita la generación de anticuerpos quiméricos y librerías genéticas para la ingeniería de anticuerpos (Harley & Vieira-Pires, 2016) .



## CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Inoculación de gallinas Lohmann Brown con antígeno de *Leishmania mexicana*

#### 3.1.1. Obtención de inóculo de *Leishmania mexicana* inactivada

Se tomó *Leishmania mexicana* a partir de cultivo celular, en concentraciones de  $1 \times 10^7$  promastigotes/mL. Estos fueron resuspendidos en 250  $\mu$ L buffer PBS 1X estéril, para luego ser inactivados con calor a 90°C por una hora. El antígeno inactivado fue preparado fresco el día de inoculación, respecto el plan indicado en la **Tabla 1**.

#### 3.1.2. Manejo de modelo *In vivo* para inoculación de antígeno

La crianza, cuidado y recolección de los huevos pre y post inoculación de las gallinas ponedoras Lohmann Brown (*Gallus gallus domesticus*), se llevó a cabo en el Galpón de Taller Avícola de las instalaciones del campus IASA I de la Universidad de las fuerzas armadas ESPE, en la hacienda El Prado, ubicado en Selva Alegre del cantón Rumiñahui en Pichincha, Ecuador.

Se dispuso de jaulas individuales para las gallinas (n=4), clasificando: Grupo control (n=1), Grupo inoculado (n=3). Se mantuvo condiciones control como la desinfección de agua con solución de cloro 5% y yodo y comida balanceada para gallinas ponedoras.

**Tabla 1**

*Plan de inoculación aplicado en el modelo de gallinas Lohmann Brown*

*Referencias: S: semana, AFC: Adyuvante completo de Freund, AFI: Adyuvante incompleto de Freund. ✓: Con inoculación*

Semana	Intervalo (Días)	Inoculación	Adyuvante	Recolección de huevos	
Control				✓	
S1	7	✓	AFC	✓	
S2		✓	AFI	✓	
S3		✓	AFI	✓	
S4		✓	AFI	✓	
S5		✓	AFI	✓	
S6				AFI	✓
S7					✓
S8					✓
S9			✓	AFI	✓
S10					✓
S11					✓

Se recolectó todos los huevos según el plan de inoculación y se almacenaron a 4°C en el laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas, ESPE.

### **3.2. Obtención y purificación de inmunoglobulinas policlonales aviares tipo IgY a partir de yemas de huevos de gallinas inmunizadas**

#### **3.2.1. Deslipidación y precipitación de proteínas totales**

El tratamiento de las muestras consistió en un primer paso de separación de la yema del albumen. El volumen final de la yema (17 mL promedio) en tubos Falcon estériles.

Se realizó la primera deslipidación completando el volumen de la yema con solución deslipidante de pectina de manzana al 0.1% (9000-69-5, Sigma Aldrich), hasta aforar 50 mL (Proporción 1:8 aproximadamente).

Se aplicó solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en proporción 1:1 (50 mL de sulfato de amonio por cada fracción de yema, un total de 100 mL por cada huevo) por goteo lento y agitación.

Se resuspendió las proteínas en 150  $\mu\text{L}$  de buffer PB 0.02 M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.02 M (7558-79-4, Loba Chemie) y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.02M (10049-21-5, Loba Chemie)) con pH 7.5.

### **3.2.2. Purificación de anticuerpos aviares tipo IgY por columna de afinidad**

Para el protocolo de purificación se preparó cuatro diferentes buffers recomendados en el inserto de la columna de cromatografía por afinidad para IgY, HiTrap IgY purification HP (GE, 2014).

- Buffer de Unión: Buffer PB 0.02M;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1M; pH 7.5
- Buffer Elusion: Buffer PB 0.02M; pH 7.5
- Buffer de Limpieza: Buffer PB 0.02M; Isopropanol 30%; pH 7.5
- Buffer Almacenamiento: Enatol 20%

La proteína total fue diluida en buffer de unión antes de pasar por la columna, en una proporción 1:5. Se cargó en jeringuillas de 10 mL adaptables al sistema de y por goteo lento, se pasó la muestra en columnas de cromatografía (HiTrap, 17511101, GE Healthcare).

Se continuó con los lavados de unión, para luego eluir las proteínas retenidas recuperando las fracciones positivas de IgY y almacenando a  $-20^\circ\text{C}$ . Finalmente se lavó la columna con buffer de limpieza y se reconstituyó la columna.

### **3.2.3. Cuantificación de proteínas por BCA**

Se evaluó la concentración de proteínas obtenidas, por medio del protocolo de BCA en Kit. En placas de 96 pocillos de unión media (CLS90-17, Sigma Aldrich), se preparó una gama de proteína estándar de albúmina (9048-46-8, Sigma Aldrich), en concentración desde 0 hasta 1000  $\mu\text{g/mL}$ , y se aplicó 25  $\mu\text{L}$  de cada muestra pura en cada pocillo respecto a un plan de placa y se preparó el reactivo de trabajo según el número de muestras con el reactivo A y B (BCA1 y B9643, Sigma Aldrich), aplicando 200  $\mu\text{L}$  en cada muestra.

Se incubó a 37°C por 30 minutos y leyó por espectrofotometría a 570 nm en lector de placa Multistank. Se reportó los resultados por medio de regresión lineal de la curva estándar.

### **3.3. Caracterización de inmunoglobulinas IgY aviares**

#### **3.3.1. Western Blot para proteínas IgY y muestras de parásito de *Leishmania*.**

##### **3.3.1.1. SDS page, electroforesis vertical para proteínas:**

Se corrió una electroforesis vertical desnaturalizante con geles de acrilamida – bis acrilamida radio 19:1 (79-06-1, Sigma Aldrich). Se empleó un gel separación al 8% y 10% v/v, y un gel de concentración al 4% v/v. Se armó la cámara de electroforesis vertical (Mini Protean Electrophoresis Cell, 1658005, Bio Rad) añadiendo buffer de electroforesis 1X.

##### **3.3.1.2. Preparación de muestras:**

Se preparó la proteína que fueron sometidas a choque térmico a 100°C por 10 minutos, seguido de choque frío a 4°C por 5 minutos. Se cargó las muestras en dos geles, uno de ellos fue teñido en Azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G 250 (6104-58-1, Himedia)) y otro fue usado para transferencia.

Se colocó marcador de peso molecular de 250 kDa (All Blue Prestained Protein Standards, 1610373, Bio Rad) y se corrió en condiciones de 110 V, 400 mA por 75 minutos.

### **3.3.1.3. Transferencia en tanque semi húmedo**

Se realizó una transferencia a membrana de nitrocelulosa (SC-201705, Santa Cruz Biotechnology), en tanque semi húmedo Transblot turbo (1704150, Bio Rad), usando buffer de transferencia 1X. Se continuó con tres ciclos de transferencia a 25 V, 2.5 A y ocho minutos. Finalmente se colocó la membrana en solución de Rojo Ponceau (Ponceau S, 6226-79-5, Sigma Aldrich) para teñir y comprobar la existencia de proteínas.

### **3.3.1.4. Inmunomarcaje de membrana**

Se comenzó con el bloqueo de la membrana con leche sin grasa al 5% p/v (sc-2325, Santa Cruz Biotechnology) en buffer TTBS y se incubó toda la noche con rotación constante a 4°C.

Para el bloqueo del marcador, se utilizó una solución de leche al 3% p/v en buffer TTBS y se incubó con las mismas condiciones que la membrana con proteínas.

Se continuó con la aplicación de anticuerpo primario IgY y secundario de reconocimiento IgG RAC HRP (A9046, Sigma Aldrich). Para el inmunomarcaje del marcador, se utilizó Strep Tactin HRP (1610381, Bio Rad).

### **3.3.1.5. Revelado por quimioluminiscencia**

Se utilizó luminol y peróxido en proporción 1:1 (1mL) (Clarity Western ECL Substrate, 170560, Bio Rad), se aplicó sobre toda la membrana, e inmediatamente se reveló en equipo C Digit® en el programa Image Studio™ Lite con sensibilidad alta por 12 minutos.

### **3.3.2. ELISA indirecto cualitativo para parásitos de *Leishmania* y pruebas cruzadas**

#### **3.3.2.1. Preparación de muestras**

Se preparó diluciones de antígeno según la Tabla 2, utilizando muestras parasitarias sonicadas de *Leishmania mexicana*, *braziliensis* e *infantum* y antígeno de bacterias inactivadas con calor a 90°C por 45 minutos, todas diluidas en solución de Bicarbonato – Carbonato 0.1 M pH 9.6.

Se distribuyó 100 µL de cada dilución en placas de 96 pocillos de unión alta (CLS3590, Sigma Aldrich), según plan de placa y se incubó por toda la noche a 4°C.

#### **3.1.1.1. Incubación con anticuerpo primario y secundario**

Continuando con la sensibilización de la placa, se bloqueó con solución de leche al 5% p/v en buffer PBS 1X, post bloqueo se aplicó el primer juego de anticuerpos IgY anti *L. mexicana* e IgY controles en solución de leche al 2.5% p/v con buffer PBS 1X. Se continuó con la aplicación de anticuerpo secundario IgG RAC-HRP.

#### **3.1.1.2. Revelado con adición de sustrato**

Finalmente se aplicó el sustrato 2,2'-Azino bis (3 etilbensotiazilna 6 – ácido sulfónico) sal diamonio (ABTS, A9941, Sigma Aldrich) diluido en Buffer Fosfato Citrato 0.05M pH 5 (P4809, Sigma Aldrich) y activado con 0.025% de peróxido de hidrogeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Las placas fueron leídas por lector Multiskan por espectrofotometría a 405 nm, para finalmente procesar los resultados.

**Tabla 2**Condiciones para pruebas ELISA para antígeno e IgY anti *L. mexicana*

Prueba	Antígeno	µg/mL	Anticuerpo primario	Diluciones	
<b>Reconocimiento de <i>L. mexicana</i></b>	<i>L. mexicana</i>	1	IgY anti <i>L. mexicana</i>	Control	
		5		S1	
		10		S3	
		25		S5	
		50		S8	
		100		S9	
				S11	
<b>Reconocimiento máximo y mínimo con IgY diluidos</b>	<i>L. mexicana</i>	5	IgY anti <i>L. mexicana</i>	1:500	
				Control	
		10		1:50	
				1:100	
		15		1:500	
				1:1000	
				S8	
<b>Reconocimiento de otras especies de Leishmania: <i>L. braziliensis</i>, <i>L. infantum</i></b>	<i>L. mexicana</i>	5	IgY anti <i>L. mexicana</i>	1:500	
		10		Control	
		15			
	<i>L. braziliensis</i>	5		S5	
		10			
		15			
	<i>L. infantum</i>	5		S8	
10					
15		S11			
<b>Pruebas cruzadas</b>	<i>L. mexicana</i>	10	IgY anti <i>L. mexicana</i>	IgY Control	
	<i>Escherichia coli</i>			IgY- Bloqueados	
	<i>Salmonella enteritidis</i>			IgY anti <i>L. mexicana</i>	
	<i>Staphylococcus aureus</i>				

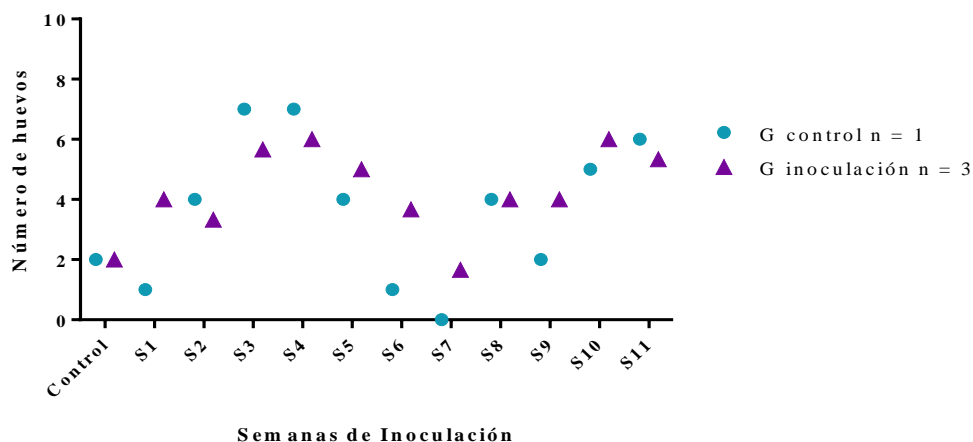
**3.1.1.3. Estadística**

Todos los datos fueron recolectados, tabulados y analizado en el programa GraphPad Prism 6. Utilizando pruebas Anova de dos vías, para comparaciones múltiples con prueba Tukey  $p = 0.05$  y pruebas ROC con  $p = 0.05$ .

