



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

Rosero Flores, Nashla Shayne

Departamento de 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

Dra. Ramos Gómez, Thelvia Isabel, PhD(c)

8 de marzo de 2023

5/3/23, 13:29

NASHLA SHAYNE ROSERO FLORES - Revisión de tesis

Informe de originalidad

NOMBRE DEL CURSO

Revisión de tesis

NOMBRE DEL ALUMNO

NASHLA SHAYNE ROSERO FLORES

NOMBRE DEL ARCHIVO

NASHLA SHAYNE ROSERO FLORES - Revisión de tesis

SE HA CREADO EL INFORME

5 mar 2023

Resumen

Fragmentos marcados	10	2 %
Fragmentos citados o entrecuillados	2	0,5 %

Coincidencias de la Web

udec.cl	8	2 %
uam.es	2	0,5 %
udelar.edu.uy	1	0,2 %
passaidireto.com	1	0,1 %

THELVIA

ISABEL RAMOS

GOMEZ

Firmado digitalmente
por THELVIA ISABEL

RAMOS GOMEZ

Fecha: 2023.03.05

19:19:21.-05:00'

Dra. Ramos Gómez, Thelvia Isabel, PhD(c)

C.C: 1753960028



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Producción de anticuerpos IgY contra proteína recombinante Gn y Gc, en *Gallus gallus domesticus* inmunizadas con ADN solo y acomplejado con polímeros catiónicos”** fue realizado por la señorita **Rosero Flores, Nashla Shayne**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 05 de marzo de 2023

THELVIA
ISABEL RAMOS
GOMEZ

Firmado digitalmente
por THELVIA ISABEL
RAMOS GOMEZ
Fecha: 2023.03.05
19:21:26 -05'00'

Dra. Ramos Gómez, Thelvia Isabel, PhD(c)

C.C: 1753960028



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Rosero Flores, Nashla Shayne**, con cédula de ciudadanía N° 1004351241, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Producción de anticuerpos IgY contra proteína recombinante Gn y Gc, en *Gallus gallus domesticus* inmunizadas con ADN solo y acompañado con polímeros catiónicos** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 05 de marzo de 2023

Nashla Rosero F.

Nashla Shayne Rosero Flores

C.C: 1004351241



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Rosero Flores, Nashla Shayne**, con cédula de ciudadanía N° 1004351241, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Producción de anticuerpos IgY contra proteína recombinante Gn y Gc, en *Gallus gallus domesticus* inmunizadas con ADN solo y acomplexado con polímeros catiónicos** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 05 de marzo de 2023

Nashla Rosero F.

Nashla Shayne Rosero Flores

C.C: 1004351241

Dedicatoria

Dedicado de todo corazón a la brillante mujer de quien recibí el nombre y la vida, Carla, quién me apoya y ama de todas las formas humanamente posibles, gracias por ser la dueña de mi corazón desde el día 1 hasta la eternidad, todo lo que hago lo hago por y para ti.

A mi abuelita, Rosita, mujer de alma bonita que ha hecho realidad mis sueños y ha puesto el corazón en cada una de sus enseñanzas, creadora de un ejército de hijas y nietas libres, inteligentes, resilientes, independientes y poderosas.

Para Alan y Milena, mis verdaderos compañeros de vida, su existencia alegra mi corazón desde siempre, gracias por acompañarme en esta vida llena de amor, abrazos, películas y pancakes.

Agradecimientos

A Carla y Rosita, por ser mi mayor fuente de inspiración, por brindarme todo el amor que tienen y siempre creer en mí.

A Marcelo, mi padre, por sus constantes palabras de apoyo y muestras de cariño a lo largo de mi carrera universitaria.

Un sincero agradecimiento a la Dra. Thelvia Ramos por confiar en mí y brindarme su apoyo incondicional, por abrirme un mundo lleno de oportunidades, desafíos, enseñanzas y ciencia. Le debo mi crecimiento académico, personal y profesional, desde el día que me eligió.

Gracias a mi tutora, Dra. Natalie Parra por guiarme, enseñarme, aconsejarme y tenerme paciencia en mi primer acercamiento al mundo de la ciencia, también por dejarme ser parte de su proyecto y creer en mí. Al Dr. Jorge Toledo por abrirme las puertas de su laboratorio e incluirme en su equipo de trabajo desde mis días como pasante hasta mi último día como tesista.

A Mirla, Shell, Mario y Andrés, mis mejores amigos y la familia que elijo todos los días, gracias por ser mi apoyo dentro y fuera de la universidad y darme amor y fuerza incondicional desde el inicio. Gracias por crecer conmigo.

A Marce, Dani y Mika, por aceptarme, amarme y escucharme todos los días, la vida es bonita y ligera desde que estamos juntas.

A Josué, Nico y Tere, que se convirtieron en mis personas favoritas y mi hogar en tiempos difíciles, cada abrazo, palabra de ánimo, llanto y vino lo llevo en el fondo de mi corazón.

A Carlita, Fer, Santi y Carlitos por los consejos y apoyo constante dentro y fuera del laboratorio.

Índice de Contenido

Hoja de resultados de la herramienta Google Assigments	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Índice de Contenido.....	8
Índice de Tablas	12
Índice de Figuras.....	13
Abreviaturas	15
Resumen	18
Capítulo 1	20
Introducción.....	20
Formulación del problema	20
Justificación del problema.....	22
Objetivos.....	25
Objetivo general	25
Objetivos específicos.....	25
Hipótesis	25
Capítulo 2	26
Marco Teórico.....	26

Hantavirus	26
Características moleculares	26
Transmisión y distribución	27
Virus Andes (ANDV)	28
Anticuerpos como tratamiento terapéutico.....	28
Inmunoglobulina Y (IgY).....	29
Características moleculares	30
Gallina como fuente de obtención de anticuerpos.....	31
Anticuerpos IgY en inmunización pasiva.....	32
Inmunización con ADN.....	34
Polímeros catiónicos.....	35
Capítulo 3	36
Metodología	36
Preparación y transformación de E. coli electrocompetentes	36
Purificación de ADN plasmídico.....	38
Descongelación de línea celular HEK-293FT	39
Propagación de línea celular HEK-293FT	39
Transfección con polietilenimina (PEI) en línea celular HEK-293FT	39
Inmunofluorescencia para evaluar el plásmido pEntry-GPC.....	40
Formulaciones para inmunización.....	41

	10
Inmunización de gallinas ponedoras con ADN.....	41
Obtención de muestras de suero desde animales inmunizados	41
Extracción de IgY mediante precipitación	42
Electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS- PAGE)	42
Western Blot.....	43
Cuantificación de IgY totales por Bradford.....	44
Determinación del título de anticuerpos IgY totales mediante ELISA	44
Capítulo 4	46
Resultados	46
Evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes Gn y Gc en la línea celular HEK- 293FT	46
Purificación de ADN plasmídico del vector pENTRY-GPC	49
Extracción de IgY a partir de yema de huevo de gallinas inmunizadas	51
Inmuno-identificación de las proteínas recombinantes Gn y Gc	53
Evaluación de los títulos de anticuerpos IgY totales en yema de huevo y suero	57
Capítulo 5	59
Discusión	59
Capítulo 6	63
Conclusiones.....	63
Recomendaciones	64

Capítulo 7	65
Bibliografía	65

Índice de Tablas

Tabla 1. <i>Protocolo de preparación de geles desnaturalizantes de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)</i>	43
--	----

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Representación esquemática del hantavirus</i>	27
Figura 2. <i>Paso de la IgY en la formación del huevo</i>	30
Figura 3. <i>Esquema de producción de IgY en gallinas ponedoras</i>	32
Figura 4. <i>Inmunidad activa y pasiva</i>	33
Figura 5. <i>Diseño del vector pENTRY-GPC</i>	37
Figura 6 . <i>Esquema de inmunización</i>	41
Figura 7. <i>Control de transfección del plásmido pENTRY-FSH</i>	46
Figura 8. <i>Inmunofluorescencia de Gn en células HEK-293FT transfectadas con el plásmido pENTRY-GPC</i>	47
Figura 9. <i>Inmunofluorescencia de Gc en células HEK-293FT transfectadas con el plásmido pENTRY-GPC</i>	48
Figura 10. <i>Simulación de la digestión de ADN plasmídico del vector pENTRY-GPC en SnapGene</i>	49
Figura 11. <i>Análisis enzimático de ADN plasmídico con las enzimas Bgl II y Not I</i>	50
Figura 12. <i>ADN plasmídico purificado y sin digerir obtenido del plásmido pENTRY-GPC</i>	51
Figura 13. <i>Presencia de anticuerpos IgY en huevos de gallinas inmunizadas con ADN solo y acompañado con PEI</i>	52
Figura 14. <i>Concentración de IgY total en yema de huevo</i>	53
Figura 15. <i>SDS-PAGE desnaturalizante al 10% y Western Blot de las glicoproteínas Gn y Gc con anticuerpos primarios de gallinas no inmunizadas</i>	55
Figura 16. <i>SDS-PAGE PAGE desnaturalizante al 10% y Western Blot de las glicoproteínas Gn y Gc con anticuerpos primarios de gallinas inmunizadas</i>	56
Figura 17. <i>Título de IgY totales en suero</i>	58

Figura 18. <i>Titulo de IgY en yema</i>	59
--	----

Abreviaturas

HV	Hantavirus
PUUV	Virus Puumala
DOBV	Virus Dobrava
HTNV	Hantaan virus
SNV	Virus Sin Nombre
ANDV	Virus de los Andes
HCPS	Síndrome cardiopulmonar por Hantavirus
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
nAbs	Anticuerpos neutralizantes
pAbs	Anticuerpos policlonales
Ig	Inmunoglobulinas
IgY	Inmunoglobulinas Y
IgG	Inmunoglobulinas G
Id	Intradérmica
Im	Intramuscular
GPC	Glicoprotein precursor
PEI	Polietilenimina

ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EC	Células endoteliales vasculares
ARN	Ácido ribonucleico
RdRp	ARN polimerasa L viral dependiente de ARN
NP	Proteína de nucleocápside viral
HFRS	fiebre hemorrágica con síndrome renal
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Fab	Fragmento de unión a antígeno
Fc	Fragmento cristalizable
CL	Cadena ligera
CH	Cadena pesada
LBE	Luria Bertani/estreptomicina
Rpm	Revoluciones por minuto
DO	Densidad óptica
SFB	Suero fetal bovino
HR	Humedad relativa
PFA	Paraformaldehído
PBS	Buffer fosfato salino
BSA	Albúmina de suero bovino

PEG	Polietilenglicol
GFP	Proteína verde fluorescente
β -ME	β - mercaptoetanol
DPI	Después de la primera inmunización
A1	Inmunización con ADN solo 1
AP2	Inmunización con ADN y PEI 2
LV	Lentivirales
CCCs	ADN circulares covalentemente cerrados
FSA	Fracción soluble en agua
DSJI	Inyección de chorro de jeringa desechable

Resumen

Las glicoproteínas Gn y Gc de la superficie de los hantavirus cumplen un papel fundamental en el ciclo de infección viral al permitir la unión y entrada del virus en la célula diana. Los hantavirus pertenecientes a la familia *Bunyavirales* son los agentes etiológicos de enfermedades zoonóticas transmitidas por aerosoles de orina, heces y saliva de roedores. En América del Sur, países como Chile y Argentina reportan casos donde la cepa de los Andes o Virus de los Andes, que se transmite de persona a persona, causa el síndrome cardiopulmonar por Hantavirus caracterizado por dificultad respiratoria y cardiovascular, cuya letalidad varía entre el 30% y el 50%. En el presente trabajo se propuso a *Gallus gallus domesticus* como plataforma para la producción de anticuerpos IgY contra proteínas recombinantes Gn y Gc de la envoltura del Virus de los Andes, mediante inmunización con ADN plasmídico solo y acompañado con polietilenimina. La evaluación del vector pENTRY-GPC, que expresa las glicoproteínas de superficie Gn y Gc, amplificado en *E. coli* cepa Top10 electrocompetente se realizó mediante inmunofluorescencia que mostró la expresión y distribución de las glicoproteínas en la membrana plasmática de la línea celular HEK-293FT. Los inmunoensayos con IgYs de yema de huevo obtenidas 47 días después de la primera inmunización mostraron especificidad de los anticuerpos para las proteínas recombinantes Gn y Gc. Además, se comparó la expresión temporal del título de anticuerpos en suero y en yema mediante ELISA indirecto. El grupo experimental inmunizado con ADN acompañado con polietilenimina obtuvo mayor título de anticuerpos en yema, específicos para la proteína recombinante Gn y Gc lo que sugiere que la estrategia de inmunización con ADN solo y acompañado con polímeros catiónicos en *Gallus gallus domesticus* produce una respuesta inmune efectiva contra las glicoproteínas Gn y Gc de la envoltura del virus de los Andes.

Palabras clave: Hantavirus, Inmunización con ADN, Producción de IgY.

Abstract

Gn and Gc glycoproteins on the surface of hantaviruses play a key role in the viral infection cycle by allowing virus binding and entry into the target cell. Hantaviruses belonging to the Bunyavirales family are the etiological agents of zoonotic diseases transmitted by aerosols of rodent urine, feces and saliva. In South America, countries such as Chile and Argentina report cases where the Andes strain or Andes Virus, which is transmitted from person to person, causes Hantavirus cardiopulmonary syndrome characterized by respiratory and cardiovascular distress, whose lethality varies between 30% and 50%. In the present research, *Gallus gallus domesticus* was proposed as a platform for the production of IgY antibodies against recombinant proteins Gn and Gc of the Andes virus envelope, by immunization with plasmid DNA alone and complexed with polyethylenimine. The evaluation of the pENTRY-GPC vector, expressing the Gn and Gc surface glycoproteins, amplified in electrocompetent *E. coli* strain Top10 was performed by immunofluorescence showing the expression and distribution of the glycoproteins in the plasma membrane of the HEK-293FT cell line. Immunoassays with egg yolk IgY obtained 47 days after the first immunization showed specificity of the antibodies for recombinant Gn and Gc proteins. In addition, the temporal expression of antibody titer in serum and yolk was compared by indirect ELISA. The experimental group immunized with DNA complexed with polyethylenimine obtained a higher titer of antibodies in yolk, specific for the recombinant Gn and Gc proteins, suggesting that the immunization strategy with DNA alone and complexed with cationic polymers in *Gallus gallus domesticus* produces an effective immune response against the Gn and Gc glycoproteins of the Andes virus envelope.

Keywords: Hantavirus, DNA immunization, IgY production.

Capítulo 1

Introducción

Formulación del problema

Las glicoproteínas Gn y Gc de la superficie de los hantavirus (HV) son las encargadas de la unión y entrada del virus en la célula diana (Cifuentes-Muñoz et al., 2014; Guardado-Calvo & Rey, 2021; Mittler et al., 2019) es por esto que durante años han sido objeto de investigación para comprender el ciclo de infección viral de los mismos (Serris et al., 2020).

Los Hantavirus, pertenecientes al orden *Bunyvirales*, familia *Hantaviridae*, son organismos biológicos responsables de enfermedades zoonóticas (Vaheiri et al., 2021), permanecen de manera asintomática en roedores hasta su transmisión al ser humano por medio de aerosoles producto de su saliva, orina y heces (Mittler et al., 2019). En función de su distribución geográfica, los HV localizados en Europa y Asia como el Hantaan virus (HTNV), Puumala virus (PUUV) y Dobrava virus (DOBV) son considerados Hantavirus del Viejo Mundo (Dheersekara et al., 2020) mientras que los VH predominantes en América que incluyen el virus Sin Nombre (SNV) y el virus de los Andes (ANDV) son llamados Hantavirus del Nuevo Mundo (D'Souza & Patel, 2020).

En América del Sur, países como Chile y Argentina han reportado casos desde el año 1995 donde el Virus de los Andes (ANDV) es el agente causal del síndrome cardiopulmonar por Hantavirus (HCPS) (Abdulla et al., 2021), caracterizado por síntomas como fiebre, escalofríos, mialgia y tos (Llah et al., 2018) que derivan en dificultad respiratoria y cardiovascular cuya letalidad varía entre el 30% y el 50% (Duehr et al., 2020).

En la actualidad, no se registran vacunas o tratamientos para el síndrome cardiopulmonar por Hantavirus (HCPS) que estén aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) (Saúl et al., 2021). Los casos

registrados se manejan con cuidados paliativos hasta que el virus sea eliminado por el organismo (Dheersekara et al., 2020).

Siendo una enfermedad emergente, varios investigadores han trabajado para encontrar un tratamiento exitoso, enfocándose en vacunas de ADN (Engdahl et al., 2021), vacunas de subunidades (Bae et al., 2021), anticuerpos neutralizantes (nAbs) (Rissanen et al., 2023) y anticuerpos policlonales (pAbs) (Williamson et al., 2021). Los estudios mencionados se han realizado en hámsteres sirios dorados infectados con el Virus de los Andes (ANDV), ya que es el único modelo animal del síndrome cardiopulmonar por Hantavirus (HCPS) (Warner et al., 2021).

