

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE

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

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Producción de anticuerpos IgY contra proteína recombinante Gn y Gc, en *Gallus gallus domesticus* inmunizadas con ADN solo y acompañado con polímeros catiónicos.

Autora: Nashla Shayne Rosero Flores

Directora:

Thelvia Ramos, PhD(c).

Natalie Parra, PhD.

Sangolquí, 8 de marzo de 2023



1. Introducción

2. Objetivos

3. Metodología

4. Resultados y Discusión

5. Conclusiones y Recomendaciones



1. Introducción

2. Objetivos

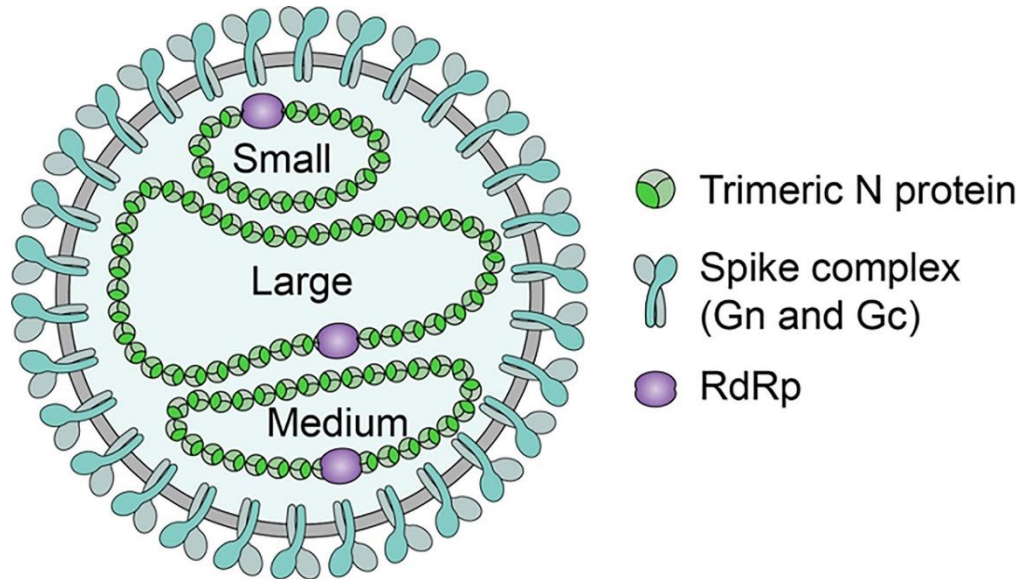
3. Metodología

4. Resultados y Discusión

5. Conclusiones y Recomendaciones



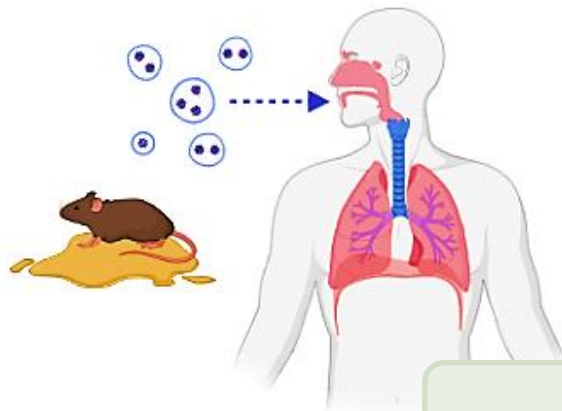
Estructura del Hantavirus



- El genoma del hantavirus es tripartito, de sentido negativo.
- Segmentos grande (L), mediano (M) y pequeño (S)
- La parte externa del virión consta de “espinas”, Gn y Gc.

Hantavirus y el Virus de los Andes (ANDV)

Transmisión y distribución del Hantavirus



Transmisión por aerosoles

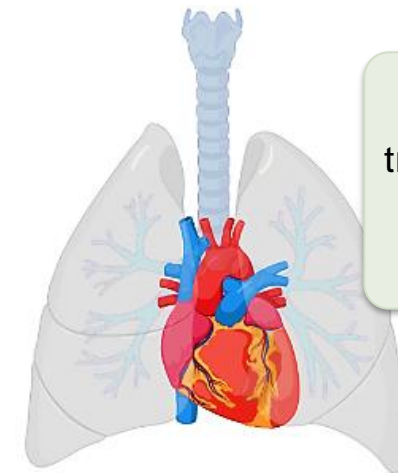
Virus de los Andes (ANDV)

Hantavirus del Nuevo Mundo



Se reportan casos desde 1995
30-50% letalidad

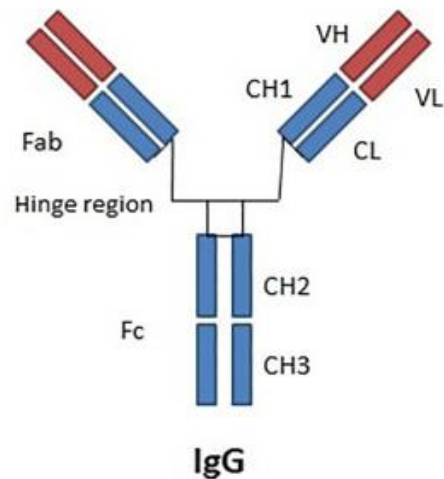
Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus (HCPS)



No hay tratamientos aprobados por la FDA

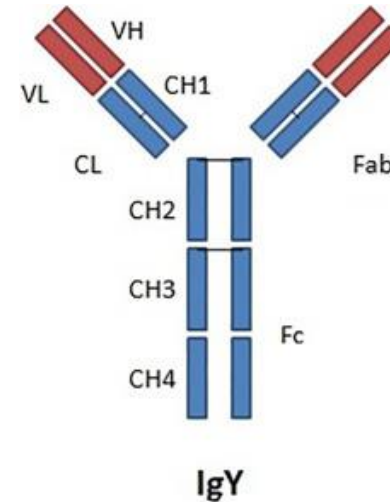
Anticuerpos como tratamiento terapéutico

Inmunoglobulina G



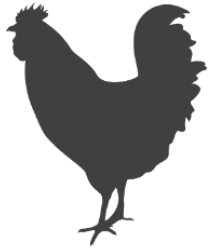
- Ampliamente estudiados
- Producidos en mamíferos
- Reacciones cruzadas
- Altos costos
- Mayor tiempo de producción

Inmunoglobulina Y



- Estructura similar a IgG
- Producidas en aves
- Se encuentra en la yema
- No hay reacciones cruzadas
- Menos tiempo de producción