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS

### 4.1. Inoculación de gallinas Lohmann Brown con antígeno de *Leishmania mexicana*

Se recolectó un total de 194 huevos, 151 del grupo de inoculación y 51 del grupo control, durante todas las semanas de inoculación de las gallinas ponedoras, con una duración de la fase experimental de dos meses y medio de trabajo en campo. Dentro de este tiempo, no hubo variaciones detectables en la producción de huevos de las gallinas.



**Figura 14.** Contabilización de huevos obtenidos durante la fase de inoculación *In vivo*.  
Referencias G: Gallinas S: Semanas

Como se observa en la **Figura 14**, se observa una producción similar de huevos por parte de las gallinas inoculadas en comparación con la gallina del grupo control. Con un incremento de producción pico de huevos en la semana 4 y decae hasta la semana 7, para recuperar la producción en la semana 10. La semana 3 y semana 4 son las semanas con mayor recolección de huevos, 7 por gallina en total, a diferencia de S7 que fue la menos productiva dos huevos por gallina.

Ningún animal fue sacrificado hasta el fin del trabajo en campo.



#### 4.2. Obtención y purificación de inmunoglobulinas policlonales aviares tipo IgY a partir de yemas de huevos de gallinas inmunizadas.

De todos los huevos recolectados, se procesaron 24% por selección aleatoria de todos los huevos post inoculación (**Tabla 3**), mediante deslipidación con pectina al 0.1% y precipitación de proteínas con solución de sulfato de amonio saturado. Los huevos restantes fueron almacenados a 4°C, conservando solamente los huevos de las gallinas del grupo inoculado.

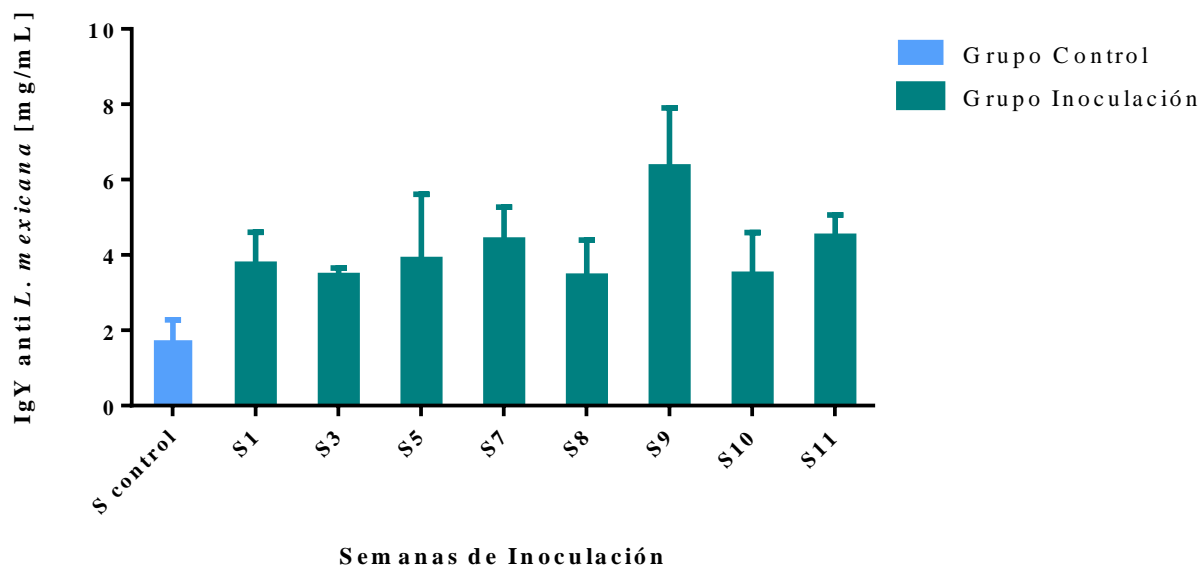
**Tabla 3**

*Huevos procesados para la precipitación y purificación de IgY anti Leishmania*

Gallina	Muestras purificadas	Huevos procesados y purificados								
		C	S1	S3	S5	S7	S8	S9	S10	S11
G1	1	✓								
G2	9			✓✓	✓✓	✓	✓	✓	✓	✓
G3	13	✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓	✓✓	✓	✓	✓✓
G4	12	✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓	✓	✓	✓	✓✓
Total	36	3	4	6	6	3	3	3	3	5

De los huevos procesados se obtuvo, en promedio, dos fracciones de 2 mL de proteína precipitada total por cada muestra. Al procesar 36 huevos, se obtuvo un total de 72 fracciones purificadas a través de cromatografía de afinidad por la columna HiTrap para IgY.

Posterior a la purificación de proteínas, el protocolo de cuantificación por BCA reveló:



**Figura 15.** Concentración de proteína IgY en mg/mL clasificada por semana

Se observó un incremento de la concentración de IgY para todas las semanas de inoculación con respecto a la semana control, teniendo valores sobre el nivel normal de IgY. Según el plan de inoculación empleado (**Tabla 1**), la fase de inoculación consecutiva, con una duración de 5 semanas desde S1 hasta S5, mostró un incremento constante de inmunoglobulinas.

En las semanas que no tuvieron inoculación, entre S6 y S8, se observa una producción homogénea de anticuerpos, ya que aumenta en S7 y se mantiene en S8. En la semana S9, donde ocurrió la última inoculación, se observó un aumento de la respuesta inmunológica, generándose aquí la mayor producción de anticuerpos registrada durante todas las semanas evaluadas.

Durante las dos siguientes semanas sin inoculación, en S10 se observa una disminución en la producción de anticuerpos, sin embargo se mantiene sobre el nivel de anticuerpos control, este valor se recupera en la S11, la semana final de evaluación, donde el título de anticuerpos se mantuvo aproximado a las mismas concentraciones obtenidas en S7.

El pico máximo promedio de producción de IgY corresponde a una concentración de 6.3 mg/mL, con un 70% de recuperación post purificación.

De forma puntual G2, no produjo huevos durante la primera semana de inoculación. Pero en la semana 5, presentó la máxima concentración de IgY durante la primera fase del proceso, con una producción máxima de 5.88 mg/mL de IgY por yema, en la semana S9 se obtiene nuevamente un pico de producción con una concentración máxima de 8 mg/mL de IgY. **(Anexo 1)**

Para G3, se alcanzó su pico de concentración en S7 con una concentración 5.04 mg/mL, comparándose a la concentración máxima obtenida de la S11 con 5.1 mg/mL de proteína. Ambas concentraciones altas se generan en la semana que no se aplicó antígeno por inoculación. En la semana 9 se obtuvo un valor aproximado de 5 mg/mL. **(Anexo 1)**

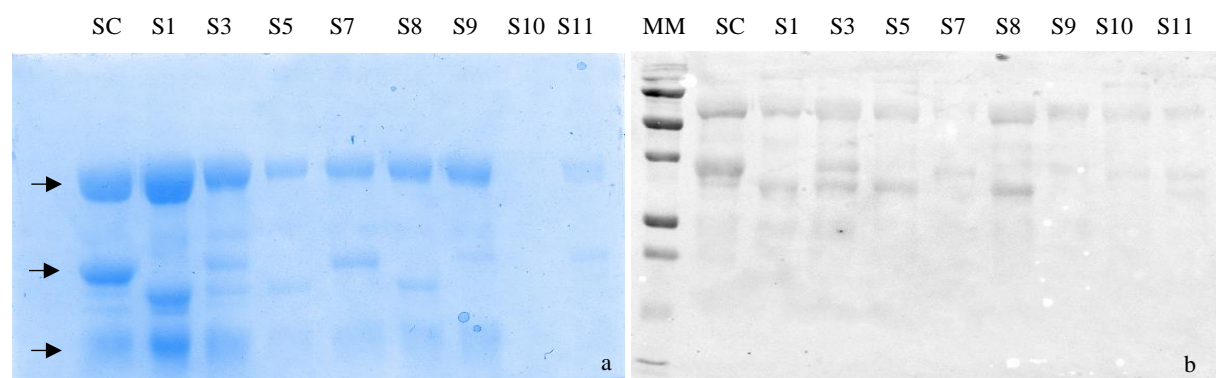
Finalmente para G4, en la inoculación final, se presentó en su pico máximo de IgYs, durante la S9 concentrando Ig con un valor de 5.792 mg/mL denotando como en S9 se reactivó de la producción de anticuerpos. **(Anexo 1)**

En cuanto al análisis estadístico, utilizando Anova de dos vías en el programa GraphPad Prism, la interacción: Gallina inoculada – semana de inoculación, no mostró un efecto significativo para la producción de IgY. Tampoco la prueba de comparaciones múltiples reveló diferencia significativa entre los resultados.

### 4.3. Caracterización de inmunoglobulinas IgY mediante Western Blot

#### 4.3.1. Estructura de inmunoglobulinas IgY aviares por Western Blot directo

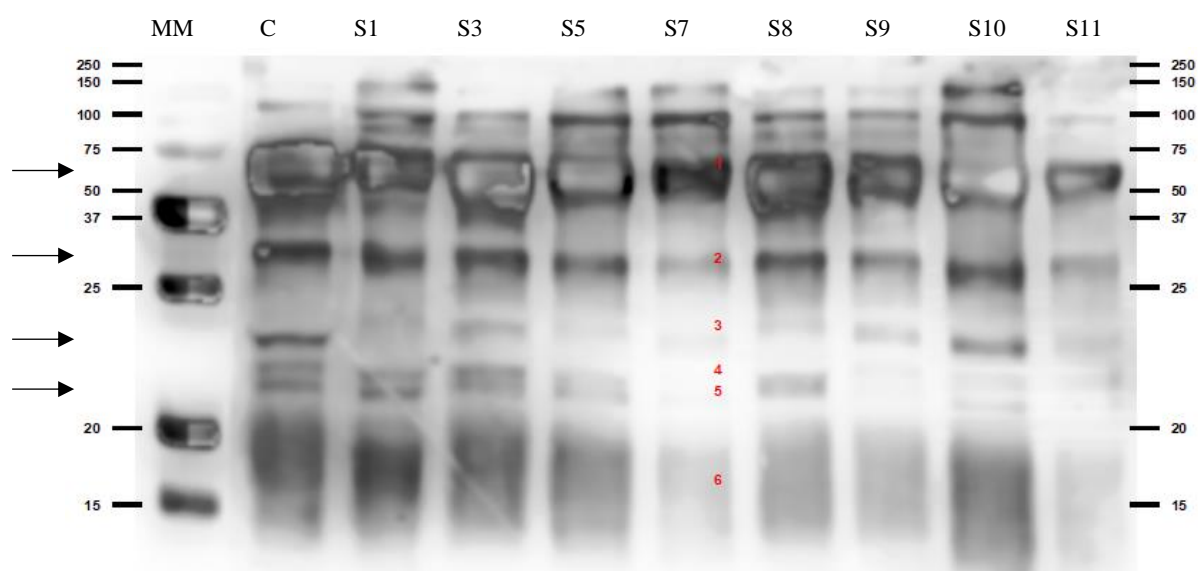
Para la caracterización estructural de las inmunoglobulinas tipo Y, se procedió al análisis proteico por Western Blot, el cual generó un gel teñido de Azul de Coomassie el cual observándose en la **Figura 16a**. Consecutivamente la transferencia de proteínas en membrana de nitrocelulosa teñida con Rojo Ponceau reveló (**Figura 16b**).



