



Evaluación de la inmunización en aves con proteínas recombinantes derivadas de Hantavirus

Enríquez Armas, Martha Lizbeth

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

Dra. Ramos Gómez, Thelvia Isabel, PhD.

04 de septiembre del 2023



Plagiarism report

Enríquez Martha Tesis Completa (1).d...

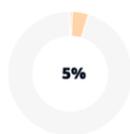
Scan details

Scan time:
September 1th, 2023 at 21:26 UTC

Total Pages:
46

Total Words:
11362

Plagiarism Detection



| Types of plagiarism | | Words |
|---------------------|------|-------|
| Identical | 0.5% | 59 |
| Minor Changes | 0.1% | 14 |
| Paraphrased | 4.3% | 491 |
| Omitted Words | 0% | 0 |

AI Content Detection



Text coverage

- AI text
- Human text

Plagiarism Results: (8)

T-ESPE-058017.pdf 3.5%

<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/36119/1/t-e...>

Cuenta Microsoft

1 Producción de anticuerpos IgY contra proteína recombinante Gn y Gc, en Gallus gallus domesticus inmunizadas con ADN solo y acompletejado...

Tesis Desarrollo y caracterizaciond.Image.Marked.pdf 1.4%

<http://repositorio.udec.cl/bitstream/11594/622/1/tesis%20de...>

Universidad de Concepción Dirección de Postgrado Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas Área Biol...

Gripe pandémica H1N1 (2009): Experiencia de la Re... 0.5%

https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s113...

Mi SciELO Servicios personalizados Servicios Personalizados Revista ...

THELVIA
ISABEL
RAMOS
GOMEZ

Firmado digitalmente por THELVIA ISABEL RAMOS GOMEZ
Fecha: 2023.09.13 15:16:49 -05'00'

Dra. Ramos Gómez, Thelvia Isabel, PhD.

C.I.: 1753960028



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Evaluación de la inmunización en aves con proteínas recombinantes derivadas de Hantavirus”** fue realizado en su totalidad por la señorita **Enríquez Armas, Martha Lizbeth**; 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, 30 de agosto de 2023

THELVIA
ISABEL
RAMOS
GOMEZ

Firmado digitalmente por
THELVIA ISABEL
RAMOS GOMEZ
Fecha:
2023.09.13
15:16:21 -05'00'

Dra. Ramos Gómez, Thelvia Isabel, PhD.

C.I.: 1753960028



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Enríquez Armas, Martha Lizbeth**, con cédula de ciudadanía N° **1727457309**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Evaluación de la inmunización en aves con proteínas recombinantes derivadas de Hantavirus** 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, 30 de agosto de 2023

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Martha Lizbeth Enríquez Armas', with a stylized flourish at the end.

Martha Lizbeth Enríquez Armas

C.I: 1727457309



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Enríquez Armas, Martha Lizbeth**, con cédula de ciudadanía N° **1727457309**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Evaluación de la inmunización en aves con proteínas recombinantes derivadas de Hantavirus** en el Repositorio InsVtucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 30 de agosto de 2023

Martha Lizbeth Enríquez Armas

C.I: 1727457309

Dedicatoria

A la extraordinaria mujer de quien llevo con orgullo el nombre, mi mamá Martha. Cada página escrita es un tributo a la influencia profunda que tuviste en mi formación. Aunque no estés físicamente presente, tu influencia se hace sentir en cada logro que he alcanzado.

A mis padres Asucena y Carlos, quienes han sido mi apoyo inquebrantable, fuente inagotable de amor y ejemplo de perseverancia. Su amor y dedicación han sido el faro que ha guiado mi camino.

A la niña que anhelaba este momento durante muchos años, ¡Lo hemos logrado!

A la familia que me otorgó esta etapa llamada universidad, atesoro con gratitud en mi alma cada risa, lágrima y palabra de aliento que me permitió llegar a este momento.

Agradecimiento

A mis padres Asucena y Carlos, por su infinito amor, apoyo y cuidado en cada etapa de mi vida. Su amor y sacrificio son las raíces de mi éxito, y siempre llevaré sus valores en mi camino hacia el futuro.

A la Dra. Thelvia Ramos, por brindarme la oportunidad y confiar en mí para desarrollar esta investigación y mis prácticas pre profesionales. Su apoyo, guía y paciencia han sido fundamentales durante todo el proceso, contribuyendo significativamente a mi desarrollo tanto personal como profesional.

Al Dr. Jorge Roberto Toledo, por abrirme las puertas de su laboratorio para desarrollar mi trabajo de integración curricular, por sus enseñanzas y consejos. A la Dra. Natalie Parra, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Su orientación, valiosos consejos, mentorías y su excelente calidad humana han enriquecido enormemente mi experiencia en el mundo de la ciencia.

A Karolay, la hermana que esta aventura me brindó. Gracias por el apoyo incondicional durante estos meses, las largas conversaciones nocturnas, los consejos, las risas, los momentos difíciles y la extrema paciencia. Cada locura que vivimos juntas las llevaré siempre en mi corazón. Tu amistad ha sido un regalo que valoro profundamente y espero conservar por mucho tiempo.

A las maravillosas personas que me brindaron un hogar a 5000 km de casa: Carlita, Santi, Carlitos, Fer, Estefi, Javi, Matheus, Thays, Félix, María Paz, Marce, Yerko, Brian, Leo, Mary y Dana. Gracias por enseñarme, aconsejarme, cuidarme y ser un apoyo incondicional durante esta aventura. A la Sra. Nancy, por su bondad, generosidad y sobre todo por tratarme como a una hija.

A la familia que encontré en este viaje académico que ha sido mi vida universitaria: Evelyn, Blanquita, Victoria, Christian, Karen, Nati e Iván. Su apoyo, cariño y amistad han sido un regalo inestimable. Gracias por ser amigos leales y formar parte de mi vida durante esta etapa tan importante. Espero que nuestra amistad siga floreciendo en el futuro y que continuemos apoyándonos mutuamente en cada sendero que la vida nos depare.

A mi hermano de toda la vida Dillan, por acompañarme, apoyarme, cuidarme y estar siempre para mí desde que éramos niños.

Desde el fondo de mi alma, infinitas gracias por todo.

Índice de Contenido

| | |
|---|----|
| Hoja de resultados de la herramienta Copyleaks..... | 2 |
| Certificación | 3 |
| Responsabilidad de autoría..... | 4 |
| Autorización de publicación | 5 |
| Dedicatoria..... | 6 |
| Agradecimiento..... | 7 |
| Índice de Contenido | 9 |
| Índice de Figuras..... | 14 |
| Listado de Abreviaturas..... | 16 |
| Resumen..... | 18 |
| Abstract | 19 |
| Capítulo 1 | 20 |
| Introducción..... | 20 |
| Formulación del problema y antecedentes | 20 |
| Justificación del problema | 22 |
| Objetivos..... | 25 |
| Objetivo general | 25 |
| Objetivos específicos..... | 25 |
| Hipótesis | 25 |

| | |
|--|----|
| Capítulo 2 | 26 |
| Marco teórico..... | 26 |
| Hantavirus..... | 26 |
| Biología celular y molecular del virus | 27 |
| Virus Andes..... | 29 |
| Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus | 30 |
| Transmisión..... | 31 |
| Proteínas recombinantes..... | 32 |
| Inmunidad pasiva y anticuerpos como método de tratamiento..... | 32 |
| Inmunoglobulinas Y | 33 |
| Capítulo 3 | 35 |
| Metodología..... | 35 |
| Expresión y aislamiento de las proteínas antigénicas del Hantavirus a partir del clon 11 G1+G2 previamente desarrollado | 35 |
| Fermentación de Pichia pastoris transformada | 35 |
| Ruptura de la levadura Pichia pastoris en molino de bolas..... | 36 |
| Solubilización de los antígenos Gn y Gc | 36 |
| Purificación de las proteínas Gn y Gc mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC)..... | 37 |
| Replegamiento de las proteínas recombinantes Gn y Gc..... | 37 |
| Concentración de las proteínas recombinantes Gn y Gc..... | 38 |
| Cuantificación de los antígenos proteicos recombinantes Gn y Gc | 38 |

| | |
|--|----|
| Inmunización de gallinas ponedoras (<i>Gallus gallus domesticus</i>) con los antígenos recombinantes purificados para recolección de sangre y huevos | 39 |
| Preparación de formulaciones antigénicas para la inmunización de las gallinas..... | 39 |
| Inmunización de gallinas ponedoras con las proteínas antigénicas Gn y Gc desarrolladas..... | 39 |
| Recolección de sangre y huevos de las gallinas inmunizadas..... | 39 |
| Determinación de la antigenicidad de las proteínas aisladas mediante ensayos de inmunización en gallinas ponedoras..... | 40 |
| Extracción de inmunoglobulinas Y con polietilenglicol..... | 40 |
| Cuantificación de inmunoglobulinas Y | 40 |
| Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)..... | 41 |
| Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)..... | 41 |
| Western Blot..... | 42 |
| Análisis estadístico..... | 43 |
| Capítulo 4 | 44 |
| Resultados..... | 44 |
| Expresión y aislamiento de las proteínas antigénicas del Hantavirus a partir del clon 11 G1+G2 previamente desarrollado. | 44 |
| Producción de las proteínas recombinantes Gn y Gc por medio de fermentación de <i>Pichia pastoris</i> transformada | 44 |
| Ruptura de la levadura <i>Pichia pastoris</i> en molino de bolas..... | 46 |
| Solubilización de los antígenos recombinantes Gn y Gc..... | 47 |
| Purificación de los antígenos recombinantes Gn y Gc mediante IMAC..... | 49 |

| | |
|---|----|
| Replegamiento y Concentración de los antígenos recombinantes Gn y Gc mediante un sistema de diafiltración | 52 |
| Inmunización de gallinas ponedoras (Gallus gallus domesticus) con los antígenos recombinantes purificados para recolección de sangre y huevos | 55 |
| Preparación de formulaciones antigénicas para la inmunización de las gallinas..... | 55 |
| Inmunización de gallinas ponedoras con las proteínas antigénicas Gn y Gc desarrolladas..... | 56 |
| Recolección de sangre y huevos de las gallinas inmunizadas..... | 57 |
| Determinación de la antigenicidad de las proteínas aisladas mediante ensayos de inmunización en gallinas ponedoras | 58 |
| Extracción de inmunoglobulinas Y mediante precipitación con polietilenglicol..... | 58 |
| Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)..... | 62 |
| Capítulo 5 | 64 |
| Discusión | 64 |
| Capítulo 6 | 70 |
| Conclusiones | 70 |
| Recomendaciones | 71 |
| Capítulo 7 | 72 |
| Referencias..... | 72 |

Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Protocolo de preparación de geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio | 42 |
| Tabla 2. Volumen y concentración de los antígenos recombinantes Gn y Gc para cada replegamiento realizado | 54 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Distribución de los Hantavirus alrededor del mundo | 27 |
| Figura 2. Representación esquemática de la estructura del Hantavirus..... | 28 |
| Figura 3. Representación esquemática del desarrollo del SCPH..... | 31 |
| Figura 4. Evaluación mediante SDS-PAGE al 10 % teñido con azul de Coomassie en condiciones reductoras y Western Blot de la expresión de GnGc en el tiempo..... | 45 |
| Figura 5. Evaluación mediante SDS-PAGE al 10 % teñido con azul de Coomassie en condiciones reductoras y Western Blot de la expresión de GnGc tras ruptura celular | 47 |
| Figura 6. Evaluación mediante SDS-PAGE al 10 % teñido con azul de Coomassie en condiciones reductoras y Western Blot de la expresión de GnGc tras solubilización..... | 49 |
| Figura 7. Cromatograma de purificación de la proteína recombinante GnGc | 51 |
| Figura 8. Evaluación mediante SDS-PAGE al 10 % teñido con azul de Coomassie en condiciones reductoras y Western Blot de la proteína recombinante GnGc purificada..... | 51 |
| Figura 9. Evaluación mediante SDS-PAGE al 10 % teñido con azul de Coomassie en condiciones reductoras y Western Blot de la proteína recombinante GnGc tras replegamiento y concentración | 53 |
| Figura 10. Curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) para cuantificar la concentración del replegamiento de los antígenos recombinantes Gn y Gc por medio de la técnica de BCA | 54 |
| Figura 11. Formulaciones antigénicas desarrolladas para obtener IgY contra los antígenos recombinantes Gn y Gc | 56 |
| Figura 12. Inmunización de gallinas ponedoras..... | 57 |
| Figura 13. Muestras recolectadas posterior a la inmunización con las proteínas antigénicas Gn y Gc | 58 |
| Figura 14. Evaluación mediante SDS-PAGE al 10 % teñido con azul de Coomassie en condiciones reductoras de la extracción y concentración de inmunoglobulinas Y en las gallinas 1, 2, 3 y 4 | 59 |

| | |
|--|----|
| Figura 15. Curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) para cuantificar la concentración de IgY en las muestras de huevos de las gallinas 1, 2 y 3..... | 61 |
| Figura 16. Concentración de inmunoglobulinas Y totales en las muestras de huevos de las gallinas 1, 2 y 3 | 61 |
| Figura 17. Títulos de inmunoglobulinas Y en suero..... | 62 |
| Figura 18. Títulos de inmunoglobulinas Y en yema de huevo | 63 |

