



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE
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
BIOTECNÓLOGA

**“Evaluación de la inmunización en aves con proteínas recombinantes
derivadas del Hantavirus”**

Elaborado por:
Martha Lizbeth Enríquez Armas

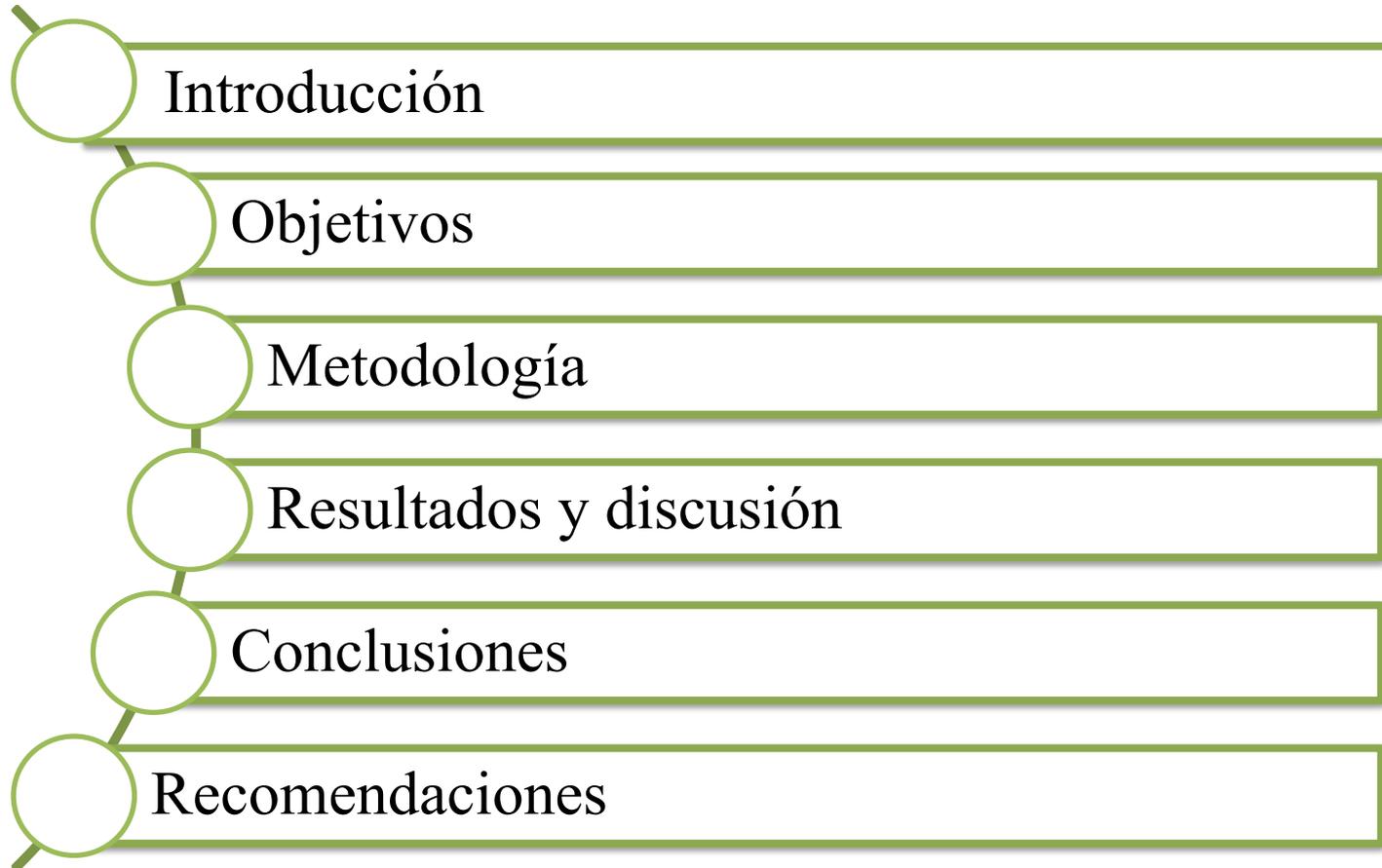
Directora
Dra. Thelvia Ramos, PhD.
Bq. Natalie Parra, PhD.