**Figura 16.** SDS page y Membrada de nitrocelulosa de proteínas IgY anti *L. mexicana*.  
 a. Gel de poli acrilamida al 8% teñido con Azul de Coomassie R250  
 b. Membrana de nitrocelulosa teñida con Rojo Ponceau.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la electroforesis SDS page, el gel control teñido reveló la estructura característica de las inmunoglobulinas, localizando las cadenas pesadas en la parte superior del gel y las cadenas ligeras aproximadamente en el centro y bandas intermedias en la parte inferior del gel. De forma preliminar se observa en la **Figura 16a y b**.

El análisis de peso molecular de estas bandas por el software Image Lab 6.0.1, reveló que las bandas corresponden a: 1. Cadenas pesadas, con peso de 67 kDa, 2 y 3. Cadenas ligeras fragmentadas con a un peso de 35 kDa y 22 kDa de peso y 4, 5 y 6 fragmentos pequeños de IgY con 18, 17 y 15 kDa. Estas bandas en total, revelan un peso aproximado de las IgY de 170 y 175 kDa (**Figura 17**).



**Figura 17.** Western Blot revelado por quimioluminiscencia para IgY anti *L. mexicana*.

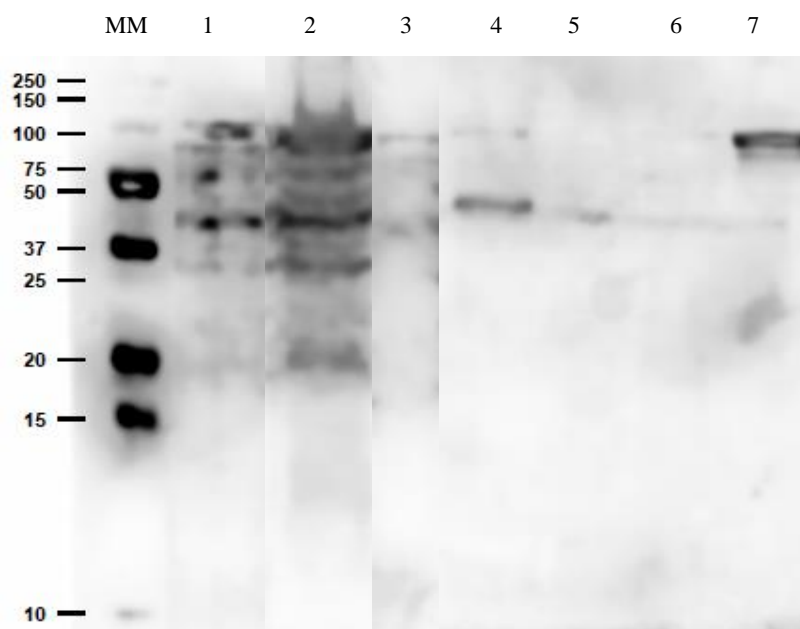
#### 4.3.2. Western Blot indirecto para tres especies de *Leishmania*.

Los IgY anti *L. mexicana* reconocieron efectivamente su antígeno objetivo, además de otras especies de *Leishmania*: *braziliensis* e *infantum*. Se detectó parásito de *L. mexicana* en diferentes condiciones: sonicado, en promastigote puro y por proteína de membrana.

Tanto en parásito sonificado como promastigote desnaturalizado, se observó la mayor cantidad de bandas, entre ellas, bandas con pesos moleculares de 100, 90, 88, 79, 63, 42, 37, 32 y 30 kDa. Mientras que en proteína de membrana se detectó apenas 3 bandas con pesos de 100, 88 y 43,7 kDa (Tabla 4).

Respecto al reconocimiento para *L. braziliensis* y *L. infantum*, tanto en parásito sonificado, como en proteína de membrana, los IgY anti *L. mexicana* detectaron proteína parasitaria para ambas especies, de diversos pesos moleculares descritos en la **Tabla 4** y expuestos en la **Figura 18**.

Los IgY anti *L. mexicana* detectan proteínas parasitarias comunes para diferentes especies de *Leishmania*, reconociéndose proteínas en 100, 90, 80, 63 y 43 kDa. Cabe destacar que se generó una mayor detección en *L. mexicana* en comparación con *L. braziliensis* y *L. infantum* (**Fig. 18**).



**Figura 18.** Western Blot revelado por quimioluminiscencia para proteínas parasitarias de *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. infantum*.

Distribución de muestras de izquierda a derecha: 1. EPS *L. mexicana*, 2. PD de *L. mexicana*, 3. PM de *L. mexicana*, 4. EPS de *L. braziliensis*, 5. PM de *L. braziliensis*, 6. EPS de *L. infantum*, PM de *L. infantum*.

**Tabla 4**

*Análisis de pesos moleculares correspondientes a las bandas detectadas por IgY anti L. mexicana en Western Blot.*

<i>Leishmania mexicana</i>							
EPS		PD		PM			
Banda	kDa	Banda	kDa	Banda	kDa		
1	105.2	1	98.3	1	107		
2	88.6	2	71	2	88.6		
3	63.2	3	49	3	43.7		
4	48	4	43				
5	42	5	38				
6	30	6	30				
7	20	7	20				

<i>Leishmania braziliensis</i>				<i>Leishmania infantum</i>			
EPS		PM		EPS		PM	
Banda	kDa	Banda	kDa	Banda	PM kDa	Banda	kDa
1	100	1	43.3	1	98.3	1	93.3
2	46.2			2	63.2	2	84.1
				3	41.8	3	41.8

#### 4.3.3. ELISA indirecto para inmunodetección cualitativa de *L. mexicana*

Se evaluó la detección de *L. mexicana* con diferentes concentraciones de anticuerpo, utilizando IgY anti *Leishmania mexicana* purificados de las semanas más relevantes.

Se observó un incremento paulatino de la detección del parásito desde la semana control, durante la fase sin inoculación, los IgY alcanzaron una máxima detección en la semana 8, en una concentración de *L. mexicana* de 50 µg/mL.

Durante la semana 9, la capacidad de detección no es tan alta como en la semana 8, pero el reconocimiento se incrementa nuevamente en la semana 11. Para todos los IgY de las semanas evaluadas, excepto el control, todos tienen una capacidad de detección de *Leishmania*, desde una concentración mínima de 5 y máxima de 100 µg/mL de antígeno, alcanzando una detección máxima óptima en 50 µg/mL.

Un análisis estadístico con prueba Tukey, ( $p=0.05$ ) para comparaciones múltiples, reveló que existe una diferencia significativa entre la detección de la semana control y S1, con S8, S9 y S11. Determinando que la capacidad de reconocimiento es mínima en primeras semanas de inoculación. Se detectó una diferencia entre S3 y S8. Mostrando que los IgY de la semana 8, son los más específicos a su antígeno ( $p < 0.0001$ ). Los datos detallados con sus respectivos p valor están descritos en la **Tabla 5**.

Esta información ratifica el incremento en la capacidad de detección de *L. mexicana* en función del tiempo, siendo mayor desde S8 hasta S11 y menor desde S1 hasta S3.

La prueba Anova de dos vías determinó la interacción significativa entre la detección de los IgY en las diferentes semanas evaluadas con las diferentes concentraciones de antígeno del parásito ( $p < 0.0001$ ).

En cuanto a la concentración de antígeno detectada la prueba de comparaciones múltiples, resultó que, los anticuerpos de la S8 detectaron concentraciones mínimas de 1 y 5 µg/mL y concentraciones máximas de 50 y 100 µg/mL de *L. mexicana*. Esto ocurre también con los IgY de la semana 11 con reconocimiento mínimo en 5 µg/mL y máximo en 50 y 100 µg/mL.



Se denotando que los anticuerpos de S8 produjeron una mayor detección de *L. mexicana* en concentraciones de antígeno máximas de 50 y 100 µg/mL ( $p = 0.001$ ).

Los IgY correspondientes a S8 y S11, detectan eficazmente *L. mexicana* en una concentración máxima efectiva de 50 µg/mL.

La curva ROC, resultó tener un área bajo la curva de 0.8182, determinando una capacidad de detección efectiva del 82%, con un  $p$  valor de 0.00155. Sensibilidad y Especificidad de 80 y 50%, con un cut off de 0.17 OD.

**Tabla 5**

*Resultado comparaciones múltiples en ELISA para detección de IgY anti L. mexicana con su antígeno.*

	Referencia gráfica Figura 20	Parámetro 1 Semana de inoculación	Parámetro 2 Semana de inoculación	P valor
<b>Diferencia de reconocimiento entre IgY de diferentes semanas</b>	#	Control	S8	< 0.0001
			S9	0.0032
			S11	0.0013
	&	S1	S8	< 0.0001
			S9	0.0064
			S11	0.0026
%	S3	S8	0.0028	

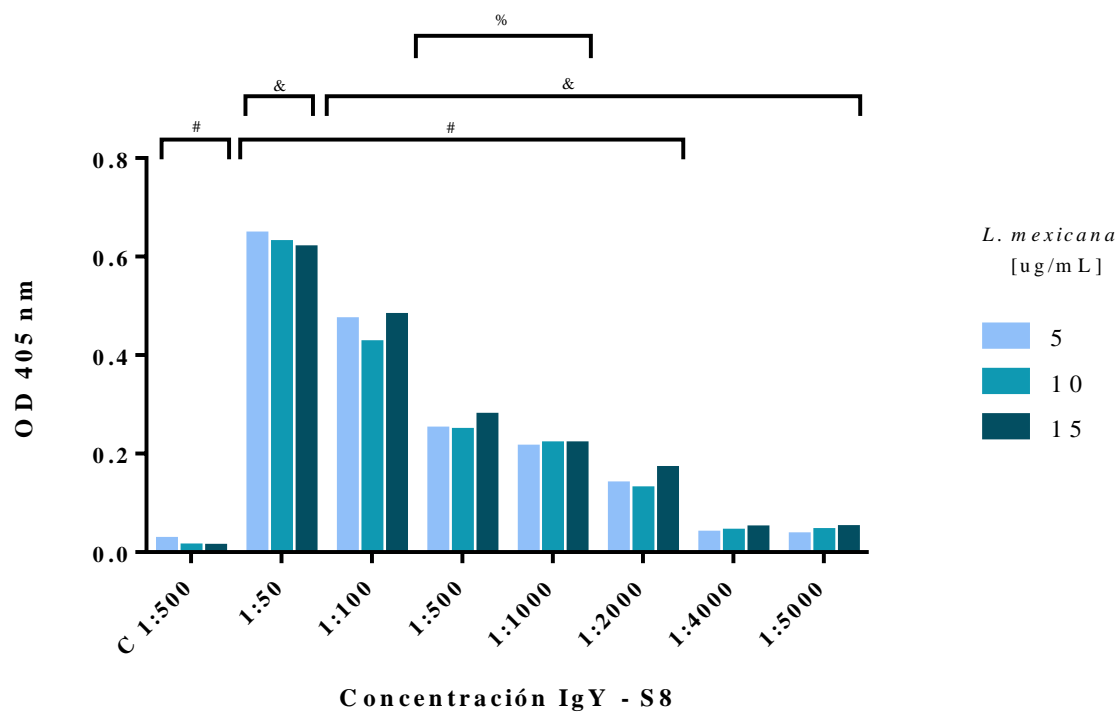
	Semana	Parámetro 1 Antígeno [µg/mL]	Parámetro 2 Antígeno [µg/mL]	P valor	
<b>Diferencia de reconocimiento entre antígeno dentro de la misma semana</b>	S8	1	50	0.0031	
			100	0.0037	
			5	0.0132	
	*	S11	1	50	0.0144
				100	0.0275
				5	0.0290

Se evaluó también la capacidad de reconocimiento de los IgY en diferentes soluciones, revelando que los IgYs detectan a su antígeno de forma eficiente en una dilución máxima de 1:50 y mínima de 1:2000 (**Figura 19**).