Listado de Abreviaturas

| | |
|-------|---|
| Ac | Anticuerpos |
| AcN | Anticuerpos neutralizantes |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ANDV | Virus Andes |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| BCA | Ácido bicinconínico |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| ELISA | Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas |
| FDA | Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América |
| FHSR | Fiebre hemorrágica con síndrome renal |
| GPC | Precursor de la glicoproteína |
| H | Cadena pesada |
| HV | Hantavirus |
| IgY | Inmunoglobulinas Y |
| IgG | Inmunoglobulinas G |
| L | Cadena ligera |
| mAbs | Anticuerpos monoclonales |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |

| | |
|----------|---|
| PEG | Polietilenglicol |
| RdRp | ARN polimerasa dependiente de ARN |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SCPH | Síndrome cardiopulmonar por Hantavirus |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico |
| VSN | Virus Sin Nombre |

Resumen

Los Hantavirus son un grupo de organismos zoonóticos causantes de un importante número de enfermedades en los seres humanos. El virus Andes es un tipo de Hantavirus reportado en Sudamérica, causante de un síndrome cardiopulmonar y el único que se transmite de persona a persona. En la actualidad no existen tratamientos aprobados por la FDA contra la infección provocada por el virus de los Andes. Sin embargo, inducir títulos elevados de anticuerpos contra las glicoproteínas Gn y Gc está estrechamente relacionado con un aumento en la tasa de supervivencia al virus. En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto inmunitario en gallinas ponedoras de una proteína recombinante basada en las glicoproteínas de membrana Gn y Gc del virus Andes. Los antígenos recombinantes se expresaron y aislaron a partir del clon 11 G1+G2 previamente desarrollado lo que requirió de varias etapas: fermentación, ruptura en molino de bolas, solubilización, replegamiento y concentración de los antígenos proteicos. Los antígenos recombinantes Gn y Gc se obtuvieron en concentraciones de 1,30 hasta 1,80 mg/mL en un volumen de 2 mL. Los antígenos obtenidos se emplearon para elaborar formulaciones con el adyuvante de Freund en sus formas completa e incompleta para inmunizar a cuatro gallinas ponedoras (*Gallus gallus domesticus*, raza Leghorn Brown), de un año de edad, 1,8 kg de peso, sanas y en condiciones de crianza apropiadas. La inmunización se realizó cada semana durante 42 días y se recolectaron muestras de sangre y huevos. A partir de las muestras recolectadas se realizó el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas del tipo indirecto obteniéndose títulos altos en la yema de huevo a partir del día 42 después de realizada la primera inmunización, esto indica que la técnica de inmunización con los antígenos recombinantes produjo una respuesta inmunitaria favorable contra las glicoproteínas de superficie Gn y Gc del virus Andes.

Palabras clave: Hantavirus, antígenos recombinantes, inmunoglobulinas Y

Abstract

Hantaviruses are a group of zoonotic organisms responsible for a significant number of diseases in humans. The Andes virus is a type of Hantavirus reported in South America, causing a cardiopulmonary syndrome and being the only one transmitted from person to person. Currently, there are no FDA-approved treatments for Andes virus infection. However, inducing high antibody titers against the Gn and Gc glycoproteins is closely associated with an increased survival rate against the virus. In this research work, the immune effect in laying hens of a recombinant protein based on the Gn and Gc membrane glycoproteins of the Andes virus was evaluated. The recombinant antigens were expressed and isolated from the previously developed clone 11 G1+G2, which required several stages: fermentation, ball mill breakage, solubilization, refolding, and concentration of the protein antigens. Recombinant Gn and Gc antigens were obtained at concentrations ranging from 1.30 to 1.80 mg/mL in a volume of 2 mL. The obtained antigens were used to prepare formulations with Freund's adjuvant in both complete and incomplete forms to immunize four laying hens (*Gallus gallus domesticus*, Leghorn Brown), breed one year old, 1.8 kg in weight, healthy, and raised under appropriate conditions. Immunization was performed weekly for 42 days, and blood and egg samples were collected. From the collected samples, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed, yielding high titers in the egg yolk starting on day 42 after the first immunization. This indicates that the immunization technique with the recombinant antigens produced a favorable immune response against the surface glycoproteins Gn and Gc of the Andes virus.

Keywords: Hantavirus, recombinant antigens, immunoglobulin Y.

Capítulo 1

Introducción

Formulación del problema y antecedentes

Los Hantavirus (HV) son un conjunto importante de organismos zoonóticos que causan gran interés en el campo de la salud pública (Mittler et al., 2019). Forman parte del orden *Bunyaviridae*, familia *Hantaviridae*, y constituyen un género con gran número de especies distintas tanto a nivel genético como patológico. Los Hantavirus son un grupo de virus de ARN monocatenario y sentido negativo (D'Souza & Patel, 2020; Kell, 2022).

En los seres humanos, la infección producida por Hantavirus da como resultado dos síndromes clínicos en dependencia de la especie de HV y su origen geográfico: el síndrome cardiopulmonar por hantavirus (SCPH) y la fiebre hemorrágica con síndrome renal (FHSR) (Avšič-Županc et al., 2019; Ermonval et al., 2016). El FHSR es consecuencia de los HV que se ubican principalmente en el continente europeo y el continente asiático (Lupi et al., 2017). Los principales síntomas de esta enfermedad incluyen fiebre, dolor de cabeza, mialgias, trastornos gastrointestinales y distintos niveles de insuficiencia renal aguda (Mattar et al., 2015). A diferencia del FHSR, el SCPH conduce a una enfermedad más grave, con tasas de letalidad de aproximadamente 30 a 50 % (Avšič-Županc et al., 2019). El SCPH se localiza en el continente americano y se presenta generalmente como consecuencia de dos tipos de HV: el virus Sin Nombre (VSN), que se localiza en América del Norte y el virus Andes (ANDV), cuyos casos han sido registrados en América del Sur (Galeno et al., 2002). Los síntomas tempranos de SCPH son similares a FHSR en cuanto a fiebre y malestares generales; sin embargo, en las fases finales los pacientes tienden a desarrollar edema pulmonar agudo e insuficiencia respiratoria que requiere ventilación mecánica (Jonsson et al., 2008).

Cada año se reportan más de 200000 casos alrededor del mundo de infecciones producidas por HV y la tasa de mortalidad varía desde el 12 % en el caso del FHSR y del 40 % para el SCPH de acuerdo con la especie de virus (Wei et al., 2022).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), los países más afectados por Hantavirus son Brasil (5243 casos), Argentina (1350 casos) y Chile (1028 casos) (Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud, 2019).

El SCPH representa un problema emergente para Sudamérica, causado por el desmesurado crecimiento de las zonas urbanas que buscan cada vez con mayor frecuencia expandir las tierras destinadas para la agricultura y ganadería en ecosistemas donde habitan los reservorios de HV (Figueiredo et al., 2014).

Cada HV se encuentra asociado con un solo huésped reservorio causando una infección permanente en el huésped para la cual normalmente son asintomáticos y puede ocurrir durante unos meses e incluso toda la vida del animal (Mittler et al., 2019). En el caso particular del virus de los Andes el huésped reservorio es el ratón de cola larga (*Oligoryzomys longicaudatus*) (Pizarro et al., 2019). El principal mecanismo por el cual los HV se transportan del huésped a los seres humanos es mediante aerosoles que, son eliminados a partir de la orina, heces, saliva y en menor frecuencia por la mordedura de roedores infectados (Olano & Walker, 2009).

El genoma viral de los HV está compuesto por tres segmentos de ARN de cadena sencilla y polaridad negativa (Serris et al., 2020). Entre los segmentos que componen al ARN del virus se encuentran, un segmento corto que codifica la proteína de la nucleocápside, un segmento largo que codifica a la polimerasa y un segmento mediano que codifica a la proteína precursora (GPC) de dos glicoproteínas de superficie viral (G1 y G2 o Gn y Gc) (Hussein et al., 2011; Muyangwa et al., 2015).

La denominada tecnología IgY fue introducida en los años 90 y consiste en usar diferentes antígenos para inmunizar gallinas ponedoras con el objetivo de producir anticuerpos IgY en la yema de

sus huevos (Karachaliou et al., 2021). Esta tecnología ha producido gran cantidad de aplicaciones para diagnóstico, profilaxis y tratamientos de distintas enfermedades dentro de la medicina y veterinaria (Yakhkeshi et al., 2022).

Las gallinas ponedoras se inmunizan normalmente mediante vacunación y en dependencia del grado de inmunogenicidad del antígeno se pueden obtener altos títulos de anticuerpos después de tres o cuatro inmunizaciones refuerzo (Pauly et al., 2011).

Justificación del problema

En la actualidad no existen productos biológicos, tratamientos ni vacunas aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) contra la infección que produce el virus de los Andes (Beltrán-Ortiz et al., 2017). Sin embargo, se han realizado investigaciones clínicas donde se demuestra que inducir títulos elevados de anticuerpos neutralizantes (AcN) contra las glicoproteínas Gn y Gc tiene una estrecha relación con un aumento en la supervivencia de ANDV (Engdahl et al., 2021).

Las glicoproteínas Gc y Gn forman un complejo, con cuatro subunidades cada una (Gavrilovskaya et al., 1998) demostraron que el complejo Gn/Gc puede interactuar con integrinas $\beta 3$, de tal modo que esta interacción facilita la entrada del virus a la célula diana (Hussein et al., 2011). El proceso de replicación de los HV ocurre generalmente en las células endoteliales y en macrófagos (Gavrilovskaya et al., 1998).

El mecanismo por el cual los anticuerpos neutralizantes protegen a las células de patógenos consiste en la capacidad que tienen para unirse a la superficie de las partículas virales, en el caso de los HV los AcN se dirigen de manera particular a Gc de tal manera que se inhibe la fusión viral (Engdahl et al., 2023).

La inmunidad pasiva se plantea como un enfoque terapéutico con gran potencial para tratar la infección producida por HV y hace referencia a la transferencia de anticuerpos de un organismo a otro

(Marcotte & Hammarström, 2015), este tipo de inmunidad otorga protección de manera inmediata sin embargo, el efecto inmunitario resulta ser de corta duración debido a que no se produce una respuesta de memoria (Mak et al., 2014).

Gracias al desarrollo de nuevas tecnologías en áreas relacionadas a la biología molecular, inmunología e ingeniería genética se ha logrado mejorar el diseño de tratamientos (Ellis et al., 2013), como en el caso de las vacunas, donde se presentan nuevas y mejores estrategias que implican el uso de proteínas recombinantes para inducir una respuesta inmunitaria favorable hacia diferentes tipos de patógenos (Cid & Bolívar, 2021).

El auge producido por el incremento de este tipo de tecnologías está relacionado de manera directa con su alta eficiencia, costos bajos y su capacidad de ser altamente aprovechable (Pollet et al., 2021). Permite producir de manera rentable proteínas recombinantes en diversos sistemas de expresión entre los que se destacan organismos como bacterias y levaduras (Tripathi & Shrivastava, 2019).