Dentro de este contexto, los anticuerpos neutralizantes (nAbs) obtenidos del plasma de pacientes convalecientes han reducido en un 14% la tasa de letalidad atribuida al HCPS (Vial et al., 2015) y se han posicionado como una herramienta terapéutica prometedora. Sin embargo, la FDA aprobó el uso de anticuerpos humanos como tratamiento para enfermedades respiratorias, como la producida por el virus SARS-CoV2, únicamente en ensayos clínicos y como un medicamento de emergencia (Nina Garcia & Cussi Coronel, 2020).

Justificación del problema

La autorización de la FDA para el uso de nAbs sugiere que la inmunización pasiva es una estrategia válida para mitigar enfermedades virales (Mittler et al., 2022) e impulsa el desarrollo e investigación de nuevas terapias basadas en anticuerpos policlonales (pAbs).

Los anticuerpos son inmunoglobulinas séricas (Ig) ampliamente utilizadas en la investigación para generar pruebas de diagnóstico y tratamientos terapéuticos (Pereira et al., 2018), comúnmente, se obtienen anticuerpos policlonales (pAbs) a partir de mamíferos como conejos, ratones, cerdos y ovejas (Abbas et al., 2018). Y aunque su producción y aplicaciones se han estudiado ampliamente (Rissanen et al., 2021) los pAbs obtenidos en mamíferos no pueden ser utilizados directamente, en su lugar, deben pasar por un proceso de humanización para evitar que el cuerpo receptor los reconozca como agentes extraños (Vanhove et al., 2021) lo que genera altos costos (alrededor de US\$100/g) (Abbas et al., 2018) y mayor tiempo de producción (Jyothilekshmi & Jayaprakash, 2021).

La búsqueda de alternativas más eficientes y económicas ha hecho que las inmunoglobulinas Y (IgY) producidas por aves, reciban especial atención debido a su similitud con las inmunoglobulinas G (IgG) presentes en mamíferos (Yakhkeshi et al., 2022). La inmunoglobulina sérica se transfiere de la madre a la yema de huevo aportándole inmunidad a sus futuras crías y denominándola IgY proveniente de yema (Amro et al., 2018).

La inmunoglobulina Y (IgY) no provoca una respuesta inmune peligrosa en el receptor (Abbas et al., 2018) ya que no muestra reacciones cruzadas en sistemas de mamíferos al no interactuar con los receptores Fc, a diferencia de la IgG (Thirumalai et al., 2019). Además, para Lu et al., (2020) otros factores como su alta especificidad, costo de fabricación accesible, facilidad de manejo y mayor tiempo de almacenamiento hacen que la IgY sea considerada para el desarrollo de tratamientos terapéuticos.

Las gallinas ponedoras, *Gallus gallus domesticus*, son una plataforma altamente rentable para la producción de anticuerpos policlonales (pAbs) (Li et al., 2022), ya que los mismos pueden purificarse directamente de la yema de huevo utilizando métodos sencillos de precipitación (Y. Lu et al., 2020), siendo un procedimiento no invasivo para el animal (El-Kafrawy et al., 2023).

Se estima que la gallina ponedora produce entre 280 y 325 huevos anualmente (Yakhkeshi et al., 2022) y de cada yema se obtiene de 50 a 150 mg de anticuerpos IgY (Mine & Kovacs-Nolan, 2002; Xu et al., 2011) (Kovacs-Nolan & Mine, 2012; Xu et al., 2011), de los cuales hasta el 10 % son de interés y específicos (Pereira et al., 2018). Esto sugiere que, al año, una gallina ponedora es capaz de producir de 20 a 40 g de IgY total (Pauly et al., 2009).

Las IgY específicas se obtienen mediante la inmunización de las gallinas con antígenos complejos como virus y bacterias (Zeng et al., 2021), o con antígenos únicos, entre ellos, proteínas y ácidos nucleicos (Bachtiar et al., 2016; Zibae et al., 2016) que, administrados cada cierto tiempo, a manera de refuerzos, garantizan la producción constante de anticuerpos (Abbas et al., 2018).

La inmunización de animales con ADN se ha posicionado como una estrategia atractiva para la producción de anticuerpos bioespecíficos (Son et al., 2022) por ser un método sencillo y accesible (Accensi et al., 2022). De esta forma el material genético que codifica la proteína de interés se administra vía intradérmica (id) o intramuscular (im) (Taslem Mourosi et al., 2022) y se generan antígenos específicos (Gloanec et al., 2022).

Según Saavedra et al., (2021) los pAbs específicos para las glicoproteínas Gn y Gc de la envoltura del VH son una posible solución para tratar el síndrome cardiopulmonar por Hantavirus (HCPS). Estudios en primates no humanos han confirmado que la inmunización con

ADN utilizando un plásmido codificante de las glicoproteínas Gn y Gc del VH genera respuesta de anticuerpos neutralizantes (Hooper et al., 2006).

Esta estrategia fue evaluada en patos obteniendo anticuerpos IgY neutralizantes de las glicoproteínas Gn y Gc a partir de la yema de huevo (R. Brocato et al., 2012) y, posteriormente replicada en gansos mostrando resultados similares (Haese et al., 2015).

El objetivo del presente trabajo de investigación es inmunizar a *Gallus gallus domesticus* usando ADN que contiene un vector de expresión con la secuencia GPC (Glicoprotein precursor) del VH, a partir de la cual se expresan las glicoproteínas Gn y Gc, para la producción de anticuerpos IgY contra la proteína Gn y Gc obtenida mediante un proceso productivo recombinante ya establecido por el laboratorio de Biofármacos Recombinantes de la Universidad de Concepción, aplicando estrategias de inmunización con ADN solo y acompañado con polietilenimina (PEI).

Objetivos

Objetivo general

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

Objetivos 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, tienen directa relación con la estrategia de inmunización utilizada.

Capítulo 2

Marco Teórico

Hantavirus

Los Hantavirus son el único género perteneciente al orden *Bunyavirales* que es albergado por roedores pequeños (Engdahl & Crowe, 2020) cuya transmisión a los humanos se da principalmente por aerosoles de partículas pequeñas de excremento, orina o saliva del animal (Mittler et al., 2019), alrededor de los años 90 en Europa y Asia, estos virus, eran considerados como los agentes causales de la fiebre hemorrágica con síndrome renal (HFRS) (Wei et al., 2022) provocado por los llamados Hantavirus (HV) del viejo mundo: Hantaan virus (HTNV), Puumala virus (PUUV) y Dobrava virus (DOBV) (Avšič-Županc et al., 2019).

A finales del siglo XX, se describió el síndrome cardiopulmonar por Hantavirus (HCPS) en el continente americano como consecuencia de la infección por el virus. Sin Nombre (SNV) y el virus de los Andes (ANDV), también conocidos como los Hantavirus del nuevo mundo (Parvate et al., 2019). El VH infecta las células endoteliales vasculares (EC) humanas y afecta principalmente los capilares y vasos pequeños, provocando daños vasculares, lesión renal aguda y en muchos de los casos, problemas de coagulación (Tariq & Kim, 2022).

Anualmente se reportan hasta 200 000 casos de infección por Hantavirus alrededor del mundo, con una letalidad promedio de 35% (D'Souza & Patel, 2020). Asimismo, se han descrito 50 especies conocidas, de las cuales más de 24 se consideran patógenas (Saavedra et al., 2021).

Características moleculares

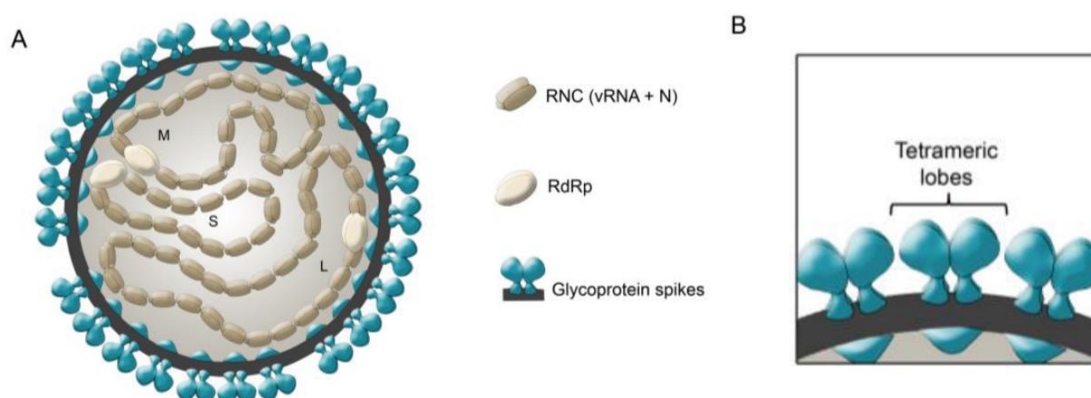
El hantavirus es un virus de ARN monocatenario envuelto en una capa de glicoproteína, que se caracteriza por su genoma tripartito de sentido negativo (R. L. Brocato & Hooper, 2019). Los segmentos grandes (L), medianos (M) y pequeños (S), codifican respectivamente la

proteína L o ARN polimerasa L viral dependiente de ARN (RdRp), el precursor de glicoproteínas (GPC) de superficie Gn y Gc (también llamadas G1 y G2) y la proteína de nucleocápside viral (NP)(Cifuentes-Muñoz et al., 2014; Serris et al., 2020; Wang et al., 2021; Welke et al., 2022).

La envoltura de glicoproteína está formada por las glicoproteínas Gn y Gc que están ancladas a la membrana formando espigas tetraméricas (Guardado-Calvo & Rey, 2021; Hepojoki et al., 2010), y al ubicarse en la superficie de los viriones, son las proteínas responsables de la unión y entrada viral (Mittler et al., 2019).

Figura 1

Representación esquemática del hantavirus



Nota. A) Representación de las partículas del hantavirus (HV), basada en el mapa crio-ET del virus. B) Vista ampliada de los picos de la envoltura del virus (Cifuentes-Muñoz et al., 2014).

Transmisión y distribución

Los hantavirus se distribuyen por todo el mundo manteniendo como reservorio natural algunas especies específicas de roedores (Hamid et al., 2021). La filogenia de estos virus ha permanecido cerca de los mismos reservorios, lo que sugiere años de coevolución (Mir, 2010). Entre sus huéspedes naturales se encuentran roedores de las familias Cricetidae y Muridae

(Wei et al., 2022) en los cuales el VH desarrolla infecciones persistentes y asintomáticas (Stock, 2008).

Los seres humanos se infectan a través de partículas de aerosol producidos por la orina, saliva o heces de roedores infectados (Hamid et al., 2021). Sin embargo, en 1996 se reportaron los primeros casos de contagio entre humanos (Padula et al., 1998) provocando dos síndromes clínicos: fiebre hemorrágica con síndrome renal (HFRS) y síndrome cardiopulmonar por hantavirus (HCPS) convirtiendo al VH en un agente potencialmente letal que eventualmente generaría problemas de salud pública (Ferro et al., 2020).

Virus Andes (ANDV)

En América del Sur, el Virus Andes es considerado el agente etiológico del síndrome cardiopulmonar por hantavirus (HCPS) (Martínez et al., 2020) con casos reportados en Argentina, Chile, Uruguay y Brasil cuya tasa de mortalidad oscila entre el 40% y el 50% (H. Singh et al., 2020).

Actualmente no hay un tratamiento, vacuna o terapia contra HCPS que esté aprobada por la OMS o la FDA (S. Singh et al., 2021) es por esto que la intervención médica se basa principalmente en el tratamiento de los síntomas hasta que el virus sea eliminado por el organismo o el paciente fallezca (Dheersekara et al., 2020).

Anticuerpos como tratamiento terapéutico

Los anticuerpos pueden evitar que las glicoproteínas de virus envueltos o la cubierta de virus no envueltos se unan y se fusionen con la membrana celular (Kabanova et al., 2014). Además, son capaces de producir la lisis directa del virus o la célula huésped, promueven la fagocitosis y liberan sustancias químicas tóxicas como citocinas o especies reactivas de oxígeno (ROS) (Y. Lu et al., 2020).

Los anticuerpos tienen dos dominios funcionales: dos de fragmento de unión a antígeno (Fab) que actúan en la respuesta humoral adaptativa y un fragmento cristalizable (Fc) que permite generar distintas funciones efectoras innatas (L. L. Lu et al., 2018). Entre las funciones efectoras de los anticuerpos se encuentran: la neutralización de toxinas (Bellows & Jankovic, 2019), neutralización de la entrada y replicación de patógeno (Xiang et al., 2022), neutralización de factores de virulencia microbiana (Gelfat et al., 2022), activación del complemento (Chaturvedi et al., 2021), citotoxicidad celular (Doepker et al., 2021) y la inducción de fagocitosis celular (Nazha et al., 2020).

Han sido utilizados como fármacos debido a que funcionan inmediatamente después de la administración, lo que presenta una ventaja ante otras estrategias como las vacunas (Saavedra et al., 2021). En enfermedades agudas y emergencias médicas se ha usado ampliamente el suero hiperinmunizado porque contiene una población mixta de anticuerpos neutralizante contra múltiples epítomos (Talaat et al., 2020). A pesar del riesgo de hipersensibilidad, la enfermedad del suero y anafilaxia (Bilò et al., 2021), los anticuerpos o fragmentos producidos en animales son ampliamente usados.

Inmunoglobulina Y (IgY)

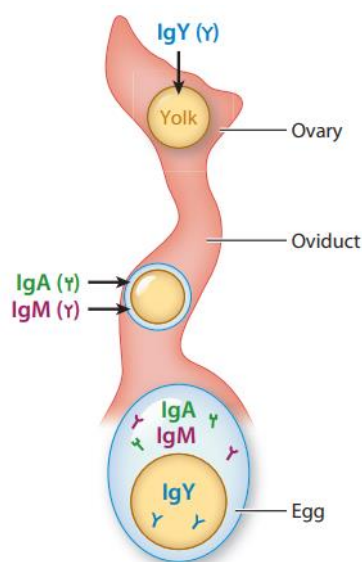
La inmunoglobulina Y es el anticuerpo sérico predominante en aves, anfibios y reptiles (Lanzarini et al., 2018) es considerada el homólogo de la inmunoglobulina G presente en mamíferos, aunque difieren estructuralmente (Larsson et al., 1993). En aves se encuentran tres isotipos de inmunoglobulinas IgY, IgM e IgA, que según Carlander et al., (1999) en gallinas ponedoras llegan a concentraciones que van de 5 a 15 mg/ml, 1-3 mg/ml y 0,3-0,5 mg/ml, respectivamente.

Durante la formación del huevo, la IgY en el suero se transfiere a la yema a través de un receptor en la superficie de la membrana de la yema específico para la translocación de IgY (Morrison et al., 2002), mientras que IgA e IgM se depositan en la clara de huevo (Rose et al.,

1974) (Figura 2). Así la madre le proporciona a sus futuras crías inmunidad humoral contra patógenos aviares, durante los primeros días después de la eclosión hasta que su sistema inmunitario alcance la maduración (Dias da Silva & Tambourgi, 2010).

Figura 2

Paso de la IgY en la formación del huevo



Nota. Distribución de las inmunoglobulinas séricas (IgY, IgA e IgM) de la gallina a través del oviducto para formar la clara y yema de huevo (Kovacs-Nolan & Mine, 2012).

Características moleculares

La IgY, al igual que su contraparte de los mamíferos, la IgG, se compone de dos cadenas ligeras (CL) y dos cadenas pesadas (CH) con pesos moleculares de 25 y 67-70 kDa, respectivamente (Grando et al., 2017) cada una con regiones constantes y variables. Las regiones variables son críticas para el reconocimiento de antígenos, mientras que las regiones constantes proporcionan la función efectora (Lanzarini et al., 2018). Las regiones Fab, similares a las inmunoglobulinas de los mamíferos, contienen los sitios de unión al antígeno, mientras

que la región Fc contiene los dominios responsables de la activación del complemento para las reacciones anafilácticas (Leslie & Clem, 1969; Zhao et al., 2000).

En las tecnologías de inmunodiagnóstico, IgY es un excelente anticuerpo para usar en ensayos inmunológicos con sueros de mamíferos, debido a las propiedades discriminatorias de IgY en comparación con IgG de mamíferos (Dias da Silva & Tambourgi, 2010), ya que IgY no reacciona con el factor reumatoide y los anticuerpos humanos IgG anti-ratón no activan el sistema del complemento y no se unen al receptor Fc (Kovacs-Nolan & Mine, 2012).