Sangolquí, 04 de septiembre del 2023

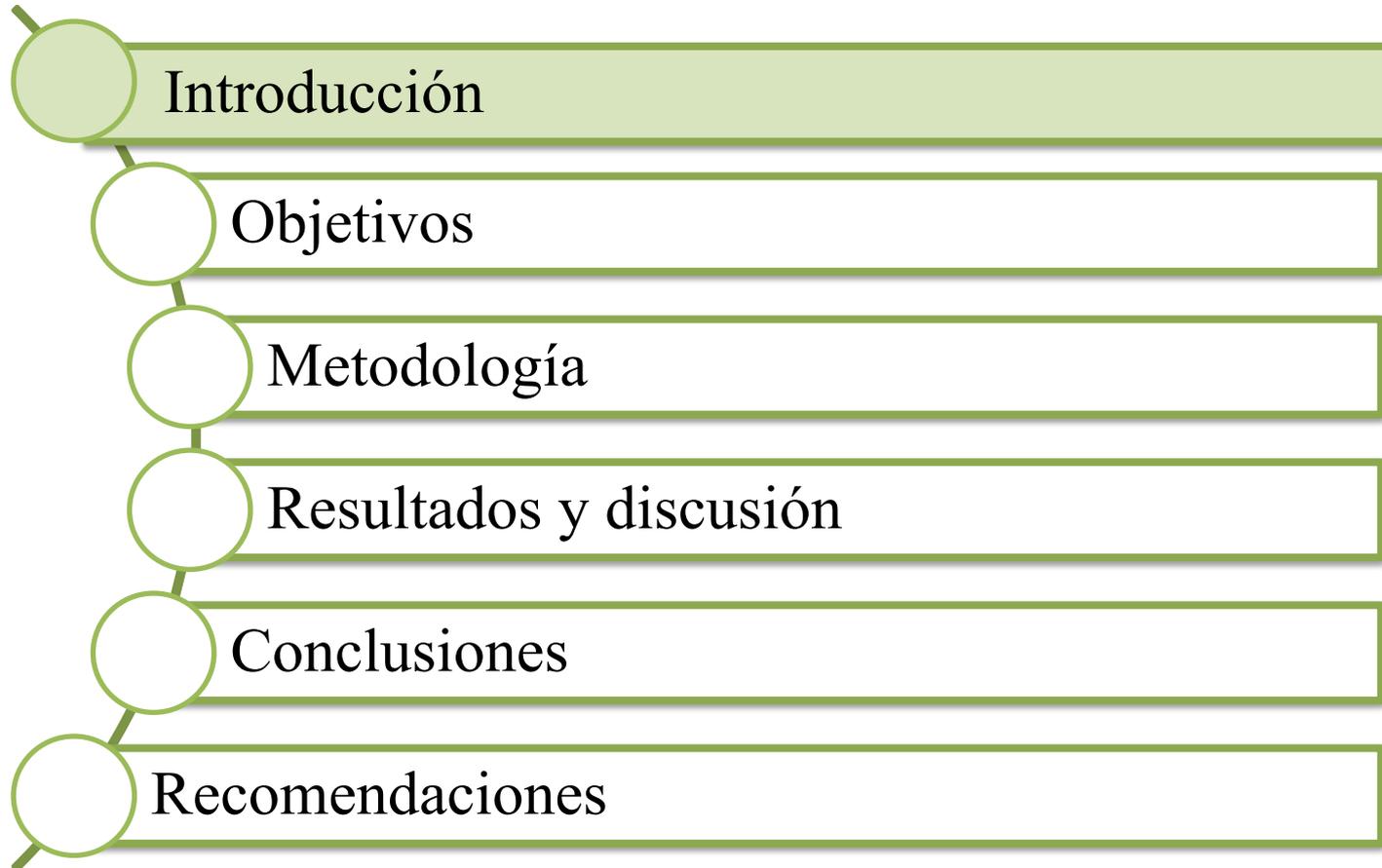
VERSIÓN: 1.0



Contenido

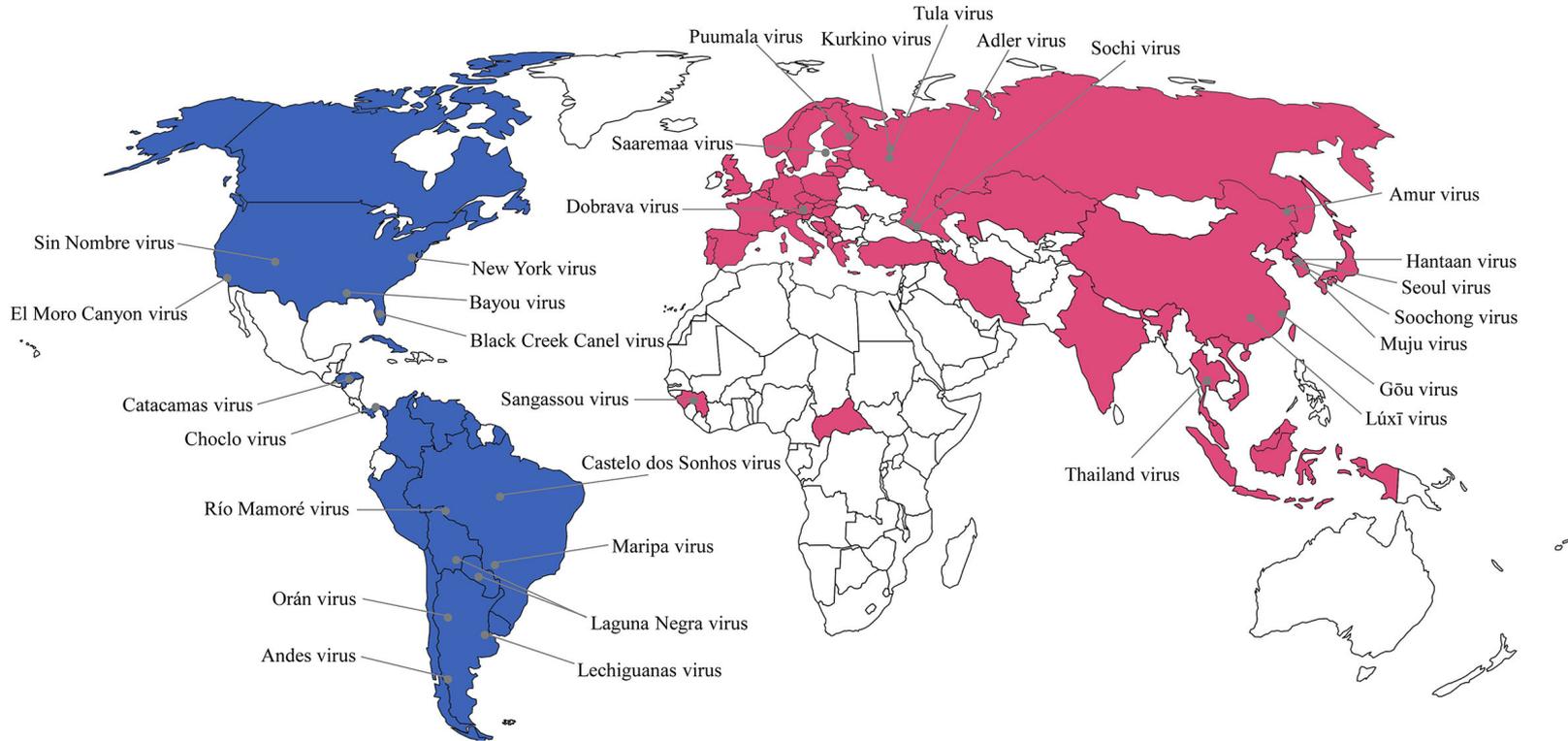


Contenido



Introducción

Distribución del Hantavirus

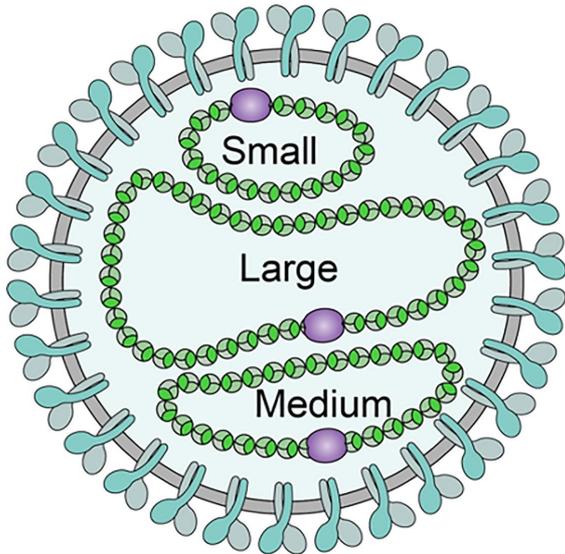


Fiebre hemorrágica con síndrome renal

Síndrome cardipulmonar por Hantavirus

Introducción

Características moleculares



-  Trimeric N protein
-  Spike complex (Gn and Gc)
-  RdRp

- ARN tripartito, de sentido negativo
- Segmento S (proteína N)
- Segmento M (GPC)
- Segmento L (ARN polimerasa dependiente deARN)

Virus Andes

- Principal causante del SCPH
- Único del que se tiene evidencia transmisión persona a persona
- Modelo animal: hámster sirio



Oligoryzomys longicaudatus

Introducción

Síndrome cardiopulmonar por Hantavirus

Tasa de mortalidad: 30 – 50 %

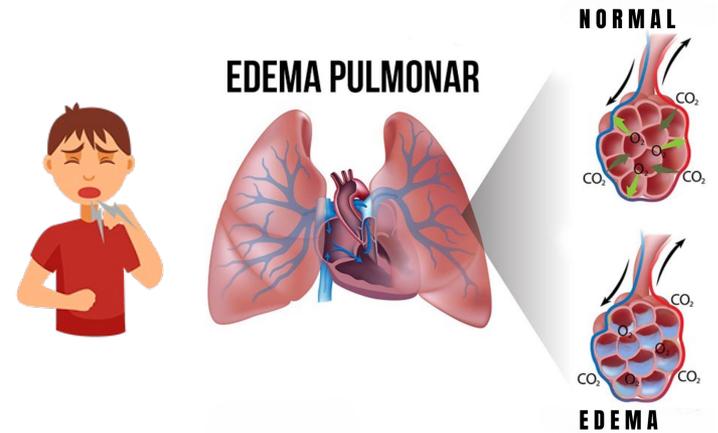
Fase Prodrómica

Hasta 45 días



Fase cardiopulmonar

- Fuga en los capilares
- Edema



Fase de convalecencia

- Depresión del miocardio
- Shock cardiogénico



Asistencia respiratoria

Introducción

Síndrome cardiopulmonar por Hantavirus



No existe tratamiento

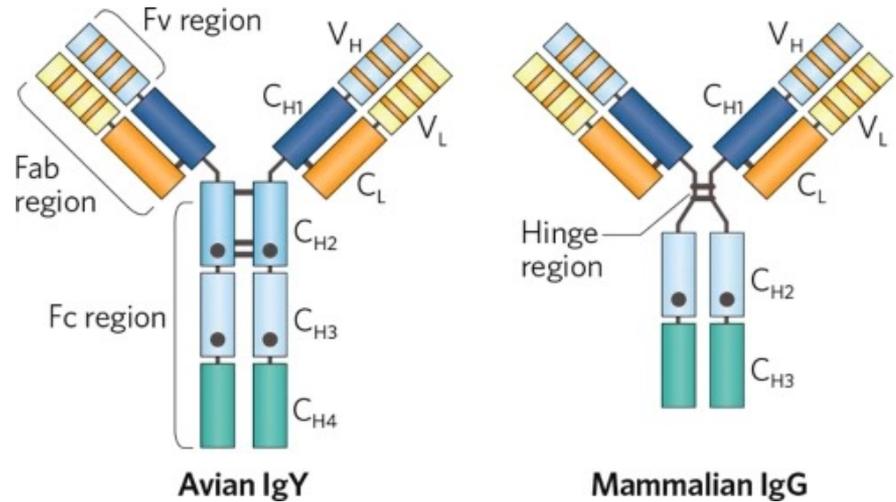
Alternativas

Anticuerpos neutralizantes

- Costoso
- Largo periodo de producción
- Invasivo
- Riesgo de reactividad



Anticuerpos como tratamiento terapéutico



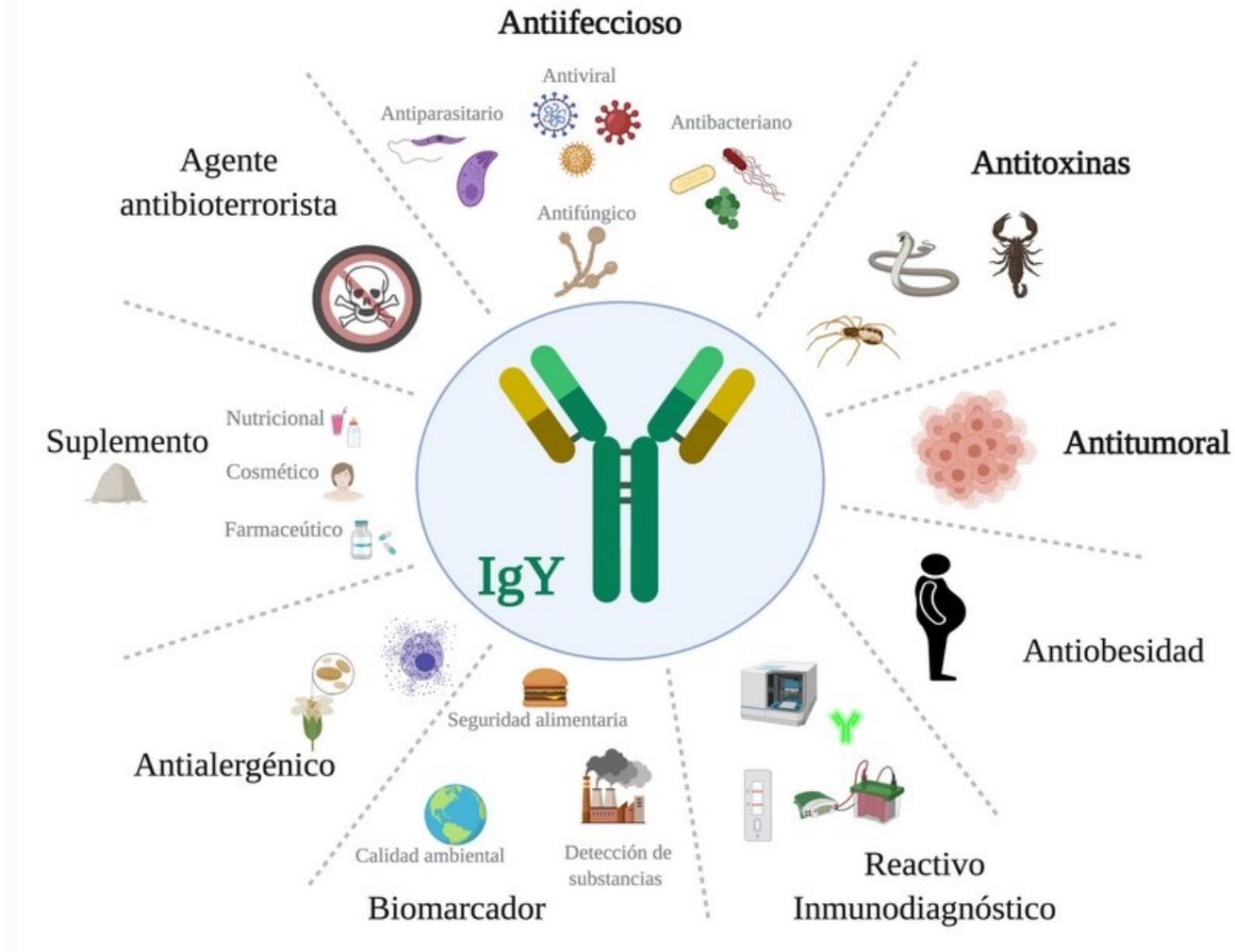
Gallinas ponedoras como fuentes de obtención de anticuerpos