Las inmunoglobulinas Y (IgY) son el tipo de anticuerpos (Ac) séricos que se encuentran en mayor cantidad en anfibios, reptiles y aves (X. Zhang et al., 2017). Tripathi & Shrivastava (2019) plantean la posibilidad de una vacuna que utilice la transferencia pasiva de IgY para ingresar al organismo anticuerpos neutralizantes que tienen la capacidad de combatir al virus mientras que el sistema inmune genera las barreras de defensa necesarias para combatir la infección

Los anticuerpos son transferidos de las madres a sus crías a través de la yema de sus huevos con la finalidad de generar en ellos inmunidad mientras se encuentran desarrollando su propio sistema inmune (Leiva et al., 2020). Según (X. Li et al., 1998) a partir de una gallina inmunizada es posible extraer en un tiempo aproximado de 6 semanas 298 g de IgY.

Las gallinas ponedoras producen inmunoglobulinas IgY y se almacenan en la yema de sus huevos durante la fase de incubación para otorgar protección a sus crías en el transcurso de los primeros días posteriores a la eclosión (Dias da Silva & Tambourgi, 2010). A diferencia de la producción de anticuerpos

en mamíferos las IgY resultan ser mejor para el bienestar del animal puesto que no requiere que el animal sangre para obtener estas moléculas (Marcq et al., 2015).

Las ventajas que presenta la inmunoterapia pasiva mediante el uso de anticuerpos IgY incluyen la posibilidad de recolectar y purificar de manera relativamente sencilla estas moléculas después de exponer gallinas ponedoras a tratamientos de inmunización con un antígeno de interés (Pérez de la Lastra et al., 2020). Otro punto a favor de los anticuerpos IgY recae en su incapacidad de producir respuesta alérgica, por lo que resultan seguros para administrar en mamíferos bajo un amplio rango de condiciones de pH y temperatura (Agurto-Arteaga et al., 2022).

La falta de tratamientos para los HV en particular para el virus Andes, considerando sus altas tasas de letalidad y su capacidad única de transmisión de persona a persona posiciona al uso de inmunoglobulinas Y como una posible solución terapéutica con múltiples beneficios y menores costos que sus contrapartes las inmunoglobulinas G obtenidas a partir de mamíferos de tal manera que, la mejora de los procesos de producción de este tipo de anticuerpos puede ser a largo plazo una terapia rentable y eficaz.

Por todo lo descrito anteriormente se propone el siguiente trabajo de investigación que tiene por objetivo evaluar el efecto inmunitario de un precursor recombinante de las glicoproteínas Gn y Gc derivadas del Hantavirus, previamente desarrollado por el laboratorio de Fisiopatología y Biofármacos de la Universidad de Concepción, en gallinas ponedoras (*Gallus gallus domesticus*). Para ello se realizó la expresión y aislamiento de las glicoproteínas Gn y Gc del virus Andes, un tipo de Hantavirus causante del síndrome cardiopulmonar en Sudamérica, para la posterior inmunización de gallinas ponedoras y finalmente se determinarán títulos de anticuerpos IgY mediante ensayos inmunológicos.

Objetivos

Objetivo general

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

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.

Capítulo 2

Marco teórico

Hantavirus

El género Orthohantavirus (Hantavirus) perteneciente a la familia Bunyaviridae (Martínez et al., 2020), comprende a un gran número de virus con envoltura lipídica que se replican en el citoplasma de las células del hospedero y poseen un genoma de ARN trisegmentado (Muranyi et al., 2005). A lo largo de los años, los HV han sido causantes de un importante número de enfermedades en los seres humanos, por tal razón se han catalogado como una amenaza para la salud pública a nivel mundial (Bi et al., 2008). De acuerdo a la clasificación de Baltimore, los HV al ser virus de ARN de sentido negativo y transcribirse para producir ARNm pertenecen a los virus del grupo V (Koonin et al., 2021).

Los HV se pueden clasificar en dos grandes grupos: Hantavirus del Viejo Mundo, donde se incluyen el virus Hantaan (HTNV), el virus Puumala (PUUV) y el virus Dobrava (DOBV), y Hantavirus del Nuevo Mundo que incluyen el virus Andes y el virus Sin Nombre (R. L. Brocato & Hooper, 2019). Los Hantavirus del Viejo Mundo se localizan principalmente en Asia y Europa provocando en los seres humanos fiebre hemorrágica con síndrome renal (FHSR), mientras que los Hantavirus del Nuevo Mundo han sido reportados en América y conducen a los pacientes infectados a un síndrome cardiopulmonar (SCPH) (Barry et al., 2005).

Tanto FHSR como SCPH son enfermedades de carácter multifactorial causando respuestas del sistema inmune y las células endoteliales. Además de trombocitopenia e hipoxia que coadyuvan el desarrollo de la enfermedad, a pesar de ser síndromes bastante diferentes comparten ciertas características comunes principalmente la capacidad que poseen los HV para infectar células endoteliales induciendo en el proceso a la permeabilidad capilar lo que conduce a una fuga de líquido hacia tejidos y órganos provocando un edema (Gorbunova et al., 2010).

Figura 1.*Distribución de los Hantavirus alrededor del mundo*

Nota. Kim et al., 2021.

En la actualidad, no existe un tratamiento o vacuna aprobada por la FDA para la infección causada por HV, los infectados reciben antibióticos, antipiréticos y analgésicos que ayudan a controlar los síntomas causados por la enfermedad (Mir, 2010). Para realizar el diagnóstico de la infección causada por HV se utilizan, pruebas serológicas, detección del ARN viral mediante RT-PCR, inmunohistoquímica y cultivo viral (Galeno A. et al., 2000).

Biología celular y molecular del virus

Los viriones que pertenecen a este género consisten en partículas circulares o pleomórficas con un diámetro que oscila entre 120 a 160 nm y una envoltura lipídica con espesor de aproximadamente 5 nm (Vaheiri et al., 2013). El genoma de los Hantavirus está compuesto por tres segmentos de ARN monocatenario de sentido negativo (Hepojoki et al., 2012). Los segmentos se organizan de acuerdo a su tamaño: pequeño (S; 1,8 – 2,1 kb), grande (L; 6,5 – 6,6 kb) y mediano (M; 3,7 – 3,8 kb) (Serris et al., 2020). El segmento S codifica para la proteína de la nucleocápside (proteína N), el segmento L codifica a

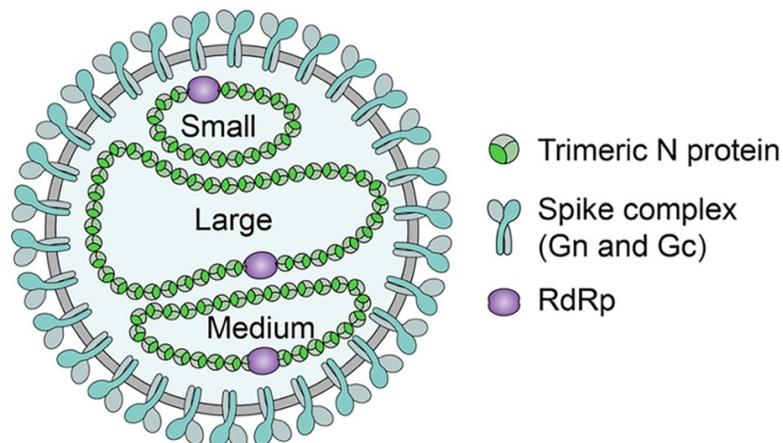
la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y el segmento M que codifica al precursor de la glicoproteína (GPC) (Jeeva et al., 2019).

GPC se escinde después del proceso de traducción, en dos unidades estructurales las glicoproteínas Gn (70 kDa) y Gc (55 kDa), la maduración del precursor tiene lugar en el retículo endoplasmático de la célula (Meier et al., 2021). Las glicoproteínas Gn y Gc se localizan en la envoltura del virus y forman un complejo en forma de espiga heterotetramérica que es de gran importancia para el reconocimiento y entrada hacia la célula huésped (Rissanen et al., 2017).

Durante su ciclo vital los HV atraviesan por varias etapas, inicialmente se adhieren a la superficie del huésped por medio de uniones entre sus receptores y las glicoproteínas Gn y Gc, posteriormente la partícula viral ingresa en el huésped mediante endocitosis independiente de clatrina a continuación, el RdRp transcribe al ARN viral que posteriormente se traduce en proteínas virales que se concentran en la membrana celular finalmente, las partículas virales salen de la célula hospedera por fusión de la vesícula biliar con la membrana (Koehler et al., 2022).

Figura 2.

Representación esquemática de la estructura del Hantavirus



Nota. D'Souza & Patel, 2020.

La fase de replicación de los HV ocurre principalmente en las células endoteliales, macrófagos, células epiteliales, podocitos, células tubulares del riñón y alveolares de los pulmones, linfocitos y células dendríticas causando edema pulmonar o hemorragia aguda (Koehler et al., 2022; Mackow et al., 2014). El proceso mediante el cual el virus ingresa a las células huésped ocurre por medio de la unión de las glicoproteínas virales Gn y Gc a las integrinas $\beta 3$ localizadas en la superficie celular del huésped y posterior endocitosis (Muranyi et al., 2005). Gn desempeña un papel importante en la unión viral y en el control de la fusión, mientras que Gc es una proteína de fusión clase II que induce la unión entre las membranas del virus y del huésped (Engdahl et al., 2021). Además, la glicoproteína de superficie Gc experimenta cambios en su conformación a causa de una disminución del pH en el endosoma como un mecanismo para intervenir en la fusión entre las membranas endosómicas virales y las del huésped (Engdahl et al., 2023).

Virus Andes

Se reportó por primera vez en el año de 1995 al suroeste de Argentina (López et al., 1997). El virus de los Andes es el principal agente causante del SCPH en países de América del Sur, sobre todo en Argentina y Chile con más de 900 casos registrados desde su primer reporte en la década de los 90 (Padula et al., 2004). El principal reservorio del virus es el ratón de cola larga (*Oligoryzomys longicaudatus*) (Torres-Pérez et al., 2010). Hasta la actualidad el virus Andes es el único tipo de HV del que se tiene evidencia documentada de transmisión de persona a persona (R. L. Brocato & Hooper, 2019). Un estudio realizado por (Ferrés et al., 2007) demostró que la transmisión de persona a persona presenta mayor riesgo cuando se da en parejas sexuales, mientras que cuando el contacto se da de manera no sexual el riesgo disminuye. El avance en la búsqueda de tratamientos para el HV ha sido limitado por la ausencia de un modelo animal práctico (Hooper et al., 2001), sin embargo, varias investigaciones (Matthys et al., 2010; Prescott et al., 2014; Slough et al., 2020; Vergote et al., 2021) señalan que para el caso particular del ANDV el mejor modelo de estudio es el hámster sirio

(*Mesocricetus auratus*) debido a que al momento de contraer la infección los animales presentan una enfermedad que resulta bastante similar al SCPH que se produce en humanos (Wahl-Jensen et al., 2007).

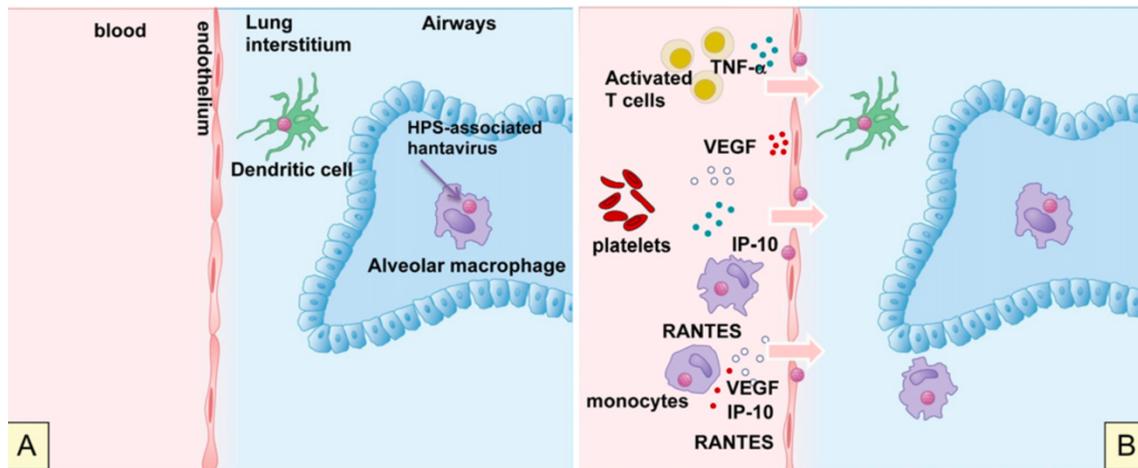
Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus

Los síntomas iniciales que se presentan por el SCPH son: dolores musculares, fiebre, malestar general, náuseas, dolor de cabeza, vómitos y dolor abdominal, entre 4 a 10 días después se pueden presentar tos y dificultad para respirar (Schmaljohn, 2009). La tasa de mortalidad para el SCPH es aproximadamente entre 30 y 50 % (Hussein et al., 2011). El SCPH presenta tres diferentes fases: fase prodrómica, fase cardiopulmonar y fase de convalecencia (Llah et al., 2018), en la fase prodrómica se presentan síntomas similares a la gripe que pueden durar hasta 45 días, durante la fase cardiopulmonar se produce una fuga en los capilares lo que provoca la reducción del gasto cardíaco y edema pulmonar (Chang et al., 2007), finalmente en la fase de convalecencia se produce un shock cardiogénico donde se requiere asistencia respiratoria y oxigenación por membrana extracorpórea (Akram et al., 2023).