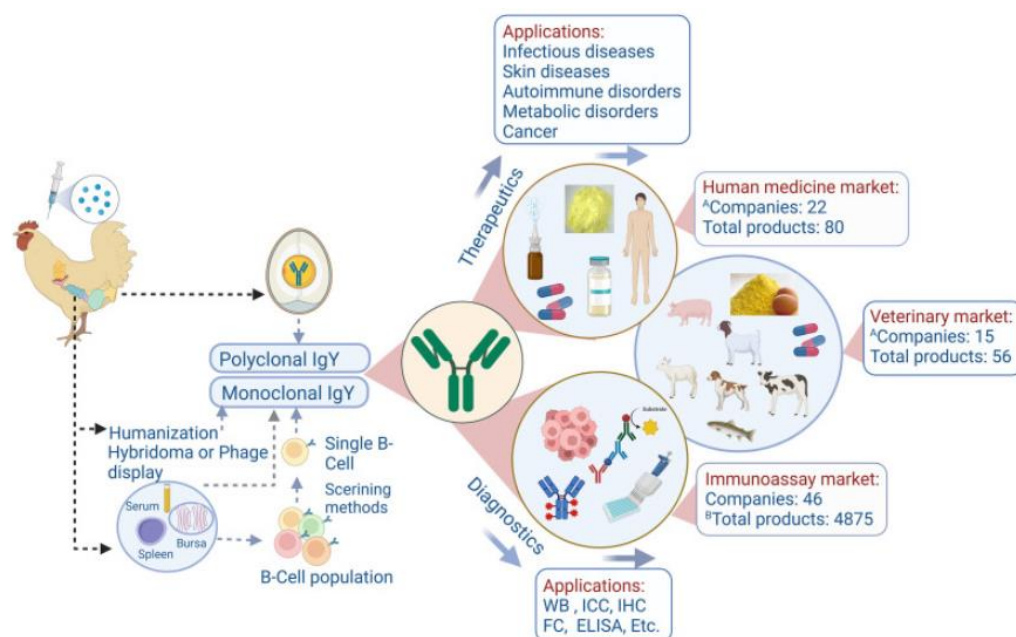
Gallina como fuente de obtención de anticuerpos

Las gallinas producen entre 50 y 150 mg de anticuerpos IgY total por yema de huevo (Xu et al., 2011), una mayor cantidad de anticuerpos en comparación con roedores (Schade et al., 2005), lo que reduce considerablemente el número de animales necesarios para la producción de anticuerpos.

En las últimas décadas, la generación de IgY monoclonales y policlonales en gallinas, ha avanzado con éxito debido a los bajos costos de mantenimiento y manipulación de estos animales frente a los mamíferos (León-Núñez et al., 2022).

Figura 3

Esquema de producción de IgY en gallinas ponedoras



Nota. Esquema de la producción de anticuerpos IgY monoclonales y policlonales en gallina ponedora y sus aplicaciones y estado en el mercado de anticuerpos (Yakhkeshi et al., 2022).

Aunque la IgY, al igual que la IgG, se puede purificar a partir de muestras de sangre del animal (Kabanova et al., 2014), en donde aproximadamente se encontraría una concentración de 5-7 mg/mL (Dias da Silva & Tambourgi, 2010). La yema de huevo es la fuente indicada para la purificación de anticuerpos, desde el punto de vista del bienestar animal (Pereira et al., 2018) haciendo que la gallina ponedora sea una plataforma de producción de anticuerpos policlonales efectiva (Kovacs-Nolan & Mine, 2012).

Anticuerpos IgY en inmunización pasiva

El interés en el uso de anticuerpos para generar nuevas terapias, como la inmunización pasiva, se da por la aparición de microorganismos resistentes a los medicamentos,

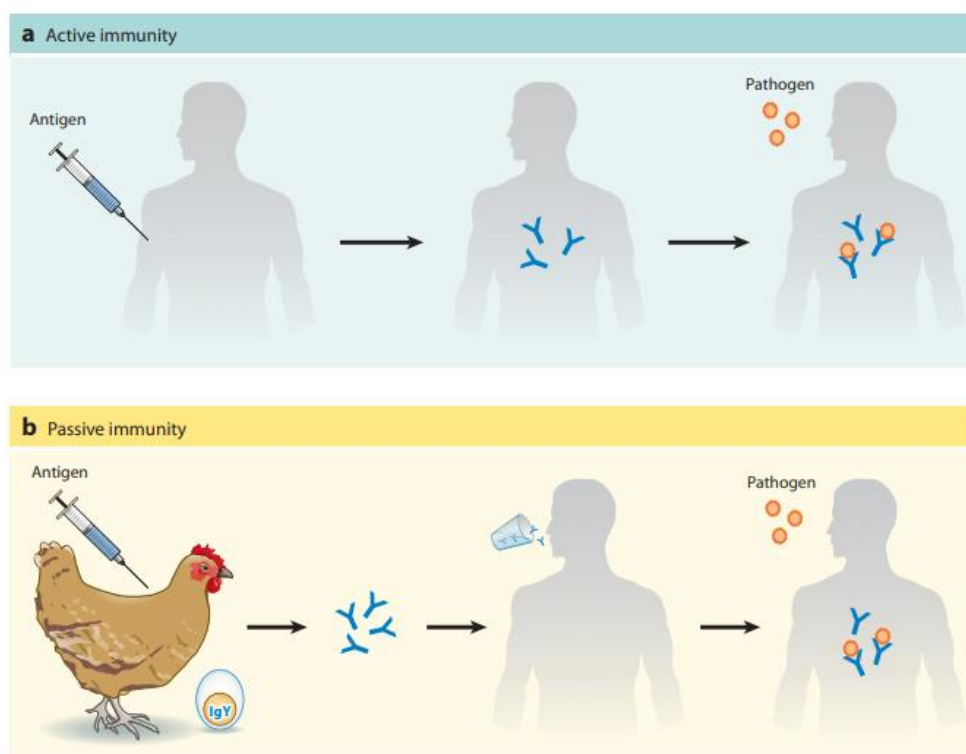
enfermedades persistentes (Kang et al., 2021) y personas inmunocomprometidas que no responden a tratamientos convencionales (Casadevall et al., 2004).

La inmunidad pasiva adquirida involucra suministrar anticuerpos específicos de antígeno obtenidos en otro individuo o animal a un individuo susceptible para proporcionarle una respuesta inmune rápida (Baxter, 2007; Bessen & Fischetti, 1988) (Figura 4).

La optimización del proceso productivo de IgY de manera rentable es clave para su uso exitoso en la inmunización pasiva (Lévesque et al., 2007). Es por esto que en la última década, varios estudios analizan estrategias óptimas para la inmunización de gallinas buscando una producción de IgY específicas favorable (Chang et al., 1999; Erhard et al., 2000).

Figura 4

Inmunidad activa y pasiva



Nota. a) Inmunidad activa b) inmunidad pasiva con anticuerpos (Kovacs-Nolan & Mine, 2012).

Inmunización con ADN

Las vacunas de ADN involucran la inyección de ADN plasmídico que actúa como un vector para la expresión de la proteína de interés en el interior de las células que son transfectadas (Rodríguez et al., 1997), generando respuestas inmunitarias humorales y celulares que le permiten al individuo contrarrestar una infección con el patógeno (Gurunathan et al., 2000). Por esto, se considera una potencial herramienta profiláctica para enfermedades que requieren las dos respuestas inmunes, como las causadas por virus (Davis & Whalen, 1995).

La inmunización de ADN estimula la respuesta de tipo celular citotóxica mediada por linfocitos T CD8+ (Chen et al., 1998), siendo esta una ventaja sobre las vacunas inactivadas o de subunidades recombinantes que pueden provocar efectos adversos en el individuo inmunizado, además esta estrategia de inmunización posee bajo costo de producción y debido a la estabilidad del ácido nucleico, no necesita cadena de frío para su distribución (Boyle et al., 1997).

A lo largo de los años, se han evaluado diferentes estrategias de inmunización que han demostrado la ventaja de combinar dos o más tipos de vacuna (Ganges et al., 2005). Así, la respuesta inmune obtenida puede ser cualitativa y cuantitativamente superior a la obtenida las vacunas por separado (Gurunathan et al., 1998).

Se ha visto que inmunizar primero con la vacuna de ADN y a continuación aplicar una vacunación de recuerdo con vacuna de subunidades, induce una respuesta inmune más efectiva que la administración de cada vacuna por separado (Huygen, 2005).

Polímeros catiónicos

Las nanopartículas de polímeros catiónicos tienen la capacidad de formar enlaces con proteínas, lo que los hace ideales en aplicaciones biomédicas emergentes (Farshbaf et al., 2018).

Actualmente las nanopartículas poliméricas son usadas para mejorar la eficacia terapéutica de fármacos solubles e insolubles en agua (Zakeri et al., 2018) y de moléculas bioactivas (Patnaik & Gupta, 2013) aumentando su solubilidad, tiempo de retención y estabilidad.

La encapsulación de fármacos en nanopartículas mejora su tolerabilidad, evita la degradación inmediata y mejora la absorción en el tejido seleccionado (Heller, 1984). Según Carmona-Ribeiro & de Melo Carrasco, (2013) la selección del sistema polimérico apropiado para un fármaco es seleccionado de acuerdo a su eficiencia de encapsulación, mejor tiempo de retención y biodisponibilidad.

Las polietileniminas lineales y ramificadas (PEI) son polímeros catiónicos que se han utilizado para liberar ácidos nucleicos tanto *in vitro* como *in vivo* (Jiang et al., 2019). Debido a su carga catiónica, los polímeros ramificados muestran alta eficiencia de transfección y, en particular, la PEI de peso molecular de 25 kDa en la administración de genes (Zakeri et al., 2018). Estos polímeros han sido ampliamente estudiados y modificados con diferentes ligandos para lograr la entrega deseada.

Capítulo 3

Metodología

El objetivo del presente trabajo fue producir anticuerpos IgY contra proteínas recombinantes Gn y Gc, en *Gallus gallus domesticus* inmunizadas con ADN solo y acompañado con polímeros catiónicos. Se transformó por electroporación a *E. coli* cepa Top10 para amplificar el vector pENTRY-GPC, facilitado por el laboratorio de Biofármacos Recombinantes de la Universidad de Concepción, a partir de la cual se expresan las glicoproteínas recombinantes Gn y Gc, las mismas que se evaluaron mediante inmunofluorescencia en la línea celular HEK-293FT. El ADN obtenido se purificó con kits comerciales y se utilizó para inmunizar a gallinas ponedoras, una parte se utilizó solo y la otra se acompañó con polietilimina. Tanto los huevos como las muestras de sangre se tomaron desde el tiempo 0 hasta el 47, se procesaron y finalmente se comparó la expresión temporal de anticuerpos en suero y en yema mediante ELISA.

Preparación y transformación de *E. coli* electrocompetentes

Se utilizó el protocolo de preparación y transformación en medio de cultivo libre de sal descrito por Sharma & Schimke, (1996). Se tomó una colonia aislada de *E. coli* cepa Top10 desde una placa con medio agar Luria Bertani/estreptomicina (LBE) (MoBio, EE.UU.) que se inoculó en 5 mL de medio LB/estreptomicina (BD Biosciences, EE.UU.) y fue incubada a 37°C por 16 horas en agitación a 120 revoluciones por minuto (rpm). Se tomaron 2 mL del cultivo previamente incubado y se agregaron en 500 mL de medio LB/estreptomicina, el matraz se llevó a 37°C y agitación orbital. El cultivo creció hasta una densidad óptica (DO) entre 0,5 y 0,8 y se enfrió en hielo durante 30 minutos para centrifugarse a 3.829 x g por 10 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 460 mL de glicerol 10% frío y se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones.

De la placa incubada, se tomaron 10 colonias aisladas que fueron sembradas en 10 minicultivos, los cuales se purificaron por lisis alcalina y posteriormente se digirieron con las enzimas Bgl II y Not I.

Purificación de ADN plasmídico

Según Birnboim & Doly, (1979) la purificación del ADN plasmídico de *E. coli* electrocompetente mediante lisis alcalina es un procedimiento simple que permite su análisis por electroforesis en gel.

Se inoculó una colonia aislada de *E. coli* electrocompetente en 300 mL de medio LB suplementado con 300 μ L de kanamicina que se incubó a 37°C por 16 horas con agitación orbital a 120 rpm. El cultivo fue centrifugado a 6.000 rpm durante 15 minutos y a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en 10 mL de Solución I de lisis alcalina (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, pH 8,0 y ARNasa 10 mg/mL) al que se le agregaron 10 mL de Solución II de lisis alcalina (NaOH 0,2 M, SDS 1% (p/v)), se mezcló por inversión y se dejó reposar a 22-25°C durante 10 minutos. Posteriormente, se adicionaron 10 mL de Solución III de lisis alcalina (Acetato de potasio 5 M, Ácido acético glacial), se mezcló por inversión y se dejó en hielo durante 15 minutos.

La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el precipitado se descartó, y el sobrenadante filtrado se mezcla con 0,8 volúmenes de isopropanol. La muestra fue centrifugada a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 600 μ L de agua estéril. La resuspensión de ADN se incubó a 37°C con 10 μ g/mL de ARNasa durante 2 horas.

Debido a que el ADN obtenido se usaría para las formulaciones de inmunización, se realizó una segunda purificación utilizando el kit EZNA Cycle Pure kit (Omega Bio-Tek, EE.UU.) según las indicaciones del fabricante. El ADN se visualizó por electroforesis en geles de agarosa al 1%, se cuantificó y la pureza se determinó por la relación de absorbancia a 260/280 y 260/230 nm en espectrofotómetro SpectroStar Nano (BMG LABTECH, Alemania)

Descongelación de línea celular HEK-293FT

Siguiendo la metodología propuesta por Robinson et al., (2021) la descongelación de las células HEK-293FT se realizó en baño termostático a 37°C con agitación. Las células se homogenizaron en 1 mL de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) que fue traspasado a un tubo de 15 mL con 4 mL del mismo medio suplementado. El tubo se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado obtenido se resuspendió en 1 mL de medio DMEM suplementado con 10% SFB. Las células fueron sembradas en una placa de cultivo de 100 mm de diámetro (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) con 10 mL de medio suplementado e incubadas a 37°C, en presencia de CO₂ al 5% y con una humedad relativa (HR) del 95%.

Propagación de línea celular HEK-293FT

Siguiendo la metodología propuesta por Robinson et al., (2021) se eliminó el medio del cultivo a 90-95% de confluencia celular, las células fueron lavadas una vez con PBS y cubiertas con 1 mL de tripsina-EDTA 0,25% (Sigma, EE. UU) después, la placa se incubó a 37°C durante 5 minutos. Al cabo de este tiempo, se agregaron 2 mL de medio suplementado a las células con tripsina y se traspasaron a un tubo de 15 mL para centrifugarse a 800 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2 mL de medio DMEM suplementado con 10% SFB. Las células se contaron en cámara de Neubauer y fueron sembradas en placas de cultivo de 100 mm de diámetro.

Transfección con polietilenimina (PEI) en línea celular HEK-293FT

La transfección se realizó siguiendo el protocolo descrito por Toledo et al., (2009) utilizando la relación PEI (μL) : ADN (μg) de 2,5:1. Se preparó una solución de ADN y otra con PEI, las dos adicionadas glucosa al 5%. Se agitaron y se dejó reposar durante 10 minutos.

Las células se lavaron 2 veces con PBS y posteriormente las dos soluciones antes preparadas se mezclaron en vortex y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos,

se añadieron a la placa junto con medio DMEM hasta un volumen final de 350 μ L por pocillo y se incubaron a 37°C con CO al 5% y HR al 95% por 5 horas antes de adicionarle 35 μ L de SFB.

Inmunofluorescencia para evaluar el plásmido pEntry-GPC

A una placa de cultivo de 24 pocillos se le colocaron cubreobjetos circulares en el fondo y se sembraron 5×10^4 células HEK293-FT. Al día siguiente, las células se transfectaron por el método descrito por Toledo et al., (2009), y para evaluar el plásmido pENTRY-GPC que codifica Gn y Gc y el plásmido pENTRY-FSH como control, se adaptó el protocolo de Asakura & Kikyo, (2022) por lo que se dejó la placa en incubación por 48 horas a 37°C.

Pasado este tiempo, las células se fijaron a temperatura ambiente con paraformaldehído (PFA) 4% por 30 minutos y fueron lavadas 3 veces con PBS durante 5 minutos, inmediatamente, se trató las células con la solución de permeabilización (Tritón 0,2%) por 5 minutos, nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS y se incubaron con buffer de bloqueo (BSA 1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguido a esto, las células se lavaron 3 veces más y se les adicionó el anticuerpo primario (Anti-Gn o Anti-Gc) a una dilución 1/200 durante 16 horas a 4°C.

Una vez cumplido el tiempo, las células se lavan nuevamente y se incuban con el anticuerpo secundario (Anti-mouse) conjugado con FITC por 4 horas a 22-25°C, vuelven a ser lavadas y los cubreobjetos con las células se montan en los portaobjetos con 7 μ l de medio de montaje Vectashield.

La expresión de GFP utilizado como control de transfección, se visualizó en el microscopio FLoid® Cell Imaging Station (Life Technologies) y para la obtención de las imágenes de inmunofluorescencia se usó el Microscopio de Fluorescencia Olympus IX8.