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Introducción

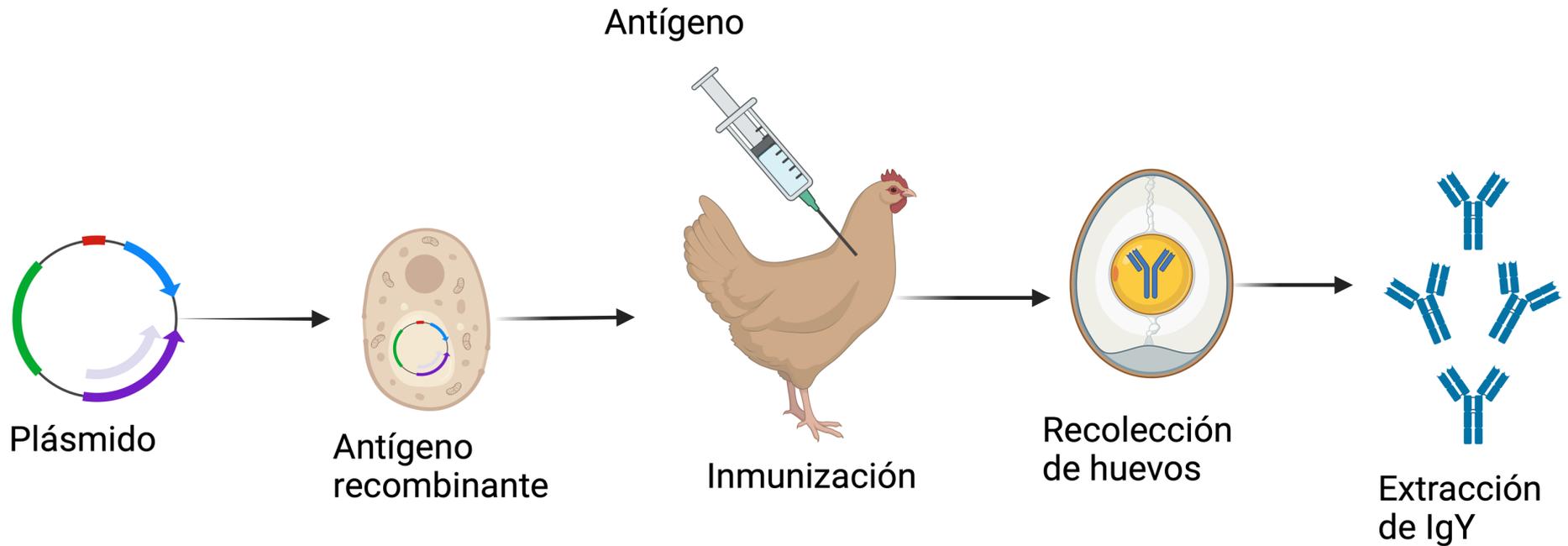
Aplicaciones de las inmunoglobulinas Y



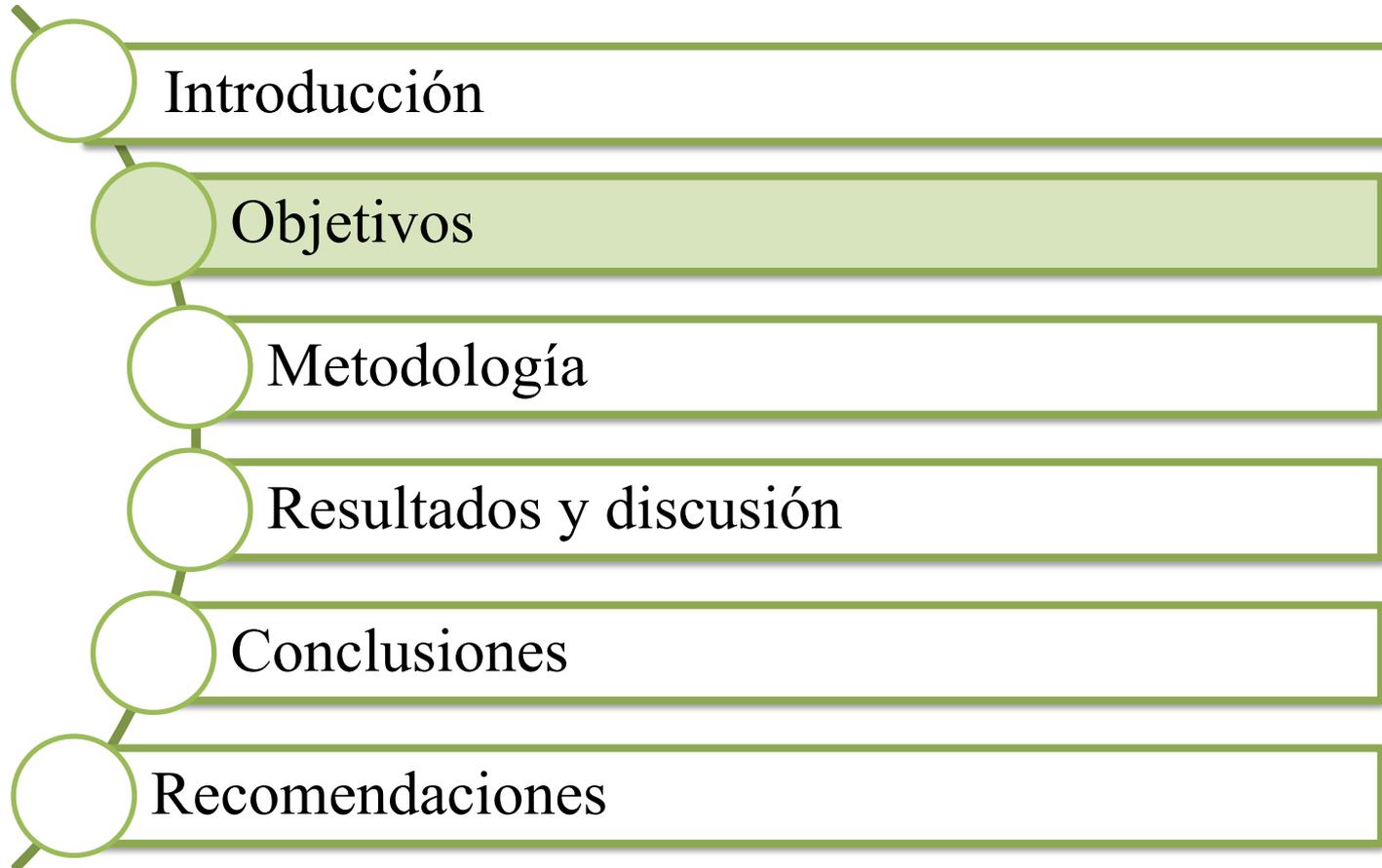
Introducción

Obtención de IgY

- 100 mg IgY totales/huevo
- 5 – 15 % específico



Contenido



Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto inmunitario en aves con proteínas recombinantes derivadas del Hantavirus.



Objetivos

Objetivos específicos

- Expresar y aislar proteínas antigénicas del Hantavirus a partir del Clon 11 G1+G2 previamente desarrollado.
- Inmunizar a *Gallus gallus domesticus* con las proteínas antigénicas purificadas para la posterior recolección de sangre y huevos.
- Determinar la antigenicidad de las proteínas aisladas mediante ensayos de inmunización en gallinas ponedoras.

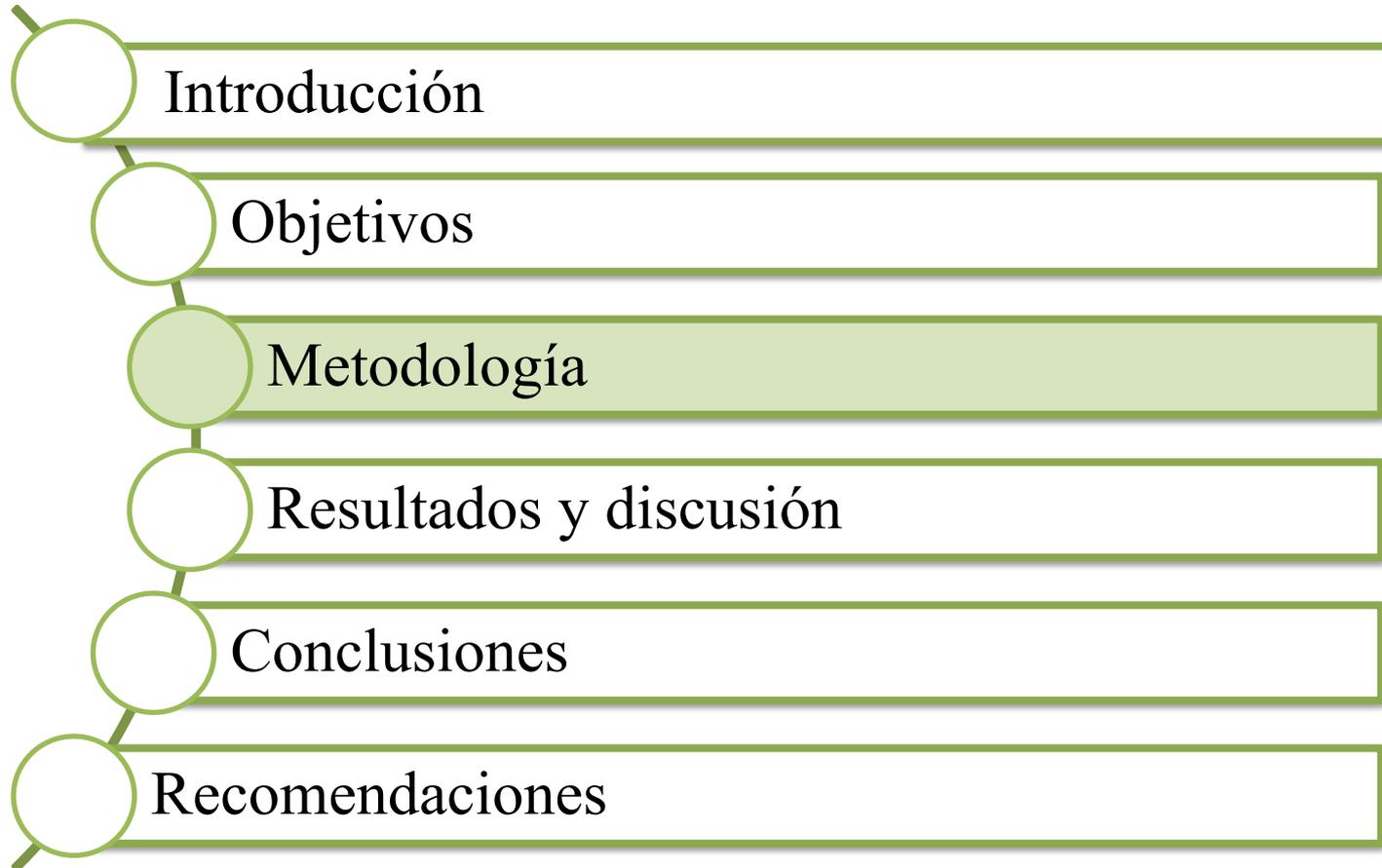


Hipótesis

Las proteínas recombinantes derivadas del Hantavirus tienen efecto inmunológico en aves.