El virus accede al endotelio vascular por medio de macrófagos alveolares y células dendríticas infectadas, simultáneamente las células endoteliales que se encuentran infectadas producen quimiocinas y citocinas proinflamatorias y regulan las moléculas de adhesión en su superficie celular atrayendo en el proceso a macrófagos, células T y monocitos los cuales al acumularse en el endotelio producen una tormenta de citocinas, adicionalmente el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es secretado por las plaquetas, células T y los macrófagos activados con el virus por lo que el VEGF proveniente de estas células logra alcanzar elevadas concentraciones en la vasculatura del pulmón dando como resultado fugas e hiperpermeabilidad de los vasos (MacNeil et al., 2011).

Figura 3.

Representación esquemática del desarrollo del SCPH



Nota. MacNeil et al., 2011.

Transmisión

La vía por la cual los seres humanos se infectan con HV es generalmente de carácter zoonótico, se transmite de roedores contaminados a personas por medio de contacto directo con los animales o con aerosoles provenientes de sus heces, orina o saliva por varias semanas e incluso meses (Bellomo et al., 2023). El mecanismo por el cual se transmite la infección y la gravedad de la misma están relacionados directamente con la especie de virus (Mir, 2010). Desde el punto de vista evolutivo, existe evidencia que señala la coevolución a lo largo de los años entre los HV y las diversas especies de roedores reservorio (Galeno A. et al., 2000). Cada HV infecta permanentemente y de manera asintomática a cada huésped reservorio, además, la transmisión a otros mamíferos resulta en infecciones no productivas, mientras que los seres humanos desarrollan enfermedades infecciosas (Ray et al., 2010).

El virus se mantiene circulando en la naturaleza gracias a la facilidad con la que se transmite entre las poblaciones de roedores infectados, lo que suele suceder cuando interactúan entre ellos o por medio de acicalamiento social y peleas (Polop et al., 2010). La relación entre los HV y sus huéspedes

reservorio es en gran medida evolucionada, puesto que presentan varias características que se mantienen constantes, como, que la infección se muestre de forma crónica y asintomática para el huésped y que usualmente se asocia cada virus con una única especie de roedor reservorio perteneciente a la familia Muridae (J. C. Young et al., 1998).

Proteínas recombinantes

Durante más de tres décadas las proteínas han sido estudiadas como un método de tratamiento para un amplio número de enfermedades inicialmente estas proteínas provienen de fuentes humanas pero con el desarrollo de la ingeniería genética la producción de proteínas terapéuticas se ha trasladado a sistemas de expresión recombinantes que presentan mejoras en cuanto a la pureza, consistencia y potencial de contaminación viral de la proteína que se desea administrar (Sethuraman & Stadheim, 2006). Los sistemas que se utilicen para la expresión de proteínas deben obedecer a ciertos criterios, como la rentabilidad y calidad permanente del producto en la actualidad, los sistemas más destacados son: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Fusarium*, *Trichoderma* y cultivos de células de mamíferos e insectos (Schmidt, 2004).

Inmunidad pasiva y anticuerpos como método de tratamiento

La inmunidad pasiva hace referencia al método mediante el cual se transfieren anticuerpos de un donante a un receptor con la finalidad de protegerlo frente a un proceso de infección (Slifka & Amanna, 2018), este tipo de inmunidad otorga protección inmediata al individuo, sin embargo, la duración resulta limitada siendo de entre varias semanas a 4 meses (Baxter, 2007). Esta técnica resulta una pieza importante dentro del control de enfermedades transmisibles, de esta manera se puede prevenir la enfermedad por medio de la interacción entre los anticuerpos que son suministrados y los patógenos invasores (M. K. Young & Cripps, 2013). Recientemente la FDA aprobó el uso de anticuerpos

monoclonales (mAb) contra el virus del Ébola y el COVID-19 ratificando a la inmunización pasiva como un método válido para combatir enfermedades virales (Mittler et al., 2022).

Los anticuerpos monoclonales son inmunoglobulinas que poseen alto grado de especificidad para un antígeno o un epítipo determinados (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2023) además, cuentan con una elevada capacidad para mejorar la respuesta inmune por lo que resultan interesantes como una alternativa para obtener agentes terapéuticos y profilácticos en infecciones causadas por virus (Pantaleo et al., 2022). A lo largo de los años, se han caracterizado una gran cantidad de anticuerpos neutralizantes para varias familias de virus, para el caso particular de los HV los anticuerpos que se han identificado atacan al complejo tetramérico que forman las glicoproteínas de membrana Gn y Gc (Engdahl et al., 2021).

Inmunoglobulinas Y

La tecnología IgY fue presentada a partir del año 1990 e implica un proceso en el cual se inmunizan gallinas ponedoras con el objetivo de generar inmunoglobulinas Y en la yema de sus huevos (Karachaliou et al., 2021). Los anticuerpos IgY son el tipo de inmunoglobulina que se encuentra en mayor cantidad en la yema y suero de reptiles, anfibios y aves (Yakhkeshi et al., 2022). Las inmunoglobulinas Y están compuestas por dos cadenas ligeras (L, 25 kDa) y dos cadenas pesadas (H, 65 kDa), por lo que la molécula completa tiene un peso aproximado de 167 kDa (Dias da Silva & Tambourgi, 2010). Las IgY pasan de la madre al hijo en la etapa latente del huevo brindando al pollito la capacidad de resistir varias enfermedades infecciosas, el transporte trans ovárico de los anticuerpos tardan aproximadamente entre 3 a 6 días (Chalghoumi et al., 2009).

Las IgY presentan una elevada eficacia en el reconocimiento de proteínas que se encuentran altamente conservadas en mamíferos debido a la distancia filogenética que existe entre especies de mamíferos y aves (Yakhkeshi et al., 2022). Los avances en la tecnología IgY señalan que puede emplearse para la obtención de anticuerpos que presenten altos niveles de especificidad frente a un gran número

de agentes patógenos (El-Kafrawy et al., 2023). El uso de IgY como terapia presenta ventajas significativas frente a otras tecnologías, como: bajos costos de producción, es altamente rentable puesto que en la yema de huevo se encuentran elevadas concentraciones de IgY, el método no es invasivo, la manipulación de las gallinas es sencilla, se evita la manipulación y constante sangrado de animales de laboratorio (Müller et al., 2015).

***Gallus gallus domesticus* como modelo animal para obtener anticuerpos**

Las gallinas ponedoras producen un volumen de yema de aproximadamente 15 mL y ponen entre 5 a 6 huevos semanalmente (Larsson et al., 1993). Los animales inmunizados producen alrededor de 100 mg de IgY totales por cada huevo y aproximadamente de entre el 2 al 10 % de estos anticuerpos presentan especificidad para el antígeno diana (Abbas et al., 2019). El uso de gallinas ponedoras para la inmunización presenta ventajas significativas en cuanto al bienestar del animal puesto que solo se requiere recolectar sus huevos y de este modo se evita recurrir a la extracción de sangre al animal (Narat, 2003). Al realizar el proceso de inmunización a las gallinas la cantidad de IgY específicas que se obtienen para determinado antígeno está directamente relacionada con el adyuvante utilizado, la edad del animal, la vía por la que se aplica el antígeno, dosis, antigenicidad y peso molecular de la molécula que se administra a cada gallina (Aston et al., 2022).

Capítulo 3

Metodología

Se evaluará la inmunización en aves con proteínas recombinantes derivadas de Hantavirus. Para cumplir con el objetivo propuesto se desarrollaron tres fases. Inicialmente se expresó y aisló las proteínas antigénicas del virus a partir de un clon desarrollado por el laboratorio de Fisiopatología y Biofármacos de la Universidad de Concepción. A continuación se desarrolló formulaciones con la proteína antigénica obtenida y se inmunizó las gallinas ponedoras, se recolectaron muestras de suero y huevos desde el día 0 hasta el día 47. Finalmente las muestras fueron procesadas y se determinó la antigenicidad del antígeno por medio de ELISA.

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

Fermentación de *Pichia pastoris* transformada

Preparación del inóculo inicial

El proceso de preparación del inóculo inicial para realizar la fermentación de *P. pastoris* se modificó de Tolner et al., 2006. Se tomó una colonia del clon 11 G1+G2 desarrollado previamente en el laboratorio y fue inoculada con 10 mL de medio YP (10 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de peptona) y glicerol al 2 %. Se incubó en un agitador orbital TU-400 *Orbital Shaker Incubator* (MRC, Israel) a 30 °C y agitación constante de 150 rpm durante 24 horas. Al finalizar las 24 horas se pasó el medio de cultivo a un matraz de 1 L que tenía 150 mL de medio YP con glicerol al 2 % y el matraz se incubó a las mismas condiciones de temperatura y agitación por 48 horas. El medio de cultivo resultante se pasó a un matraz de 2 L con 350 mL de medio YP y glicerol al 2 % incubado bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación durante 24 horas. Cada paso fue realizado por duplicado por lo cual al final se centrifugó el medio de cultivo de uno de los matraces de 2 L y se resuspendió en el medio de cultivo del otro matraz.

Inoculación del fermentador

El proceso de fermentación de la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* se desarrolla de manera discontinua con la finalidad de obtener una elevada densidad celular y aumentar la productividad del proceso (W. Zhang et al., 2002). El protocolo de fermentación de *P. pastoris* se adaptó de Tolner et al., 2006. El medio de cultivo con el clon C11 G1+G2 se pasó a un fermentador de 5 L con medio salino, extracto de levadura, biotina, vitaminas, sales y glicerol a 30 °C, pH 5,22 y agitación de 500 rpm. El proceso de fermentación fue desarrollado en dos etapas, inicialmente se empleó glicerol como fuente de carbono durante aproximadamente 24 horas y en la segunda etapa del proceso se agregó metanol al 0,3 % para inducir al promotor del gen que codifica para la alcohol oxidasa (AOX1) y la producción de Gn y Gc. El proceso de inducción duró 72 horas. Se separó la biomasa del sobrenadante por medio de centrifugación a 8000 rpm durante 10 min. La biomasa resultante fue almacenada a -80 °C.

Ruptura de la levadura Pichia pastoris en molino de bolas

Para la ruptura de las células de la levadura se tomó el precipitado proveniente de la fermentación y fue resuspendido en tampón de ruptura (PBS 1X, PMSF 0,1 mM, pH 7,4) a una concentración de 10 g/100 mL. La ruptura celular fue realizada en el molino de bolas *DYNO[®]-MILL MULTI LAB* (WAB, EE.UU.) en 10 ciclos de ruptura. Se recolectó la biomasa rota y se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min a 4 °C.

Solubilización de los antígenos Gn y Gc

El protocolo de solubilización fue adaptado de Palmer & Wingfield, 2004. Se pesaron 25 g de la fracción insoluble de ruptura (obtenida anteriormente) y se resuspendió en tampón de solubilización (Urea 8M, β -Mercaptoetanol 10mM, PMSF 0,1 mM, NaOH 20 mM, pH 12). Se incubó durante 1 hora a 45 °C, agitándose vigorosamente en vórtex cada 15 min. La muestra solubilizada se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se ajustó a un pH 8 con NaH_2PO_4 y HCl. La fracción soluble se guardó a -20 °C.