Formulaciones para inmunización

Las dosis de inmunización se realizaron usando 2 formulaciones vacunales compuestas por ADN, PEI y glucosa 5%. Las preparaciones empleadas fueron:

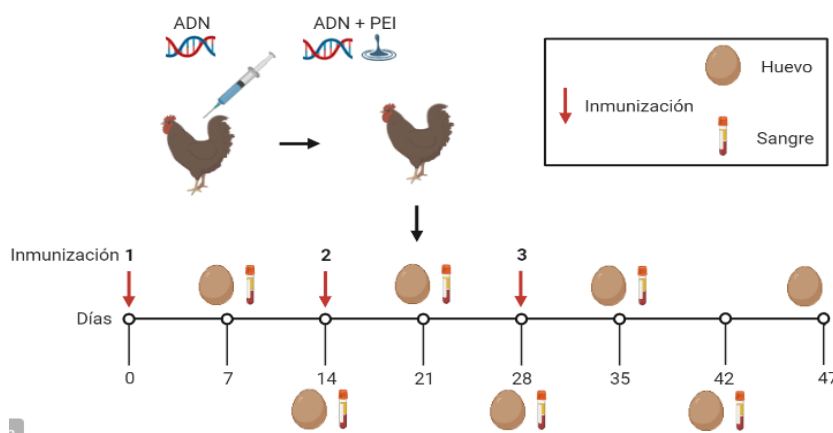
- Formulación A: ADN plasmídico purificado 300 µg/mL
- Formulación AP: ADN plasmídico purificado 300 µg/mL + PEI 25 kDa + Glucosa 5%

Inmunización de gallinas ponedoras con ADN

El esquema de inmunización implementado se adaptó del estudio con patos realizado por R. Brocato et al., (2012). A cada grupo experimental se le administró una de las distintas formulaciones mencionadas anteriormente. Las inmunizaciones se realizaron en los días 1, 14 y 28 por inyección intramuscular, el grupo 1 recibió 350 µL de la formulación A y el grupo 2 un total de 2 mL de la formulación AP. Diariamente se recogieron los huevos de cada grupo y se tomaron muestras de sangre semanalmente hasta el día 47.

Figura 6

Esquema de inmunización



Nota. Esquema de inmunización y recolección de muestras para los grupos experimentales.

Obtención de muestras de suero desde animales inmunizados

Se tomaron muestras de 1,5-3 mL por punción de la vena basílica izquierda. Las muestras de sangre fueron colectadas en tubos de 15 mL y posteriormente centrifugadas a

3.000 rpm durante 10 minutos. El suero fue recolectado y alicuotado en microtubos que se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Extracción de IgY mediante precipitación

Se siguió el protocolo para la extracción de IgY por medio de precipitación con polietilenglicol (PEG) descrito por Polson et al., (1980). Se transfirió la yema de cada huevo a un tubo de 50 mL diferente, en el que se agregó el doble de volumen de PBS y PEG 6000 al 3,5% y se dejó rodar el tubo en una mesa de mezcla de laminación durante 10 minutos para después centrifugar a 10.000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4°C. Se descartó el precipitado y al sobrenadante filtrado se le añadió PEG 6000 al 8,5%, siguiendo las mismas condiciones de mezcla y centrifugación, a diferencia de que esta vez se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 mL de PBS al que eventualmente se le añadieron 9 mL más, con un volumen final de 10 mL se agregó PEG 6000 al 12% se mezcló y centrifugó. El precipitado se resuspendió en 800 µL de PBS.

Las muestras se dializaron toda la noche en una solución salina de NaCl 0,1% y al día siguiente se dializaron 3 horas más en PBS. Las IgY extraídas se alicuotaron en microtubos y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

Los geles se prepararon a 10 y 12,5 % de poliacrilamida y con 1 mm de espesor según el procedimiento descrito por Laemmli, (1970). Los geles separador y concentrador se prepararon de acuerdo a la siguiente tabla.

Tabla 1

Protocolo de preparación de geles desnaturalizantes de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

	Gel separador 10 %	Gel separador 12 %	Gel concentrador
Agua	2,5 mL	2,0 mL	1,0 mL
Poliacrilamida (Acrilamida 30% Bisacrilamida 0.8%)	1,9 mL	2,4 mL	300 µL
Buffer separador (Tris-HCl 1.5 M, SDS 10% pH: 8.8)	1,5 mL	1,5 mL	-
Buffer concentrador (Tris- HCl 0.5 M, SDS 10% pH: 6.8)	-	-	444 µL
PSA 10%	90 µL	90 µL	28 µL
TEMED	4 µL	4 µL	5 µL

Nota. Protocolo adaptado de Laemmli, (1970)

El buffer de corrida se preparó con agentes desnaturalizantes: Tris/HCl 25 mM (Calbiochem, Inglaterra), Glicina 192 mM (Calbiochem, Inglaterra) y SDS 0,1% (p/v) (Calbiochem, Inglaterra). Las muestras se dejaron correr a 100 V por 2 horas, pasado este tiempo, el gel se incubó durante 1 hora en solución de tinción: Azul de Coomassie 0,5 g/l (Merck, Alemania), Metanol 10%, (TCL, Chile) y se dejó durante toda la noche en Solución de destinción: Metanol 20% (v/v) (TCL, Chile), Ácido acético 10% (v/v) (Merck, Alemania).

Western Blot

Finalizada la electroforesis, la inmuno-identificación de las proteínas recombinantes Gn y Gc se realizó según el procedimiento descrito por Burnette, (1981). Se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa BA-85 (Schleicher & Schuell, Alemania) en una celda de transferencia semi-húmeda (BioRad, EE. UU) a una corriente constante de 0,3 A y voltaje máximo de 25 V, durante 30 minutos. La membrana se cortó en secciones que

contenían el marcador de peso molecular y la muestra de proteína GnGc y cada una se incubó por separado durante 2 horas en solución de bloqueo (leche descremada al 5% en TBS) a temperatura ambiente y agitación constante, transcurrido este tiempo, cada membrana se incubó con los anticuerpos IgY diluidos 1/50 en leche descremada al 5% con TBS durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos IgY utilizados fueron los obtenidos del tiempo 0 y 47 de una gallina de cada grupo experimental, IgY anti-Hanta y Anti-histidina.

Las membranas se lavaron 3 veces con Tween-20 0.1% (v/v) (Sigma-Aldrich, EEUU) diluido en TBS, cada lavado duró 10 minutos y se realizó en agitación.

Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado durante 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente se realizaron los 3 lavados de 10 minutos y se revelaron utilizando el equipo detector de fluorescencia Odyssey® CLx (LiCor Biosciences, EE.UU.).

Cuantificación de IgY totales por Bradford

Se construyó una curva de albúmina de suero bovino (BSA) (Thermo Scientific, EE.UU.) con concentraciones de 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250, 125, 25 y 0 µg/mL. Se realizaron diluciones 1/50 de las muestras a analizar y siguiendo las instrucciones del fabricante, en una placa de 96 pocillos se agregaron 5 µL de cada muestra con 200 µL de Reactivo Bradford. Inmediatamente, la placa se leyó a una longitud de onda de 595 nm.

Determinación del título de anticuerpos IgY totales mediante ELISA

El siguiente protocolo fue adaptado a partir del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para inmunoglobulina G descrito por Engvall & Perlmann, (1971). En una placa de 96 pocillos para ELISA (Thermo Scientific, EE.UU.) se adicionaron 50 µL de la proteína recombinante GnGc diluida en tampón carbonato de sodio ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$) 50 mM, pH 9,4-9,6 (Merck, Alemania) a una concentración de 5 µg/mL. La placa se incubó toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

Al otro día, los pocillos recubiertos fueron lavados 2 veces con PBS-Tween al 0,05%. Una vez eliminado el exceso de solución, en cada pocillo se añadieron 250 μ L de Leche descremada 3% (p/v) (Svelty, Nestlé, Suiza) diluida en PBS y se incubó la placa por 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Después, la placa se lavó 3 veces con solución de lavado de ELISA y se adicionaron 90 μ L de los sueros e IgY extraídas de las gallinas a varias diluciones y por duplicado, diluidos en leche descremada 1% PBS-Tween al 0,05%. Incluyendo el control positivo. Se dejó a 37°C en cámara húmeda por 2 horas. Pasado este tiempo, los pocillos se lavaron 3 veces más y la placa fue incubada por 1 hora, a las mismas condiciones anteriores, con anticuerpo secundario anti-IgY conjugado a HRP, preparado en leche descremada 1% PBS-Tween al 0,05%.

Se realizaron 4 lavados más a la placa y se añadió 100 μ L/pocillo de Ultra TMB-ELISA (Thermo Scientific, EE.UU.), se incubó por 10-15 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda y oscuridad. La reacción se detuvo adicionando 50 μ L de ácido sulfúrico 2.5 N a cada pocillo. Finalmente, la placa se leyó a una longitud de onda de 450 nm y los títulos de anticuerpos se analizarán mediante ANOVA de dos vías de comparaciones múltiples, a partir del test de Sidak.

Capítulo 4

Resultados

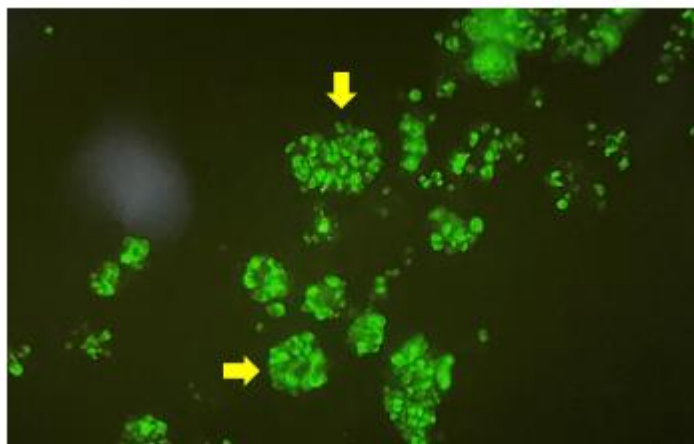
El presente estudio se enfocó en obtener ADN plasmídico de buena calidad, comprobando su pureza y concentración mediante electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos. Como resultado de la inmunización se tomaron las muestras de sangre y huevos para comparar el título de anticuerpos específicos para la proteína recombinante Gn y Gc.

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

La inmunofluorescencia en células HEK- 293FT transfectadas con los plásmidos pENTRY-GPC, precursor de las glicoproteínas Gn y Gc, y pENTRY-FSH usado como control de transfección para observar la expresión de proteína fluorescente después de 48 horas (Figura 7), permite el análisis de la distribución celular de Gn y Gc en las células.

Figura 7

Control de transfección del plásmido pENTRY-FSH.

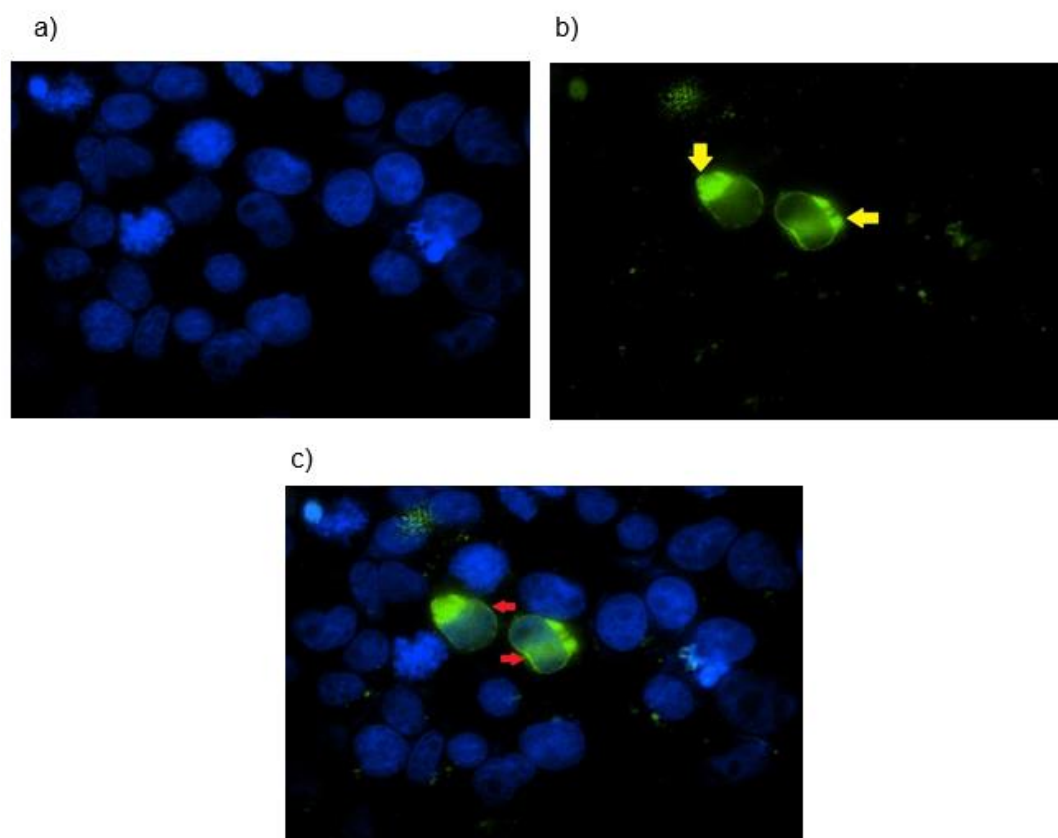


Nota. Producción de proteína verde fluorescente (GFP) por la línea celular HEK-293FT transfectada con el plásmido pENTRY-FSH. Fuente: elaboración propia.

La Figuras 8 y 9 muestran las imágenes obtenidas para Gn y Gc, respectivamente, sugieren la presencia de proteínas en la membrana plasmática.

Figura 8

Inmunofluorescencia de Gn en células HEK-293FT transfectadas con el plásmido pENTRY-GPC.

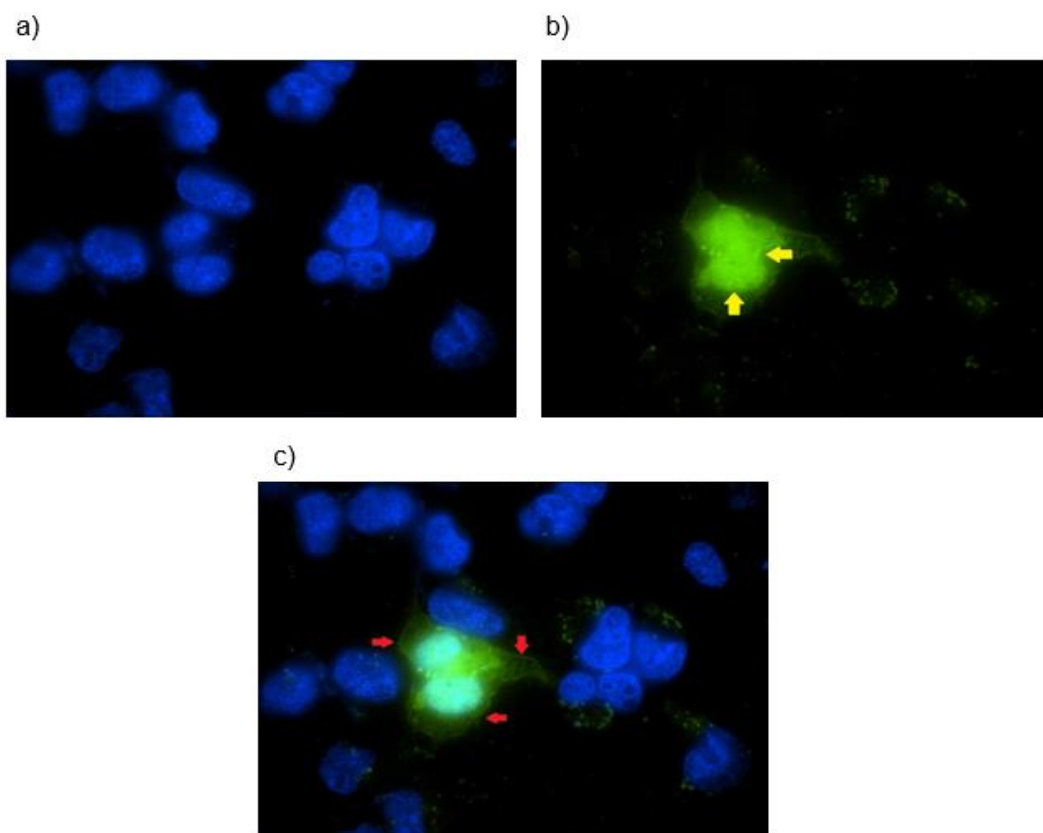


Nota. Inmunofluorescencia de Gn en células HEK-293FT transfectadas con el plásmido pENTRY-GPC, utilizando anticuerpo monoclonal murino IgG anti-Glicoproteína N de ADN, clon 6B9/F5 (Cat: HNM-6022CX1-5) y anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón conjugado con FITC producido en cabra (Cat: sc-2356). a) Núcleos teñidos con DAPI. b) Al usar el canal de fluorescencia se muestra la acumulación de Gn en un organelo interno. c) Superposición de a)

y b) en donde se evidencia la presencia de Gn en el contorno de la célula. Fuente: elaboración propia.