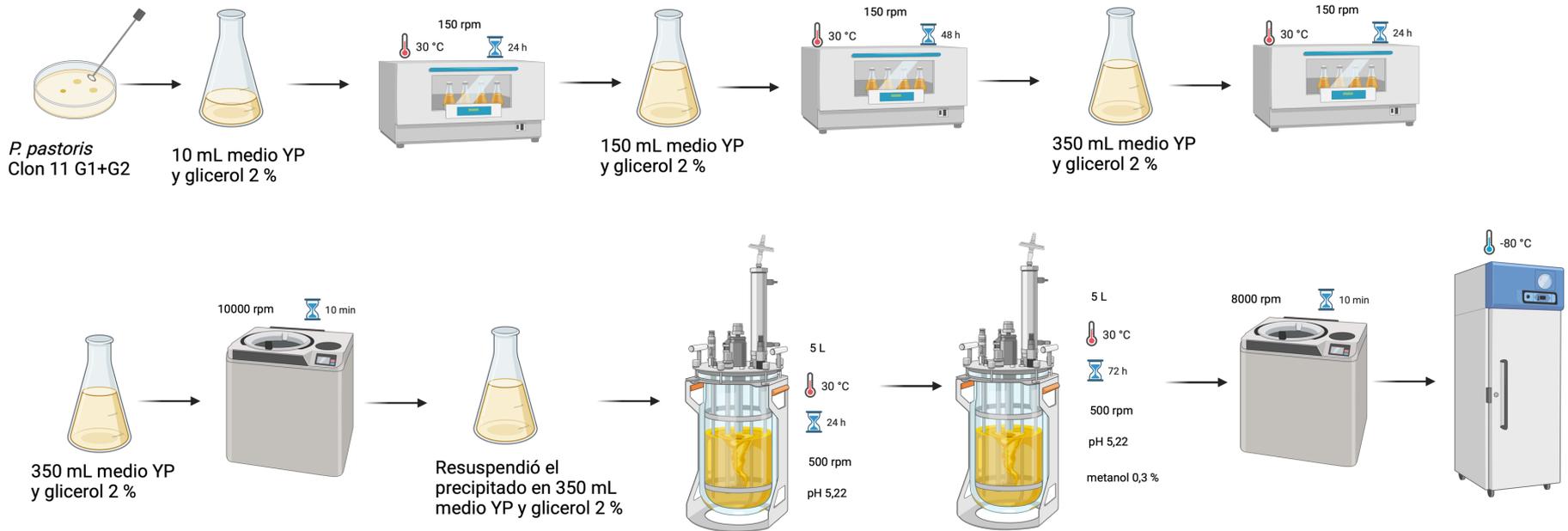
Contenido



Metodología

Expresión y aislamiento de las proteínas antigénicas del Hantavirus a partir del clon 11 G1+G2

• Fermentación de *Pichia pastoris* transformada



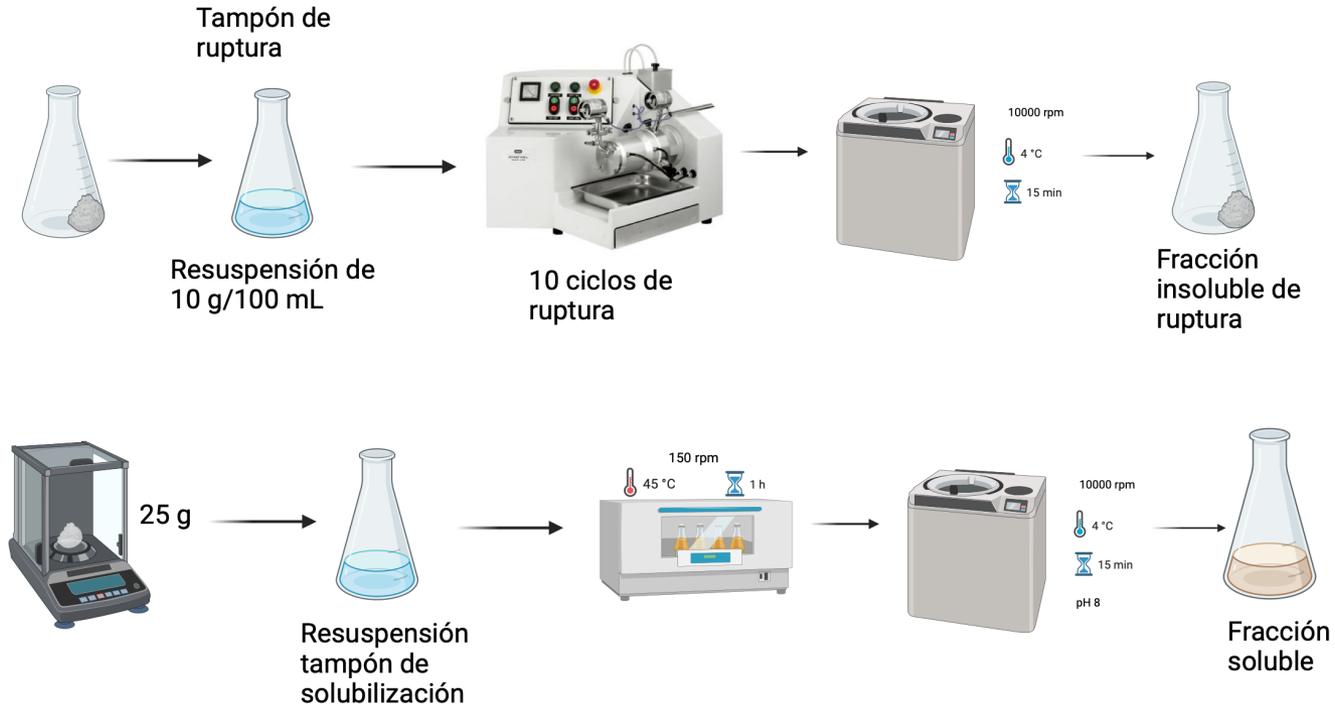
Medio YP: 10 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de peptona

Medio del fermentador: extracto de levadura, biotina, vitaminas, sales y glicerol

Metodología

Expresión y aislamiento de las proteínas antigénicas del Hantavirus a partir del clon 11 G1+G2

- Ruptura de *P. pastoris* en molino de bolas y solubilización de los antígenos Gn y Gc*



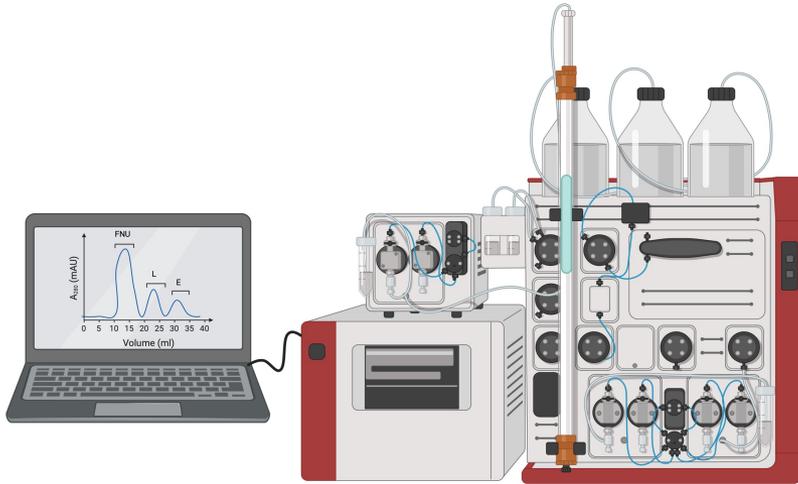
Tampón de ruptura: PBS 1X, PMSF 0,1 mM, pH 7,4

Tampón de solubilización: Urea 8M, β -Mercaptoetanol 10mM, PMSF 0,1 mM, NaOH 20 mM, pH 12

Metodología

Expresión y aislamiento de las proteínas antigénicas del Hantavirus a partir del clon 11 G1+G2

- *Purificación de los antígenos recombinantes Gn y Gc mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC)*



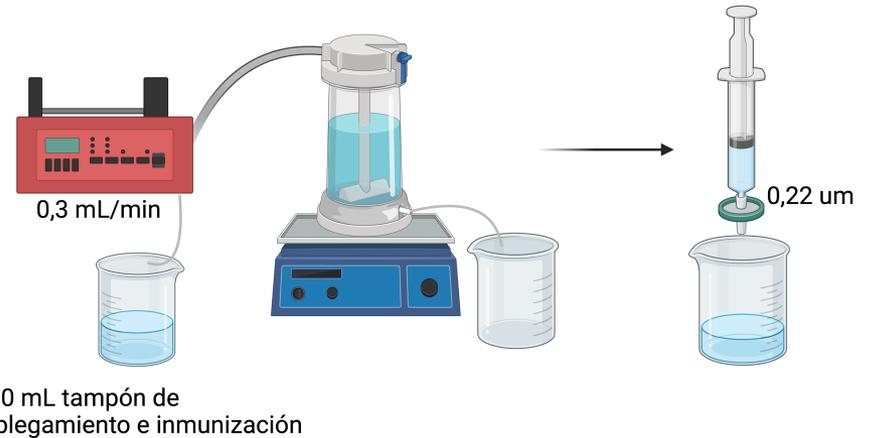
Flujo: 1 mL/min

Tampón de equilibrio: Urea 8M, β -Mercaptoetanol 10 mM, Imidazol 5 mM, PMSF 0,1 mM, pH 8

Tampón de lavado: Urea 8 M, β -Mercaptoetanol 10 mM, Imidazol 100 mM, PMSF 0,1 mM, pH 8

Tampón de eluido: Urea 8 M, β -Mercaptoetanol 10 mM, Imidazol 200 mM, PMSF 0,1 mM, pH 8

- *Replegamiento y concentración de las proteínas recombinantes Gn y Gc*



100 mL tampón de replegamiento e inmunización

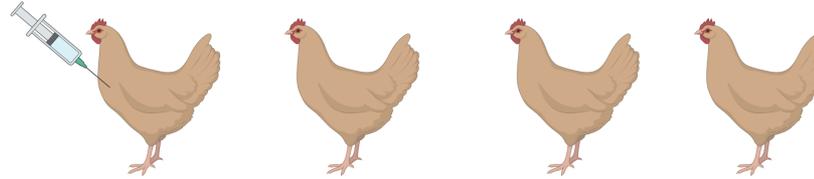
Tampón de replegamiento: L-Arginina 0,8 M, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Glutación Oxidado 750 μ M, Tris 100 mM, PMSF 0,1 mM, pH 8,3

Tampón de inmunización: Sacarosa 100 mg/mL, PMSF 0,1 mM, pH 7,4

Metodología

Inmunización de gallinas ponedoras con los antígenos recombinantes purificados para recolección de sangre y huevos

100 ug de antígeno

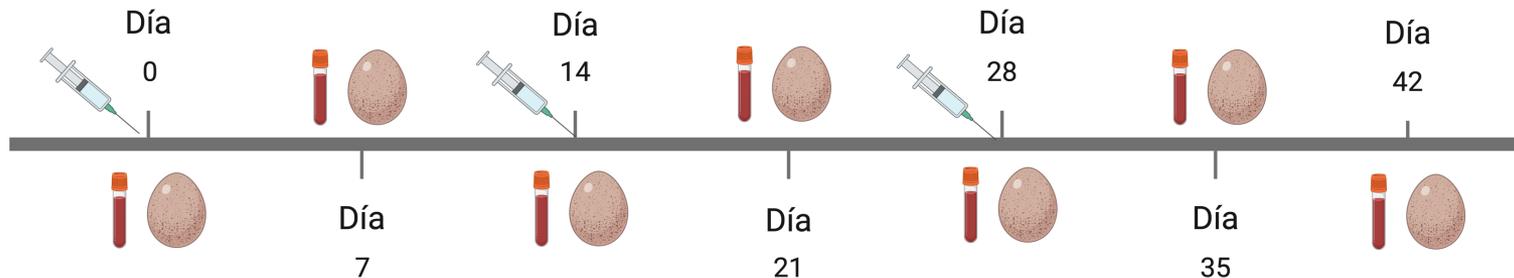


Gallus gallus domesticus, raza Leghorn Brown
1 año
1,8 kg

100 ug de antígeno + ACF

50 ug de antígeno + AIF

50 ug de antígeno + AIF



ACF: Adyuvante completo de Freund

AIF: Adyuvante incompleto de Freund

(Brocato et al., 2012)