Gallina ponedora como fuente de obtención de anticuerpos



Proceso no invasivo



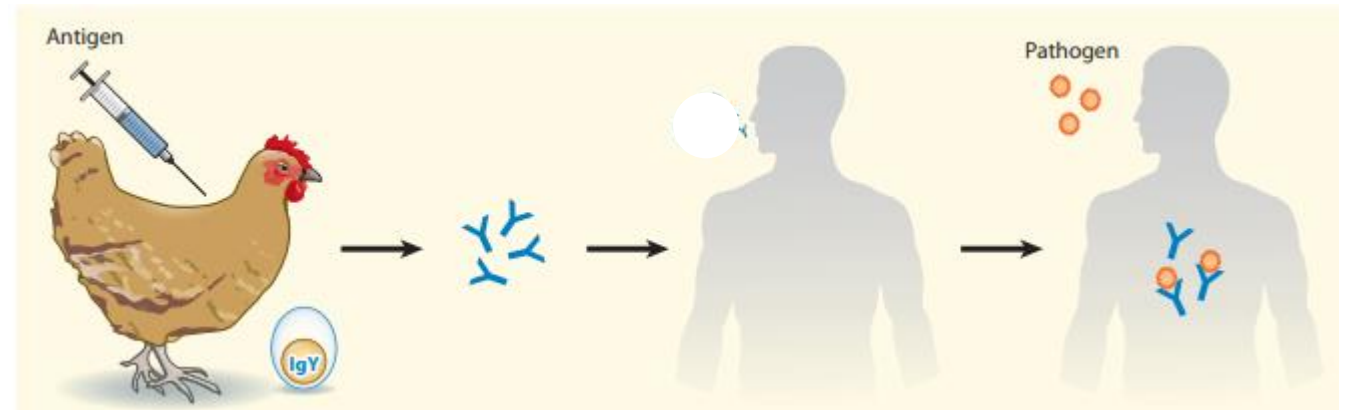
≈ 300 huevos anuales



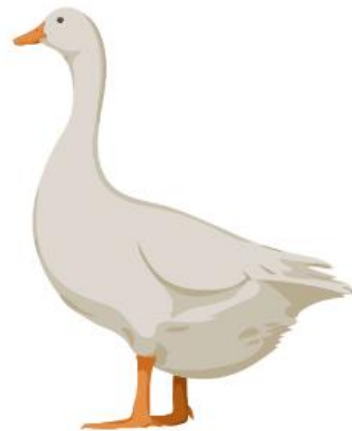
Cada yema contiene de 50-150 mg de IgY



Proceso productivo más eficiente

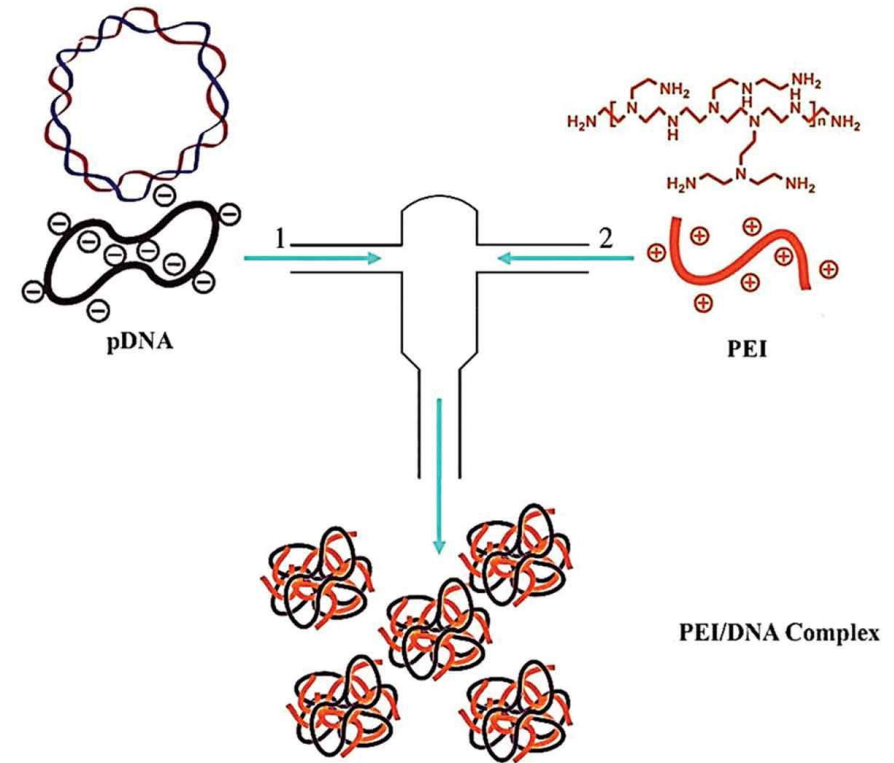


Inmunización con ADN



- Estudios realizados en patos y gansos
- Inmunizando con plásmidos que contienen el segmento M
- Obtuvieron gran cantidad de anticuerpos específicos
- Inmunizaciones hasta 1 año después

Polímeros catiónicos



1. Introducción

2. Objetivos

3. Metodología

4. Resultados y Discusión

5. Conclusiones y Recomendaciones



1. Introducción

2. Objetivos

3. Metodología

4. Resultados y Discusión

5. Conclusiones y Recomendaciones



Objetivo General

Producir anticuerpos IgY contra proteínas recombinantes Gn y Gc, en *Gallus gallus domesticus* inmunizadas con ADN solo y acompañado con polímeros catiónicos.



Objetivo Específicos

- Evaluar mediante inmunofluorescencia la expresión de las proteínas recombinantes Gn y Gc en cultivo celular.
- Inmunizar *Gallus gallus domesticus* con dosis de ADN solo y ADN acompañado con polietilenimina (PEI).
- Comparar mediante ELISA la expresión temporal de anticuerpos en suero y en huevos de *Gallus gallus domesticus* inmunizadas con ADN solo y ADN acompañado con Polietilenimina (PEI).



Hipótesis

Los niveles de expresión de anticuerpos IgY de *Gallus gallus domesticus*, contra proteínas recombinantes Gn y Gc, tiene directa relación con la estrategia de inmunización utilizada.