Figura 9

Inmunofluorescencia de Gc en células HEK-293FT transfectadas con el plásmido pENTRY-GPC.



Nota. Inmunofluorescencia de Gc en células HEK-293FT transfectadas con el plásmido pENTRY-GPC, utilizando anticuerpo monoclonal murino IgG anti-Glicoproteína C de ANDV, clon 6C5/D12 (Cat: HNM-6023CY1-5) y anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón conjugado con FITC producido en cabra (Cat: sc-2356). a) Núcleos teñidos con DAPI. b) Al usar el canal de fluorescencia se muestra la acumulación de Gc en un organelo interno. c) Superposición de a)

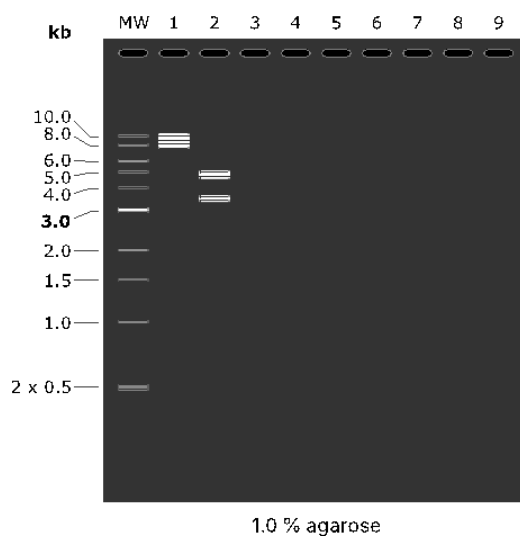
y b) en donde se evidencia la presencia de Gc en el contorno de la célula. Fuente: elaboración propia.

Purificación de ADN plasmídico del vector pENTRY-GPC

En el gel virtual del programa SnapGene se realizó la simulación de la digestión del ADN plasmídico con las enzimas Bgl II y Not I (Figura 10) y se obtuvieron 2 bandas con los siguientes tamaños moleculares: 4851 pb y 3453 pb.

Figura 10

Simulación de la digestión de ADN plasmídico del vector pENTRY-GPC en SnapGene.

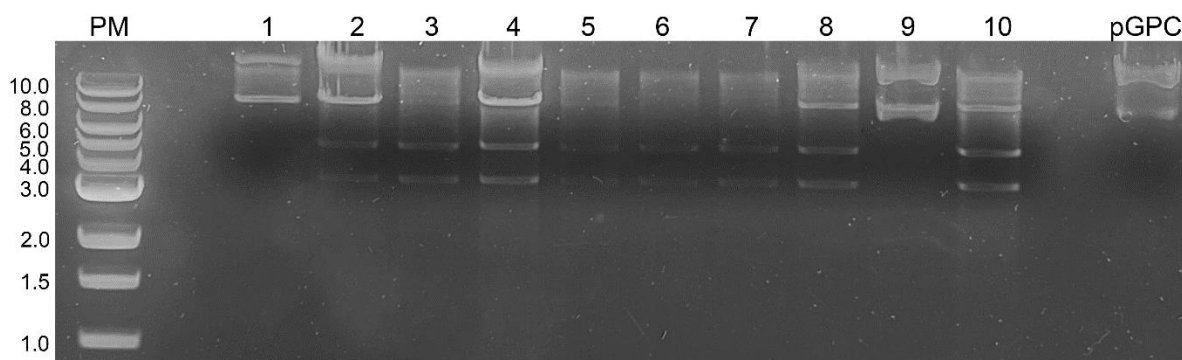


Nota. Simulación de un gel de agarosa 1%. Carriles: MW, marcador de peso molecular 1 kb; 1, ADN plasmídico del vector pENTRY-GPC sin digerir; 2, ADN plasmídico del vector pENTRY-GPC digerido con las enzimas Bgl II y Not I. Fuente: Elaboración propia.

El ADN plasmídico de los 10 minicultivos de *E.coli* cepa Top10 purificados por lisis alcalina se digirieron con las enzimas Bgl II y Not I (Figura 11). Y se evidenció la presencia de 2 bandas con pesos moleculares de 4851 y 3453 pb, respectivamente, similares a los obtenidos mediante la simulación en SnapGene.

Figura 11

Análisis enzimático de ADN plasmídico con las enzimas Bgl II y Not I.

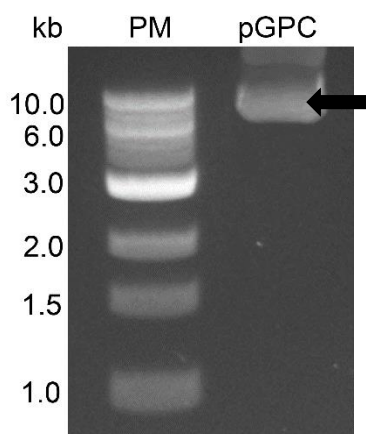


Nota. Electroforesis en gel de agarosa 1% del ADN plasmídico purificado pGPC obtenido de cada minicultivo de *E.coli* cepa Top10 transformada con el vector Pentry-GPC, digeridos con las enzimas de restricción Bgl II y Not I. Carriles: PM, marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1-10, ADN plasmídico pGPC digerido con enzimas Bgl II y Not I; pGPC, ADN plasmídico del vector pENTRY-GPC sin digerir sin digerir. Fuente: Elaboración propia.

El ADN plasmídico extraído mediante lisis alcalina se incubó con RNAsa 10 µg/mL y, se purificó con el kit comercial EZNA Cycle Pure kit a través de mini columnas de centrifugado de sílice para llegar a la pureza requerida en la inmunización. Se obtuvo ADN plásmidico con una concentración de 900-1.800 µg/mL y pureza de 1,9 (ratio A260/230) que se considera como ADN puro al situarse dentro del rango 1,8-2,2 (Figura 12).

Figura 12

ADN plasmídico purificado y sin digerir obtenido del plásmido pENTRY-GPC



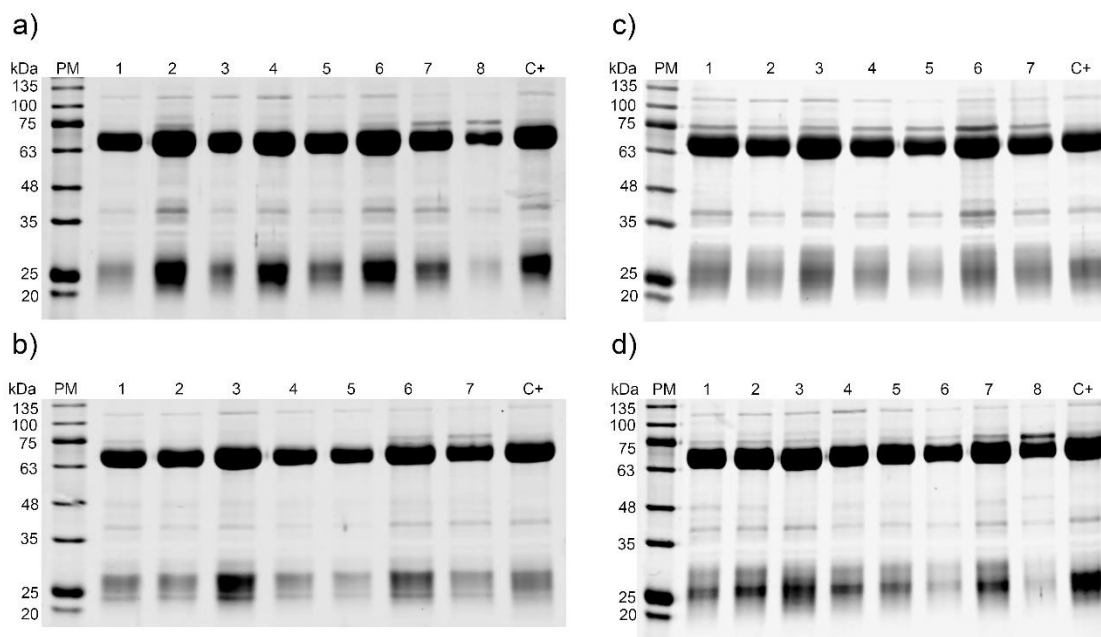
Nota. Electroforesis en gel de agarosa 1% del ADN plasmídico pGPC purificado. Carriles: PM, marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder; pGPC, ADN plasmídico del vector pENTRY-GPC sin digerir sin digerir. Fuente: Elaboración propia.

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

Los anticuerpos extraídos de cada grupo experimental se corrieron en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12.5%, las muestras se trataron con β - mercaptoetanol (β -ME) como agente reductor y así se visualizaron las cadenas pesadas (CH) con un peso molecular de 67 a 70 kDa y las livianas (CL) con 25 kDa que componen a la IgY (Figura 13).

Figura 13

Presencia de anticuerpos IgY en huevos de gallinas inmunizadas con ADN solo y acompañado con PEI



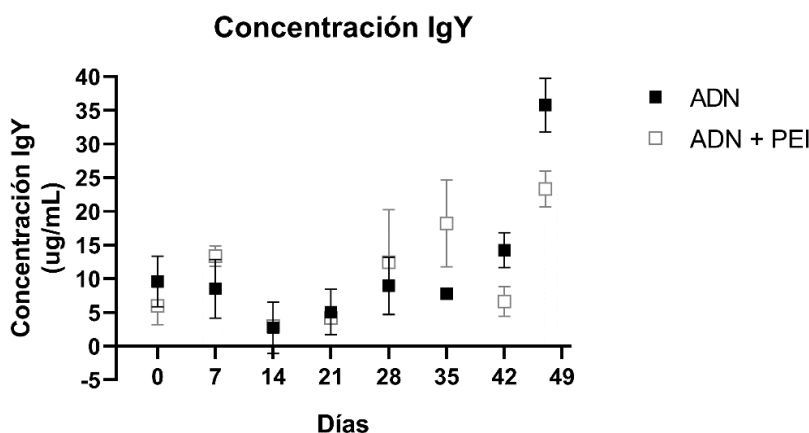
Nota. SDS-PAGE al 12.5% en condiciones desnaturizantes y reductoras, de IgY. a) Gallina A1 inmunizada con ADN solo. b) Gallina A2 inmunizada con ADN solo. c) Gallina AP1 inmunizada con ADN + PEI. d) Gallina AP2 inmunizada con ADN + PEI. Carriles: PM, marcador de peso molecular AccuRuler RGB PLUS Prestained Protein Ladder 10-245 kDa; 1, IgY tiempo 0; 2, IgY tiempo 7 después de la primera inmunización (DPI); 3, IgY tiempo 14 DPI; 4, IgY tiempo 21 DPI; 5, IgY tiempo 28 DPI; 6, IgY tiempo 35 DPI; 7, IgY tiempo 42 DPI; 8, IgY tiempo 47 DPI; C+; Control positivo. Fuente: Elaboración propia.

Los anticuerpos IgY totales se cuantificaron por el método de Bradford, el Azul de Coomassie G-250 presente en el reactivo se une a la proteína generando una coloración celeste leída a 595 nm, la absorbancia obtenida se comparó con la coloración producto de la misma unión en los diferentes puntos de la curva de BSA.

El cálculo de la concentración de IgY total presente en las gallinas inmunizadas con ADN solo y acompañado con PEI no reflejó diferencia significativa desde el tiempo 0 hasta el 28. En el día 35 se observó una mayor expresión de IgY total en las gallinas inmunizadas con ADN acompañado, esta tendencia cambia para el día 47 en el que el ADN muestra mayor expresión (Figura 14).

Figura 14

Concentración de IgY total en yema de huevo



Nota. Comparación temporal de la concentración promedio de anticuerpos IgY totales obtenidos en yema de huevo de gallinas inmunizadas con ADN solo y acompañado con PEI.

Fuente: Elaboración propia.

Inmuno-identificación de las proteínas recombinantes Gn y Gc

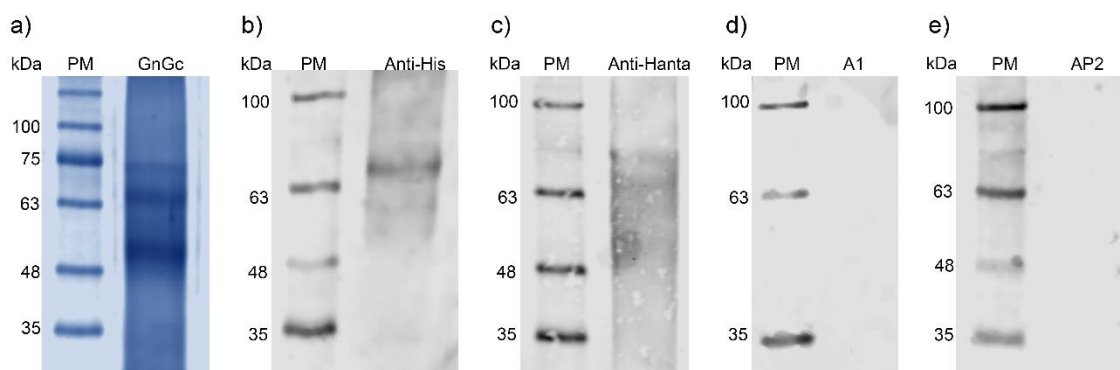
Los análisis en SDS-PAGE desnaturalizante al 10% y Western blot se realizaron para comprobar la especificidad de los anticuerpos IgY Anti-GnGc extraídos de yema de huevo. El gel desnaturalizante de poliacrilamida en condiciones reductoras mostró bandas entre 48 y 75 kDa, que pudieran corresponder a las glicoproteínas recombinantes Gn y Gc, según su peso molecular teórico de 44,4 y 51,5 KDa, respectivamente. En la inmuno-identificación se utilizaron cuatro anticuerpos primarios para verificar la presencia de las proteínas recombinantes Gn y

Gc: anticuerpo monoclonal murino anti-histidina (Cat: A00186-100) diluido 1:10.000 (Figura 15b), anticuerpo policlonal IgY Anti-Hantavirus diluido 1:50 y anticuerpos policlonales IgY de yema de huevo de gallinas inmunizadas con ADN solo (A1) y ADN acomplejado con PEI (AP2) en tiempo 0 y tiempo 47 posterior a la primera inmunización, diluidos 1:50. Como anticuerpos secundarios se usaron anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón conjugado con la sonda fluorescente AlexaFluor® (680nm) producido en cabra (Cat: A-21057) y anticuerpo policlonal anti-IgY de pollo conjugado con la sonda fluorescente AlexaFluor® (790nm) producido en cabra.

La señal que se observó con los anticuerpos Anti-His y Anti-Hantavirus, usados como control positivo para el ensayo, corroboró la presencia de las glicoproteínas de superficie recombinantes Gn y Gc (Figura 15b y 15c). Los inmunoensayos con los anticuerpos primarios IgY extraídos del tiempo 0 no reconocieron las bandas correspondientes a las glicoproteínas recombinantes Gn y Gc, debido a ello fueron usados como control negativo para los siguientes ensayos (Figura 15d y 15e).