Purificación de las proteínas Gn y Gc mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos

inmovilizados (IMAC)

Se purificó la fracción soluble modificando el protocolo propuesto por (Bornhorst & Falke, 2000); usando el sistema de cromatografía *Äktaprime plus* (GE Healthcare Life Science, Inglaterra), utilizando una matriz *Chelatin Sepharose Fast Flow®* (GE Healthcare Life Science, Inglaterra) cargada con sulfato de níquel (NiSO₄). Se equilibró la matriz con 100 mL de tampón de equilibrio (Urea 8M, β-Mercaptoetanol 10 mM, Imidazol 5 mM, PMSF 0,1 mM, pH 8), a un flujo de 1,5 mL/min. A continuación, se cargó a la matriz 100 mL de la muestra solubilizada, a un flujo de 0,5 mL/min. Una vez pasada la muestra, se lavó la matriz con tampón de lavado (Urea 8 M, β-Mercaptoetanol 10 mM, Imidazol 100 mM, PMSF 0,1 mM, pH 8). A la muestra contenida en la matriz se le aplicó un tampón de elución (Urea 8M, β-Mercaptoetanol 10 mM, Imidazol 200 mM, PMSF 0,1 mM, pH 8). Se cargaron 100 mL de tampón de lavado y de tampón de elución a un flujo constante de 1 mL/min. Durante cada etapa se recolectaron las fracciones resultantes (no unida, lavado y eluido).

Replegamiento de las proteínas recombinantes Gn y Gc

Para el replegamiento de la fracción eluida se utilizó el sistema de diafiltración *Amicon 8010 Bioseparations Stirred Cells* de 15 mL (Merck, Alemania) con un disco de ultrafiltración *Ultracel* de 5 kDa de Celulosa Regenerada (Merck Millipore, Alemania). El sistema fue conectado a una bomba peristáltica NE-900 (*SyringePump*, EE.UU.) y se incorporó a una plancha de agitación CIMAREC⁺ (*ThermoFisher Scientific*, EE.UU.).

Una vez terminado el montaje del sistema, se colocó en el equipo de diafiltración la muestra eluida de la purificación y se pasaron 100 mL de tampón de replegamiento (L-Arginina 0,8 M, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Glutación Oxidado 750 μM, Tris 100 mM, PMSF 0,1 mM, pH 8,3) a un flujo constante de 0,3 mL/min. Se pasaron 100 mL de tampón de inmunización (Sacarosa 100 mg/mL, PMSF 0,1 mM, pH 7,4) a

un flujo constante de 0,3 mL/min. Se abrió el sistema Amicon y se recuperó la fracción que se encontraba en el tampón de inmunización y se agregó Tween 20 (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.) 0,02 % v/v. La muestra se filtró mediante una membrana de 0,22 μm y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El protocolo para el replegamiento de las proteínas fue modificado de Ferré y colaboradores (2005).

Concentración de las proteínas recombinantes Gn y Gc

Una vez que los antígenos proteicos Gn y Gc se replegaron correctamente se procedió a concentrarlos. Se utilizó el sistema de diafiltración *Amicon 8010 Bioseparations Stirred Cells* de 15 mL (*Merck*, Alemania) con un disco de ultrafiltración *Ultracel* de 5 kDa de Celulosa Regenerada (*Merck Millipore*, Alemania) incorporado a una plancha de agitación (*BioStir®*, EE.UU.) y conectado a un tanque de nitrógeno gaseoso. Una vez terminado el montaje del sistema, se colocó en el equipo de diafiltración 13 mL de la muestra replegada y se pasó nitrógeno a un flujo constante de 0,3 mL/min durante 40 min para obtener un volumen final de la muestra concentrada de 2 mL. El protocolo para la concentración de proteínas recombinantes se adaptó de Ferré y colaboradores (2005).

Cuantificación de los antígenos proteicos recombinantes Gn y Gc

Para cuantificar las proteínas recombinantes Gn y Gc se utilizó la técnica del ácido bicinonínico (BCA) y se elaboró una curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA) (*Thermo Scientific*, EE.UU.) con concentraciones conocidas de 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 y 0 mg/mL. Para la solución de BCA se utilizó el *kit Pierce BCA Protein Assay* (*Thermo Scientific*, EE.UU.). En una placa de 96 pocillos se agregaron 5 μL de las tres muestras replegadas y 200 μL de la solución de BCA preparada de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La placa se leyó en un sistema lector de microplacas *Synergy HTX* (*Biotek Instruments*, EE.UU.) a una longitud de onda de 562 nm.

Inmunización de gallinas ponedoras (*Gallus gallus domesticus*) con los antígenos recombinantes purificados para recolección de sangre y huevos

Preparación de formulaciones antigénicas para la inmunización de las gallinas

La formulación inicial se elaboró con 100 µg del antígeno recombinante Gn/Gc y se emulsionó con adyuvante completo de *Freund* (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.) en una proporción de 50:50 de fase acuosa y fase oleosa. Para homogeneizar la emulsión se conectó una llave de tres vías (*Heuer*, India) a dos jeringas de 3 mL (*Nipro Medical Corporation*, EE.UU.), el proceso se detuvo cuando una gota de la formulación fue colocada en un vaso de precipitación y conservó su conformación durante 5 min. Se realizaron refuerzos semanales a una concentración de 50 µg del antígeno recombinante y se emulsionó con el adyuvante incompleto de *Freund* (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.). El esquema para inmunizar a las 4 gallinas fue modificado de Brocato y colaboradores (2012).

Inmunización de gallinas ponedoras con las proteínas antigénicas Gn y Gc desarrolladas

El protocolo de inmunización a las gallinas ponedoras se adaptó de un estudio realizado por Brocato y colaboradores (2012). La inmunización se llevó a cabo en cuatro gallinas ponedoras (*Gallus gallus domesticus*, raza Leghorn Brown) de un año de edad, 1,8 kg de peso y clínicamente sanas. Los animales fueron conservados en jaulas de crianza individuales y condiciones de crianza apropiadas. Cada jaula contó con suministro alimenticio especializado para gallinas ponedoras, agua estéril en cantidades suficientes y ambiente climatizado, libre de insectos y otros patógenos con ingreso monitoreado del personal. Todas las inmunizaciones fueron aplicadas por medio de inyección intramuscular en el músculo pectoral. El volumen de cada dosis se dividió en 250 µL para cada lado del pecho de los animales.

Recolección de sangre y huevos de las gallinas inmunizadas

Se realizó la recolección de muestras de huevos en los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 posteriores a la inmunización. Para el procesamiento de las muestras los huevos fueron rotulados con el día y número

de gallina correspondientes. Una vez terminado este proceso fueron almacenados a 4 °C para evaluaciones posteriores. Mientras los huevos fueron recolectados, se tomó muestras de sangre a cada gallina para posterior extracción de suero. Una vez extraído el suero fue almacenado a -20 °C para próximos análisis.

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

Extracción de inmunoglobulinas Y con polietilenglicol

La extracción de las IgY se realizó mediante precipitación con polietilenglicol (PEG) de acuerdo al protocolo descrito por Polson y colaboradores (1980). Se rompió cada huevo, se descartó la clara, se conservó la yema y se transfirió cada yema a un tubo Falcon de 50 mL. Se agregó el doble de PBS del volumen de la yema y se agregó PEG 6000 al 3,5 %. Los tubos se dejaron en un agitador de rodillos para tubos durante 10 min y después se centrifugaron por 20 min a 10000 rpm con una temperatura de 4 °C. Se filtró el sobrenadante y se agregó PEG 6000 al 8,5 %, bajo las mismas condiciones de agitación y posterior centrifugación. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 10 mL de PBS, se agregó PEG 6000 al 12 % agitándose vigorosamente para homogeneizar. Las muestras fueron agitadas y centrifugadas, el precipitado resultante fue resuspendido en 1 mL de PBS. Una vez terminado este proceso las muestras fueron almacenadas a -20 °C.

Cuantificación de inmunoglobulinas Y

Se elaboró una curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA) (*Thermo Scientific*, EE.UU.) con concentraciones conocidas de 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 y 0 mg/mL. En una placa de 96 pocillos de fondo plano (*Thermo Scientific*, EE.UU.) se agregaron 5 µL de las muestras diluidas a una relación de 1:5 en PBS y 200 µL de Reactivo de Bradford. La placa se leyó en un sistema lector de microplacas Synergy HTX (*Biotek Instruments*, EE.UU.) a una longitud de onda de 595 nm.

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se adaptó el protocolo descrito por Engvall & Perlmann, 1971 para el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de las inmunoglobulinas G (IgG). En una placa de 96 pocillos de fondo en *U MaxiSorp* para ELISA (*Thermo Scientific*, EE.UU.) se agregó la proteína recombinante GnGc diluida en tampón de recubrimiento (NaHCO_3 35 mM, Na_2CO_3 15 mM, pH 9,4-9,6) a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se incubó por una noche en cámara húmeda a 4 °C.

Los pocillos recubiertos con las proteínas recombinantes fueron lavados con tampón de lavado (PBS-Tween 0,05 %). Se añadió a cada pocillo 250 μL de solución de bloqueo (leche descremada 3 %, PBS) y se dejó incubar por 1 hora en cámara húmeda a 37 °C. A continuación, se lavó la placa 3 veces y se agregó suero de las gallinas inmunizadas por duplicado, a diferentes diluciones (1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000 y 1:128000) en leche descremada 1 % y PBS-Tween 0,05 %. Se dejó incubar a 37 °C en cámara húmeda durante 2 horas.

Los pocillos se lavaron 3 veces y se agregó anticuerpo secundario anti-IgY conjugado a HRP (leche descremada 1 %, PBS-Tween 0,05 %). La placa se incubó por 1 hora bajo las mismas condiciones y se lavó 4 veces más añadiendo 100 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de *Ultra TMB-ELISA* (*Thermo Scientific*, EE.UU.). Se dejó incubar por 10 min en cámara húmeda y oscuridad. Para detener la reacción se agregó en cada pocillo 50 μL de H_2SO_4 2,5 N. Finalmente, se leyó la placa en un sistema lector de microplacas Synergy HTX (*Biotek Instruments*, EE.UU.) a una longitud de onda de 450 nm.

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

La presencia de la proteína recombinante y las IgY, se evaluó con geles de poliacrilamida al 10 y 12, 5 % respectivamente, con un espesor de 1 mm de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli (1970). En la tabla 1 se describen los reactivos usados para preparar los geles separador y concentrador. Para la electroforesis se utilizó el sistema *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* (*BIO-RAD*, EE.UU.). En los pocillos se

cargaron 1,5 μ L del patrón de peso molecular *RGB Plus Prestained Protein Ladder 10-245 kDa* (*MaestroGen*, EE.UU.) y 20 μ L de muestra. Se agregó tampón de corrida (Tris/HCl 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1 %) y se corrieron las muestras a 100 V durante 90 min. Terminada la electroforesis se dejó el gel incubando 1 hora en Azul de Coomassie R-250, se destiñó el gel con solución de destinción (metanol 20 %, ácido acético 10 %). El gel fue escaneado usando el sistema de imágenes *Odyssey® CLx* (*LI-COR*, EE.UU.).

Tabla 1.