Los datos mostraron la diferencia significativa entre el reconocimiento de los IgY control (C 1:500), con las concentraciones desde 1:50 hasta 1:2000 ( $p < 0.0001$ ) (**Figura 19**), siendo no significativa la detección en concentraciones mínimas de 1:4000 y 1:5000. El mayor reconocimiento de IgY en 1:50, resultó ser significativamente diferente para diluciones menos concentradas 1:4000 y 1:5000 ( $p < 0.0001$ ) (**Tabla 6**).

Todas las diluciones de IgY detectaron concentraciones mínimas de 5 y máximas de 15  $\mu\text{g/mL}$  sin observarse diferencia.

Para la detección entre dilución de IgY 1:500 y 1:1000 resultó no ser significativamente diferente, por lo cual para pruebas ELISA o Western Blot se recomienda el usar estas concentraciones.



**Figura 19.** ELISA indirecto con dilución máxima y mínima de IgY anti *L. mexicana* para su antígeno.

#Diferencia significativa entre el control con 1:50 hasta 1:2000 ( $p < 0.0001$ ); &Diferencia significativa entre 1:50 con 1:100 hasta 1:5000 ( $p < 0.0001$ ); %No es significativamente diferente 1:500 y 1:1000 ( $p = 0.059$ )

Para esta prueba ELISA, la curva ROC reveló un área bajo la curva de 1, con un p valor de 0.005, Sensibilidad y Especificidad de 100% y un valor de Cut off de 0.2 OD.

**Tabla 6**

Resultado comparaciones múltiples en Elisa para IgY anti *L. mexicana* en diferentes diluciones.

	Referencia gráfica (Figura 21)	Parámetro 1 Dilución de IgY	Parámetro 2 Dilución de IgY	P valor
<b>Diferencia de reconocimiento entre IgY en diferentes diluciones</b>	#	Control	1:50	< 0.0001
			1:100	
			1:500	
			1:1000	
			1:2000	
	&	1:50	1:100	< 0.0001
			1:500	
			1:1000	
			1:2000	
			1:4000	
	%	1:500	1:1000	0.059

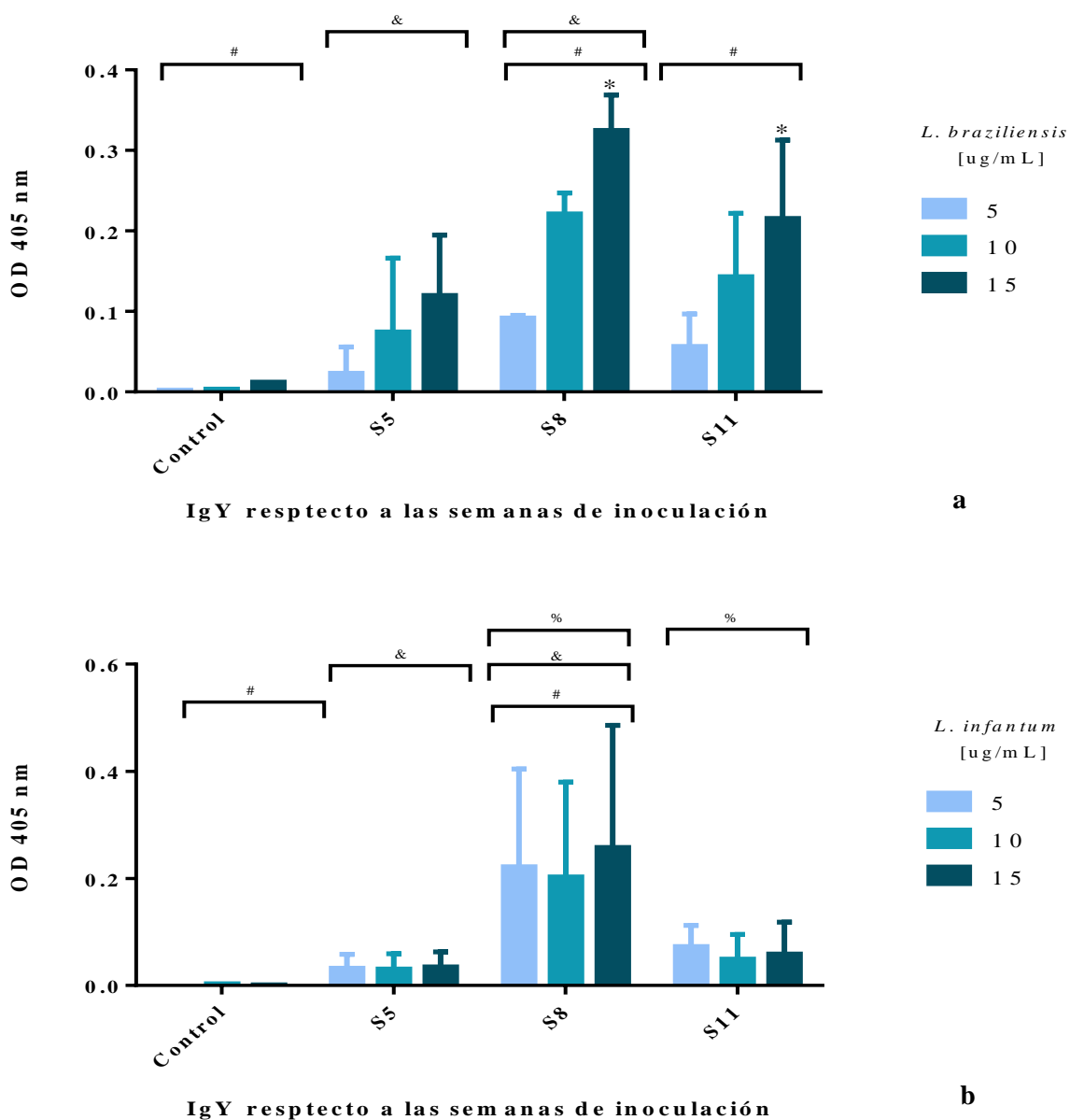
#### 4.3.4. ELISA para inmunodetección cualitativa de otras especies de *Leishmania*

Se generó también pruebas de detección con otras especies del parásito. Utilizando *Leishmania braziliensis* y *Leishmania infantum* como antígeno. Obteniéndose los siguientes resultados (**Figura 20**).

Se produjo reconocimiento de *L. braziliensis* por los IgY anti *L. mexicana* (**Figura 20a**), los anticuerpos de la semana 8 presentaron una mayor detección y afinidad en concentraciones desde 15 µg/mL de antígeno. Los resultados obtenidos se describen en la **Tabla 7**.

Finalmente para *L. infantum*, también se obtuvo reconocimiento por medio de los IgY anti *L. mexicana*. Revelando que los IgY de S8 y S11 pueden detectar una concentración mínima de 5 µg/mL y máxima de 15 µg/mL. (**Figura 20b**).

Para esta prueba ELISA, del mismo modo se generó una curva ROC para conocer la capacidad de descarte entre positivos y negativos, proveyendo un área bajo la curva de 1, indicando una prueba perfecta entre la discriminación entre positivos y negativos con un p valor < 0.001.



**Figura 20.** ELISA de IgY anti *L. mexicana*, con otras especies de Leishmania: *braziliensis* e *infantum*.

**Tabla 7**

Resultados comparaciones múltiples en ELISA de IgY anti *L. mexicana* con otras especies de *Leishmania*.

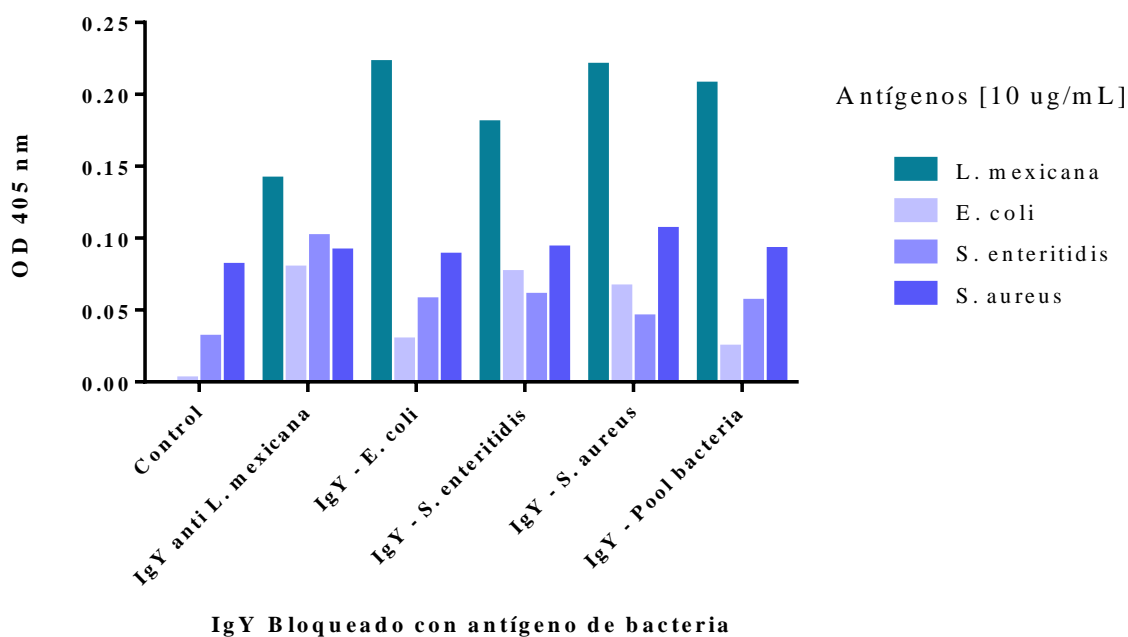
		Referencia gráfica Figura 22a	Parámetro 1 semana		Parámetro 2 semana	p valor
<b>L. braziliensis</b>	<b>Diferencia de reconocimiento entre IgY de diferentes semanas</b>	#	Control		S8	< 0.0001
					S11	0.0013
		&	S5		S8	0.0007
			Semana	Parámetro 1 Antígeno µg/mL	Parámetro 2 Antígeno µg/mL	p valor
	<b>Diferencia de reconocimiento entre diferentes concentraciones de antígeno dentro de la misma semana</b>	*	S8	5	10	0.0195
					15	< 0.0001
S11			5	15	0.0039	
		<b>Referencia gráfica (Figura 22b)</b>	<b>Parámetro 1 semana</b>	<b>Parámetro 2 semana</b>	<b>p valor</b>	
<b>L. infantu</b>	<b>Diferencia de reconocimiento entre IgY de diferentes semanas</b>	#	Control	S8	0.0006	
		&	S5	S8	0.0026	
		%	S8	S11	0.0094	

#### 4.3.5. Pruebas cruzadas con bacterias mediante prueba ELISA indirecto.

Un análisis de pruebas cruzadas reveló que los anticuerpos IgY anti *L. mexicana*, además de detectar el antígeno parasitario, reconocieron bacterias de la microbiota como *E. coli*, *S. enteritidis* y *S. aureus*. Los anticuerpos de la semana control detectaron estas bacterias, previo al proceso de inoculación (**Figura 21**)

Se separó los IgY más afines a epitopes bacterianos, por un proceso de “bloqueo”, donde los anticuerpos fueron expuestos a antígeno de bacteria. Este proceso aumentó los IgY específicos para *Leishmania*, incrementando el reconocimiento en la prueba ELISA.