1. Introducción

2. Objetivos

3. Metodología

4. Resultados y Discusión

5. Conclusiones y Recomendaciones



1. Introducción

2. Objetivos

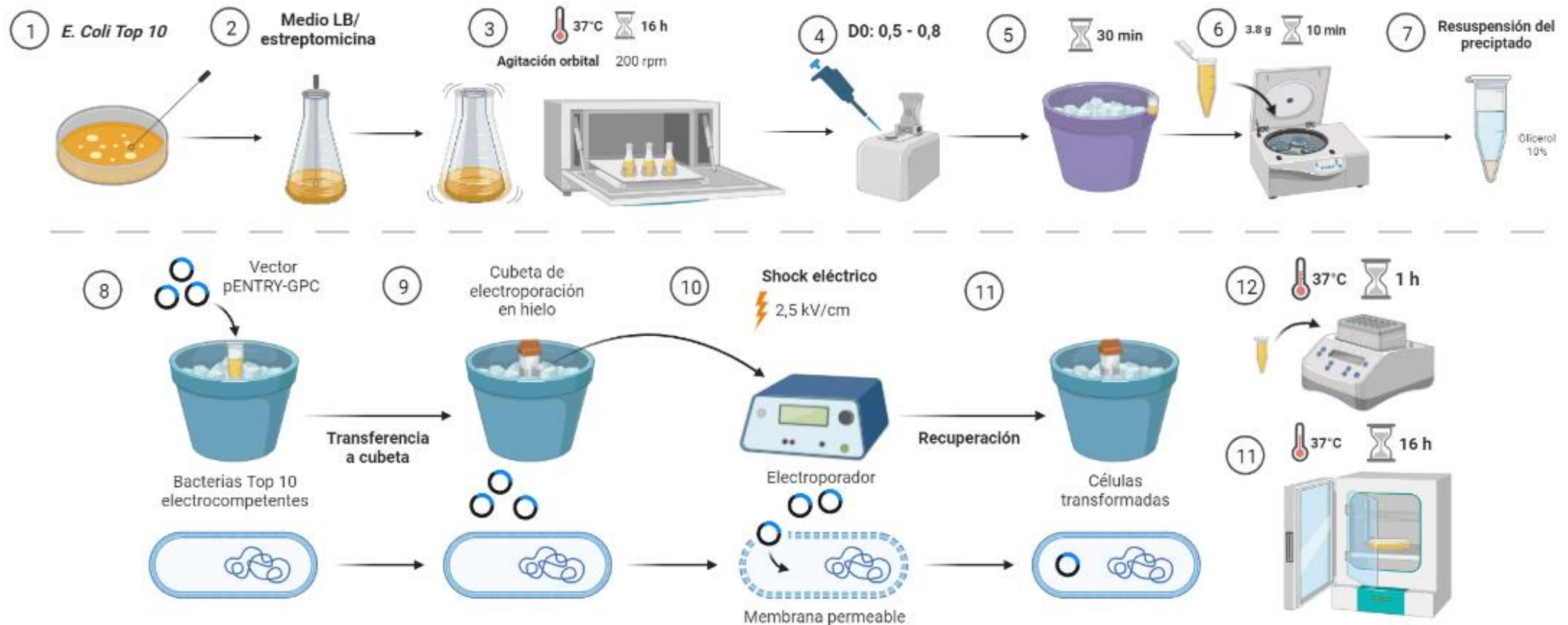
3. Metodología

4. Resultados y Discusión

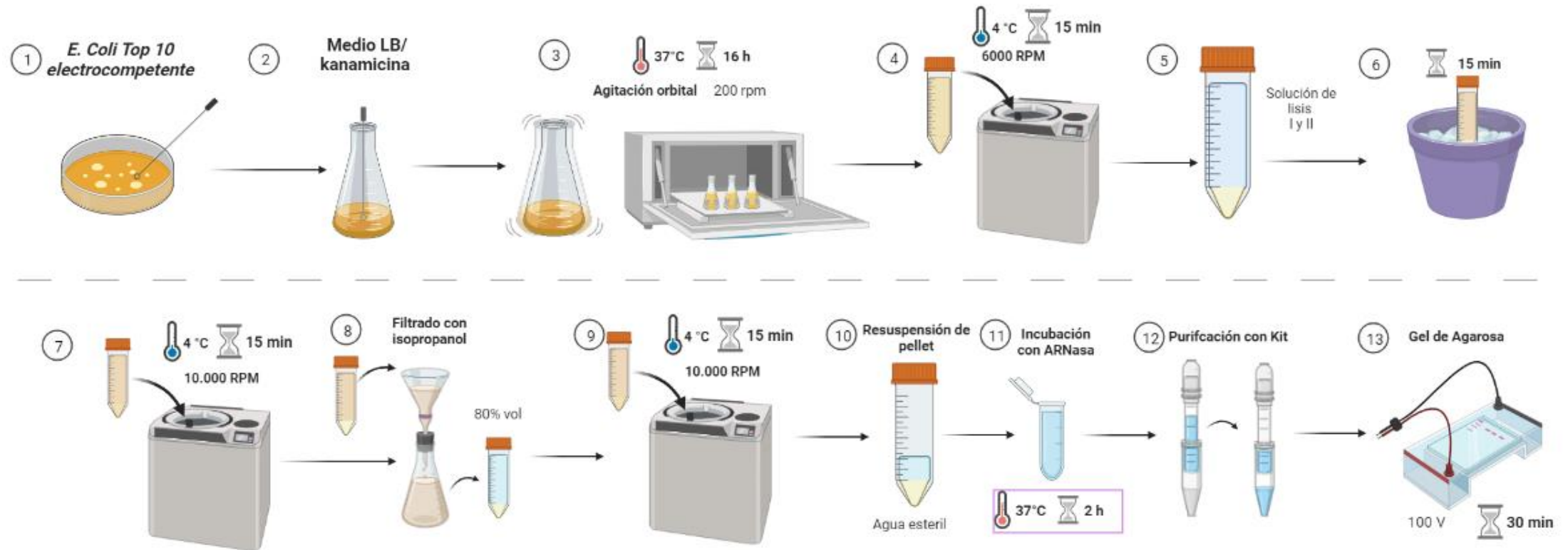
5. Conclusiones y Recomendaciones



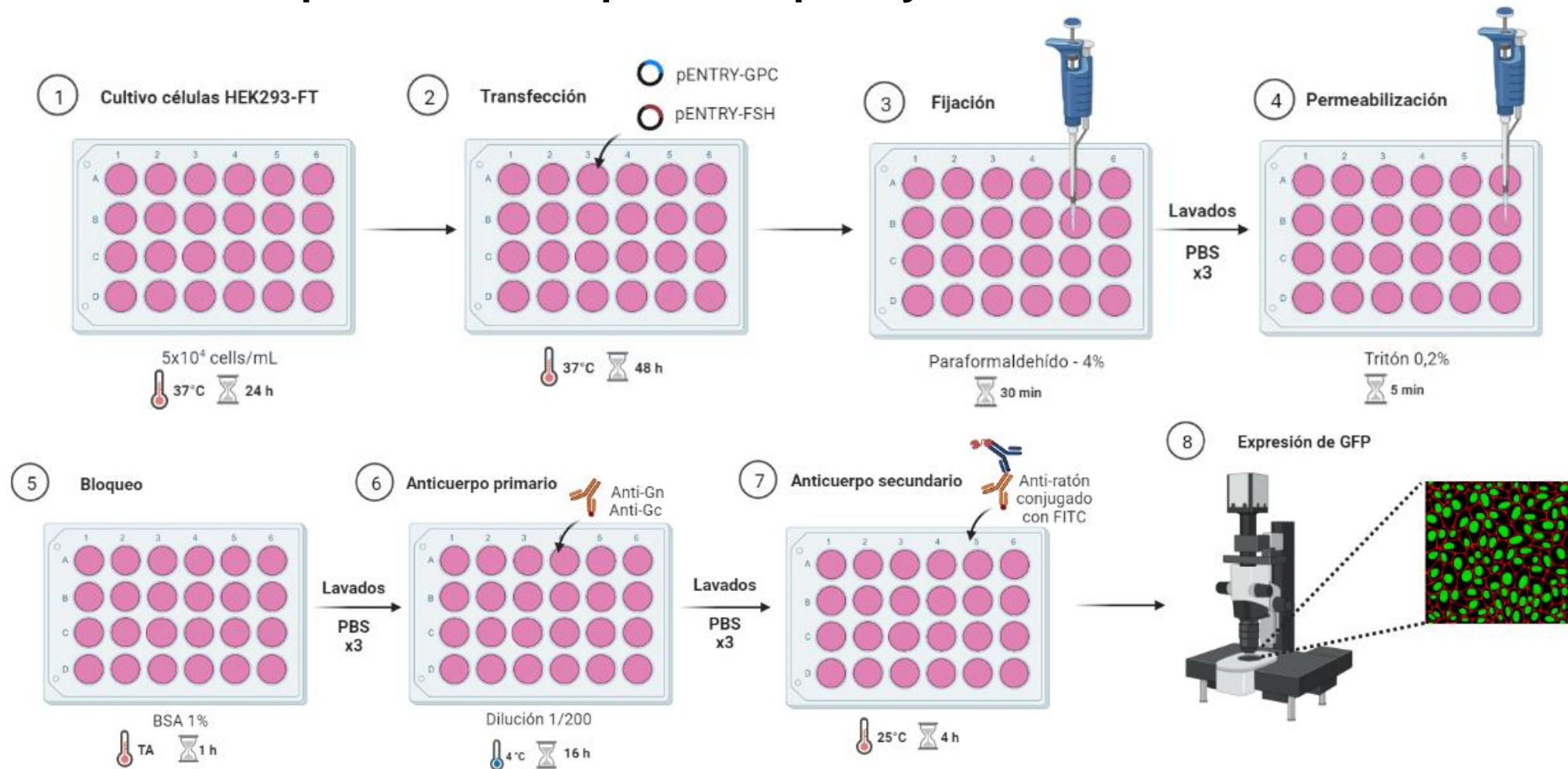
Preparación y transformación de *E. coli* electrocompetentes