Figura 15

SDS-PAGE desnaturalizante al 10% y Western Blot de las glicoproteínas Gn y Gc con anticuerpos primarios de gallinas no inmunizadas

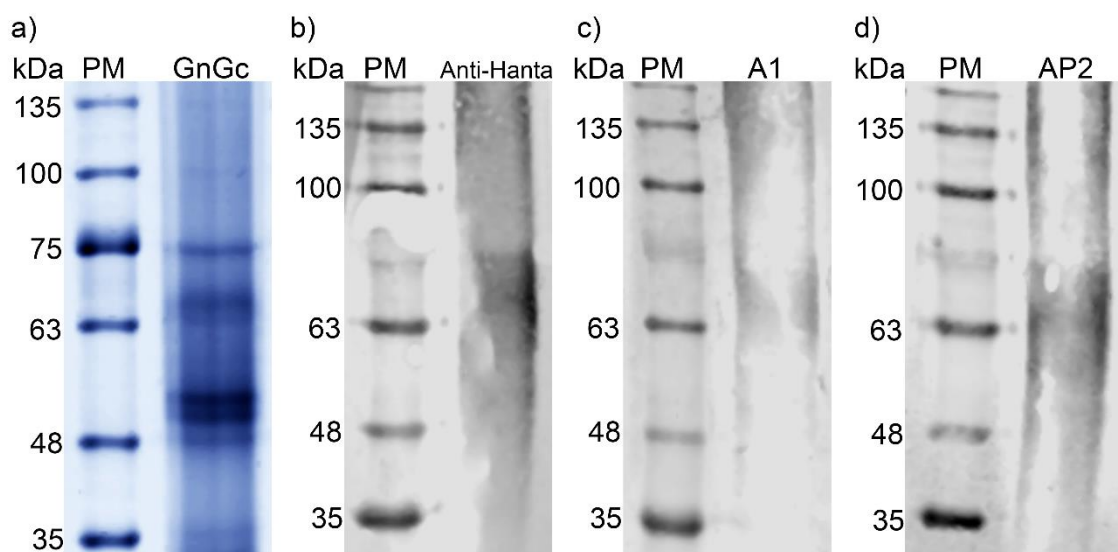


Nota. a) SDS-PAGE al 10% en condiciones desnaturalizantes y reductoras, teñido con azul de Coomasie R-250 b) Western Blot utilizando anticuerpo monoclonal murino anti-histidina (Cat: A00186-100) diluido 1:10.000. C) Western Blot utilizando anticuerpo IgY Anti-Hantavirus. D) Western Blot utilizando anticuerpo IgY de A1 tiempo 0. E) Western Blot utilizando anticuerpo IgY de AP2 tiempo 0. Carriles: PM, marcador de peso molecular AccuRuler RGB PLUS Prestained Protein Ladder 10-245 kDa; GnGc, proteína recombinante Gn y Gc; Anti-his, anti-polihistidina; Anti-Hanta, anti-hantavirus; A1, IgY extraídas del tiempo 0 en gallinas inmunizadas con ADN solo; AP2, IgY extraídas del tiempo 0 en gallinas inmunizadas con ADN acompañado con PEI. Fuente: Elaboración propia.

El inmuno-ensayo específico, Western Blot, usando las IgY Anti-GnGc extraídas de los huevos puestos el día 47 después de la primera inmunización (Figura 16), indica la especificidad de los anticuerpos después de completar el esquema de inmunización propuesto, ya que se marcan las bandas comprendidas entre 63 y 75 kDa, que corresponderían a las proteínas recombinantes Gn y Gc.

Figura 16

SDS-PAGE PAGE desnaturalizante al 10% y Western Blot de las glicoproteínas Gn y Gc con anticuerpos primarios de gallinas inmunizadas



Nota. a) SDS-PAGE al 10% en condiciones desnaturalizantes 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 tiempo 47. d) Western Blot utilizando anticuerpo Anti-GnGc de AP2 tiempo 47. Carriles: PM, marcador de peso molecular AccuRuler RGB PLUS Prestained Protein Ladder 10-245 kDa; GnGc, proteína recombinante Gn y Gc; Anti-Hanta, anti-hantavirus; A1, IgY extraídas del tiempo 47 en gallinas inmunizadas con ADN solo; AP2, IgY extraídas del tiempo 47 en gallinas inmunizadas con ADN acomplexado con PEI. Fuente: Elaboración propia.

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

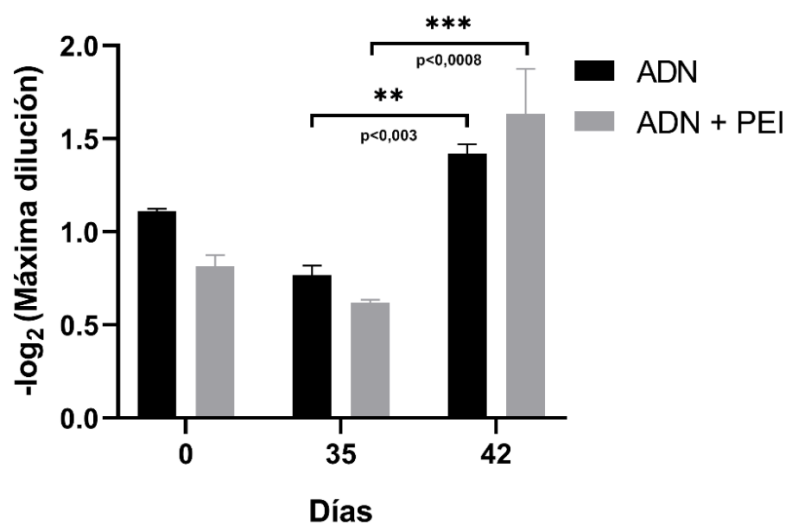
Los anticuerpos IgY totales se titularon mediante ELISA. Se fijó la proteína recombinante Gn y Gc en el fondo de placas de 96 pocillos high binding, y se hicieron diluciones seriadas de las IgY obtenidas de la yema y del suero colectado.

La detección se realizó con un anticuerpo policlonal anti-IgY conjugado a HRP, producido en cabra. Los sueros recolectados de los dos tratamientos evidenciaron mayor título de anticuerpos en el día 42 posterior a la primera inmunización, los títulos de anticuerpos IgY totales variaron entre cada grupo experimental: En el grupo A se alcanzaron títulos a una dilución máxima de 1/400 (Figura 17) mientras que en el grupo AP la titulación se alcanzó en 1/800. Se mostró diferencia significativa dentro de cada grupo, entre el día 35 y 42, en donde se evidencia el aumento de IgY específicas para proteína recombinante Gn y Gc en sangre.

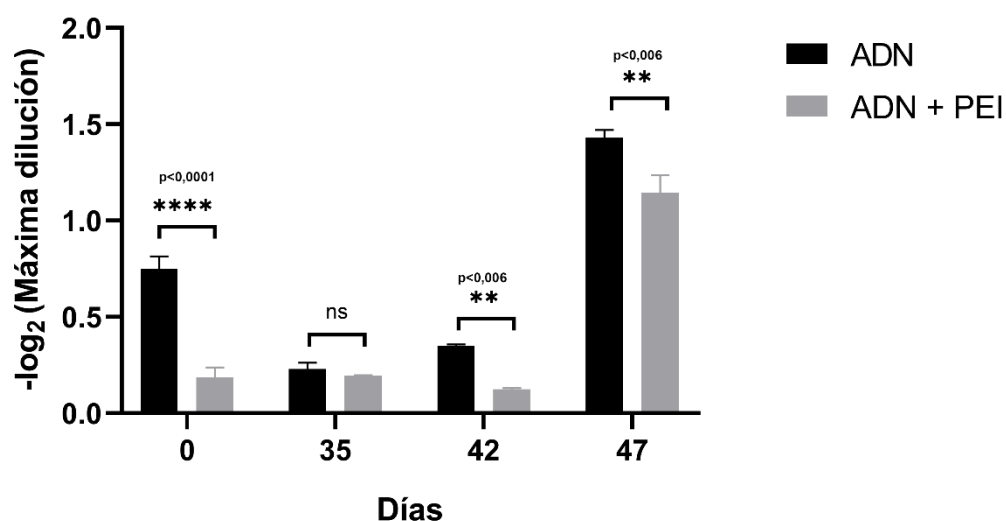
Por otra parte, en las IgY obtenidas de la yema de huevo se evaluaron los días 0, 35, 42 y 47 posteriores a la primera inmunización, en donde se muestra el aumento de anticuerpos específicos para la proteína de interés en el día 47 (Figura 18) el título de anticuerpos obtenido de la inmunización con ADN llegó a una dilución máxima de 1/800 mientras que en el grupo AP la dilución máxima fue de 1/1600, mediante un análisis ANOVA de dos vías de comparaciones múltiples, a partir del test de Sidak, se muestra diferencia significativa entre los dos grupos experimentales, excepto en el día 35 en el que el título de anticuerpo es bajo en los dos casos.

Figura 17

Titulo de IgY totales en suero



Nota. Títulos de anticuerpos IgY totales inducidos en gallinas inmunizadas con las distintas formulaciones vacunales, obtenidos en suero. Los valores representan el promedio \pm D.E. resultado de un análisis ANOVA de dos vías de comparaciones múltiples, a partir del test de Sidak; **, $p < 0,003$; ***, $p < 0,0008$.

Figura 18*Título de IgY en yema*

Nota. Títulos de anticuerpos IgY totales inducidos en gallinas inmunizadas con las distintas formulaciones vacunales, obtenidos en yema de huevo. Los valores representan el promedio \pm D.E. resultado de un análisis ANOVA de dos vías de comparaciones múltiples, a partir del test de Sidak; **, $p<0,006$; **** $p<0,0001$; ns, no significativo).

Capítulo 5

Discusión

El análisis de la distribución celular de Gn y Gc en HEK-293FT mediante inmunofluorescencia es relevante, porque en esta línea celular se producen vectores lentivirales (LV) (Perry & Rayat, 2021) que presentan menos efectos mutagénicos adversos a comparación de otros vectores virales (Bauler et al., 2019), siendo importantes en el avance de la terapia génica. En las Figuras 8 y 9 se identifica la presencia de proteínas en el contorno de la célula, lo que sugiere que tanto Gn como Gc podrían estar presentes en la membrana plasmática. Esto último coincide con lo predicho por los servidores bioinformáticos (Rissanen et

al., 2021) y también con las diferentes investigaciones del orden *Bunyavirales* (Krylova et al., 2021) que describen la presencia de Gn y Gc de virus Hantaan en la membrana celular.

Vinograd et al., (1965) determinaron que el DNA puede adoptar distintas formas topológicas, podía encontrarse tanto en forma lineal como circular. Las moléculas circulares, además, podían presentarse desde moléculas relajadas hasta enrolladas sobre sí mismas. A cada una de estas isoformas se les denominó topoisómeros (Bates & Maxwell, 1997), que se consideran las diferentes conformaciones espaciales que pueden adoptar las moléculas de ADN circulares covalentemente cerrados (CCCs)

El proceso de lisis alcalina desnatura el ADN cromosómico de alto peso molecular mientras que el ADN circular covalentemente cerrado permanece bicatenario (Birnboim & Doly, 1979), esto permite la detección del ADN plasmídico recombinante producido por el plásmido pENTRY-GPC que al no haber pasado por una digestión, en la electroforesis muestra su forma de monómero súperenrollado CCC moviéndose más rápido a comparación de otras formas debido a su estructura compacta. El plásmido pENTRY-GPC al ser digerido con las enzimas de restricción Bgl II y Not I (Figura 11) muestra 2 fragmentos de ADN con peso conocido: 4851 pb y 3453 pb, que se confirma con una simulación usando el programa SnapGene, esto quiere decir que las bacterias electrocompetentes replican el material genético proporcionado por el plásmido pENTRY-GPC.

La segunda purificación del ADN plasmídico se realizó con un kit comercial siguiendo la [ficha técnica](#) del fabricante, esto descartó la presencia de cebadores, enzimas de nucleótidos, sales y otras impurezas de una muestra de ADN (Paalme & Speek, 2021). Además, al no usarse compuestos tóxicos como el fenol y cloroformo, el ADN resuspendido en agua estéril alcanzó una pureza aproximada de 1,9, lo que hace a la muestra ideal para el proceso de inmunización.

La inmunización con ADN desnudo se considera una terapia génica no viral (Zakeri et al., 2018) cuyo éxito depende del desarrollo de un sistema de administración de material genético seguro y eficaz. Los sistemas de vectores no virales, basados en polímeros catiónicos muestran resultados favorables para la entrega de genes (Zhang et al., 2017) al ser más seguros que los sistemas virales que pueden provocar respuestas inmunogénicas (Molinaro et al., 2013).

La extracción de IgY se basa en la eliminación de los lípidos de yema de huevo para obtener una fracción soluble en agua (FSA) en la que se encuentran los anticuerpos (Pauly et al., 2011), que posteriormente se precipitan (Polson et al., 1980). Una revisión de diferentes protocolos para extracción de IgY a partir de la yema de huevo descrita por De Meulenaer & Huyghebaert, (2001) establece que la elección del método adecuado debe considerar el grado de pureza requerida, la escala de extracción y la tecnología disponible. Todo esto depende en gran medida de la aplicación destinada para el anticuerpo.

La extracción de IgY por precipitación con PEG 6000 se considera un método sencillo y fácil de estandarizar a escala de laboratorio, del cual se obtiene anticuerpos IgY totales a concentraciones de 3-35 mg/mL aptos para usarse en ensayos inmunológicos como Western Blot y ELISA.

Las glicoproteínas Gn y Gc requieren su co-expresión para un correcto plegamiento (Deyde et al., 2005), el proceso de co-expresión de los antígenos establecido en el laboratorio de Biofármacos Recombinantes de la Universidad de Concepción, a través de la transformación de levaduras, no secreta las proteínas al medio de cultivo sino que Gn y Gc quedan retenidos en el interior de las levaduras, formando agregados de alto peso molecular por la interacción entre ambas proteínas, esto coincide al analizar los antígenos mediante *SDS-PAGE* y Western Blot (Figuras 15 y 16) donde se observa la presencia de Gn y Gc entre 63 y 75 kDa (Petazzi et al., 2021) que es la posición esperada si estuvieran en su estado

monomérico, pero también la aparición de agregados de alto peso molecular que forman manchas que se extienden a lo largo de todo el carril. A partir de este ensayo, donde se mostró la especificidad de los anticuerpos, se realizaron ELISA indirectos con IgY obtenidas de muestras de suero y yema de huevo.

La respuesta inmune desarrollada en gallinas ponedoras se dio por un esquema de tres inmunizaciones (inicial y 2 refuerzos) adaptada de una investigación para la producción de anticuerpos policlonales de pato generados por vacunas de ADN (R. Brocato et al., 2012). Se decidió emplear dos formulaciones diferentes, en dos grupos experimentales, para evaluar el título de anticuerpos totales. La inmunización usando el vector pENTRY-GPC solo se considera una vacuna de ADN asequible, fácil de usar y capaz de mantener altos niveles de expresión de antígenos para provocar inmunidad celular específica (Son et al., 2022); para la segunda formulación, el ADN plasmídico acomplejado con PEI se propuso como una alternativa novedosa debido a que, en años recientes, la PEI se ha posicionado como un vector apropiado para la entrega efectiva de genes (Zakeri et al., 2018).

Los anticuerpos obtenidos de yema en el grupo experimental inmunizado con ADN y PEI dieron títulos promedio de 1/1600 en el día 47 posterior a la primera inmunización, habiendo una diferencia significativa con el grupo inyectado con ADN solo. Sin embargo, en comparación con el tiempo 0 o control negativo el aumento de títulos no es significativamente alto en ningún grupo, esto es por que para obtener títulos de anticuerpos altos en una inmunización con ADN es necesario, según R. Brocato et al., (2012), seguir un esquema de inmunización que puede alargarse durante un año con dosis en concentraciones aproximadas a 1mg de ADN.

Capítulo 6

Conclusiones

- 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 por lisis alcalina a partir del cultivo de *E.coli* transformada con el vector pENTRY-GPC, 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 acompañado con PEI el que obtuvo mayor título de anticuerpos, obtenidos en yema, específicos para la proteína recombinante Gn y Gc después de 47 días de la primera dosis.

Recomendaciones

- Cambios en el esquema de inmunización como aumento de dosis y refuerzos, podrían dar como resultado mejoras en los títulos de anticuerpos IgY totales. Siguiendo estrategias de inmunización descritas en investigaciones con gansos y patos, 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, también el uso de otros polímeros catiónicos para acomplejar el ADN podría aportarle relevancia al estudio.
- 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, esto además contribuye en la eliminación de contaminantes de bajo peso molecular por lo que se obtendrá IgY más pura.