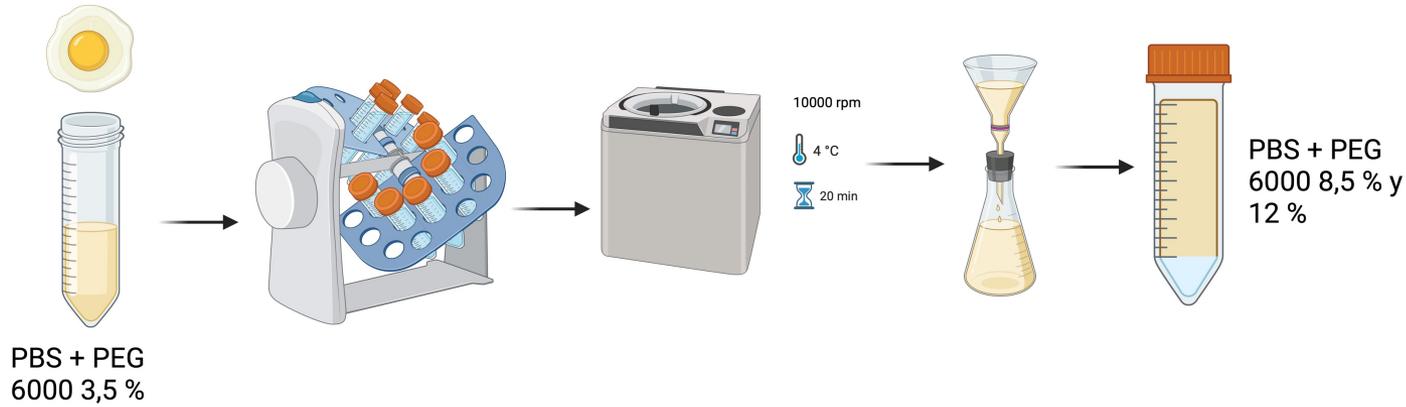


ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

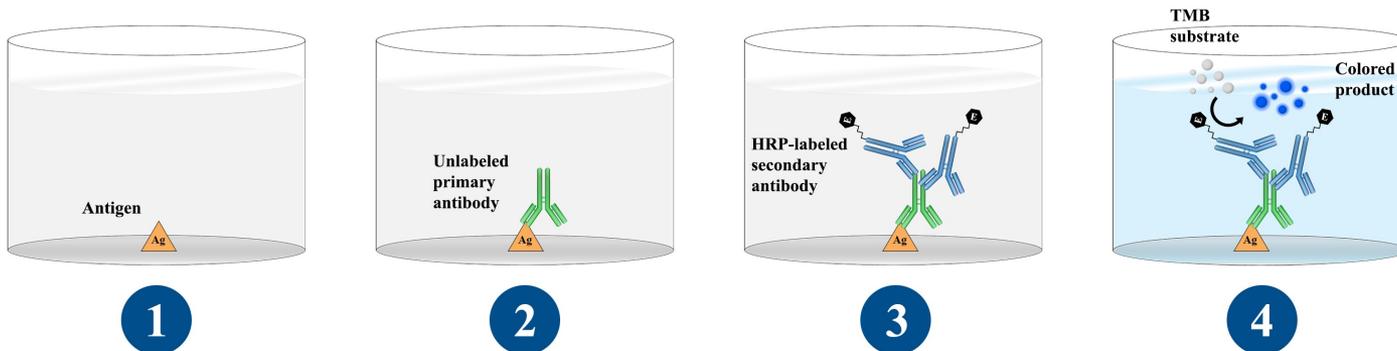
Metodología

Determinación de la antigenicidad de las proteínas aisladas mediante ensayos de inmunización en gallinas ponedoras

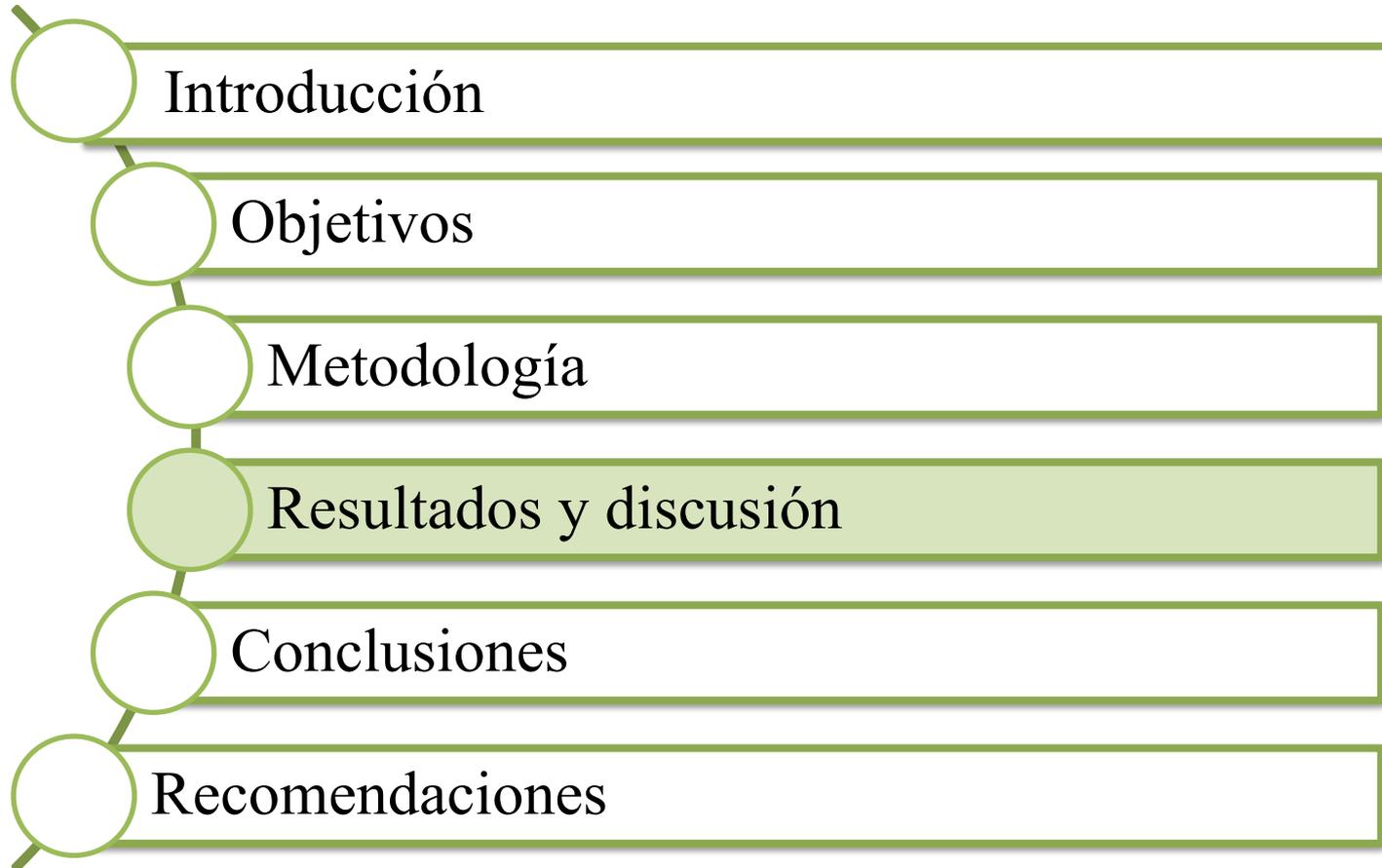
- *Extracción de IgY por precipitación con polietilenglicol 6000*



- *ELISA*



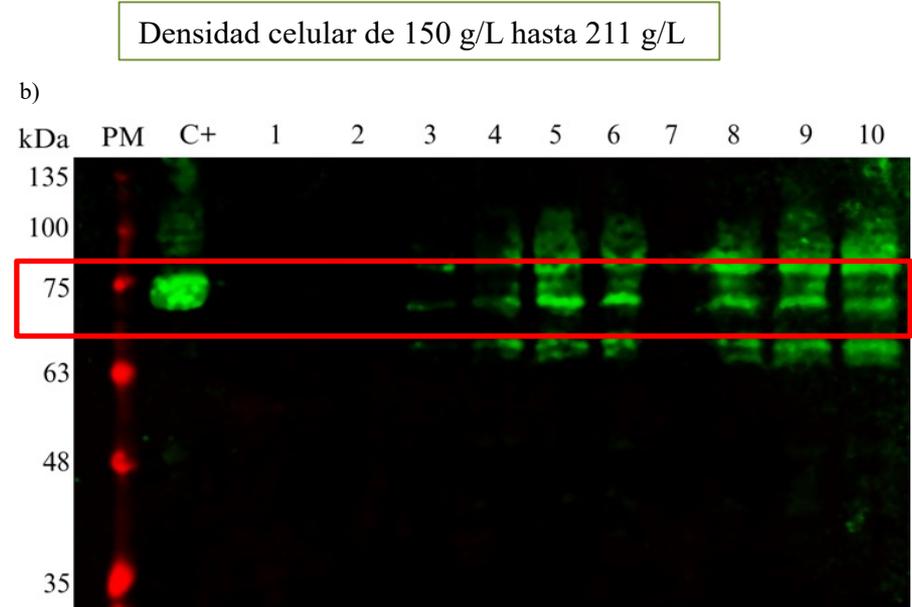
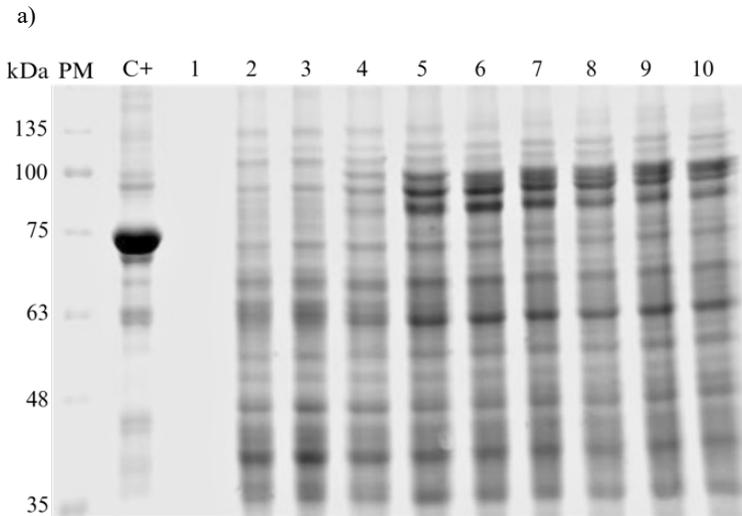
Contenido



Resultados y Discusión

Expresión y aislamiento de las proteínas antigénicas del Hantavirus a partir del clon 11 G1+G2

- Fermentación de Pichia pastoris transformada*



Nota. a) SDS-PAGE al 10 % en condiciones reductoras teñido con azul de Coomassie. b) Western Blot con el anticuerpo monoclonal anti-Histidina de ratón y con el anticuerpo secundario anti-ratón AlexaFluor 680 de cabra. Carril PM: marcador de peso molecular RGB Plus Prestained Protein Ladder 10-245 kDa, carril C+: control positivo, carril 1: vacío, carril 2: 0 horas después de la inducción, carril 3: 8 horas después de la inducción, carril 4: 16 horas después de la inducción, carril 5: 24 horas después de la inducción, carril 6: 36 horas después de la inducción, carril 7: 40 horas después de la inducción, carril 8: 48 horas después de la inducción, carril 9: 64 horas después de la inducción, carril 10: 72 horas después de la inducción.