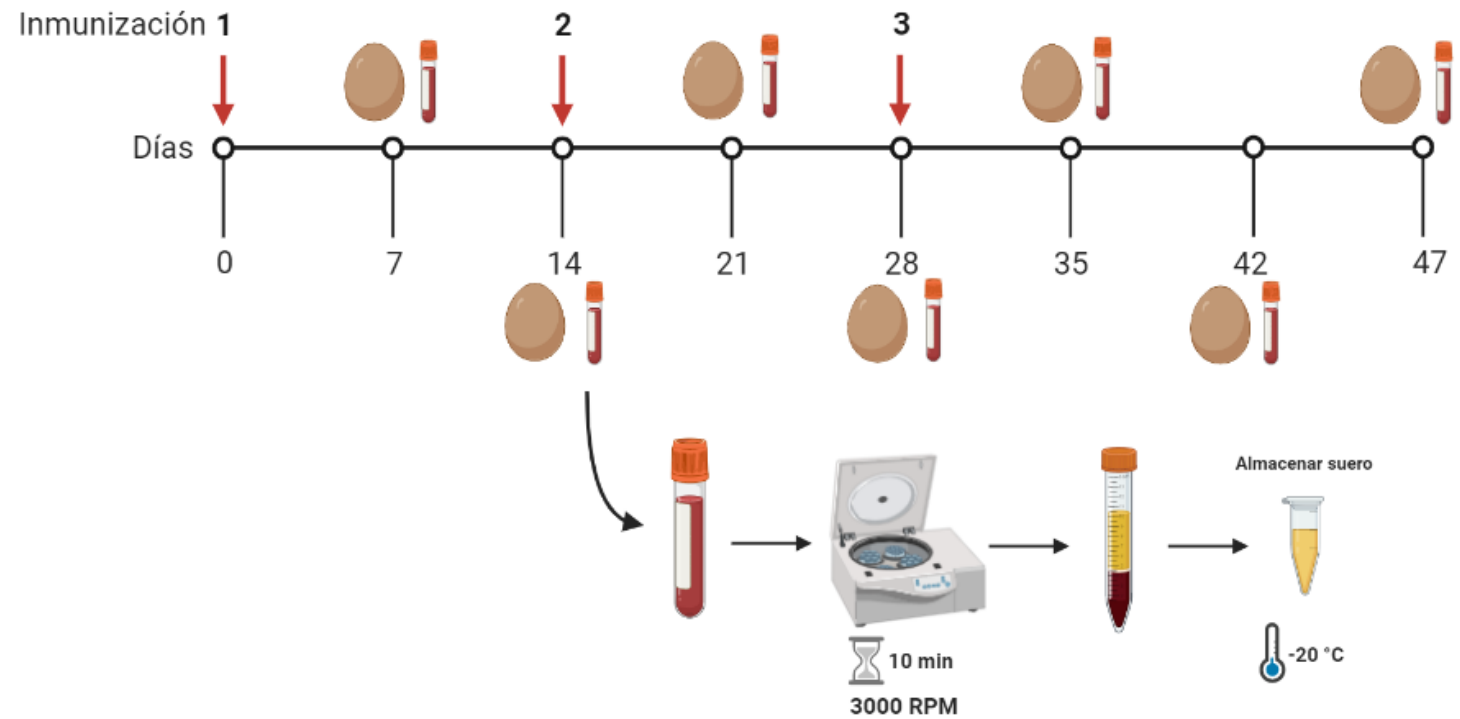
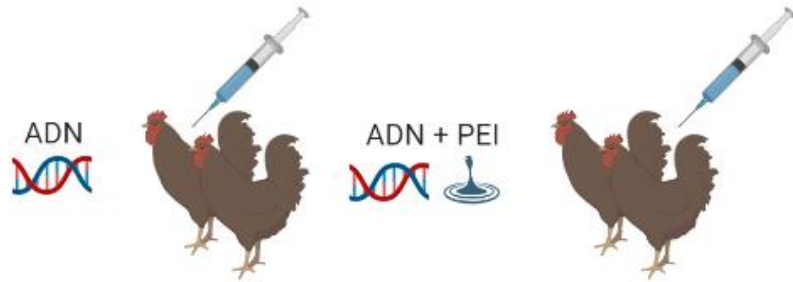
Purificación de ADN plasmídico del vector pENTRY-GPC



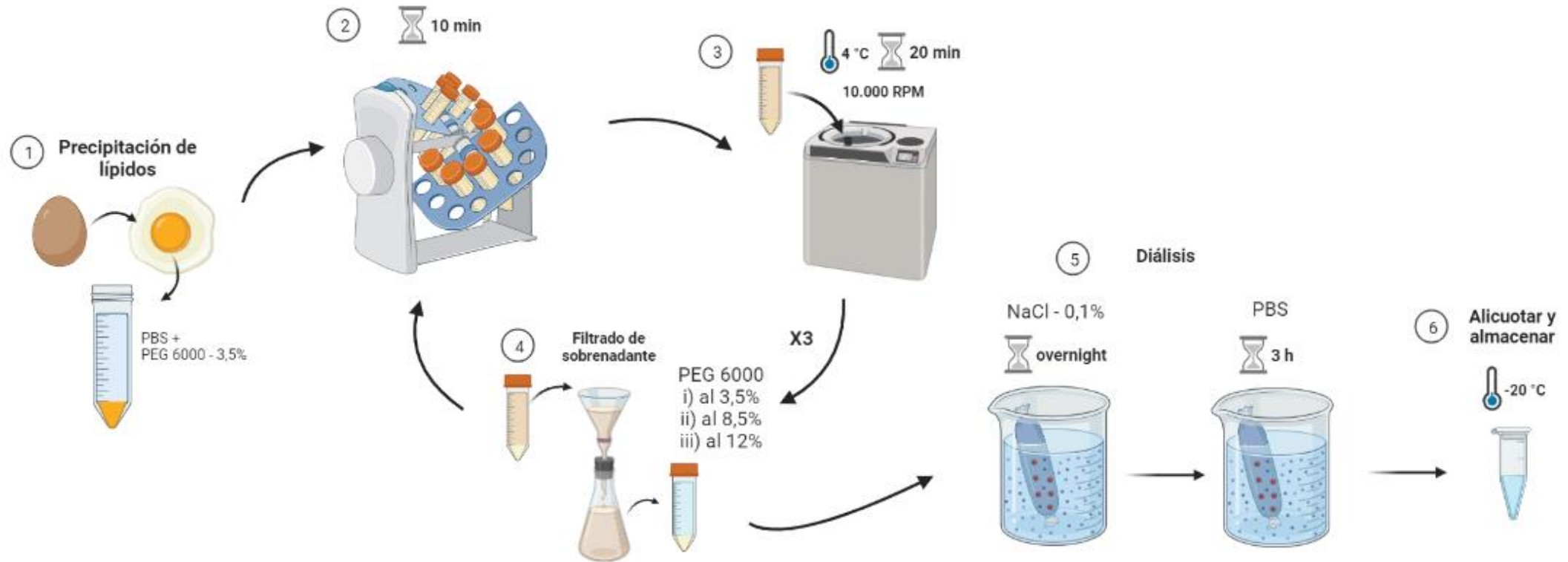
Inmunofluorescencia para evaluar el plásmido pEntry-GPC