Capítulo 7

Bibliografía

- Abbas, A. T., El-Kafrawy, S. A., Sohrab, S. S., & Azhar, E. I. A. (2018). IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *15*(1), 264–275. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1514224>
- Abdulla, F., Nain, Z., Hossain, M. M., Syed, S. Bin, Ahmed Khan, M. S., & Adhikari, U. K. (2021). A comprehensive screening of the whole proteome of hantavirus and designing a multi-epitope subunit vaccine for cross-protection against hantavirus: Structural vaccinology and immunoinformatics study. *Microbial Pathogenesis*, *150*, 104705. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104705>
- Accensi, F., Bosch-Camós, L., Monteagudo, P. L., & Rodríguez, F. (2022). DNA Vaccines in Pigs: From Immunization to Antigen Identification. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *2465*, 109–124. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2168-4_6
- Amro, W. A., Al-Qaisi, W., & Al-Razem, F. (2018). Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, *16*(1), 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.003>
- Asakura, A., & Kikyo, N. (2022). Immunofluorescence analysis of myogenic differentiation. *Methods in Cell Biology*, *170*, 117–125. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2022.02.010>
- Avšič-Županc, T., Saksida, A., & Korva, M. (2019). Hantavirus infections. *Clinical Microbiology and Infection*, *21*, e6–e16. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12291>
- Bachtiar, E. W., Bachtiar, B. M., Soejoedono, R. D., Wibawan, I. W., & Afdhal, A. (2016). Biological and Immunogenicity Property of IgY Anti S. mutans ComD. *The Open Dentistry Journal*, *10*, 308–314. <https://doi.org/10.2174/1874210601610010308>

- Bae, J.-Y., Kim, J. Il, Park, M. S., Lee, G. E., Park, H., Song, K.-J., & Park, M.-S. (2021). The Immune Correlates of Orthohantavirus Vaccine. *Vaccines*, *9*(5), 518.
<https://doi.org/10.3390/vaccines9050518>
- Bates, A. D., & Maxwell, A. (1997). DNA topology: topoisomerases keep it simple. *Current Biology: CB*, *7*(12), R778-781. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(06\)00403-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(06)00403-9)
- Bauler, M., Roberts, J. K., Wu, C.-C., Fan, B., Ferrara, F., Yip, B. H., Diao, S., Kim, Y.-I., Moore, J., Zhou, S., Wielgosz, M. M., Ryu, B., & Throm, R. E. (2019). Production of Lentiviral Vectors Using Suspension Cells Grown in Serum-free Media. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, *17*, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.11.011>
- Baxter, D. (2007). Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occupational Medicine*, *57*(8), 552–556. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqm110>
- Bellows, S., & Jankovic, J. (2019). Immunogenicity Associated with Botulinum Toxin Treatment. *Toxins*, *11*(9), 491. <https://doi.org/10.3390/toxins11090491>
- Bessen, D., & Fischetti, V. A. (1988). Passive acquired mucosal immunity to group A streptococci by secretory immunoglobulin A. *The Journal of Experimental Medicine*, *167*(6), 1945–1950. <https://doi.org/10.1084/jem.167.6.1945>
- Bilò, M. B., Martini, M., Tontini, C., Corsi, A., & Antonicelli, L. (2021). Anaphylaxis. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, *53*(1), 4–17.
<https://doi.org/10.23822/EurAnnACI.1764-1489.158>
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, *7*(6), 1513–1523.
<https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>

- Boyle, J. S., Koniaras, C., & Lew, A. M. (1997). Influence of cellular location of expressed antigen on the efficacy of DNA vaccination: cytotoxic T lymphocyte and antibody responses are suboptimal when antigen is cytoplasmic after intramuscular DNA immunization. *International Immunology*, *9*(12), 1897–1906. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/9.12.1897>
- Brocato, R., Josleyn, M., Ballantyne, J., Vial, P., & Hooper, J. W. (2012). DNA Vaccine-Generated Duck Polyclonal Antibodies as a Postexposure Prophylactic to Prevent Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS). *PLoS ONE*, *7*(4), e35996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035996>
- Brocato, R. L., & Hooper, J. W. (2019). Progress on the Prevention and Treatment of Hantavirus Disease. *Viruses*, *11*(7), 610. <https://doi.org/10.3390/v11070610>
- Burnette, W. N. (1981). “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, *112*(2), 195–203. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)
- Carlander, D., Stålberg, J., & Larsson, A. (1999). Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. *Upsala Journal of Medical Sciences*, *104*(3), 179–189. <https://doi.org/10.3109/03009739909178961>
- Carmona-Ribeiro, A. M., & de Melo Carrasco, L. D. (2013). Cationic antimicrobial polymers and their assemblies. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(5), 9906–9946. <https://doi.org/10.3390/ijms14059906>
- Casadevall, A., Dadachova, E., & Pirofski, L. (2004). Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nature Reviews. Microbiology*, *2*(9), 695–703. <https://doi.org/10.1038/nrmicro974>

- Chang, H. M., Ou-Yang, R. F., Chen, Y. T., & Chen, C. C. (1999). Productivity and Some Properties of Immunoglobulin Specific against *Streptococcus mutans* Serotype c in Chicken Egg Yolk (IgY). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(1), 61–66. <https://doi.org/10.1021/jf980153u>
- Chaturvedi, S., Braunstein, E. M., & Brodsky, R. A. (2021). Antiphospholipid syndrome: Complement activation, complement gene mutations, and therapeutic implications. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, *19*(3), 607–616. <https://doi.org/10.1111/jth.15082>
- Chen, Y., Webster, R. G., & Woodland, D. L. (1998). Induction of CD8+ T cell responses to dominant and subdominant epitopes and protective immunity to Sendai virus infection by DNA vaccination. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *160*(5), 2425–2432. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9498786>
- Cifuentes-Muñoz, N., Salazar-Quiroz, N., & Tischler, N. D. (2014). Hantavirus Gn and Gc Envelope Glycoproteins: Key Structural Units for Virus Cell Entry and Virus Assembly. *Viruses*, *6*(4), 1801–1822. <https://doi.org/10.3390/v6041801>
- Davis, H. L., & Whalen, R. G. (1995). DNA-based immunization. *Molecular and Cell Biology of Human Diseases Series*, *5*, 368–387. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0547-7_18
- De Meulenaer, B., & Huyghebaert, A. (2001). Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: A review. *Food and Agricultural Immunology*, *13*(4), 275–288. <https://doi.org/10.1080/09540100120094537>
- Deyde, V. M., Rizvanov, A. A., Chase, J., Otteson, E. W., & St. Jeor, S. C. (2005). Interactions and trafficking of Andes and Sin Nombre Hantavirus glycoproteins G1 and G2. *Virology*, *331*(2), 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.11.003>

- Dheeraseskara, K., Sumathipala, S., & Muthugala, R. (2020). Hantavirus Infections—Treatment and Prevention. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, 12(4), 410–421. <https://doi.org/10.1007/s40506-020-00236-3>
- Dias da Silva, W., & Tambourgi, D. V. (2010). IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 135(3), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.12.011>
- Doepker, L. E., Danon, S., Harkins, E., Ralph, D. K., Yaffe, Z., Garrett, M. E., Dhar, A., Wagner, C., Stumpf, M. M., Arenz, D., Williams, J. A., Jaoko, W., Mandaliya, K., Lee, K. K., Matsen, F. A., & Overbaugh, J. M. (2021). Development of antibody-dependent cell cytotoxicity function in HIV-1 antibodies. *ELife*, 10, e63444. <https://doi.org/10.7554/eLife.63444>
- D'Souza, M. H., & Patel, T. R. (2020). Biodefense Implications of New-World Hantaviruses. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.00925>
- Duehr, J., McMahon, M., Williamson, B., Amanat, F., Durbin, A., Hawman, D. W., Noack, D., Uhl, S., Tan, G. S., Feldmann, H., & Krammer, F. (2020). Neutralizing Monoclonal Antibodies against the Gn and the Gc of the Andes Virus Glycoprotein Spike Complex Protect from Virus Challenge in a Preclinical Hamster Model. *MBio*, 11(2), e00028-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00028-20>
- El-Kafrawy, S. A., Abbas, A. T., Oelkrug, C., Taha, M., Ezzat, S., Zumla, A., & Azhar, E. I. (2023). IgY antibodies: The promising potential to overcome antibiotic resistance. *Frontiers in Immunology*, 14, 1065353. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1065353>
- Engdahl, T. B., & Crowe, J. E. (2020). Humoral Immunity to Hantavirus Infection. *MSphere*, 5(4), e00482-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00482-20>

- Engdahl, T. B., Kuzmina, N. A., Ronk, A. J., Mire, C. E., Hyde, M. A., Kose, N., Josleyn, M. D., Sutton, R. E., Mehta, A., Wolters, R. M., Lloyd, N. M., Valdivieso, F. R., Ksiazek, T. G., Hooper, J. W., Bukreyev, A., & Crowe, J. E. (2021). Broad and potently neutralizing monoclonal antibodies isolated from human survivors of New World hantavirus infection. *Cell Reports*, 35(5). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109086>
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-X](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X)
- Erhard, M. H., Mahn, K., Schmidt, P., Oltmer, S., Preisinger, R., Zinsmeister, P., & Stangassinger, M. (2000). Evaluation of Various Immunisation Procedures in Laying Hens to Induce High Amounts of Specific Egg Yolk Antibodies. *Alternatives to Laboratory Animals*, 28(1), 63–80. <https://doi.org/10.1177/026119290002800105>
- Farshbaf, M., Davaran, S., Zarebkohan, A., Annabi, N., Akbarzadeh, A., & Salehi, R. (2018). Significant role of cationic polymers in drug delivery systems. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(8), 1872–1891. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1395344>
- Ferro, I., Bellomo, C. M., López, W., Coelho, R., Alonso, D., Bruno, A., Córdoba, F. E., & Martínez, V. P. (2020). Hantavirus pulmonary syndrome outbreaks associated with climate variability in Northwestern Argentina, 1997-2017. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(11), e0008786. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008786>
- Ganges, L., Barrera, M., Núñez, J. I., Blanco, I., Frias, M. T., Rodríguez, F., & Sobrino, F. (2005). A DNA vaccine expressing the E2 protein of classical swine fever virus elicits T cell responses that can prime for rapid antibody production and confer total protection upon viral challenge. *Vaccine*, 23(28), 3741–3752. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.153>

- Gelfat, I., Aqeel, Y., Tremblay, J. M., Jaskiewicz, J. J., Shrestha, A., Lee, J. N., Hu, S., Qian, X., Magoun, L., Sheoran, A., Bedenice, D., Giem, C., Manjula-Basavanna, A., Pulsifer, A. R., Tu, H. X., Li, X., Minus, M. L., Osborne, M. S., Tzipori, S., ... Joshi, N. S. (2022). Single domain antibodies against enteric pathogen virulence factors are active as curli fiber fusions on probiotic *E. coli* Nissle 1917. *PLoS Pathogens*, *18*(9), e1010713. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010713>
- Gloanec, N., Dory, D., Quesne, S., Béven, V., Poezevara, T., Keita, A., Chemaly, M., & Guyard-Nicodème, M. (2022). Impact of DNA Prime/Protein Boost Vaccination against *Campylobacter jejuni* on Immune Responses and Gut Microbiota in Chickens. *Vaccines*, *10*(6), 981. <https://doi.org/10.3390/vaccines10060981>
- Grando, T. H., Baldissera, M. D., de Sá, M. F., do Carmo, G. M., Porto, B. C. Z., Aguirre, G. S. V., Azevedo, M. I., de Jesus, F. P. K., Santurio, J. M., Sagrillo, M. R., Stefani, L. M., & Monteiro, S. G. (2017). Avian antibodies (IgY) against *Trypanosoma cruzi*: Purification and characterization studies. *Journal of Immunological Methods*, *449*, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.07.002>
- Guardado-Calvo, P., & Rey, F. A. (2021). The surface glycoproteins of hantaviruses. *Current Opinion in Virology*, *50*, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.07.009>
- Gurunathan, S., Klinman, D. M., & Seder, R. A. (2000). DNA Vaccines: Immunology, Application, and Optimization. *Annual Review of Immunology*, *18*(1), 927–974. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.927>
- Gurunathan, S., Prussin, C., Sacks, D. L., & Seder, R. A. (1998). Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. *Nature Medicine*, *4*(12), 1409–1415. <https://doi.org/10.1038/4000>

- Haese, N., Brocato, R. L., Henderson, T., Nilles, M. L., Kwilas, S. A., Josleyn, M. D., Hammerbeck, C. D., Schiltz, J., Royals, M., Ballantyne, J., Hooper, J. W., & Bradley, D. S. (2015). Antiviral Biologic Produced in DNA Vaccine/Goose Platform Protects Hamsters Against Hantavirus Pulmonary Syndrome When Administered Post-exposure. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *9*(6), e0003803. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003803>
- Hamid, K., Sathyanarayanan, S. P., Naim, T., Hamza, M., Mahmood Baig, M. O., & Sitta, E. A. (2021). Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome and Diffuse Alveolar Hemorrhage in the Era of COVID-19. *Case Reports in Infectious Diseases*, *2021*, 8800500. <https://doi.org/10.1155/2021/8800500>
- Heller, J. (1984). Biodegradable polymers in controlled drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, *1*(1), 39–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6400195>
- Hepojoki, J., Strandin, T., Vaheri, A., & Lankinen, H. (2010). Interactions and Oligomerization of Hantavirus Glycoproteins. *Journal of Virology*, *84*(1), 227–242. <https://doi.org/10.1128/JVI.00481-09>
- Hooper, J. W., Custer, D. M., Smith, J., & Wahl-Jensen, V. (2006). Hantaan/Andes virus DNA vaccine elicits a broadly cross-reactive neutralizing antibody response in nonhuman primates. *Virology*, *347*(1), 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.035>
- Huygen, K. (2005). Plasmid DNA vaccination. *Microbes and Infection*, *7*(5), 932–938. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.03.010>
- Jiang, C., Chen, J., Li, Z., Wang, Z., Zhang, W., & Liu, J. (2019). Recent advances in the development of polyethylenimine-based gene vectors for safe and efficient gene delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *16*(4), 363–376. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1604681>

- Jyothilekshmi, I., & Jayaprakash, N. S. (2021). Trends in Monoclonal Antibody Production Using Various Bioreactor Syst. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 349–357. <https://doi.org/10.4014/jmb.1911.11066>
- Kabanova, A., Perez, L., Lilleri, D., Marcandalli, J., Agatic, G., Becattini, S., Preite, S., Fuschillo, D., Percivalle, E., Sallusto, F., Gerna, G., Corti, D., & Lanzavecchia, A. (2014). Antibody-driven design of a human cytomegalovirus gHgLpUL128L subunit vaccine that selectively elicits potent neutralizing antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(50), 17965–17970. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415310111>
- Kang, H.-J., Kim, M.-J., Chu, K.-B., Lee, S.-H., Moon, E.-K., & Quan, F.-S. (2021). Passive Immunity and Antibody Response Induced by *Toxoplasma gondii* VLP Immunization. *Vaccines*, 9(5), 425. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050425>
- Kovacs-Nolan, J., & Mine, Y. (2012). Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 163–182. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101137>
- Krylova, N. V., Silchenko, A. S., Pott, A. B., Ermakova, S. P., Lunikhina, O. V, Rasin, A. B., Kompanets, G. G., Likhatskaya, G. N., & Shchelkanov, M. Y. (2021). In Vitro Anti-Orthohantavirus Activity of the High-and Low-Molecular-Weight Fractions of Fucoidan from the Brown Alga *Fucus evanescens*. *Marine Drugs*, 19(10), 577. <https://doi.org/10.3390/md19100577>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

- Lanzarini, N. M., Bentes, G. A., Volotão, E. de M., & Pinto, M. A. (2018). Use of chicken immunoglobulin Y in general virology. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 39(3), 235–248. <https://doi.org/10.1080/15321819.2018.1500375>
- Larsson, A., Bålöv, R.-M., Lindahl, T. L., & Forsberg, P.-O. (1993). Chicken Antibodies: Taking Advantage of Evolution—A Review. *Poultry Science*, 72(10), 1807–1812. <https://doi.org/10.3382/ps.0721807>
- León-Núñez, D., Vizcaíno-López, M. F., Escorcía, M., Correa, D., Pérez-Hernández, E., & Gómez-Chávez, F. (2022). IgY Antibodies as Biotherapeutics in Biomedicine. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, 11(4), 62. <https://doi.org/10.3390/antib11040062>
- Leslie, G. A., & Clem, L. W. (1969). Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. *The Journal of Experimental Medicine*, 130(6), 1337–1352. <https://doi.org/10.1084/jem.130.6.1337>
- Lévesque, S., Martinez, G., & Fairbrother, J. M. (2007). Improvement of Adjuvant Systems to Obtain a Cost-Effective Production of High Levels of Specific IgY. *Poultry Science*, 86(4), 630–635. <https://doi.org/10.1093/ps/86.4.630>
- Li, J., Liang, T., Hei, A., Wang, X., Li, H., Yu, X., Zhao, R., Gao, P., Fang, C., Zhou, J., Li, M., He, E., & Skog, S. (2022). Novel neutralizing chicken IgY antibodies targeting 17 potent conserved peptides identified by SARS-CoV-2 proteome microarray, and future prospects. *Frontiers in Immunology*, 13, 1074077. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1074077>
- Llah, S. T., Mir, S., Sharif, S., Khan, S., & Mir, M. A. (2018). Hantavirus induced cardiopulmonary syndrome: A public health concern. *Journal of Medical Virology*, 90(6), 1003–1009. <https://doi.org/10.1002/jmv.25054>

Lu, L. L., Suscovich, T. J., Fortune, S. M., & Alter, G. (2018). Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nature Reviews. Immunology*, 18(1), 46–61.

<https://doi.org/10.1038/nri.2017.106>

Lu, Y., Wang, Y., Zhang, Z., Huang, J., Yao, M., Huang, G., Ge, Y., Zhang, P., Huang, H., Wang, Y., Li, H., & Wang, W. (2020). Generation of Chicken IgY against SARS-COV-2 Spike Protein and Epitope Mapping. *Journal of Immunology Research*, 2020, e9465398.

<https://doi.org/10.1155/2020/9465398>

Martínez, V. P., Di Paola, N., Alonso, D. O., Pérez-Sautu, U., Bellomo, C. M., Iglesias, A. A., Coelho, R. M., López, B., Periolo, N., Larson, P. A., Nagle, E. R., Chitty, J. A., Pratt, C. B., Díaz, J., Cisterna, D., Campos, J., Sharma, H., Dighero-Kemp, B., Biondo, E., ... Palacios, G. (2020). “Super-Spreaders” and Person-to-Person Transmission of Andes Virus in Argentina. *New England Journal of Medicine*, 383(23), 2230–2241.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2009040>

Mir, M. (2010). Hantaviruses. *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1), 67–91.