Resultados y Discusión

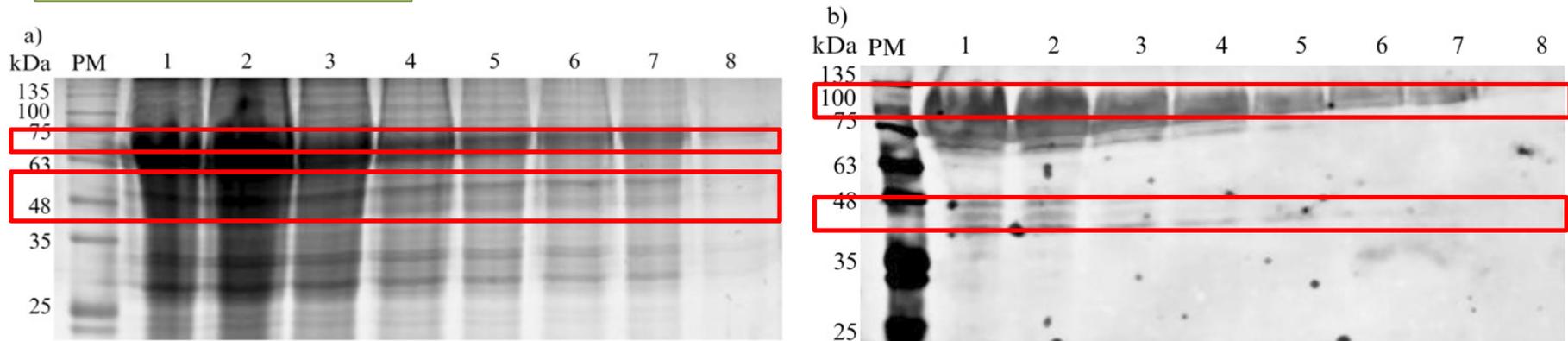
Expresión y aislamiento de las proteínas antigénicas del Hantavirus a partir del clon 11 G1+G2

- *Ruptura de P. pastoris en molino de bolas y solubilización de los antígenos Gn y Gc*

P. pastoris forma cuerpos de inclusión

Muestra de la ruptura celular
Factor de dilución 2

Rendimiento de 2 g de antígeno por L de fermentación

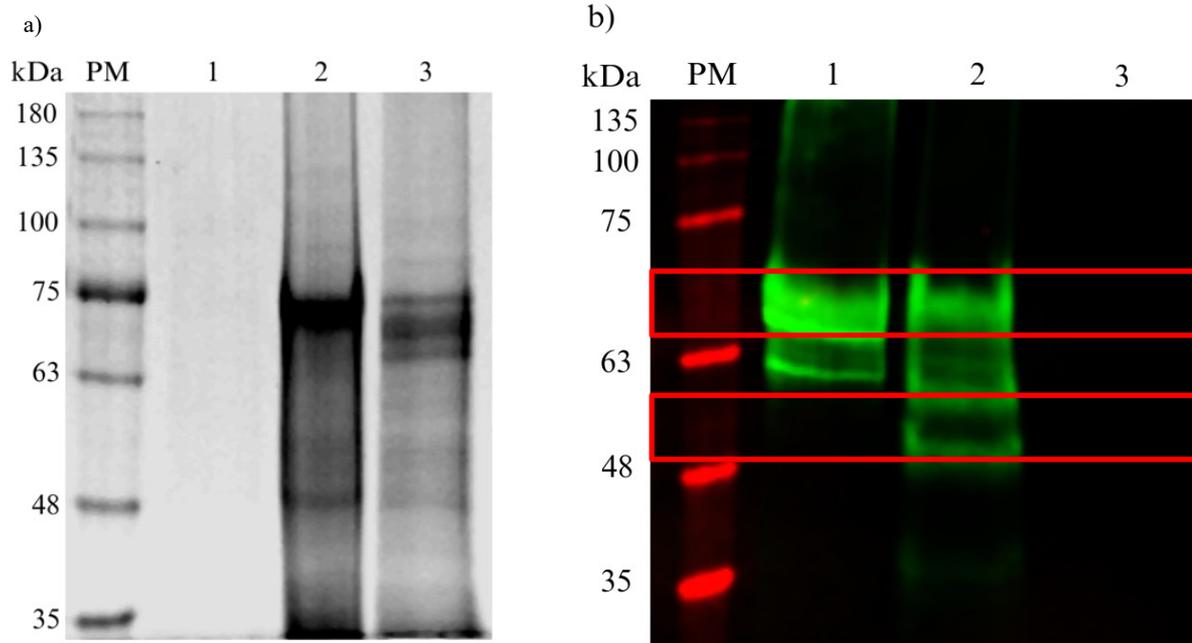


Nota. a) SDS-PAGE al 10 % en condiciones reductoras teñido con azul de Coomassie. b) Western Blot con el anticuerpo monoclonal anti-Histidina de ratón y con el anticuerpo secundario anti-ratón AlexaFluor 680 de cabra. Carril PM: marcador de peso molecular RGB Plus Prestained Protein Ladder 10-245 kDa, carril 1: muestra de la ruptura celular, carril 2: dilución 1:2 de la muestra de la ruptura celular, carril 3: dilución 1:4 de la muestra de la ruptura celular, carril 4: dilución 1:8 de la muestra de la ruptura celular, carril 5: dilución 1:16 de la muestra de la ruptura celular, carril 6: dilución 1:32 de la muestra de la ruptura celular, carril 7: dilución 1:64 de la muestra de la ruptura celular, carril 8 dilución 1:128 de la muestra de la ruptura celular.

Resultados y Discusión

Expresión y aislamiento de las proteínas antigénicas del Hantavirus a partir del clon 11 G1+G2

- *Ruptura de P. pastoris en molino de bolas y solubilización de los antígenos Gn y Gc*



El 70 % de las proteínas recombinantes se expresan como cuerpos de inclusión.

Nota. a) SDS-PAGE al 10 % en condiciones reductoras teñido con azul de Coomassie. b) Western Blot con el anticuerpo monoclonal anti-Histidina de ratón y con el anticuerpo secundario anti-ratón AlexaFluor 680 de cabra. Carril PM: marcador de peso molecular RGB Plus Prestained Protein Ladder 10-245 kDa, carril 1: muestra insoluble, carril 2: muestra solubilizada con 8M de urea, carril 3: muestra de la ruptura sin solubilizar.

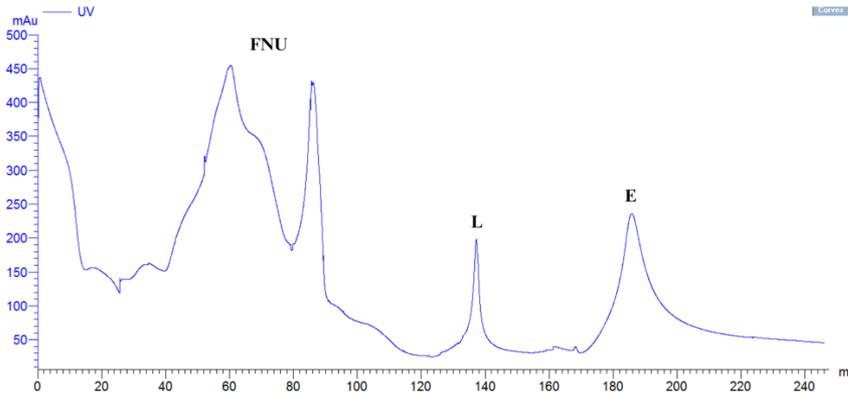
Resultados y Discusión

Expresión y aislamiento de las proteínas antigénicas del Hantavirus a partir del clon 11 G1+G2

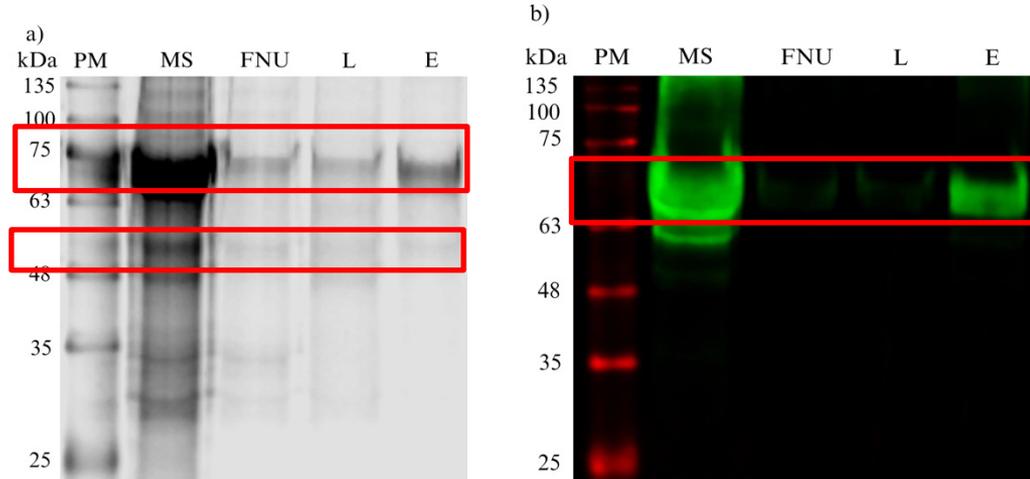
- *Purificación de los antígenos recombinantes Gn y Gc mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC)*

La muestra contiene gran cantidad de impurezas.