Protocolo de preparación de geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

| | Gel separador 10 % | Gel separador 12,5 % | Gel concentrador |
|--|-----------------------|-------------------------|------------------|
| Agua destilada | 2,5 mL | 2 mL | 1 mL |
| Poliacrilamida (Acrilamida 30 %- Bisacrilamida 0,8 %) | 1,9 mL | 2,4 mL | 300 μ L |
| Tampón separador (Tris-HCl 1,5 M, SDS 10 % a pH 8,8) | 1,5 mL | 1,5 mL | - |
| Tampón concentrador (Tris-HCl 0,5 M, SDS 10 % a pH 6,8) | - | - | 444 μ L |
| Persulfato de amonio (PSA) 10 % | 90 μ L | 90 μ L | 28 μ L |
| Tetrametiletlenodiamina (TEMED) | 4 μ L | 4 μ L | 5 μ L |

Nota. Modificado de Laemmli, 1970

Western Blot

Al terminar la separación de las proteínas recombinantes Gn y Gc por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando un equipo de transferencia semiseco (*BioRad*, EE.UU.) a 0,3 A, 25 V durante 45 min. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con leche descremada al 5 % diluida en TBS a 4 °C durante una noche. A continuación, se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-Histidina de ratón (*Clontech*, EE.UU.) diluido 1:5000 en leche descremada al 5 % en TBS durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación constante. Se realizaron tres lavados con TBS durante 10 min cada uno, la membrana

se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón *AlexaFluor*[®] 680 de cabra (*ThermoFisher Scientific*, EE.UU.) diluido 1:10000 en leche descremada al 5 % en TBS durante 1 hora a temperatura ambiente manteniendo agitación constante. Se realizaron tres lavados con TBS durante 10 min cada uno. La membrana se analizó con el sistema de imágenes *Odyssey* (*LI-COR*, EE.UU.).

Análisis estadístico

Los títulos de los anticuerpos IgY obtenidos mediante ELISA se analizaron analíticamente mediante la prueba de Shapiro Wilks y gráficamente para determinar normalidad y para la homocedasticidad se utilizó el test de Levene e igualmente se realizó el análisis gráfico. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias de Tukey al 5 % con la finalidad de analizar si existieron diferencias significativas entre los títulos obtenidos en diferentes días (0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42).

Capítulo 4

Resultados

Para evaluar el efecto inmunitario del antígeno recombinante Gn y Gc derivado del Hantavirus en gallinas ponedoras se expresó, aisló, purificó y concentró la proteína a partir del clon 11 G1+G2, previamente seleccionado por el Laboratorio de Biofarmacos Recombinantes de la Universidad de Concepción. Se desarrollaron formulaciones con la proteína antigénica obtenida y los adyuvantes completo e incompleto de Freud para inmunizar gallinas ponedoras y recolectar huevos para extraer y concentrar inmunoglobulinas Y. Se determinó la antigenicidad de la proteína recombinante mediante ensayos de ELISA.

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

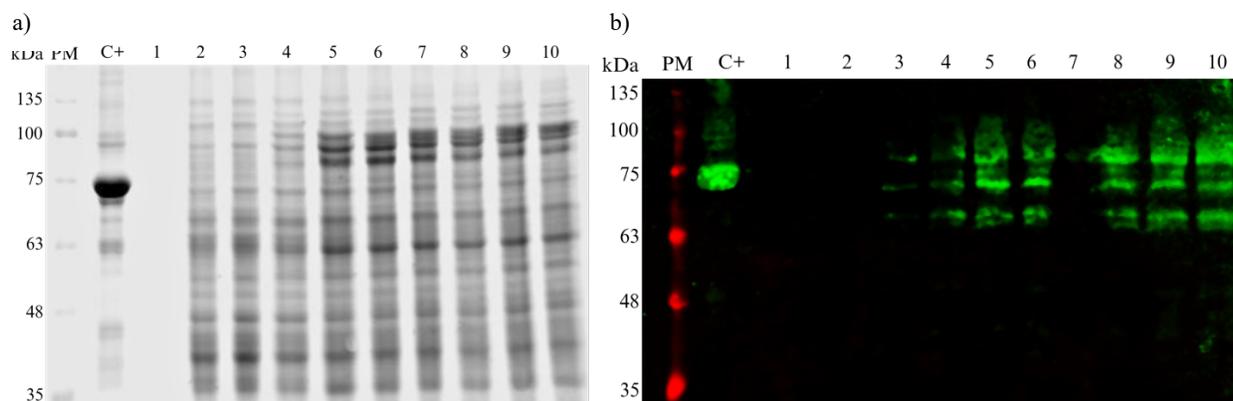
Producción de las proteínas recombinantes Gn y Gc por medio de fermentación de Pichia pastoris transformada

Para la expresión de los antígenos Gn y Gc, se realizó una inducción de 72 horas del clon 11 G1+G2 en un fermentador a escala piloto de 5 L con medio de cultivo salino suplementado con biotina, glicerol, extracto de levadura y vitaminas, la temperatura del proceso fue de 30 °C, el pH de 5,22 y se mantuvo en agitación controlada de 500 rpm. La fermentación se realizó en dos etapas inicialmente, se empleó glicerol como fuente de carbono durante 20 horas y posteriormente se utilizó 0,3 % de metanol para la inducción. La fase de inducción duró 72 horas obteniéndose un incremento de biomasa (peso húmedo) de aproximadamente 150 g/L hasta 211 g/L. Se evaluó la expresión de las proteínas Gn y Gc por medio de SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras teñido con azul de Coomassie y *Western Blot* incubado con el anticuerpo monoclonal anti-Histidina de ratón (*Clontech*, EE.UU.) y con el anticuerpo secundario anti-ratón *AlexaFluor*[®] 680 de cabra (*ThermoFisher Scientific*, EE.UU.). Para evaluar la

expresión de los antígenos recombinantes Gn y Gc se tomó el pellet de fermentación a través del tiempo (0, 8, 16, 24, 36, 40, 48, 64 y 72 horas después de la inducción) y se cargó las muestras a partir del carril número 2, el carril 1 se dejó libre para evitar contaminación de las muestras. Como control positivo del *Western Blot*, se utilizó una proteína con un *tag* de histidinas 6X (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.). En el *Western Blot* se observó a partir del carril número 3 una banda a una altura aproximada de 70 kDa y otra banda a la altura de 55 kDa, correspondientes a los antígenos recombinantes Gn y Gc respectivamente, que se marcan más en función del tiempo de inducción (Figura 4). Al finalizar el proceso de fermentación el pellet resultante se almacenó a -80 °C.

Figura 4.

Evaluación mediante SDS-PAGE al 10 % teñido con azul de Coomassie en condiciones reductoras y Western Blot de la expresión de GnGc en el tiempo



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 (*Clontech*, EE.UU.) y con el anticuerpo secundario anti-ratón *AlexaFluor*[®] 680 de cabra (*ThermoFisher Scientific*, EE.UU.). Carril PM: marcador de peso molecular *RGB Plus Prestained Protein Ladder 10-245 kDa* (*MaestroGen*, EE.UU.), carril C+: control positivo, carril 1: vacío, carril 2: 0 horas, 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:

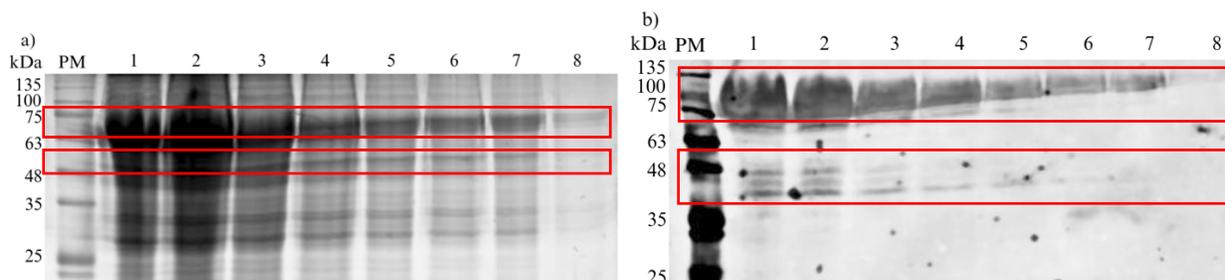
40 horas después de la inducción, carril 8: 48 horas después de la inducción, carril 9: 64 horas después de la inducción, carril 10: 72 horas después de la inducción.

Ruptura de la levadura *Pichia pastoris* en molino de bolas

La biomasa obtenida previamente en la fermentación del clon 11 G1+G2 fue resuspendida en tampón de ruptura. La ruptura de la célula se requirió pues la proteína se expresó de manera insoluble formando cuerpos de inclusión en el citoplasma de la levadura. Se rompieron 10 g/100 mL de levadura en 10 ciclos de ruptura en molino de bolas *DYNO[®]-MILL MULTI LAB* (WAB, EE.UU.). A partir de una fermentación de 5 L se obtuvieron 10 g de biomasa. Se evaluó la expresión de las proteínas recombinantes Gn y Gc mediante SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras teñido con azul de Coomassie y *Western Blot* incubado con el anticuerpo monoclonal anti-Histidina de ratón (*Clontech*, EE.UU.) y con el anticuerpo secundario anti-ratón *AlexaFluor[®] 680* de cabra (*ThermoFisher Scientific*, EE.UU.). En el carril número 1 se cargó la muestra correspondiente a la ruptura celular, desde el carril número 2 hasta el carril 8 se cargaron diluciones seriadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128) de la muestra correspondiente a la ruptura celular. Tanto en el SDS-PAGE como en el *Western Blot* se observaron bandas marcadas a una altura de 75 kDa y 55 kDa respectivamente, lo que confirmó la presencia de las proteínas recombinantes Gn y Gc después de la ruptura celular. Sin embargo en la dilución 1:128 ubicada en el carril número 8 las bandas se observan muy tenues. Para el caso del *Western Blot* las bandas a la altura de 55 kDa no se observan desde el carril número 4 (Figura 5). Al finalizar el proceso de ruptura el pellet resultante se almacenó a -20 °C.

Figura 5.

Evaluación mediante SDS-PAGE al 10 % teñido con azul de Coomassie en condiciones reductoras y Western Blot de la expresión de GnGc tras ruptura celular



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 (*Clontech*, EE.UU.) y con el anticuerpo secundario anti-ratón *AlexaFluor*[®] 680 de cabra (*ThermoFisher Scientific*, EE.UU.). Carril PM: marcador de peso molecular *RGB Plus Prestained Protein Ladder* 10-245 kDa (*MaestroGen*, EE.UU.), 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.

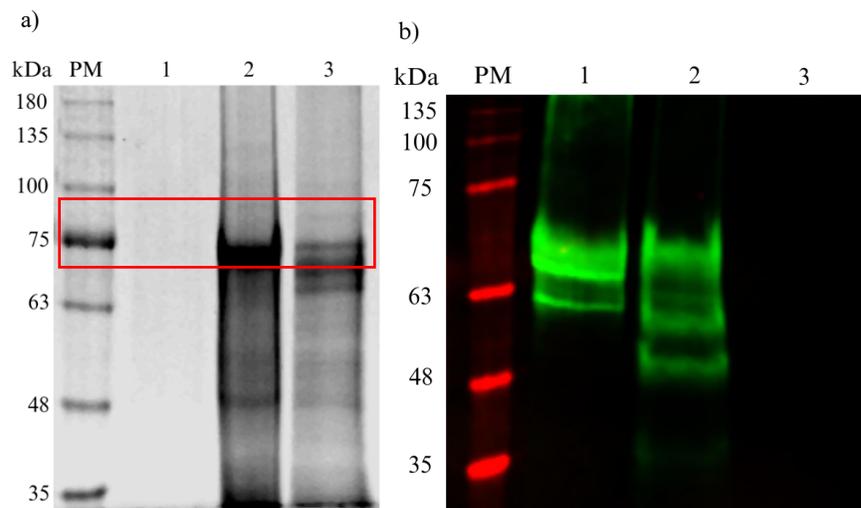
Solubilización de los antígenos recombinantes Gn y Gc

La proteína requiere ser solubilizada para poder ser purificada dado que después de la ruptura se encuentra de manera insoluble y los antígenos recombinantes Gn/Gc no se expresan. Para solubilizar la proteína se tomó el pellet insoluble de la ruptura celular y fue resuspendido en tampón de solubilización que contiene: urea 8 M, β -Mercaptoetanol 10 mM, PMSF 0,1 mM y NaOH 20 mM a un pH de 12. La muestra se centrifugó y el pellet obtenido se resuspendió en PBS. Se determinó la presencia de los antígenos recombinantes en la muestra insoluble, la muestra solubilizada y la muestra inicial proveniente de la ruptura sin solubilizar usando SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras teñido con

azul de Coomassie y *Western Blot* con el anticuerpo monoclonal anti-Histidina de ratón (*Clontech*, EE.UU.) y con el anticuerpo secundario anti-ratón *AlexaFluor*[®] 680 de cabra (*ThermoFisher Scientific*, EE.UU.). En el SDS-PAGE para el carril número 1 que contenía la fracción insoluble de la proteína no se observaron bandas marcadas lo que sugiere que las proteínas no se expresan cuando se encuentran de manera insoluble. Se presentaron bandas marcadas a una altura de 70 kDa en los carriles 2 y 3 correspondientes la muestra solubilizada con 8 M de urea y a la muestra de la ruptura sin solubilizar lo que corresponde al peso molecular del antígeno recombinante Gn. Para el caso de la proteína recombinante Gc no se visualizó con claridad una banda marcada a la altura correspondiente sino varias bandas marcadas a una altura de 35 y 50 kDa. En el *Western Blot* se presentaron bandas marcadas a una altura de 70 kDa en los carriles 1 y 2 correspondientes a la muestra de la ruptura sin solubilizar y la muestra solubilizada con 8 M de urea respectivamente lo que corresponde al peso molecular del antígeno recombinante Gn. Para el carril número 3 que contenía la fracción insoluble de la proteína no se observaron bandas marcadas lo que sugiere que las proteínas no se expresan cuando se encuentran de manera insoluble. En el caso del antígeno recombinante Gn se observó una banda a la altura de 50 kDa en el carril número 2 correspondiente a la muestra solubilizada con 8 M de urea.