<https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.01.004>

Mittler, E., Dieterle, M. E., Kleinfelter, L. M., Slough, M. M., Chandran, K., & Jangra, R. K. (2019). Hantavirus entry: Perspectives and recent advances. *Advances in Virus Research*, 104, 185–224. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2019.07.002>

Mittler, E., Wec, A. Z., Tynell, J., Guardado-Calvo, P., Wigren-Byström, J., Polanco, L. C., O'Brien, C. M., Slough, M. M., Abelson, D. M., Serris, A., Sakharkar, M., Pehau-Arnaudet, G., Bakken, R. R., Geoghegan, J. C., Jangra, R. K., Keller, M., Zeitlin, L., Vapalahti, O., Ulrich, R. G., ... Chandran, K. (2022). Human antibody recognizing a quaternary epitope in the Puumala virus glycoprotein provides broad protection against orthohantaviruses.

Science Translational Medicine, 14(636), eabl5399.

<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abl5399>

Molinaro, R., Wolfram, J., Federico, C., Cilurzo, F., Di Marzio, L., Ventura, C. A., Carafa, M., Celia, C., & Fresta, M. (2013). Polyethylenimine and chitosan carriers for the delivery of RNA interference effectors. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 10(12), 1653–1668.

<https://doi.org/10.1517/17425247.2013.840286>

Morrison, S. L., Mohammed, M. S., Wims, L. A., Trinh, R., & Etches, R. (2002). Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Molecular Immunology*, 38(8), 619–625. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(01\)00095-5](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(01)00095-5)

Nazha, B., Inal, C., & Owonikoko, T. K. (2020). Disialoganglioside GD2 Expression in Solid Tumors and Role as a Target for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*, 10, 1000.

<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01000>

Nina Garcia, N. M., & Cussi Coronel, G. A. (2020). Uso de plasma convaleciente en pacientes con COVID-19. *Gaceta Médica Boliviana*, 43(1), 80–85.

http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1012-29662020000100013&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Paalme, V., & Speek, M. (2021). Simple, inexpensive and RNase-free purification of plasmid DNA by fractional precipitation with isopropanol. *BioTechniques*, 71(3), 490–494.

<https://doi.org/10.2144/btn-2021-0018>

Padula, P. J., Edelstein, A., Miguel, S. D. L., López, N. M., Rossi, C. M., & Rabinovich, R. D. (1998). Hantavirus Pulmonary Syndrome Outbreak in Argentina: Molecular Evidence for Person-to-Person Transmission of Andes Virus. *Virology*, 241(2), 323–330.

<https://doi.org/10.1006/VIRO.1997.8976>

- Parvate, A., Williams, E. P., Taylor, M. K., Chu, Y.-K., Lanman, J., Saphire, E. O., & Jonsson, C. B. (2019). Diverse Morphology and Structural Features of Old and New World Hantaviruses. *Viruses*, *11*(9), 862. <https://doi.org/10.3390/v11090862>
- Patnaik, S., & Gupta, K. C. (2013). Novel polyethylenimine-derived nanoparticles for in vivo gene delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *10*(2), 215–228. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.744964>
- Pauly, D., Chacana, P. A., Calzado, E. G., Brembs, B., & Schade, R. (2011). IgY Technology: Extraction of Chicken Antibodies from Egg Yolk by Polyethylene Glycol (PEG) Precipitation. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, *51*, 3084. <https://doi.org/10.3791/3084>
- Pauly, D., Dorner, M., Zhang, X., Hlinak, A., Dorner, B., & Schade, R. (2009). Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. *Poultry Science*, *88*(2), 281–290. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00323>
- Pereira, S., Kildegaard, H. F., & Andersen, M. R. (2018). Impact of CHO Metabolism on Cell Growth and Protein Production: An Overview of Toxic and Inhibiting Metabolites and Nutrients. *Biotechnology Journal*, *13*(3), 1700499. <https://doi.org/10.1002/BIOT.201700499>
- Perry, C., & Rayat, A. C. M. E. (2021). Lentiviral Vector Bioprocessing. *Viruses*, *13*(2), 268. <https://doi.org/10.3390/v13020268>
- Petazzi, R. A., Koikkarah, A. A., Tischler, N. D., & Chiantia, S. (2021). Detection of Envelope Glycoprotein Assembly from Old World Hantaviruses in the Golgi Apparatus of Living Cells. *Journal of Virology*, *95*(4), e01238-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.01238-20>

- Polson, A., von Wechmar, M. B., & van Regenmortel, M. H. V. (1980). Isolation of Viral IgY Antibodies from Yolks of Immunized Hens. *Immunological Communications*, 9(5), 475–493.
<https://doi.org/10.3109/08820138009066010>
- Rissanen, I., Krumm, S. A., Stass, R., Whitaker, A., Voss, J. E., Bruce, E. A., Rothenberger, S., Kunz, S., Burton, D. R., Huiskonen, J. T., Botten, J. W., Bowden, T. A., & Doores, K. J. (2021). Structural Basis for a Neutralizing Antibody Response Elicited by a Recombinant Hantaan Virus Gn Immunogen. *MBio*, 12(4), e0253120.
<https://doi.org/10.1128/mBio.02531-20>
- Rissanen, I., Krumm, S. A., Stass, R., Whitaker, A., Voss, J. E., Bruce, E. A., Rothenberger, S., Kunz, S., Burton, D. R., Huiskonen, J. T., Botten, J. W., Bowden, T. A., & Doores, K. J. (2023). Structural Basis for a Neutralizing Antibody Response Elicited by a Recombinant Hantaan Virus Gn Immunogen. *MBio*, 12(4), e02531-20.
<https://doi.org/10.1128/mBio.02531-20>
- Robinson, E. K., Covarrubias, S., Zhou, S., & Carpenter, S. (2021). Generation and utilization of a HEK-293T murine GM-CSF expressing cell line. *PLoS ONE*, 16(4), e0249117.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249117>
- Rodriguez, F., Zhang, J., & Whitton, J. L. (1997). DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction. *Journal of Virology*, 71(11), 8497–8503.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC192313/>
- Rose, M. E., Orleans, E., & Buttress, N. (1974). Immunoglobulin classes in the hen's egg: Their segregation in yolk and white. *European Journal of Immunology*, 4(7), 521–523.
<https://doi.org/10.1002/eji.1830040715>

- Saavedra, F., Díaz, F. E., Retamal-Díaz, A., Covián, C., González, P. A., & Kalergis, A. M. (2021). Immune response during hantavirus diseases: implications for immunotherapies and vaccine design. *Immunology*, *163*(3), 262–277. <https://doi.org/10.1111/imm.13322>
- Saúl, P. A., Sánchez-Cunto, M., Gregori-Sabelli, R. A., Chacón, N. R., Chediack, V., & Cunto, E. R. (2021). [Controversies on corticosteroid therapy in hantavirus cardiopulmonary syndrome]. *Medicina*, *81*(4), 617–623. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34453805>
- 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. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, *33*(2), 129–154. <https://doi.org/10.1177/026119290503300208>
- Serris, A., Stass, R., Bignon, E. A., Muenza, N. A., Manuguerra, J.-C., Jangra, R. K., Li, S., Chandran, K., Tischler, N. D., Huiskonen, J. T., Rey, F. A., & Guardado-Calvo, P. (2020). The Hantavirus Surface Glycoprotein Lattice and Its Fusion Control Mechanism. *Cell*, *183*(2), 442-456.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.023>
- Sharma, R. C., & Schimke, R. T. (1996). Preparation of electrocompetent E. coli using salt-free growth medium. *BioTechniques*, *20*(1), 42–44. <https://doi.org/10.2144/96201bm08>
- Singh, H., Kaur, H., & Medhi, B. (2020). Novel therapeutic approaches toward Hantaan virus and its clinical features' similarity with COVID-19. *Indian Journal of Pharmacology*, *52*(5), 347–355. https://doi.org/10.4103/ijp.ijp_1001_20
- Singh, S., Numan, A., Sharma, D., Shukla, R., Alexander, A., Jain, G. K., Ahmad, F. J., & Kesharwani, P. (2021). Epidemiology, virology and clinical aspects of hantavirus infections: an overview. <https://doi.org/10.1080/09603123.2021.1917527>, *32*(8), 1815–1826. <https://doi.org/10.1080/09603123.2021.1917527>

- Son, H.-Y., Jeong, H.-K., Apostolopoulos, V., & Kim, C.-W. (2022). MUC1 expressing tumor growth was retarded after human mucin 1 (MUC1) plasmid DNA immunization. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 36, 03946320221112358. <https://doi.org/10.1177/03946320221112358>
- Stock, I. (2008). [Hantavirus infections]. *Medizinische Monatsschrift Fur Pharmazeuten*, 31(4), 127–136; quiz 137–138. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18497244>
- Talaat, K. R., Porter, C. K., Bourgeois, A. L., Lee, T. K., Duplessis, C. A., Maciel, M., Gutierrez, R. L., DeNearing, B., Adjoodani, B., Adkinson, R., Testa, K. J., Feijoo, B., Alcalá, A. N., Brubaker, J., Beselman, A., Chakraborty, S., Sack, D., Halpern, J., Trop, S., ... Prouty, M. G. (2020). Oral delivery of Hyperimmune bovine serum antibodies against CS6-expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* as a prophylactic against diarrhea. *Gut Microbes*, 12(1), 1732852. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1732852>
- Tariq, M., & Kim, D.-M. (2022). Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome: Literature Review, Epidemiology, Clinical Picture and Pathogenesis. *Infection & Chemotherapy*, 54(1), 1–19. <https://doi.org/10.3947/ic.2021.0148>
- Taslem Mouroso, J., Awe, A., Jain, S., & Batra, H. (2022). Nucleic Acid Vaccine Platform for DENGUE and ZIKA Flaviviruses. *Vaccines*, 10(6), 834. <https://doi.org/10.3390/vaccines10060834>
- Thirumalai, D., Visaga Ambi, S., Vieira-Pires, R. S., Xiaoying, Z., Sekaran, S., & Krishnan, U. (2019). Chicken egg yolk antibody (IgY) as diagnostics and therapeutics in parasitic infections - A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 755–763. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.118>
- Toledo, J. R., Prieto, Y., Oramas, N., & Sánchez, O. (2009). Polyethylenimine-Based Transfection Method as a Simple and Effective Way to Produce Recombinant Lentiviral

Vectors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(3), 538–544.

<https://doi.org/10.1007/s12010-008-8381-2>

Vaheri, A., Henttonen, H., & Mustonen, J. (2021). Hantavirus Research in Finland: Highlights and Perspectives. *Viruses*, 13(8), 1452. <https://doi.org/10.3390/v13081452>

Vanhove, B., Duvaux, O., Rouse, J., Royer, P.-J., Evanno, G., Ciron, C., Lheriteau, E., Vacher, L., Gervois, N., Oger, R., Jacques, Y., Conchon, S., Salama, A., Duchi, R., Lagutina, I., Perota, A., Delahaut, P., Ledure, M., Paulus, M., ... Soullillou, J.-P. (2021). High neutralizing potency of swine glyco-humanized polyclonal antibodies against SARS-CoV-2. *European Journal of Immunology*, 51(6), 1412–1422. <https://doi.org/10.1002/eji.202049072>

Vial, P. A., Valdivieso, F., Calvo, M., Rioseco, M. L., Riquelme, R., Araneda, A., Tomicic, V., Graf, J., Paredes, L., Florenzano, M., Bidart, T., Cuiza, A., Marco, C., Hjelle, B., Ye, C., Hanfelt-Goade, D., Vial, C., Rivera, J. C., Delgado, I., ... Chile, H. S. G. in. (2015). A non-randomized multicentre trial of human immune plasma for treatment of hantavirus cardiopulmonary syndrome caused by Andes virus. *Antiviral Therapy*, 20(4), 377–386. <https://doi.org/10.3851/IMP2875>

Vinograd, J., Lebowitz, J., Radloff, R., Watson, R., & Laipis, P. (1965). The twisted circular form of polyoma viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 53(5), 1104–1111.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC301380/>

Wang, Q., Yue, M., Yao, P., Zhu, C., Ai, L., Hu, D., Zhang, B., Yang, Z., Yang, X., Luo, F., Wang, C., Hou, W., & Tan, W. (2021). Epidemic Trend and Molecular Evolution of HV Family in the Main Hantavirus Epidemic Areas From 2004 to 2016, in P.R. China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 584814.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.584814>

- Warner, B. M., Sloan, A., Deschambault, Y., Dowhanik, S., Tierney, K., Audet, J., Liu, G., Stein, D. R., Lung, O., Buchanan, C., Sroga, P., Griffin, B. D., Siragam, V., Frost, K. L., Booth, S., Banadyga, L., Saturday, G., Scott, D., Kobasa, D., & Safronetz, D. (2021). Differential pathogenesis between Andes virus strains CHI-7913 and Chile-9717869 in Syrian Hamsters. *Journal of Virology*, *95*(10), e00108-21, JVI.00108-21.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00108-21>
- Wei, X., Li, X., Song, S., Wen, X., Jin, T., Zhao, C., Wu, X., Liu, K., & Shao, Z. (2022). Trends and focuses of hantavirus researches: a global bibliometric analysis and visualization from 1980 to 2020. *Archives of Public Health = Archives Belges De Sante Publique*, *80*(1), 218.
<https://doi.org/10.1186/s13690-022-00973-5>
- Welke, R.-W., Sperber, H. S., Bergmann, R., Koikkarah, A., Menke, L., Sieben, C., Krüger, D. H., Chiantia, S., Herrmann, A., & Schwarzer, R. (2022). Characterization of Hantavirus N Protein Intracellular Dynamics and Localization. *Viruses*, *14*(3), 457.
<https://doi.org/10.3390/v14030457>
- Williamson, B. N., Prescott, J., Garrido, J. L., Alvarez, R. A., Feldmann, H., & Barría, M. I. (2021). Therapeutic Efficacy of Human Monoclonal Antibodies against Andes Virus Infection in Syrian Hamsters. *Emerging Infectious Diseases*, *27*(10), 2707–2710.
<https://doi.org/10.3201/eid2710.210735>
- Xiang, Q., Li, L., Wu, J., Tian, M., & Fu, Y. (2022). Application of pseudovirus system in the development of vaccine, antiviral-drugs, and neutralizing antibodies. *Microbiological Research*, *258*, 126993. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.126993>
- Xu, Y., Li, X., Jin, L., Zhen, Y., Lu, Y., Li, S., You, J., & Wang, L. (2011). Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: A

review. *Biotechnology Advances*, 29(6), 860–868.

<https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2011.07.003>

Yakhkeshi, S., Wu, R., Chelliappan, B., & Zhang, X. (2022). Trends in industrialization and commercialization of IgY technology. *Frontiers in Immunology*, 13, 991931.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.991931>

Zakeri, A., Kouhbanani, M. A. J., Beheshtkhoo, N., Beigi, V., Mousavi, S. M., Hashemi, S. A. R., Karimi Zade, A., Amani, A. M., Savardashtaki, A., Mirzaei, E., Jahandideh, S., & Movahedpour, A. (2018). Polyethylenimine-based nanocarriers in co-delivery of drug and gene: a developing horizon. *Nano Reviews & Experiments*, 9(1), 1488497.

<https://doi.org/10.1080/20022727.2018.1488497>

Zeng, X., Wang, H., Huang, C., Logue, C. M., Barbieri, N. L., Nolan, L. K., & Lin, J. (2021). Evaluation of the Immunogenic Response of a Novel Enterobactin Conjugate Vaccine in Chickens for the Production of Enterobactin-Specific Egg Yolk Antibodies. *Frontiers in Immunology*, 12, 629480. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.629480>

Zhang, X., Zhang, J., Quan, G., Yang, P., Pan, X., & Wu, C. (2017). The Serum-Resistant Transfection Evaluation and Long-Term Stability of Gene Delivery Dry Powder Based on Mesoporous Silica Nanoparticles and Polyethyleneimine by Freezing-Drying. *AAPS PharmSciTech*, 18(5), 1536–1543. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0617-9>

Zhao, Y., Rabbani, H., Shimizu, A., & Hammarström, L. (2000). Mapping of the chicken immunoglobulin heavy-chain constant region gene locus reveals an inverted alpha gene upstream of a condensed epsilon gene. *Immunology*, 101(3), 348–353.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00106.x>

Zibae, S., Nassiri, M. R., Nasiri, K., Haghparast, A., & Tahmoorespur, M. (2016).

Production and characterization of egg yolk antibody (IgY) against recombinant VP8-

S2 antigen. *Polish Journal of Veterinary Sciences*; 2016; No 2.

<https://journals.pan.pl/dlibra/publication/120985/edition/105386>