Inmunización a gallinas ponedoras



Extracción de IgY de yema mediante precipitación con PEG6000



1. Introducción

2. Objetivos

3. Metodología

4. Resultados y Discusión

5. Conclusiones y Recomendaciones



1. Introducción

2. Objetivos

3. Metodología

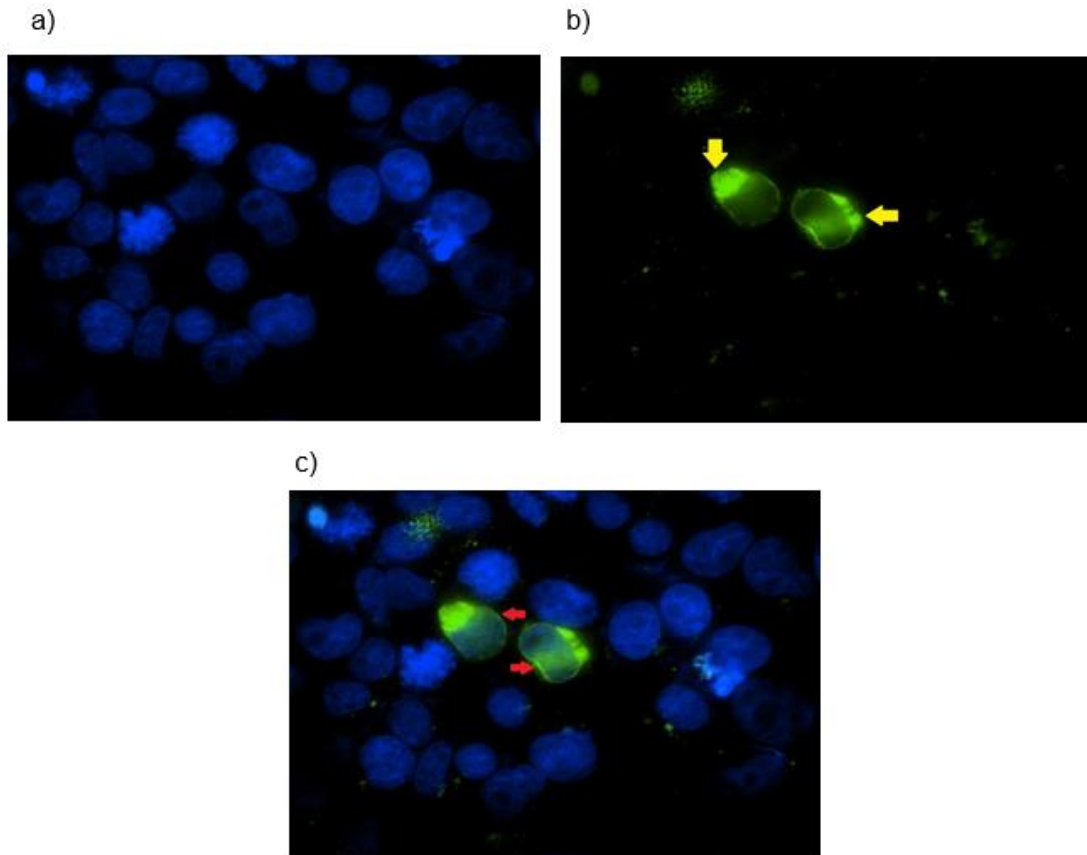
4. Resultados y Discusión

5. Conclusiones y Recomendaciones

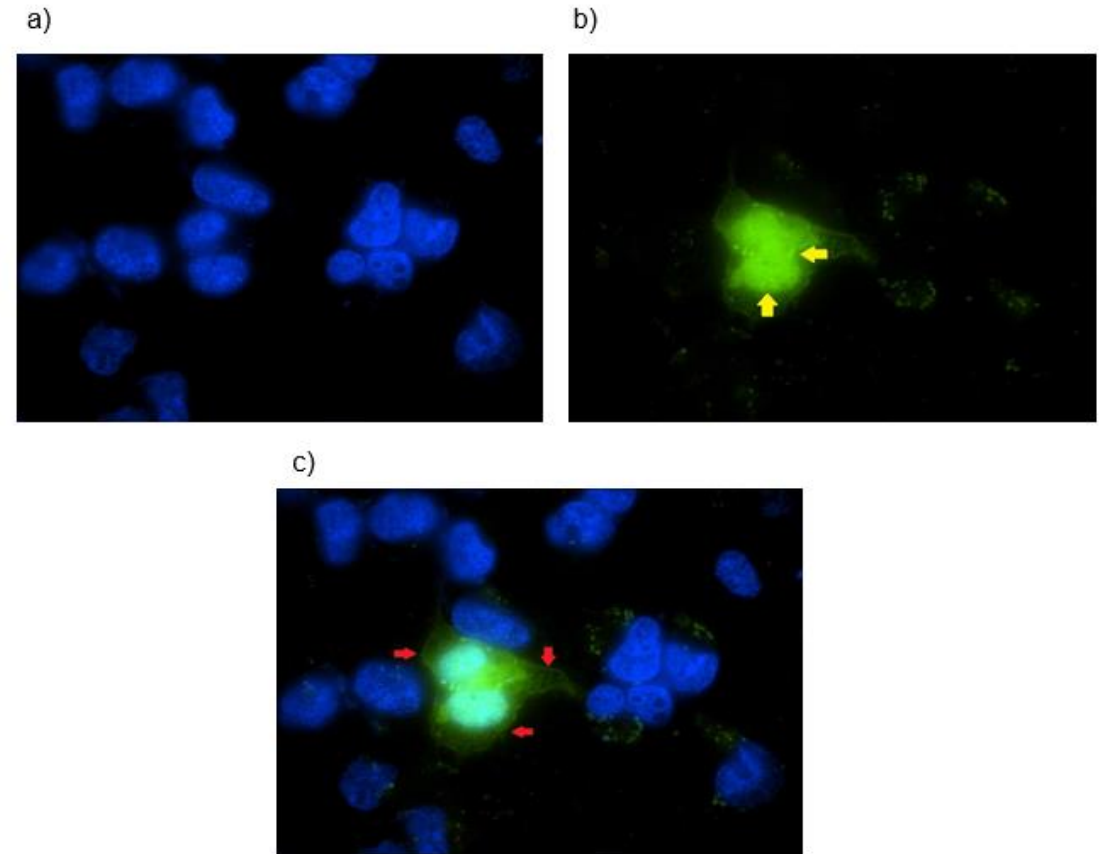


Evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes Gn y Gc en la línea celular HEK-293FT