La condición de los anticuerpos IgY anti *Leishmania* al ser de tipo policlonal, permitió que se genere la detección de más de un antígeno.



**Figura 21.** ELISA indirecto para pruebas cruzadas con IgY anti *Leishmania mexicana* para bacterias

Considerando que los IgY anti *L. mexicana* pueden presentar un reconocimiento cruzado con bacterias, la generación de la curva ROC, reveló un AUC de 0.872, es decir, la prueba tiene un 87% de discriminación entre positivos y negativos incluyendo antígeno bacteriano, mientras que en el caso de solo utilizarse antígeno parasitario de *L. mexicana* la curva ROC presentó un AUC de 1 con un p valor de 0.009, con sensibilidad y especificidad del 100%. Además se reportó un valor de 0.093 para el Cut off de esta prueba.



## CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Inoculación de gallinas Lohmann Brown con antígeno parasitario

La inoculación de gallinas de raza Lohmann Brown para la producción de anticuerpos, representó una alternativa eficaz para la obtención de una fuente fija de inmunoglobulinas, evitando el sacrificio del modelo animal y costos altos mantenimiento (Pereira, van Tilburg, Florean, & Guedes, 2019). Una gallina durante su vida reproductiva puede poner al menos 300 huevos, los que pueden ser almacenados por al menos un año a 4°C (Amro et al., 2018; Pereira et al., 2019), preservando los anticuerpos IgY sin alterar su concentración o función.

Se obtuvo en promedio un huevo diario, por parte de las gallinas del grupo de inoculación y del grupo control, lo que aseguró una muestra disponible para análisis de IgY.

La gallina 2 (G2) del grupo inoculado, no produjo huevos durante la primera semana de inoculación, probablemente relacionado con la adaptación de los animales en jaulas por los espacios reducidos (Campbell, Lee, Hinch, & Roberts, 2017). Por ello se contó con un periodo de cuarentena correspondiente a la semana control, para asegurar la adaptación de los animales, luego de este periodo la cantidad de huevos incrementa paulatinamente (**Figura 14**).

La adaptación de las gallinas en las jaulas, no solamente se ve relacionada con el espacio disponible, sino también a los objetos como comederos cercanos, bebederos y objetos para la recreación. Comederos cercanos aseguran la ingesta continua de alimento, que propicia la ovoposición de huevos completos y de peso aceptable (Campbell et al., 2017).

La disposición de agua limpia también fue prevista, tratándose con yodo y cloro de forma semanal para evitar infecciones intestinales que afecten a los animales.

La edad en la que las gallinas alcanzan su madurez reproductiva, es entre la semana 18 y 24 de vida (Esmailnejad et al., 2019), siendo este factor importante para el ciclo de ovoposición y concentración de IgY en yema (Kaspers, 2016).

La producción efectiva de anticuerpos no solo dependerá de un correcto estímulo inmunológico, sino también de la edad y estado fisiológico. Respecto a Oláh et al. (2014), gallinas muy maduras pueden tener su Bursa ineficiente. Según Koutsos et. al (2014) el tejido del timo o de la Bursa puede liberar corticosteroides, de los cuales, la corticosterona tiene la capacidad de modular el sistema inmunológico. Cuando aumenta esta hormona de forma crónica influenciada por la exposición a un antígeno o un agente estresante, influye directamente en la producción de anticuerpos, reduciendo su concentración.

La alimentación del animal es de suma importancia para que exista la suficiente energía para mantener la respuesta inmunológica y asegurar la producción de huevos completos que contengan suficiente concentración de IgYs (Montini et al., 2018), durante el desarrollo de la respuesta adaptativa, el requerimiento nutricional es mayor y se reduce una vez que se ha activado completamente (Koutsos & Klasing, 2014).

En cuanto a la vía inoculación de los animales, esta investigación empleó la vía intramuscular, con frecuencias de siete días en diferentes tiempos de inoculación, realizando un total de 6 inmunizaciones, relacionando el tipo de adyuvante empleado y el inoculo administrado.

El adyuvante de Freund completo e incompleto es utilizado para elevar la capacidad inmunológica de un antígeno, liberándolo continuamente en el organismo del animal para asegurar la respuesta inmunológica y mantener títulos altos de anticuerpos en sangre (Apostólico et al., 2016), siendo el adyuvante un factor de relevancia para la obtención eficaz de inmunoglobulinas (Montini et al., 2018). Su eficacia fue comprobada ya que los títulos de anticuerpos resultaron mayores respecto a la concentración control (**Figura 15**)

Siguiendo el mismo tratamiento que otros autores como Grando et al. (2017), Esmailnejad et al. (2019) y Montini et al. (2018), la ruta intramuscular resultó ser efectiva para la experimentación realizada, teniendo en cuenta que se puede optar por ruta subcutánea o intradérmica pero los efectos de producción de IgY son iguales (Montini et al., 2018).

A pesar de que los adyuvantes de Freud son utilizados como Gold estándar para la producción de inmunoglobulinas dada a su eficacia, los componentes pueden desencadenar efectos secundarios en los animales (Marcq et al., 2015). Para prevenir los inconvenientes, otros estudios proponen otros inmunoestimulantes como los CpG ODN o adyuvante de Montanida (Marcq et al., 2015). los CpG ODN, son oligodeoxinucleótidos sintéticos que actúan como inmunopotenciadores y activan a las APCs para la producción de citoquinas y quimioquinas para estimular la respuesta inmunológica adaptativa (Apostólico et al., 2016).

El tipo de antígeno empleado también es crucial para levantar una reacción inmunológica efectiva, en el caso de utilizar parásitos o células completas la ruta intramuscular es la vía más eficiente (Montini et al., 2018) siendo demostrado en este estudio, como ruta efectiva, ya que se utilizó parásito completo inactivado con calor.

La frecuencia de inoculación, influye en la producción de anticuerpos, considerando que los IgY tienen un tiempo de vida media de 4.1 días en plasma (Aizenshtein et al., 2016), las inoculaciones se produjeron cada siete días como indica Schade et al. (2005), de este modo se asegura una producción continua de IgY con títulos altos.

Se conoce que la respuesta adaptativa se genera por medio de dos vías, la primera el sistema de respuesta adaptativa humoral en la cual se genera la producción de anticuerpos y la respuesta adaptativa celular en la cual actúan los macrófagos y los linfocitos T y B (Davison, 2014). La activación, proliferación y secreción de inmunoglobulinas, por parte de los linfocitos B durante respuestas de memoria (Ratcliffe & Hartle, 2014) fue el mecanismo inmunológico activado durante el protocolo de inmunización, que permitió la obtención de anticuerpos IgY.

## **5.2. Obtención y purificación de inmunoglobulinas aviares tipo IgY anti *L. mexicana***

Una vez que se ha estimulado la reacción inmunológica adaptativa de la gallina, a través de la inoculación consecutiva, los anticuerpos IgY en suero pueden tener una concentración hasta de 5 mg/mL, los cuales al transferirse, pueden concentrarse 1.7 veces más en la yema (Atsushi Murai, 2013). Según Grando et al. (2017) en promedio, se puede obtener 8.5 mg/mL de IgY de cada yema de huevo, según Esmailnejad et al. (2019) pueden llegar a una concentración de hasta 25 mg/mL. Para esta investigación, los IgY tuvieron un título máximo en promedio de 6.5 mg/mL. Determinando que, los IgY se incrementaron al menos tres veces en comparación con los IgY de la gallina control, obteniéndose un incremento mayor que el reportado por Atsushi Murai (2013).

Los valores de IgY en promedio reportados coinciden con el reporte bibliográfico por parte de Hartle et al. (2014) mencionando que los IgY pueden encontrarse de entre 5 y 7 mg/mL por huevo y que la concentración de IgY en yema va a ser proporcional a los IgY en suero.

Amro et al. (2018) reportó también la existencia de razas de gallinas con mayor capacidad de respuesta a ciertos patógenos y dado a esto, ciertas gallinas pueden generar mayor títulos de anticuerpo que otras.

En el estudio presentado por Grando et al. (2017) para la producción de IgY anti *Trypanosoma cruzi*, se utilizó una concentración de parásito de  $1 \times 10^4$  en forma de tripomastigotes, concentración de antígeno suficiente para llegar a títulos altos de IgY. Mientras que en este estudio se utilizó una concentración de *L. mexicana* de  $1 \times 10^7$  promastigotes/mL, valor que es mayor que la concentración de *T. cruzi*.

En el caso de los IgY para *T. cruzi* se utilizó menos antígeno con parásito entero, en periodos de inoculación de 10 días (Grando et al., 2017). Schade et al. (2005) menciona que es importante el desarrollo inmunológico humoral relacionado a la memoria, siendo este más eficiente en intervalos de tiempo de entre 10 y 15 días, por lo que periodos muy cortos de tiempo pueden desencadenar en la depresión de la reacción inmune.

Esto puede verse reflejado en la semana 9, donde se aplicó el refuerzo de antígeno a los 21 días, que fue suficiente para incrementar los anticuerpos de forma rápida en la misma semana y mantenerlos en títulos altos hasta la semana 11.

Respecto a la estimulación inmunoduladora, que fue activada por las inoculaciones continuas, se menciona que, los IgY producidos para un antígeno específico se pueden encontrar en los huevos a partir del cuarto o sexto día después de la primera inoculación (Hartle et al., 2014; Müller et al., 2015), dato que concuerda con los resultados obtenidos, ya que en los huevos correspondientes a la primera semana post inoculación dentro de un periodo de 7 días, mostraron concentraciones de IgY mayores a la concentración de IgY de los huevos control. Comprobando a

su vez la transferencia materna de anticuerpos de plasma a yema en un periodo correspondiente a la maduración folicular y al ciclo de ovoposición como menciona Hartle et al. (2014).

Para extraer y obtener la máxima concentración de anticuerpos se utiliza procesos combinados o independientes, según criterios de concentración, pureza y actividad biológica (Júnior et al., 2017), usando aquí un proceso combinado de extracción y purificación. Se comenzó con el proceso de deslipidación, aplicándolo pectina de manzana para liberar la mayor cantidad de anticuerpos en la fase soluble, tanto la goma natural, como el pH de la solución, son aspectos fundamentales para obtener un máximo porcentaje de recuperación de anticuerpos en fase líquida. Utilizando la pectina se genera una interacción entre el polisacárido con las lipoproteínas que forman la emulsión de la yema, la interacción se basa en interacciones iónicas, hidrofóbicas y entre puentes de Hidrógeno, y aquí radica la importancia del ajuste de pH en 4.5 para asegurar la gelificación y precipitación de los lípidos (Tong, Geng, He, Cai, & Ma, 2014).