Figura 6.

Evaluación mediante SDS-PAGE al 10 % teñido con azul de Coomassie en condiciones reductoras y Western Blot de la expresión de GnGc tras solubilización



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

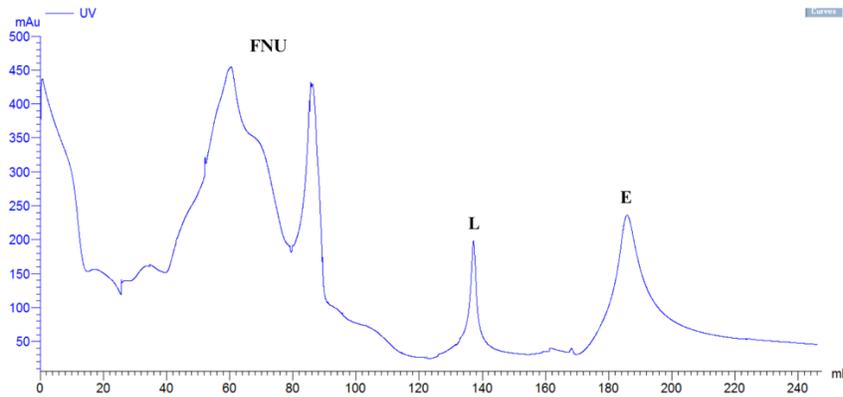
Purificación de los antígenos recombinantes Gn y Gc mediante IMAC

Una vez obtenida la fracción soluble mediante la solubilización de las proteínas recombinantes Gn y Gc se procedió a purificarlas. El proceso se realizó por medio de cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC) en una columna que contenía una matriz *Chelating Sepharose Fast Flow*

cargada con níquel. El cromatograma obtenido de la purificación se midió a una absorbancia de 280 nm. Cada pico que se observó en el cromatograma fue directamente proporcional a la cantidad de proteína que se encuentra en cada fracción (no unida, lavado y eluido). La fracción no unida presentó una absorbancia mayor (450 mAu) que la fracción de lavado (200 mAu) y la eluida (230 mAu) (Figura 7). Se recolectó cada una de las fracciones obtenidas en la purificación y se evaluó la expresión de los antígenos proteicos por medio de SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras teñido con azul de Coomassie y *Western Blot* con el anticuerpo monoclonal anti-Histidina de ratón (*Clontech*, EE.UU.) y con el anticuerpo secundario anti-ratón *AlexaFluor*[®] 680 de cabra (*ThermoFisher Scientific*, EE.UU.). La expresión de las proteínas recombinantes Gn y Gc se analizó en cada una de las fracciones (carril 1: fracción no unida, carril 2: lavado y carril 3: eluido). Tanto en el SDS-PAGE como en el *Western Blot* se presentaron bandas marcadas a una altura de 70 kDa en los carriles 1, 2, 3 y 4 correspondientes a la muestra solubilizada con 8M de urea, fracción no unida, lavado y eluido respectivamente lo que corresponde al peso molecular del antígeno recombinante Gn. Para el caso de la proteína recombinante Gc en el SDS-PAGE se visualizaron varias bandas marcadas a una altura de 35, 48 y 50 kDa en los carriles 1 y 2 mientras que en los carriles 3 y 4 las bandas marcadas corresponden a una altura de 50 kDa. En el *Western Blot* no se observaron bandas por debajo de los 70 kDa (Figura 8).

Figura 7.

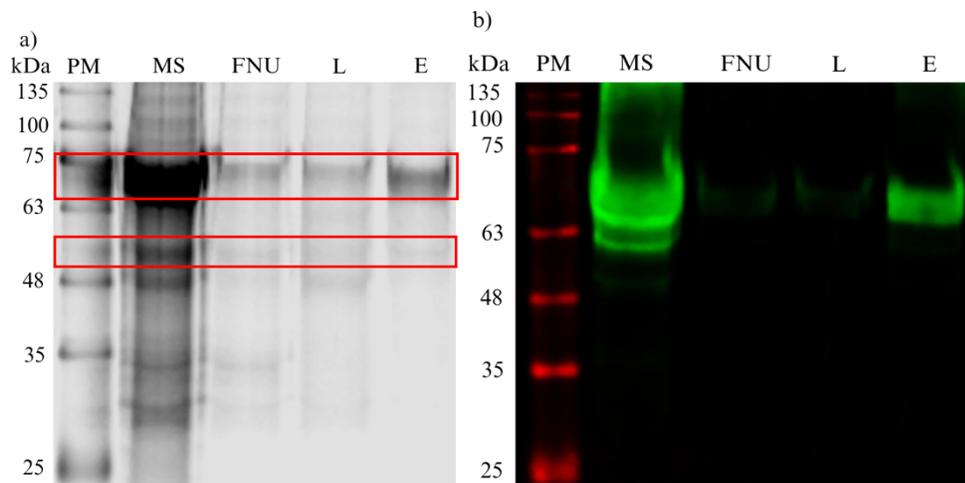
Cromatograma de purificación de la proteína recombinante GnGc



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.

Figura 8.

Evaluación mediante SDS-PAGE al 10 % teñido con azul de Coomassie en condiciones reductoras y Western Blot de la proteína recombinante GnGc purificada



Nota. a) SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie en condiciones reductoras. b) *Western Blot* con el anticuerpo monoclonal anti-Histidina de ratón (*Clontech*, EE.UU.) y con el anticuerpo secundario anti-

ratón *AlexaFluor*[®] 680 de cabra (*ThermoFisher Scientific*, EE.UU.). Carril PM: marcador de peso molecular *RGB Plus Prestained Protein Ladder* 10-245 kDa (*MaestroGen*, EE.UU.), carril 1: muestra soluble, carril 2: fracción no unida, carril 3: lavado, carril 4: eluido.

Replegamiento y Concentración de los antígenos recombinantes Gn y Gc mediante un sistema de diafiltración

Los antígenos recombinantes Gn y Gc purificados que se recolectaron en la fracción de elución durante el proceso de purificación fueron replegados usando el sistema de diafiltración Amicon (*Merck*, Alemania) conectado a una bomba peristáltica (*SyringePump*, EE.UU.) e incorporado a una plancha de agitación (*ThermoFisher Scientific*, EE.UU.). Se pasó tampón de replegamiento y tampón de inmunización a un flujo constante de 0,3 mL/min al finalizar se recuperó la muestra retenida en tampón de inmunización. El proceso de replegamiento de los antígenos recombinantes Gn y Gc a partir de la elución resultante en la purificación se repitió 3 veces obteniéndose un volumen aproximado de 13 mL en cada replegamiento.

Para la concentración de las proteínas se utilizó el mismo sistema de diafiltración Amicon (*Merck*, Alemania) incorporado a una plancha de agitación (*BioStir*[®], EE.UU.) y conectado a un tanque de nitrógeno gaseoso. Se pasó el nitrógeno a un flujo constante de 0,3 mL/min para obtener un volumen final de la muestra concentrada de 2 mL. El proceso se repitió para cada muestra que se replegó anteriormente. Para la evaluación del replegamiento y concentración de las proteínas recombinantes se utilizó SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras teñido con azul de Coomassie y *Western Blot* con el anticuerpo monoclonal anti-Histidina de ratón (*Clontech*, EE.UU.) y con el anticuerpo secundario anti-ratón *AlexaFluor*[®] 680 de cabra (*ThermoFisher Scientific*, EE.UU.). Se observaron bandas a una altura de 70 kDa lo que corresponde al peso molecular de la proteína recombinante Gn. Para el caso del antígeno recombinante Gc en el SDS-PAGE se visualizaron varias bandas marcadas tenuemente a una altura entre

48 y 63 kDa en los carriles 2, 3, 5 y 7 mientras que en los carriles 1 y 4 no existieron bandas por debajo de 70 kDa. En el *Western Blot* se presentaron bandas marcadas a una altura de 55 kDa en los carriles 5 y 7, bandas marcadas tenuemente a la misma altura en los carriles 2, 3, 4 y 6 mientras que, en el carril número 1 no se marcaron bandas debajo de 70 kDa (Figura 9). Finalmente se realizó la cuantificación de los antígenos recombinantes concentrados por medio de la técnica de BCA donde fue elaborada una curva estándar con concentraciones conocidas de BSA (Figura 10). A partir de la curva de calibración se obtuvo mediante regresión lineal la siguiente ecuación:

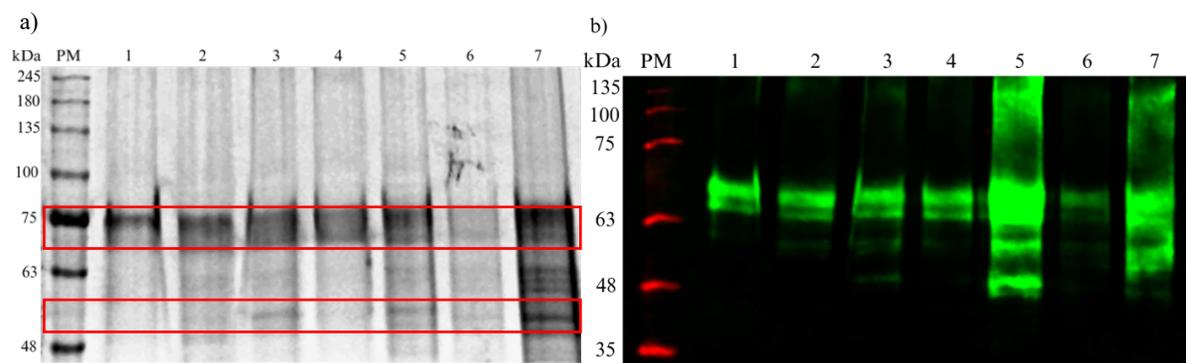
$$y = 0,4260x + 0,02110$$

donde, y representó a la absorbancia y x correspondió a la concentración de las proteínas recombinantes Gn y Gc en mg/mL, con un coeficiente de determinación igual a $R^2 = 0,9604$.

En la tabla 2 se muestran el volumen y la concentración obtenidos para cada muestra del replegamiento que fue concentrada.

Figura 9.