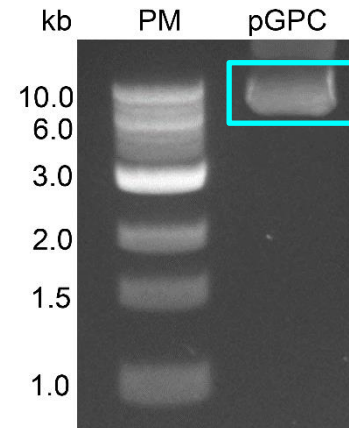
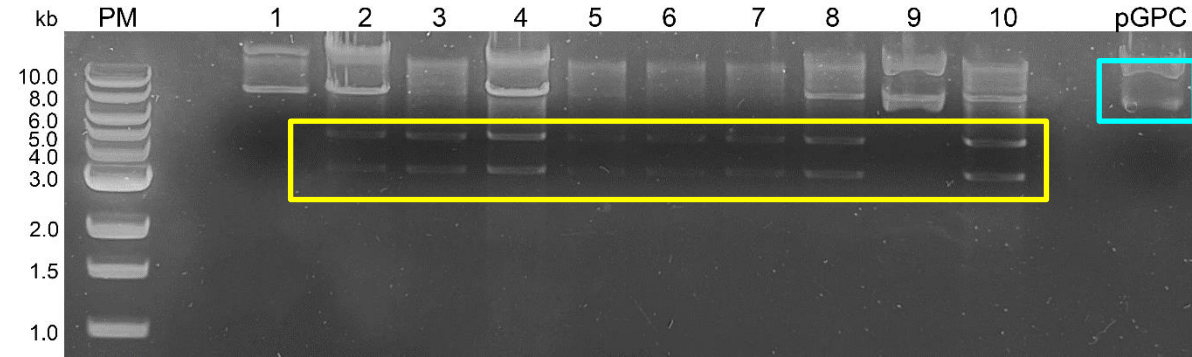
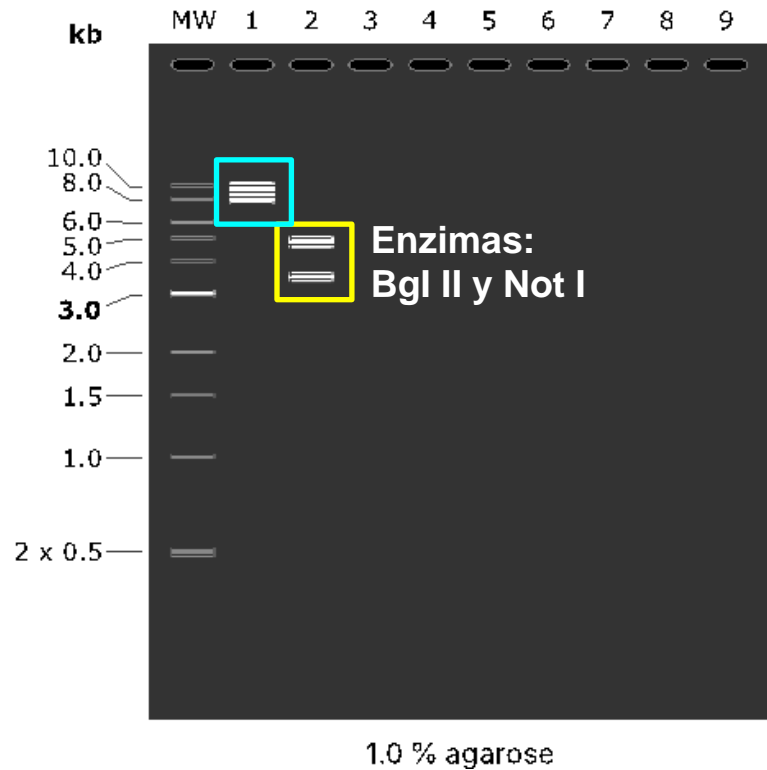
Inmunofluorescencia de Gn