Pureza 40 al 90 %.



Nota. FNU: fracción de proteínas no unidas a la matriz, L: lavado con 100 mM de imidazol y E: elución con 200 mM de imidazol.



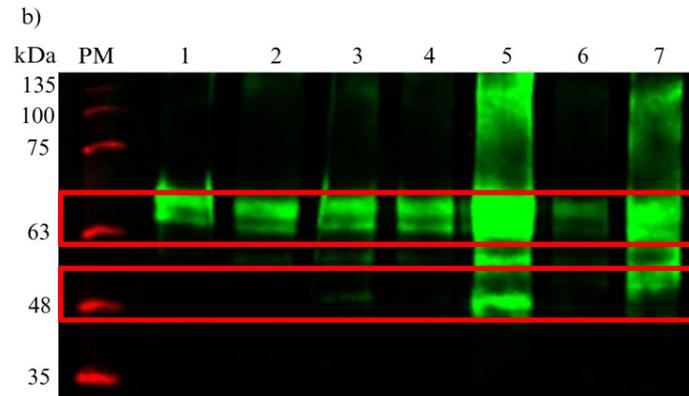
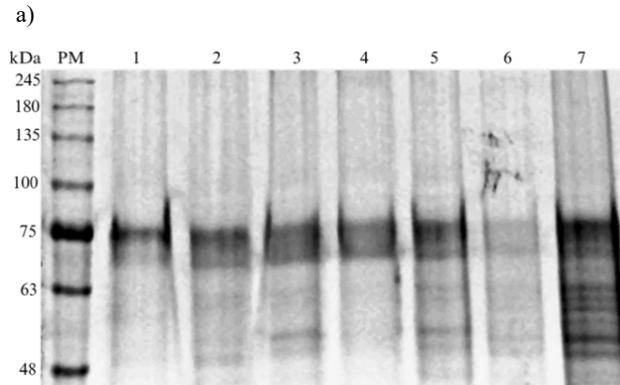
Nota. a) SDS-PAGE al 10 % en condiciones reductoras teñido con azul de Coomassie. b) Western Blot con el anticuerpo monoclonal anti-Histidina de ratón y con el anticuerpo secundario anti-ratón AlexaFluor 680 de cabra. Carril PM: marcador de peso molecular RGB Plus Prestained Protein Ladder 10-245 kDa, carril 1: muestra soluble, carril 2: fracción no unida, carril 3: lavado, carril 4: eluido.

Resultados y Discusión

Expresión y aislamiento de las proteínas antigénicas del Hantavirus a partir del clon 11 G1+G2

- *Replegamiento y concentración de las proteínas recombinantes Gn y Gc*

Moléculas biológicamente activas



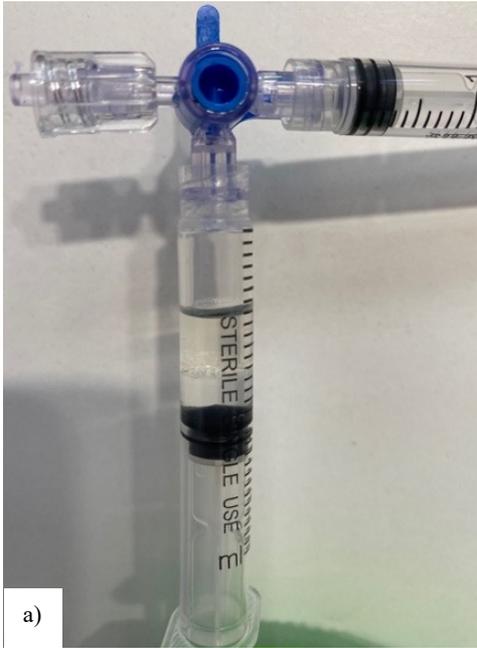
Nota. a) SDS-PAGE al 10 % en condiciones reductoras teñido con azul de Coomassie. b) Western Blot con el anticuerpo monoclonal anti-Histidina de ratón y con el anticuerpo secundario anti-ratón AlexaFluor 680 de cabra. Carril PM: marcador de peso molecular RGB Plus Prestained Protein Ladder 10-245 kDa, carril 1: muestra soluble, carril 2: fracción no unida, carril 3: lavado, carril 4: eluido.

Replegamiento	Volumen (mL)	Concentración (mg/mL)	Volumen (mL)
1	13	1,50	2
2	13	1,80	2
3	13	1,30	2

Nota. Volumen y concentración de los antígenos recombinantes Gn y Gc para cada replegamiento realizado

Resultados y Discusión

Inmunización de gallinas ponedoras con los antígenos recombinantes purificados para recolección de sangre y huevos



Nota. a) Formulación en proporción 50:50 fase acuosa/fase oleosa. b) Emulsión homogenizada. c) Criterio de evaluación de la conformación de la emulsión en el tiempo.

Resultados y Discusión

Immunización de gallinas ponedoras con los antígenos recombinantes purificados para recolección de sangre y huevos



Gallus gallus domesticus, raza Leghorn Brown



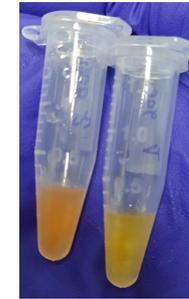
Vía intramuscular, músculo pectoral

(Schade et al., 2005)

Alta producción 20 semanas

Ciclo de puesta factores:

- Genéticos
- Ambientales
- Endocrinos



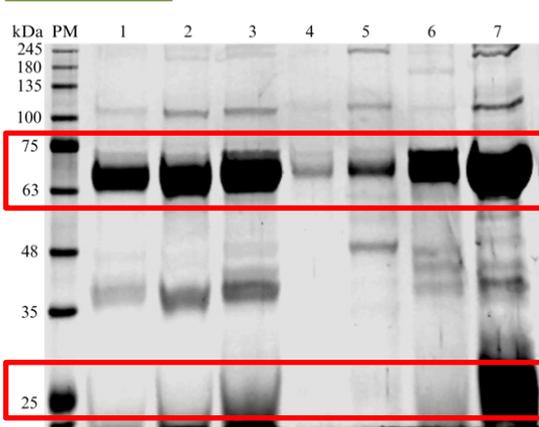
Muestras de huevos y suero recolectados

Resultados y Discusión

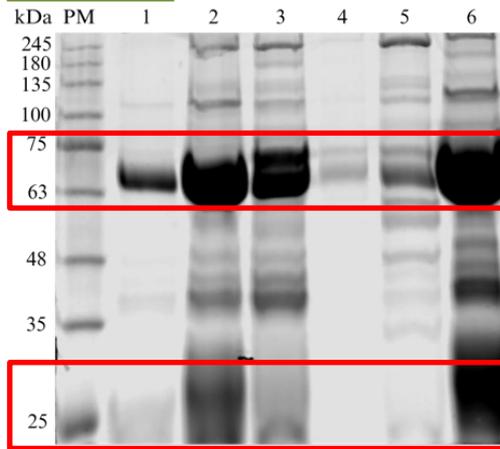
Determinación de la antigenicidad de las proteínas aisladas mediante ensayos de inmunización en gallinas ponedoras

- Extracción, concentración y cuantificación de IgY obtenidas a partir de yema de huevo de gallinas inmunizadas

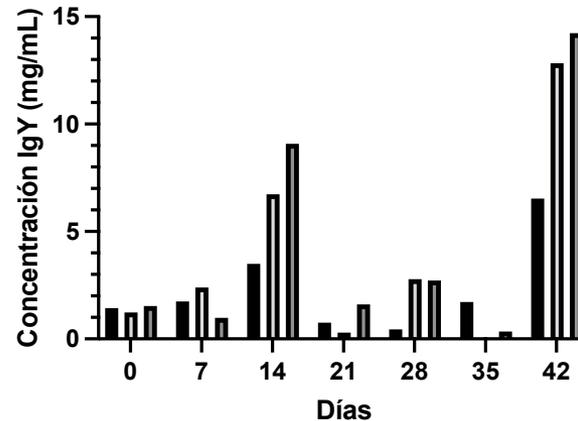
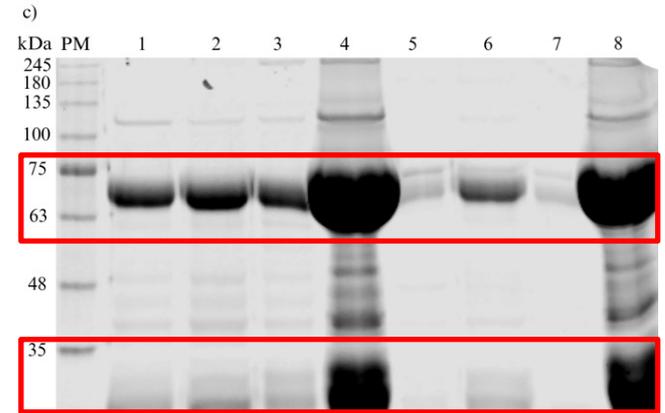
Gallina 1



Gallina 2



Gallina 3



- Gallina 1
- Gallina 2
- Gallina 3

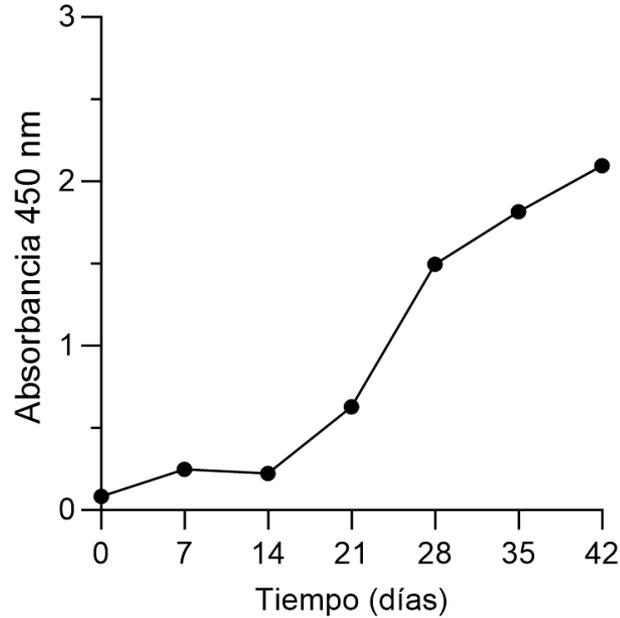
Concentración de IgY: 3 a 25 mg/mL



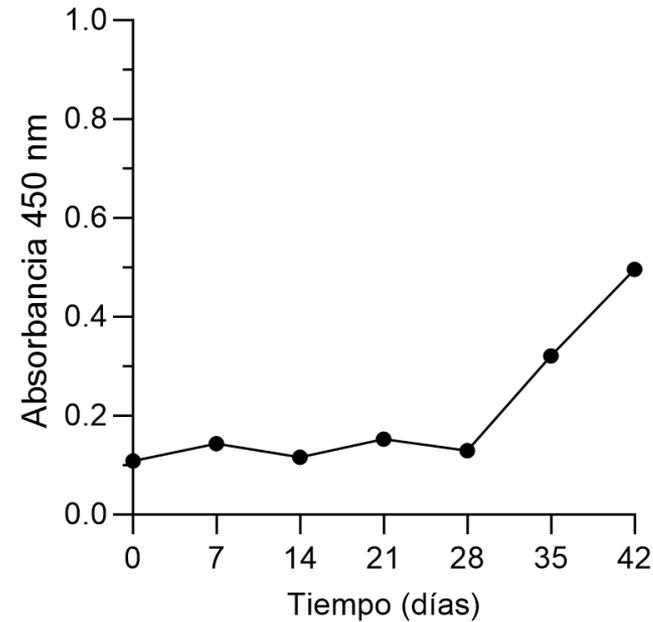
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Resultados y Discusión