Consecuentemente, la concentración óptima de pectina para este proceso según reporta Tong et al. (2014), es del 0,1% para un porcentaje recuperación del 86% de IgY, durante esta investigación la yema fue tratada por un proceso doble de deslipidación con pectina al 0.1% con pH 4.5 para incrementar el porcentaje de recuperación de los IgY.

Posterior al proceso de deslipidación, los anticuerpos encontrados en la fase líquida deben ser separados y uno de los protocolos más efectivos, responde a la precipitación con sales de amonio, como el utilizado aquí, que corresponde al sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ , que permite una precipitación efectiva según la concentración de la sal y además mantiene la actividad biológica los anticuerpos (Júnior et al., 2017), a pesar de ser eficaz para una obtención fácil de proteínas, no

suele presentar alta pureza (Tong et al., 2014), por lo que se continuó con una purificación por columna de afinidad Hitrap específica para IgY.

La columna empleada en este proceso fue una columna de cromatografía por afinidad, mediado por una adsorción tiofílica por la 2 mercaptopiridina unida a sefarosa (GE, 2014), Júnior et al. (2017) menciona que, una cromatografía por interacción tiofílica puede generar una recuperación del 100% de IgYs, donde los anticuerpos y un ligando interactúan de forma selectiva con los IgY en altas concentraciones de sal, esta, media la unión entre el anticuerpo y el ligando, esta unión es eluida con soluciones bajas de sal y liberando específicamente los IgY (Arora et al., 2017). La casa fabricante de la columna de afinidad menciona que el porcentaje de recuperación de anticuerpos es del 70% (GE-Healthcare, 2017), concordando efectivamente con la recuperación reportada en este trabajo.

La variación entre los porcentajes de recuperación propuestos por Júnior et al. (2017) y GE-Healthcare (2017) dependen del ligando que corresponda a la membrana tiofílica, así como del uso de cromatografías de modo mixto.

### **5.3. Caracterización de IgY aviares anti *Leishmania mexicana***

#### **5.3.1. Inmunoglobulinas aviares IgY**

Posterior al proceso de purificación se comprobó que la estructura corresponda a las inmunoglobulinas obtenidas, las cuales teóricamente presentan la estructura de dos cadenas idénticas pesadas y dos cadenas ligeras, teniendo la cadena pesada cuatro dominios constantes denominados C<sub>v</sub>1-4 (Zhang et al., 2017). También se presentan dos regiones variantes pesadas y

ligeras y regiones CDR más grandes que los encontrados en anticuerpos mamíferos (Harley & Vieira-Pires, 2016). Y en lugar de bisagra, puentes disulfuro y sitios de glicosilación que mantiene unidas las estructuras (Harley & Vieira-Pires, 2016)

Las otras bandas encontradas con pesos de 18, 17 y 15 kDa pueden ser fragmentos resultantes de la desnaturalización, ya que la región variable Fv compuesta de VH y VL tiene un peso aproximado a los 25 kDa en anticuerpos monoméricos (Harley & Vieira-Pires, 2016).

Sin embargo se ratifica el hecho de que la estructura de los IgY es variante en cuanto al peso molecular final (Grando et al., 2017). El análisis de cada banda reconocida y mostrada en la **Figura 17**; Error! No se encuentra el origen de la referencia., reveló un peso molecular final de los IgY anti *L. mexicana* de 175 kDa, peso aproximado al peso final de 180 kDa que menciona Málaga-Machaca et al. (2017) y Tong et al. (2014).

### **5.3.2. Afinidad para *L. mexicana*, *braziliensis* e *infantum* con IgY anti *Leishmania mexicana* por medio de western blot.**

Como fue indicado en los resultados, IgY anti *L. mexicana* tiene capacidad de reconocimiento específico hacia a su antígeno, que puede ser en estado puro de promastigote, escindido por sonicación o solamente proteína de membrana. Además de identificar *L. mexicana*, la característica policlonal de los IgY, permiten el reconocimiento de proteínas conservadas similares entre el género *Leishmania*, detectando así *L. braziliensis* y *L. infantum*.

La proteínas detectadas en muestras de promastigote y extracto sonicado de *L. mexicana*, con bandas de peso molecular de 48 y 49 kDa, pueden corresponder a la  $\beta$  tubulina, así como también, fragmentos de esta a 20 kDa (Nugent, Karsani, Wait, Tempero, & Smith, 2004). De estas



mismas muestras, se detectó una banda de 30 kDa aproximados que puede ser comparada con un fragmento de GAPDH de 29 kDa. En la muestra de promastigote desnaturalizado la banda correspondiente a 38 kDa, podría corresponder a la GAPDH completa como reporta Nugent et al. (2004).

Que se encuentre GAPDH solamente en extracto sonificado y promastigote puro desnaturalizado, concuerda con que no se encuentren estas bandas en las muestra de proteína de membrana, ya que GAPDH es una enzima metabólica, mas no constitutiva.

En proteínas de membrana, un estudio realizado por Lynn, Marr, and McMaster (2013), menciona que existe una GP63 común entre *L. mexicana* y *L. infantum*, dada a su similitud estructural, ambas expresadas en estadio de promastigote. Resultado que concuerda con lo aquí presentado ya que para las dos especies, los IgY anti *L. mexicana* marcaron una banda en 63 kDa, que puede ser comparada con la proteína de virulencia responsable de la evasión de lisis en los fagolisosomas (Lynn et al., 2013).

Según estudios de filogenia, reportan que durante eventos evolutivos de expansión, la GP63 puede ser diferente en tres familias parasitarias, por esto la GP63 encontrada en *L. braziliensis*, es diferente a la GPG3 reportada como común en *L. mexicana* y *L. infantum*, ya que la GP63 de *L. braziliensis* se compone de dos isoformas (Rodríguez, Scholte, Oliveira, Gabaldón, & Bartholomeu, 2015), esto explica por qué no se reportó banda en 63 kDa para *L. braziliensis*.

En cuanto a proteínas de virulencia, se conoce que existe una proteína en los estadios de promastigote de Leishmania, que corresponde a una metalopeptidasa de zinc con un peso molecular de 63 kDa, representando el 1% de las proteínas de membrana del parásito, a esta glicoproteína se la denomina leishmaniosin o incluso MSP (Major Surface Peptidase) y que tiene además

características similares a las metaloendopeptidasas de mamífero (d'Avila-Levy, Altoé, Uehara, Branquinha, & Santos, 2014). esta proteína en los parásitos, tiene roles de adhesión en estadio promastigote para mantenerse en el organismo de sus huéspedes invertebrados más no una actividad proteolítica (d'Avila-Levy et al., 2014).

Para *L. infantum* según indican los estudios de Brotherton et al. (2012), las proteínas con peso molecular de 100 kDa pueden estar relacionados con receptores de membrana extracelulares, o como en 88 kDa, con proteínas transmembrana como la GPI16, además que en *L. infantum* existen proteínas conservadas que aparecen en procesos de patología visceral, una vez que ha entrado en el huésped mamífero, estas proteínas se encuentran en un complejo de antígeno denominado A2 corresponden a un peso molecular de 42 y 100 kDa pero estas proteínas se encuentran en el estadio amastigote (Akhoundi et al., 2013).

### **5.3.3. Reconocimiento de los IgY anti *Leishmania mexicana* en pruebas ELISA.**

Las pruebas ELISA se reconocen como una de las pruebas de detección y cuantificación de antígenos o anticuerpos, con mayor sensibilidad en el área de inmunodiagnóstico, influyendo la afinidad entre un anticuerpo y el antígeno, a su vez reconociendo esta unión por otro anticuerpo que se encuentra conjugado a una enzima que genera productos colorimétricos o luminiscentes (Lin, 2015).

Como menciona Aydin (2015), la eficacia de la técnica se basa a la afinidad del anticuerpo a su antígeno, ya que este no puede unirse a otra molécula que no sea la que el anticuerpo puede reconocer (Aydin, 2015).

Se observó en la prueba ELISA, que los IgY aumentan su afinidad y especificidad hacia su antígeno respecto al tiempo, efecto que fue visualizado por su incremento paulatino, teniéndose picos de detección en semanas como S8, S9 y S11, haciendo énfasis en la estimulación humoral de memoria y especificidad (Aydin, 2015)

En cuanto a los resultados generados con la prueba ELISA, correspondientes a la capacidad de detección de los IgY anti *L. mexicana* hacia su antígeno, la curva ROC generó una capacidad de discriminación del 82%, con AUC de 0.82, valor que es aceptado dentro del rango como menciona Fan, Upadhye, and Worster (2006) con una sensibilidad del 88% y una especificidad del 50% aproximadamente.

Según la fórmula para obtener el cut off propuesta por Lardeux, Torrico, and Aliaga (2016), el cut off es de una OD a 405nm de 0.17, identificando como reconocimiento positivo a la interacción de los anticuerpos recuperados de la semana 5, 8, 9 y 11, que detectaron antígeno desde los 25 µg/mL. Resultado que concuerda con el resultado de pruebas cruzadas.

En cuanto al ELISA empleado para analizar la dilución máxima y mínima capaz de reconocer *L. mexicana*, el AUC de la curva ROC fue un valor de uno, con una capacidad de discernimiento del 100% entre positivos y negativos, siendo 100% sensible y 100% específica. El cut off por selección del interprete como menciona Fan et al. (2006), fue obtenido respecto a los resultados máximos en comparaciones múltiples, fijando el valor en un OD a 405nm de 0.15, siendo así los resultados positivos desde una dilución máxima de 1:50 y mínima de 1:2000 de IgY. Estos valores tienen relación con los resultados presentados por Cakir-Koc (2016), en los cuales una dilución de IgY anti *Toxoplasma gondii* mayor a 1:3000, reduce significativamente con la capacidad de detección del antígeno.

Se reconoce que la cercanía genética entre especies de *Leishmania*, propicia a que los IgY anti *Leishmania mexicana* los detecten otras especies por sus características policlonales. Para el caso entre *Leishmania mexicana* e *infantum*, se reporta una diferencia de proteínas constitutivas del 26% (Lynn et al., 2013), por lo que el 84% de proteínas similares de *L. infantum* podrán ser reconocidos por los IgY por su capacidad de detección policlona.

La detección mediada por los IgY hacia otras especies de *Leishmania*, generó un AUC de la curva ROC de 1, con sensibilidad y especificidad del 100%, y del mismo modo que la asignación del cut off por Fan et al. (2006), se definió este en 0.2, donde el reconocimiento positivo se genera para los anticuerpos de la semana 8 para las tres especies y la semana 11 solo para *L. mexicana* y *L. infantum* (**Figura 20**).

En las pruebas cruzadas, se observó un reconocimiento moderado por la bacteria *Staphylococcus aureus*, a pesar de combinar los IgY con antígeno de esta bacteria para rezagar los IgY más afines por este antígeno, no hubo diferencia en la capacidad final de reconocimiento. No se reporta bibliográficamente homología entre la bacteria y el parásito en cuestión, pero si se menciona que el *S. aureus* puede estar relacionada con la microbiota natural o enfermedades de aves de corral (Ali et al., 2017).

Por otro lado, es comprensible que los IgY detecten *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*, considerando que *E. coli* es parte de las enterobacterias más comunes en el área avícola y por su lado la *Salmonella enteritidis* es agente causal de la mayoría de problemas industriales en el área alimenticia avícola (Esmailnejad et al., 2019).

## CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

- Se obtuvo inóculo inactivado por calor de *Leishmania mexicana* en estadio promastigote que fue inoculado en gallinas ponedoras Lohmann Brown de forma intramuscular con adyuvante de Freund completo e incompleto en aplicaciones semanales, en diferentes periodos, durante 11 semanas post infección. La aplicación de antígeno desarrolló el estímulo inmunológico relacionado a la producción de inmunoglobulinas, siendo estos concentrados en yemas por mecanismos de transferencia materna, por lo cual, los huevos de gallina fueron empleados como fuentes continuas de anticuerpos.
- Se obtuvieron anticuerpos IgY contra *Leishmania mexicana* en todos los huevos procesados post inoculación, obteniéndose una máxima producción de inmunoglobulinas en la semana 9 de investigación, con una concentración máxima promedio de 6.5 mg/mL de IgY por yema, utilizando métodos estándar efectivos de deslipitación con pectina 0.1%, precipitación con solución saturada de Sulfato de Amonio y purificación tiofílica combinada con columnas de afinidad HiTrap.
- Se caracterizó IgY contra *L. mexicana* como proteínas puras de peso molecular de 175 kDa, de estructura completa con cadenas pesadas de 67 kDa y cadenas ligeras de 35 y 22 kDa. Estas inmunoglobulinas tuvieron una capacidad de reconocimiento de *L. mexicana* en concentraciones mínimas de 5 y máximas efectivas de 50 µg/mL de antígeno, con anticuerpos de mayor especificidad en la semana 8 y 11 usados hasta en diluciones mínimas de 1:2000.

Los IgY anti *L. mexicana* reconocieron proteínas constitutivas, metabólicas y patogénicas del parásito, como  $\beta$  globulina, GAPDH, GP63 respectivamente por protocolo de Western Blot indirecto. Se observó afinidad también por otras especies de *Leishmania* principalmente con *L. infantum* ya que corresponden a la misma familia evolutiva, reconocimiento que fue mediado por la característica policlonal de los anticuerpos. Las pruebas ELISA indirectas, generaron un valor de cut off de 0.2 OD y AUC de 1.

## CAPÍTULO 7. RECOMENDACIONES

- Se debe asegurar condiciones óptimas de mantención para los animales, por lo que se enfatiza en la sanidad animal, aplicando vacunaciones y limpiezas diarias tanto de comederos como jaulas para evitar infecciones no deseadas que alteren el resultado de la investigación.
- Los anticuerpos deben ser almacenados y tratados en cadenas de frío y esterilidad para asegurar la conservación de su actividad biológica.
- La respuesta inmunoestimuladora relacionada con la especificidad y la memoria están estrechamente relacionadas con el tiempo del estímulo, por lo que se recomienda en próximos análisis, utilizar periodos entre inoculaciones más largos, para afianzar la reacción humoral y potenciar la producción de anticuerpos.
- Las cromatografías combinadas proveen un mejor porcentaje de recuperación de IgY, las columnas por afinidad empleadas en este estudio permitieron obtener proteínas completas y más puras, sin embargo el tiempo necesario para la purificación, hace que esta técnica sea extensa, por lo cual se recomienda, utilizar sistemas automatizados que regulen el paso de la muestra por la columna, y poder aplicarlo a escalas industriales.
- Se recomienda también emplear los IgY en pruebas citotóxicas *In vitro*, que permitirá catapultar este tipo de inmunoglobulinas como biofármacos terapéuticos.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abbas, A. K., Lichtman, A., & Pober, J. (2000). B cell activation and antibody production. *Cellular and molecular immunology*, 1, 243-267.
- Acharya, P., Quinlan, A., & Neumeister, V. (2017). The ABCs of finding a good antibody: How to find a good antibody, validate it, and publish meaningful data. *F1000Research*, 6.
- Agrawal, R., Hirpurkar, S., Sannat, C., & Gupta, A. K. (2016). Comparative study on immunoglobulin Y transfer from breeding hens to egg yolk and progeny chicks in different breeds of poultry. *Veterinary world*, 9(4), 425.
- Aizenshtein, E., Yosipovich, R., Kvint, M., Shadmon, R., Krispel, S., Shuster, E., . . . Shahar, E. (2016). Practical aspects in the use of passive immunization as an alternative to attenuated viral vaccines. *Vaccine*, 34(22), 2513-2518.
- Akbari, M., Oryan, A., & Hatam, G. (2017). Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. *Acta tropica*, 172, 86-90.
- Akhoundi, B., Mohebbali, M., Shojaee, S., Jalali, M., Kazemi, B., Bandehpour, M., . . . Malekafzali, H. (2013). Rapid detection of human and canine visceral leishmaniasis: assessment of a latex agglutination test based on the A2 antigen from amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Experimental parasitology*, 133(3), 307-313.
- Ali, Y., Islam, M. A., Muzahid, N. H., Sikder, M. O. F., Hossain, M. A., & Marzan, L. W. (2017). Characterization, prevalence and antibiogram study of *Staphylococcus aureus* in poultry. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(3), 253-256.



- Allende, S., Kennedy, A., & Delta, A. (2018). Estudio de Casos de Leishmaniasis Cutánea Registrados en un Hospital Público en Portoviejo, Ecuador. *Revista científica digital INSPILIP Código ISSN, 2588, 0551*.
- Amro, W. A., Al-Qaisi, W., & Al-Razem, F. (2018). Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 16*(1), 99-103.
- An, I., Harman, M., Esen, M., & Celik, H. (2019). The Effect of Pentavalent Antimonial Compounds used in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis on Hemogram and Biochemical Parameters. *Cutaneous and Ocular Toxicology*(just-accepted), 1-12.
- Apostólico, J. d. S., Lunardelli, V. A. S., Coirada, F. C., Boscardin, S. B., & Rosa, D. S. (2016). Adjuvants: classification, modus operandi, and licensing. *Journal of immunology research, 2016*.
- Arora, S., Saxena, V., & Ayyar, B. V. (2017). Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. *Methods, 116*, 84-94.
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides, 72*, 4-15.
- Beck, A., Wurch, T., Bailly, C., & Corvaia, N. (2010). Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nature reviews immunology, 10*(5), 345.
- Bradbury, A., & Plückthun, A. (2015). Reproducibility: Standardize antibodies used in research. *Nature News, 518*(7537), 27.
- Brotherton, M.-C., Racine, G., Ouameur, A. A., Leprohon, P., Papadopoulou, B., & Ouellette, M. (2012). Analysis of membrane-enriched and high molecular weight proteins in *Leishmania infantum* promastigotes and axenic amastigotes. *Journal of proteome research, 11*(8), 3974-3985.

- Cakir-Koc, R. (2016). Production of anti-SAG1 IgY antibody against *Toxoplasma gondii* parasites and evaluation of antibody activity by ELISA method. *Parasitology research*, *115*(8), 2947-2952.
- Calvopiña, M., Cevallos, W., Paredes, Y., Puebla, E., Flores, J., Loor, R., & Padilla, J. (2017). Intralesional infiltration with meglumine antimoniate for the treatment of leishmaniasis recidiva cutis in Ecuador. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *97*(5), 1508-1512.
- Campbell, D., Lee, C., Hinch, G., & Roberts, J. (2017). Egg production and egg quality in free-range laying hens housed at different outdoor stocking densities. *Poultry science*, *96*(9), 3128-3137.
- Courtenay, O., Peters, N. C., Rogers, M. E., & Bern, C. (2017). Combining epidemiology with basic biology of sand flies, parasites, and hosts to inform leishmaniasis transmission dynamics and control. *PLoS pathogens*, *13*(10), e1006571.
- d'Avila-Levy, C. M., Altoé, E. C., Uehara, L. A., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. (2014). GP63 function in the interaction of trypanosomatids with the invertebrate host: facts and prospects. In *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma* (pp. 253-270): Springer.
- Davison, F. (2014). *The importance of the avian immune system and its unique features* (K. Schat, B. Kaspers, & P. Kaiser Eds. 2nd ed.). Science Direct: Elsevier.
- de Vries, H. J., Reedijk, S. H., & Schallig, H. D. (2015). Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *American journal of clinical dermatology*, *16*(2), 99-109.

- Ecuador, M. d. S. P. d. (2014). *Manual de procedimientos del subsistema de vigilancia epidemiológica alerta acción SIVE - Alerta*. salud.gob.ec Retrieved from <https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/MANUAL%20DE%20PROCEDIMIENTOS%2016%20de%20Octubre%20de%202014.pdf>
- Esmailnejad, A., Abdi-Hachesoo, B., Nasab, E. H., & Shakoori, M. (2019). Production, purification, and evaluation of quail immunoglobulin Y against *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*. *Molecular immunology*, *107*, 79-83.
- Fan, J., Upadhye, S., & Worster, A. (2006). Understanding receiver operating characteristic (ROC) curves. *Canadian Journal of Emergency Medicine*, *8*(1), 19-20.
- Ferreira Júnior, Á., Santos, J. P. d., Sousa, I. d. O., Martin, I., Alves, E. G. L., & Rosado, I. R. (2018). *Gallus gallus domesticus*: immune system and its potential for generation of immunobiologics. *Ciência Rural*, *48*(8).
- Franco-Paredes, C., & Santos-Preciado, J. I. (2015). *Neglected Tropical Diseases-Latin America and the Caribbean*: Springer.
- Gaetani, C., Ambrosi, E., Ugo, P., & Moretto, L. (2017). Electrochemical immunosensor for detection of IgY in food and food supplements. *Chemosensors*, *5*(1), 10.
- Gagnon, P. (2012). Technology trends in antibody purification. *Journal of chromatography A*, *1221*, 57-70.
- GE-Healthcare. (2017). Antibody purification. In. GE Healthcare.
- GE. (2014, 2014). HiTrap IgY Purification HP. Retrieved from <https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=11171>

- Gedda, M. R., Singh, O. P., Srivastava, O. N., & Sundar, S. (2019). Therapeutic Leishmaniasis: Recent Advancement and Developments in Nanomedicines. In *Nanotechnology in Modern Animal Biotechnology* (pp. 195-220): Springer.
- Grando, T. H., Baldissera, M. D., de Sá, M. F., do Carmo, G. M., Porto, B. C. Z., Aguirre, G. S., . . . Sagrillo, M. R. (2017). Avian antibodies (IgY) against *Trypanosoma cruzi*: Purification and characterization studies. *Journal of immunological methods*, 449, 56-61.
- Hage, D. S., & Matsuda, R. (2015). Affinity chromatography: a historical perspective. In *Affinity Chromatography* (pp. 1-19): Springer.
- Harley, C., & Vieira-Pires, R. S. (2016). Antibody fragment technology and avian IgY antibodies: a powerful combination. *Drug Target Review*, 3(1), 62-66.
- Hartle, S., Magor, K., Gobel, T., & Davison, F. (2014). *Structure and evolution of avian immunoglobulins* (K. Schat, B. Kaspers, & P. Kaiser Eds. 2nd ed.). Science direct: Elsevier.
- Hashiguchi, Y., Gomez, E. A., Cáceres, A. G., Velez, L. N., Villegas, N. V., Hashiguchi, K., . . . Kato, H. (2018). Andean cutaneous leishmaniasis (Andean-CL, uta) in Peru and Ecuador: the causative *Leishmania* parasites and clinico-epidemiological features. *Acta tropica*, 177, 135-145.
- Hashiguchi, Y., Velez, L. N., Villegas, N. V., Mimori, T., Gomez, E. A., & Kato, H. (2017). Leishmaniasis in Ecuador: comprehensive review and current status. *Acta tropica*, 166, 299-315.
- Huang, X., & Ahn, D. U. (2019). How Can the Value and Use of Egg Yolk Be Increased? *Journal of food science*, 84(2), 205-212.
- Júnior, A. F., Santos, J. P., Bassi, P. B., Bittar, J. F., & Bittar, E. R. (2017). IgY-Technology Applied to Studies of *Toxoplasma gondii* Infection. *Toxoplasmosis*, 141.