Inmunofluorescencia de Gc

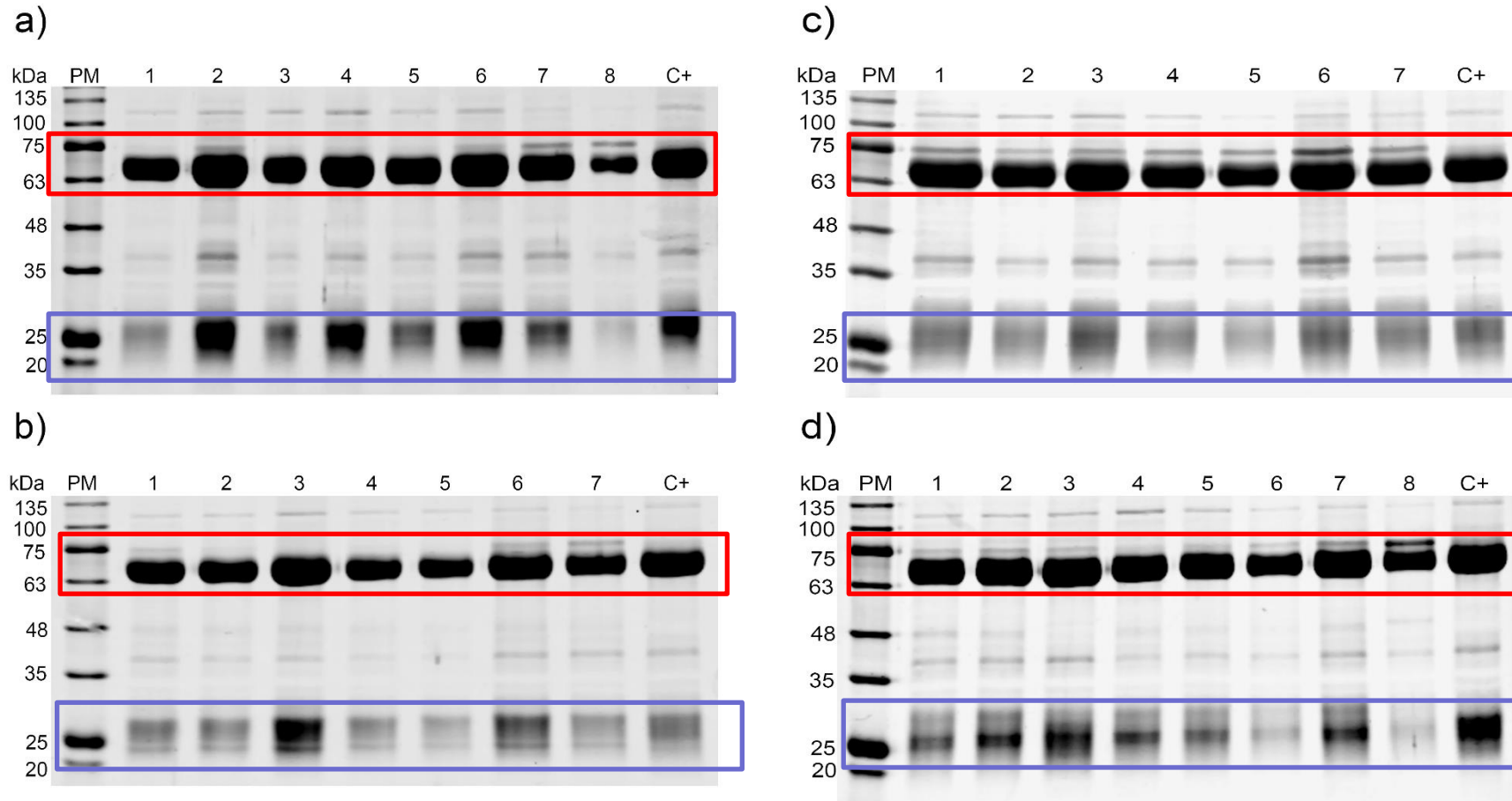


Purificación de ADN plasmídico del vector pENTRY-GPC



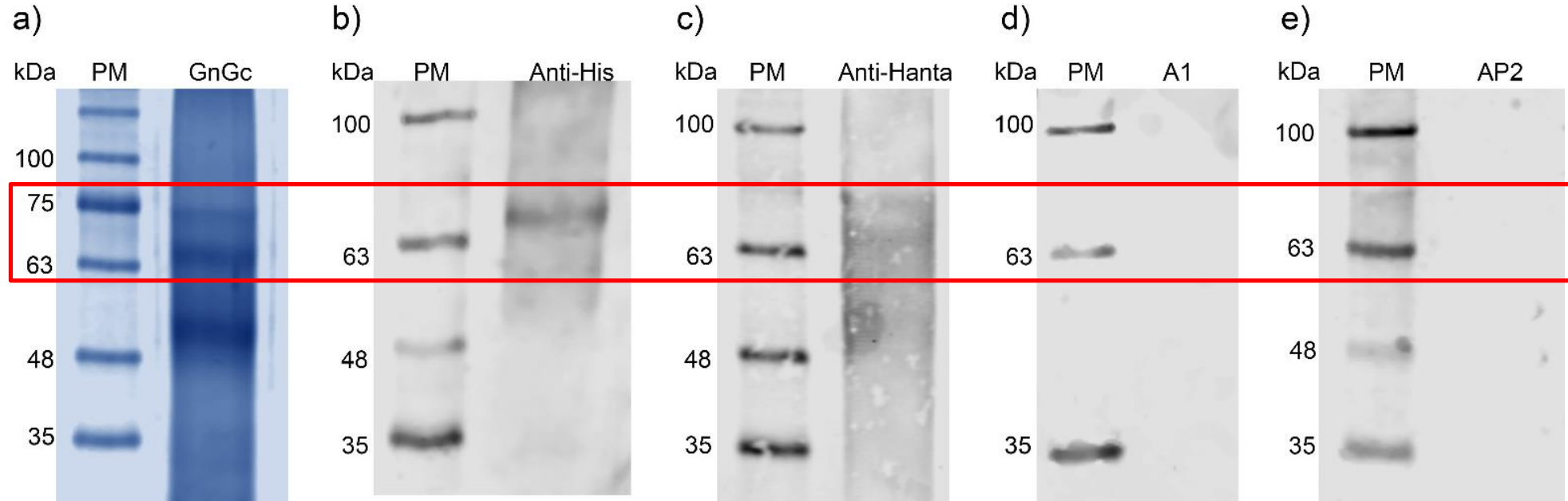
Se obtuvo ADN plasmídico con una concentración de 900 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y pureza de 1,9 (ratio A260/230).

Extracción de IgY a partir de yema de huevo de gallinas inmunizadas



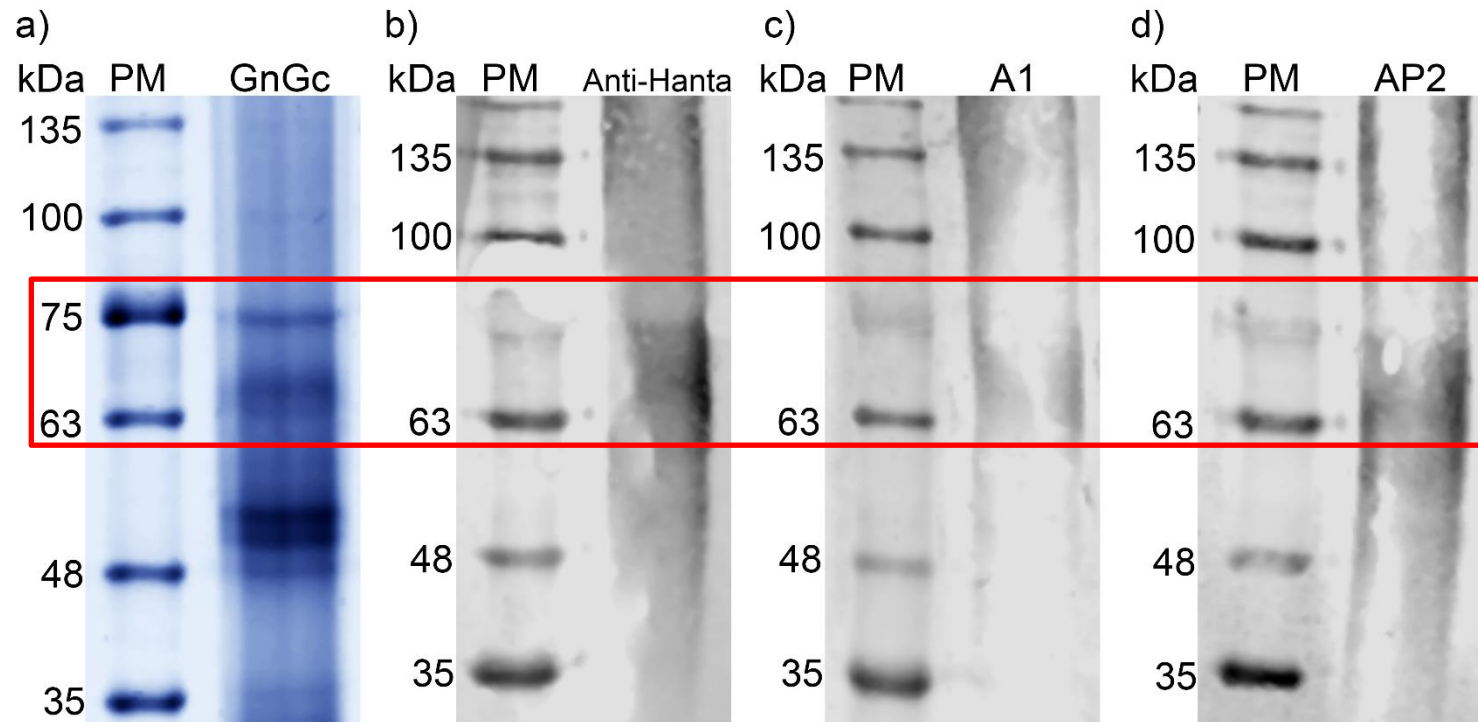
Se visualizaron las cadenas pesadas con un peso molecular de 67 a 70 kDa y las livianas con 25 kDa que componen a la IgY

Inmuno-identificación de las proteínas recombinantes Gn y Gc



Nota. a) SDS-PAGE al 10% en condiciones desnaturalizantes y reductoras, teñido con azul de Coomassie R-250 b) Western Blot utilizando anticuerpo monoclonal murino antihistidina (Cat: A00186-100) diluido 1:10.000. c) Western Blot utilizando anticuerpo IgY Anti-Hantavirus. d) Western Blot utilizando anticuerpo IgY de A1 día 0. e) Western Blot utilizando anticuerpo IgY de AP2 día 0.