Determinación de la antigenicidad de las proteínas aisladas mediante ensayos de inmunización en gallinas ponedoras

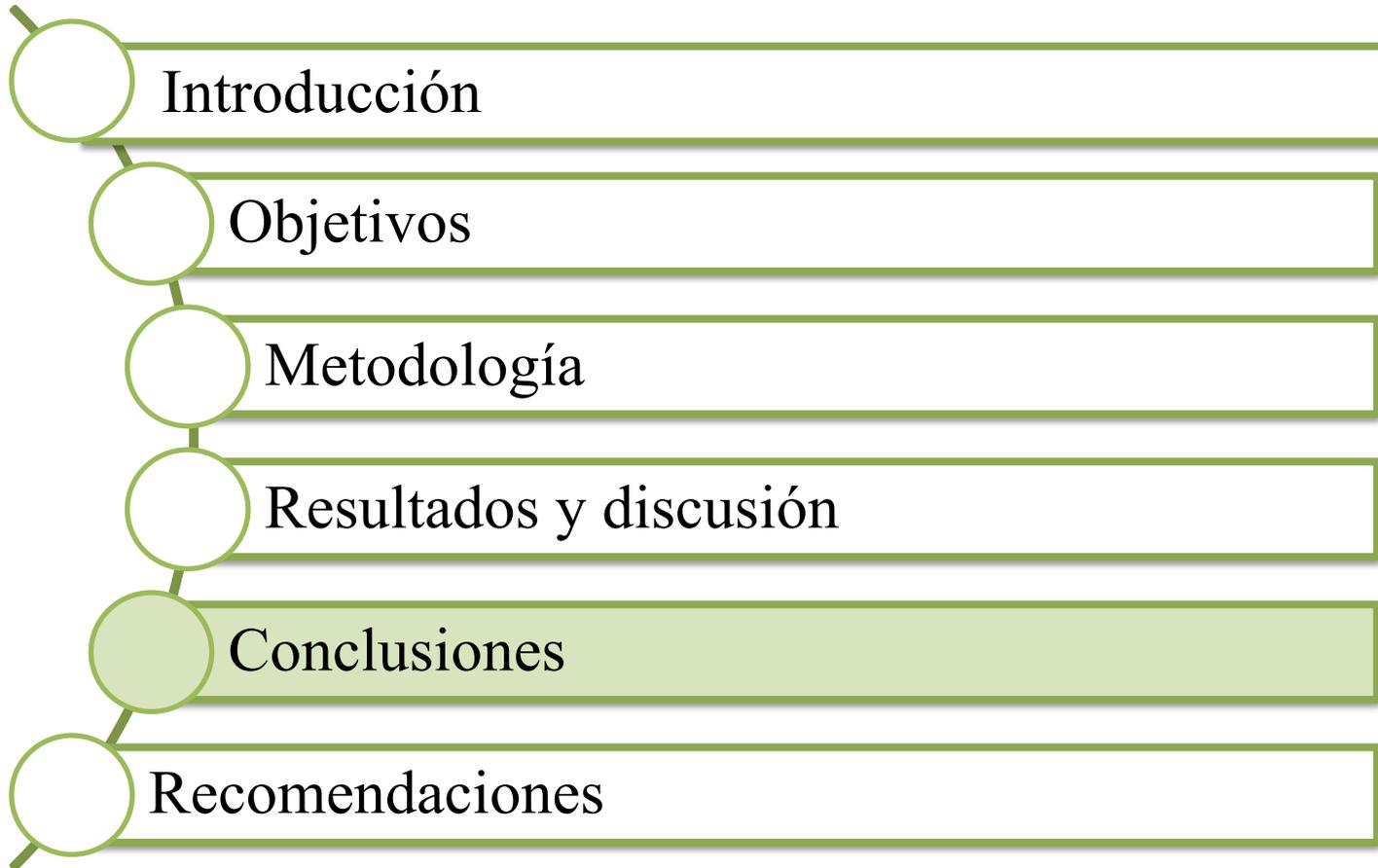


Nota. Títulos de inmunoglobulinas Y obtenidos a partir del suero de cuatro gallinas inmunizadas con el antígeno recombinante Gn/Gc. Test de Tukey $p < 0,005$.



Nota. Títulos de inmunoglobulinas Y obtenidos a partir de los huevos de tres gallinas inmunizadas con el antígeno recombinante Gn/Gc. Test de Tukey $p < 0,005$.

Contenido

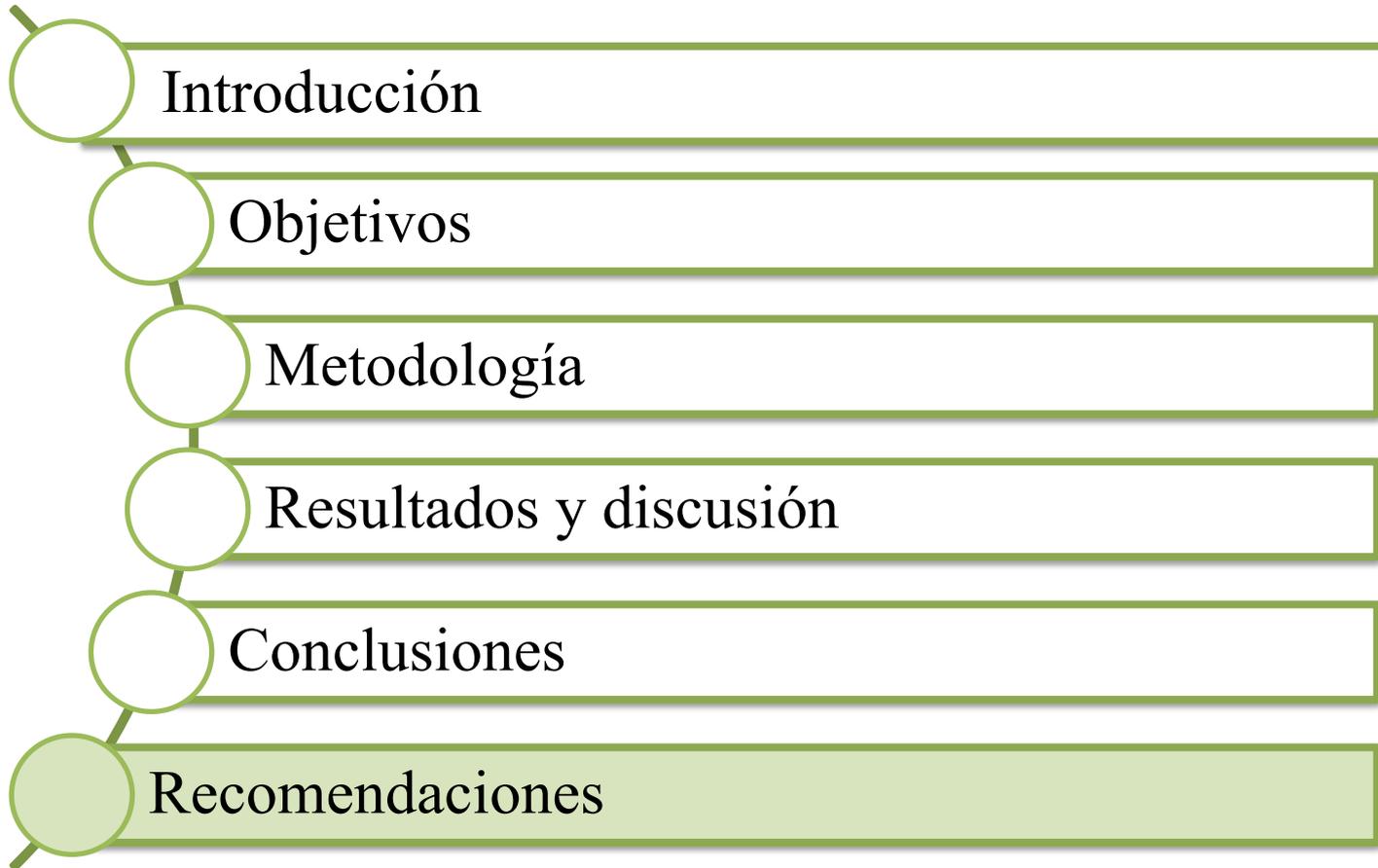


Conclusiones

- La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* presenta alto rendimiento (2 g/L) en la expresión de una proteína recombinante basada en las glicoproteínas de superficie Gn y Gc del virus Andes causante del SCPH.
- El uso de la proteína recombinante Gn y Gc como agente terapéutico requiere de procesos de solubilización, purificación, replegamiento y concentración de tal modo que la molécula que ingrese al animal se encuentre biológicamente activa y pueda cumplir su función.
- El uso de adyuvantes en las formulaciones antigénicas, como el adyuvante de Freund en sus formas completa e incompleta, estimula y potencia el efecto inmunitario del antígeno aumentando la producción de inmunoglobulinas Y.
- La inmunización de gallinas ponedoras con los antígenos recombinantes Gn y Gc presenta altos títulos de anticuerpos después de 42 días de inmunización por lo que se evidencia la capacidad del antígeno para generar una respuesta inmune.



Contenido



Recomendaciones

- Realizar un segundo paso de purificación de los antígenos recombinantes Gn y Gc para reducir la presencia de otras moléculas contaminantes.
- Verificar la actividad biológica de los antígenos proteicos antes de realizar las formulaciones para aplicar a las gallinas ponedoras.
- Purificar y concentrar las inmunoglobulinas Y obtenidas para eliminar moléculas contaminantes antes de aplicarlas en tratamientos.



Agradecimientos



Dra. Thelvia Ramos Gómez
Tutora de tesis
Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE – Ecuador

Dra. Natalie Parra Pereira
Tutora de tesis
Universidad de Concepción



Dr. Jorge Toledo Alonso
Director del Laboratorio de Fisiopatología
Universidad de Concepción