- Juul-Madsen, H. R., Viertlböeck, B., Härtle, S., Smith, A. L., & Göbel, T. W. (2014). Innate immune responses. In *Avian Immunology* (pp. 121-147): Elsevier.
- Kaiser, K. S. B. K. P. (2014). *Avian Immunology* (2nd ed.). Elsevier.
- Kaspers, B. (2014). The bursa of fabricius and its essential role in B cell development and antibody production. *Merial avian science review*. Retrieved from <http://avian.merial.com/sites/merial.avian/files/merial-avian-science-review-en.pdf>
- Kaspers, B. (2016). An egg a day - the physiology of egg formation. *Lohmann information*, 2, 3. Retrieved from [https://www.ltz.de/de-wAssets/docs/lohmann-information/Lohmann-Information2\\_2016\\_Vol-50-2-December-Kaspers.pdf](https://www.ltz.de/de-wAssets/docs/lohmann-information/Lohmann-Information2_2016_Vol-50-2-December-Kaspers.pdf).
- Kevric, I., Cappel, M. A., & Keeling, J. H. (2015). New world and old world Leishmania infections: a practical review. *Dermatologic clinics*, 33(3), 579-593.
- Khan, K. H., Himeno, A., Kosugi, S., Nakashima, Y., Rafique, A., Imamura, A., . . . Ito, Y. (2017). IgY-binding peptide screened from a random peptide library as a ligand for IgY purification. *Journal of Peptide Science*, 23(10), 790-797.
- Khosravi, A., Sharifi, I., Tavakkoli, H., Keyhani, A. R., Afgar, A., Salari, Z., . . . Varma, R. S. (2019). Toxicopathological effects of meglumine antimoniate on human umbilical vein endothelial cells. *Toxicology in Vitro*, 56, 10-18.
- Koczula, K. M., & Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays in biochemistry*, 60(1), 111-120.
- Kollberg, H. (2015). Avian antibodies (IgY) to fight antibiotic resistance. *Clinical Microbiology: Open Access*, 4(2).
- Koutsos, E., & Klasing, L. (2014). *Factors modulating the avian immune system* (P. K. K. S. B. Kaspers Ed. 2nd ed.). Science Direct: Elsevier.

- Kumar, A. (2019). Transmission of leishmaniasis from human to other vertebrates: a rapid zoonanthroponotic evolution. *International Microbiology*, 1-3.
- Lardeux, F., Torrico, G., & Aliaga, C. (2016). Calculation of the ELISA's cut-off based on the change-point analysis method for detection of *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivian dogs in the absence of controls. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(8), 501-504.
- Lee, W., Atif, A. S., Tan, S. C., & Leow, C. H. (2017). Insights into the chicken IgY with emphasis on the generation and applications of chicken recombinant monoclonal antibodies. *Journal of immunological methods*, 447, 71-85.
- Lesnierowski, G., & Stangierski, J. (2018). What's new in chicken egg research and technology for human health promotion?-A review. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 46-51.
- Li, X., Wang, L., Zhen, Y., Li, S., & Xu, Y. (2015). Chicken egg yolk antibodies (IgY) as non-antibiotic production enhancers for use in swine production: a review. *Journal of animal science and biotechnology*, 6(1), 40.
- Lin, A. V. (2015). Indirect ELISA. In *ELISA* (pp. 51-59): Springer.
- Lynn, M. A., Marr, A. K., & McMaster, W. R. (2013). Differential quantitative proteomic profiling of *Leishmania infantum* and *Leishmania mexicana* density gradient separated membranous fractions. *Journal of proteomics*, 82, 179-192.
- Machado, P. R., Ribeiro, C. S., França-Costa, J., Dourado, M. E., Trinconi, C. T., Yokoyama-Yasunaka, J. K., . . . Uliana, S. R. (2018). Tamoxifen and meglumine antimoniate combined therapy in cutaneous leishmaniasis patients: a randomised trial. *Tropical Medicine & International Health*, 23(9), 936-942.
- Málaga-Machaca, E. S., Romero-Ramirez, A., Gilman, R. H., Astupiña-Figueroa, S., Angulo, N., Florentini, A., . . . Cabello, I. (2017). Polyclonal antibodies for the detection of

- Trypanosoma cruzi circulating antigens. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(11), e0006069.
- Marcq, C., Marlier, D., & Beckers, Y. (2015). Improving adjuvant systems for polyclonal egg yolk antibody (IgY) production in laying hens in terms of productivity and animal welfare. *Veterinary immunology and immunopathology*, 165(1-2), 54-63.
- Matte, C., Casgrain, P.-A., Séguin, O., Moradin, N., Hong, W. J., & Descoteaux, A. (2016). Leishmania major promastigotes evade LC3-associated phagocytosis through the action of GP63. *PLoS pathogens*, 12(6), e1005690.
- McKee, A. S., & Marrack, P. (2017). Old and new adjuvants. *Current opinion in immunology*, 47, 44-51.
- Montini, M. P. O., Fernandes, E. V., Ferraro, A. C. N. d. S., Almeida, M. A., da Silva, F. C., & Venancio, E. J. (2018). Effects of inoculation route and dose on production and avidity of IgY antibodies. *Food and Agricultural Immunology*, 29(1), 306-315.
- Müller, S., Schubert, A., Zajac, J., Dyck, T., & Oelkrug, C. (2015). IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. *Nutrition journal*, 14(1), 109.
- Murai, A. (2013). Maternal transfer of immunoglobulins into egg yolks of birds. *The Journal of Poultry Science*, 0120194.
- Murai, A. (2013). Study on the mechanism of IgY transfer into egg yolks, and production of designer eggs. In.
- Nassif, P. W., De Mello, T. F. P., Navasconi, T. R., Mota, C. A., Demarchi, I. G., Aristides, S. M. A., . . . Silveira, T. G. V. (2017). Safety and efficacy of current alternatives in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. *Parasitology*, 144(8), 995-1004.

- Nugent, P. G., Karsani, S. A., Wait, R., Tempero, J., & Smith, D. F. (2004). Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. *Molecular and biochemical parasitology*, 136(1), 51-62.
- Oláh, I., Nagy, N., & Verdelde, L. (2014). *Structure of the avian lymphoid system* (K. Schat, B. kaspers, & P. Kaiser Eds. 2nd ed.). Elsevier.
- OpenStax (Producer). (2018a). B lymphocytes and humoral immunity. Retrieved from <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/b-lymphocytes-and-humoral-immunity/>
- OpenStax. (2018b). Polyclonal and monoclonal antibody production. In.
- OPS, W. (Producer). (2018). Ecuador: Leishmaniasis cutánea y mucosa 2017. Retrieved from [http://www.panaftosa.org/leish/inf2017\\_es/INFO\\_ECU\\_ESP\\_2017.pdf](http://www.panaftosa.org/leish/inf2017_es/INFO_ECU_ESP_2017.pdf)
- OPS, W. (2018). *Leishmaniasis cutánea y mucosa 2017, Ecuador*. WHO Retrieved from [http://www.panaftosa.org/leish/inf2017\\_es/INFO\\_ECU\\_ESP\\_2017.pdf](http://www.panaftosa.org/leish/inf2017_es/INFO_ECU_ESP_2017.pdf)
- OPS, W. (2019). Leishmaniasis, informe epidemiológico de las américas. 8. Retrieved from <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/2019-cde-leish-informe-epi-americas.pdf>
- Pereira, E., van Tilburg, M., Florean, E., & Guedes, M. (2019). Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. *International immunopharmacology*, 73, 293-303.
- Petersen, J. S. G. B. C. (Producer). (2016). Leishmaniosis.
- Podinovskaia, M., & Descoteaux, A. (2015). *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future microbiology*, 10(1), 111-129.



- Ratcliffe, M., & Hartle, S. (2014). *B cells, the Bursa of Fabricius and the Generation of Antiboie Repertoires* (K. Schat, B. Kaspers, & P. Kaiser Eds. 2nd ed.). Elsevier.
- Ribatti, D. (2015). The Bursa of Fabricius. In *The Development of Immunologic Competence* (pp. 13-23): Springer.
- Rodríguez, H. O. V., Scholte, L. L. S., Oliveira, G. C. d., Gabaldón, T., & Bartholomeu, D. C. (2015). The Leishmania metaphylome: A comprehensive survey of Leishmania protein phylogenetic relationships.
- Schade, R., Calzado, E. G., Sarmiento, R., Chacana, P. A., Porankiewicz-Asplund, J., & Terzolo, H. R. (2005). Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern Lab Anim*, 33(2), 129-154.
- Schijns, V., Zande, S. V. d., Lupiani, B., & Reddy, S. (2014). *Practical aspects of poultry vaccination* (K. S. B. K. K. Peter Ed.). Elsevier.
- Spillner, E., Braren, I., Greunke, K., Seismann, H., Blank, S., & du Plessis, D. (2012). Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. *Biologicals*, 40(5), 313-322.
- Sun, Y., Yang, Y., Wang, L., Lv, L., Zhu, J., Han, W., . . . Zhen, Y. (2015). Highly sensitive detection of cancer antigen human epidermal growth factor receptor 2 using novel chicken egg yolk immunoglobulin. *Biologicals*, 43(3), 165-170.
- Sundar, S., & Singh, B. (2018). Understanding Leishmania parasites through proteomics and implications for the clinic. *Expert review of proteomics*, 15(5), 371-390.
- Taslimi, Y., Zahedifard, F., & Rafati, S. (2018). Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. *Parasitology*, 145(4), 497-507.

- ThermoFisher-Scientific. (2009a). Chemiluminescent Western Blotting technical guide and protocols. In (pp. 10).
- ThermoFisher-Scientific (Producer). (2009b). Overview of Affinity Purification. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-affinity-purification.html>
- Thomaz-Soccol, V., Ferreira da Costa, E. S., Karp, S. G., Junior Letti, L. A., Soccol, F. T., & Soccol, C. R. (2018). Recent advances in vaccines against Leishmania based on patent applications. *Recent patents on biotechnology*, 12(1), 21-32.
- Tong, C., Geng, F., He, Z., Cai, Z., & Ma, M. (2014). A simple method for isolating chicken egg yolk immunoglobulin using effective delipidation solution and ammonium sulfate. *Poultry science*, 94(1), 104-110.
- Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Res*, 6, 750. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28649370>. doi:10.12688/f1000research.11120.1
- Vinaud, M. C., & Junior, R. d. S. L. (2017). Mode of action of the main anti-parasitic drugs. *Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology*, 46(2), 121-133.
- Wigley, P., barrow, P., & Schat, K. (2014). *The avian reproductive immune system* (K. K. Schat, Bernd; Pete, Kaiser Ed. 2nd ed.). Elsevier.
- Wingfield, P. T. (2016). Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current protocols in protein science*, 84(1), A. 3F. 1-A. 3F. 9.
- Zhang, X., Calvert, R. A., Sutton, B. J., & Doré, K. A. (2017). IgY: a key isotype in antibody evolution. *Biological Reviews*, 92(4), 2144-2156.