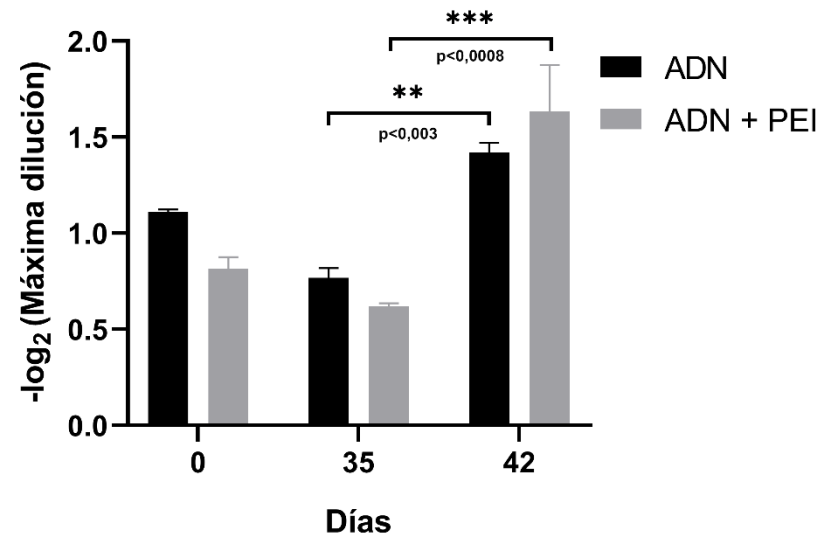
Inmuno-identificación de las proteínas recombinantes Gn y Gc



Nota. a) SDS-PAGE al 10% en condiciones desnaturizantes y reductoras, teñido con azul de Coomasie R-250. b) Western Blot utilizando anticuerpo Anti-Hantavirus. c) Western Blot utilizando anticuerpo Anti-GnGc de A1 día 47. d) Western Blot utilizando anticuerpo Anti-GnGc de AP2 día 47

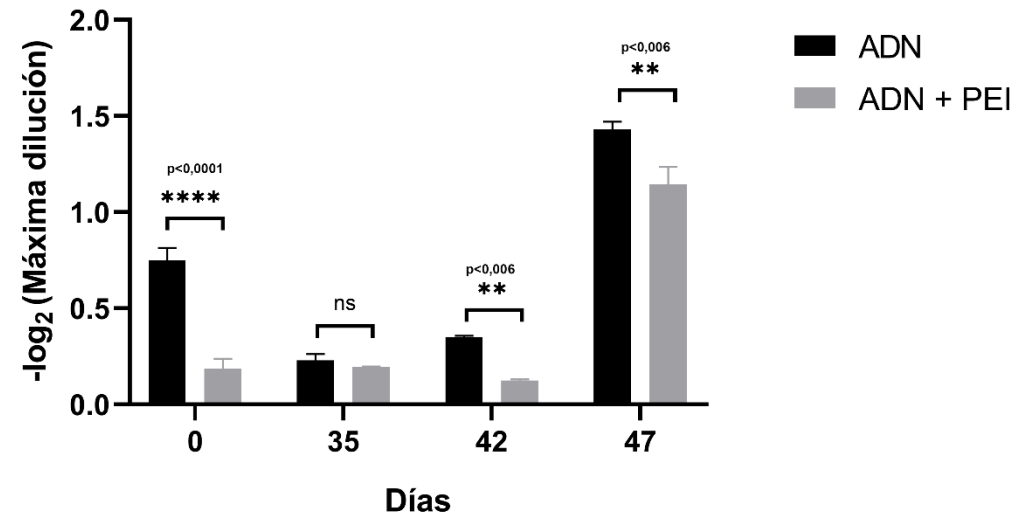
Evaluación de los títulos de anticuerpos IgY en yema de huevo y suero

Análisis en suero



Nota. Títulos de anticuerpos IgY totales inducidos en gallinas inmunizadas con las distintas formulaciones vacunales, obtenidos en suero.

Análisis en yema



Nota. Títulos de anticuerpos IgY totales inducidos en gallinas inmunizadas con las distintas formulaciones vacunales, obtenidos en yema de huevo.

1. Introducción

2. Objetivos

3. Metodología

4. Resultados y Discusión

5. Conclusiones y Recomendaciones



1. Introducción

2. Objetivos

3. Metodología

4. Resultados y Discusión

5. Conclusiones y Recomendaciones



- La presencia de las glicoproteínas de superficie Gn y Gc en la membrana plasmática de las células HEK-293FT, evidencian una transfección exitosa con el ADN plasmídico obtenido, demostrando la capacidad del vector para expresar ambas proteínas.
- Los títulos de anticuerpos de suero obtenidos en el día 42 sugirieron la presencia de IgY específica para la proteína recombinante Gn y Gc, y ya que la transferencia de la inmunoglobulina a la yema ocurre por un proceso activo donde los ovocitos captan mediante receptores específicos la IgY sérica, siendo un proceso que tarda aproximadamente 5 días en realizarse, se analizaron los huevos del día 47 posterior a la primera dosis.
- La inmunización de gallinas con ADN solo y acompañado es capaz de producir una respuesta inmune, siendo el grupo experimental inmunizado con ADN el que obtuvo mayor título de anticuerpos, después de 47 días de la primera dosis.



- Cambios en el esquema de inmunización como aumento de dosis y refuerzos, podrían dar como resultado mejoras en los títulos de anticuerpos IgY totales.
- Se debería contar un dispositivo de inyección de chorro de jeringa desechable (DSJI) el cual provoca respuestas de anticuerpos neutralizantes de alto título, particularmente después de un refuerzo de largo alcance que podría ser hasta los 588 días después de la primera inmunización.
- El uso otros polímeros catiónicos podría aportar relevancia a diferentes investigaciones sobre acomplejar el ADN.
- El uso de columnas de desalinización con resina Sephadex G-25 para la purificación de IgY extraídas mediante precipitación con PEG, pueden evitar la segunda diálisis del proceso, que contribuye en la eliminación de contaminantes de bajo peso molecular obteniéndose una IgY más pura.





Laboratorio de Biofármacos Recombinantes
Universidad de Concepción, Chile

Thelvia Ramos, PhD(c).

Directora

Universidad de las Fuerzas Armadas, Ecuador

Natalie Parra, PhD.

Directora

Universidad de Concepción, Chile

Amigos y familia