Evaluación mediante SDS-PAGE al 10 % teñido con azul de Coomassie en condiciones reductoras y Western Blot de la proteína recombinante GnGc tras replegamiento y concentración

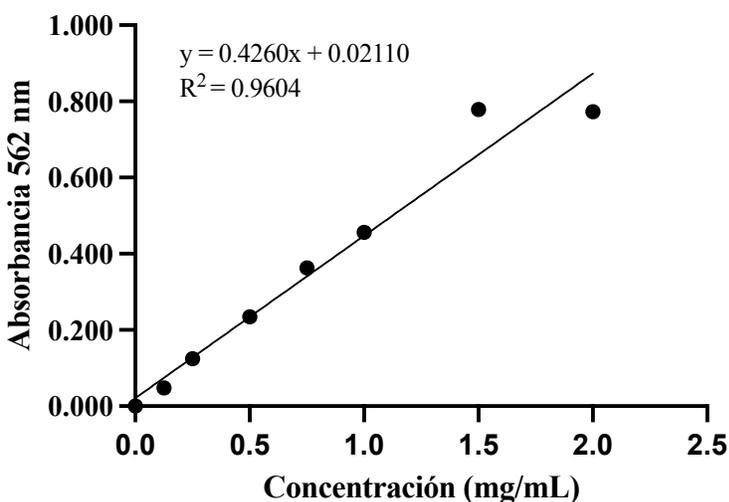


Nota. a) SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie en condiciones reductoras. b) *Western Blot* con el anticuerpo monoclonal anti-Histidina de ratón (*Clontech*, EE.UU.) y con el anticuerpo secundario anti-

ratón *AlexaFluor*[®] 680 de cabra (*ThermoFisher Scientific*, EE.UU.). Carril PM: marcador de peso molecular *RGB Plus Prestained Protein Ladder* 10-245 kDa (*MaestroGen*, EE.UU.), carril 1: muestra eluida, carril 2: replegamiento 1, carril 3: concentración del replegamiento 1, carril 4: replegamiento 2, carril 5: concentración del replegamiento 2, carril 6: replegamiento 3, carril 7: concentración del replegamiento 3.

Figura 10.

Curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) para cuantificar la concentración del replegamiento de los antígenos recombinantes Gn y Gc por medio de la técnica de BCA



Nota. Para cada replegamiento concentrado se realizó una curva estándar diferente.

Tabla 2.

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

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

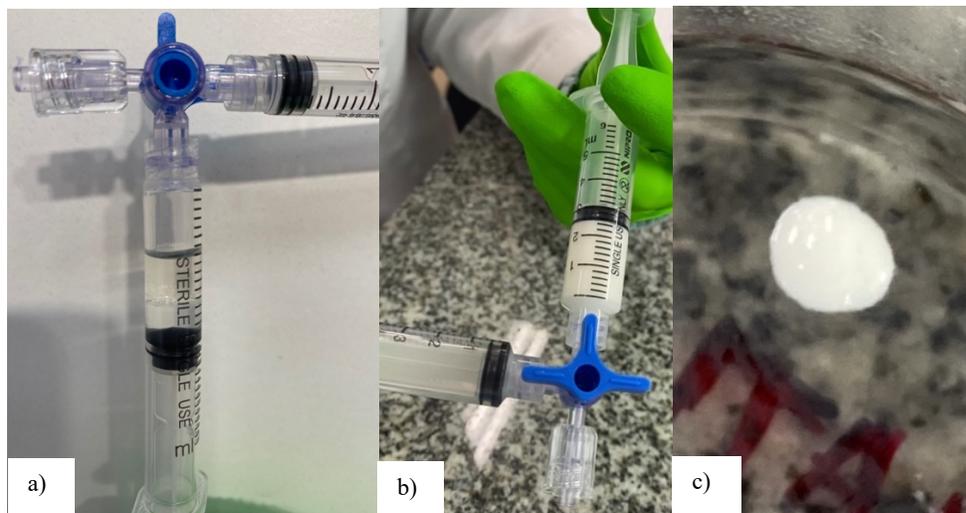
Inmunización de gallinas ponedoras (*Gallus gallus domesticus*) con los antígenos recombinantes purificados para recolección de sangre y huevos

Preparación de formulaciones antigénicas para la inmunización de las gallinas

Se preparó una formulación con los antígenos recombinantes Gn y Gc obtenidos anteriormente y con los adyuvantes completo e incompleto de Freund que permiten incrementar la potencia, modular y mantener la respuesta inmunológica contra las proteínas Gn y Gc. Las formulaciones se prepararon para inmunizar a cuatro gallinas ponedoras. Para la primera formulación se utilizaron los antígenos recombinantes Gn y Gc con el adyuvante completo de Freund (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.) y se realizaron refuerzos del antígeno con el adyuvante incompleto de Freund (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.) cada 2 semanas. Para las formulaciones se preparó una emulsión de agua en aceite (50:50) (Figura 11 a) y se homogenizó hasta obtener una emulsión cremosa (Figura 11 b) que se verificó al colocar una gota en un vaso de precipitación con agua y mantuvo su forma durante el tiempo (Figura 11 c). La primera formulación se realizó con 100 μg de los antígenos recombinantes para cada gallina por otro lado, las dosis de refuerzo fueron formuladas con 50 μg de las proteínas Gn y Gc.

Figura 11.

Formulaciones antigénicas desarrolladas para obtener IgY contra los antígenos recombinantes Gn y Gc



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.

Immunización de gallinas ponedoras con las proteínas antigénicas Gn y Gc desarrolladas

La inmunización se realizó en cuatro gallinas ponedoras de la raza Leghorn Brown clínicamente sanas (Figura 12 a). Todas las inmunizaciones fueron realizadas por medio de inyección intramuscular en el pecho de cada animal. Cada gallina recibió una dosis de 250 μ L a cada lado del músculo pectoral al mismo momento (Figura 12 b).

Al administrar las formulaciones, las gallinas fueron supervisadas para evaluar si presentaban alguna alteración en la zona de inyección, algún efecto visible que afectara su comportamiento o algún cambio físico. Los resultados de esta evaluación demostraron que las formulaciones no provocaron alteraciones cutáneas, ni cambios del aspecto físico ni el comportamiento. Sin embargo, a partir del día 7 la gallina número 4 dejó de poner huevos.

Figura 12.*Inmunización de gallinas ponedoras*

Nota. a) *Gallus gallus domesticus*, raza Leghorn Brown de un año de edad y 1,8 kg de peso en jaulas de crianza individuales. b) Aplicación de inmunizaciones por vía intramuscular.

Recolección de sangre y huevos de las gallinas inmunizadas

Se recolectaron muestras de sangre y huevos cada semana desde el día 0 hasta el día 42. Los huevos que fueron recolectados se usaron posteriormente para extraer IgY de la yema mediante precipitación con polietilenglicol 6000 (PEG 6000) y con esos anticuerpos realizar el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Al recolectar los huevos fueron rotulados con el día y el número de gallina respectivamente y almacenados a 4 °C (Figura 13 a). Mientras se realizó el proceso de recolección de huevos, se tomó una muestra de sangre a cada gallina para extracción de suero mediante centrifugación por 15 min y posterior recolección del sobrenadante, el suero obtenido fue almacenado a -20 °C (Figura 13 b), para ser usado posteriormente en el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.

Figura 13.

Muestras recolectadas posterior a la inmunización con las proteínas antigénicas Gn y Gc



Nota. a) Huevos recolectados rotulados con número de gallina y fecha de recolección. b) Suero extraído a partir de las muestras de sangre recolectadas.

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

Extracción de inmunoglobulinas Y mediante precipitación con polietilenglicol

La expresión de las inmunoglobulinas Y extraídas y concentradas se analizó mediante SDS-PAGE al 12,5 % teñido con azul de Coomassie en condiciones reductoras. Las muestras fueron analizadas a los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 posteriores a la inmunización con el antígeno Gn/Gc, en el caso de la gallina número 2 el día 35 después de la inmunización no se evaluó debido a que el animal no puso huevos al igual que la gallina número 4 que solo puso huevos en el día 0. En el SDS-PAGE se observaron bandas a una altura de 65 y 25 kDa lo que corresponde al peso molecular de las cadenas pesadas (H) y las cadenas ligeras (L) de las inmunoglobulinas Y respectivamente (Figura 14). Finalmente se cuantificó la concentración de IgY extraídas de los huevos de las gallinas 1, 2 y 4 a los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 posteriores a la inmunización con el antígeno Gn/Gc mediante precipitación con PEG 6000 por medio de la técnica de Bradford donde se elaboró una curva estándar con concentraciones conocidas de BSA

(Figura 15). A partir de la curva de calibración se obtuvo mediante regresión lineal la siguiente ecuación:

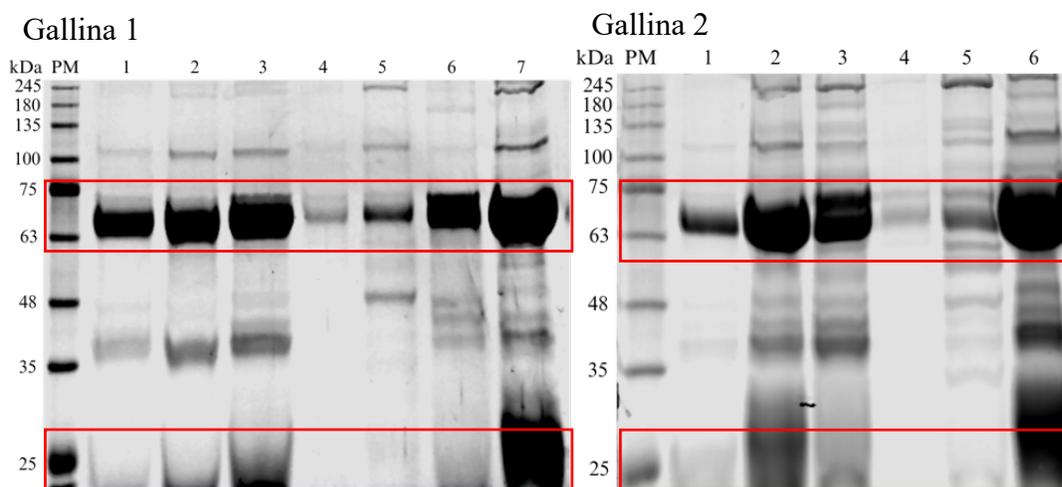
$$y = 0,7084$$

donde, y representó a la absorbancia y x correspondió a la concentración de las proteínas recombinantes Gn y Gc en mg/mL, con un coeficiente de determinación igual a $R^2 = 0,9836$.

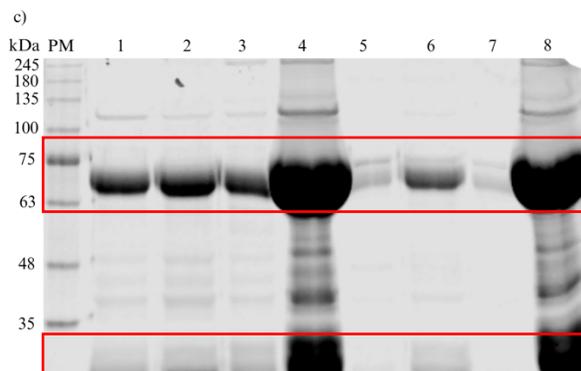
La concentración de las inmunoglobulinas Y totales en los huevos tomados de las gallinas inmunizadas con los antígenos recombinantes Gn y Gc presentaron diferencias significativas en el día 14 donde se observó un aumento en la concentración de IgY y en el día 42 donde la expresión fue mayor para las tres gallinas (Figura 16).

Figura 14.

Evaluación mediante SDS-PAGE al 10 % teñido con azul de Coomassie en condiciones reductoras de la extracción y concentración de inmunoglobulinas Y en las gallinas 1, 2, 3 y 4



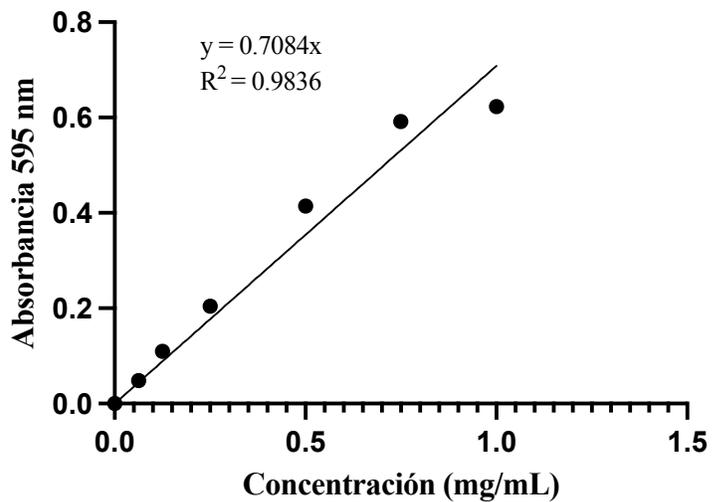
Gallinas 3 y 4



Nota. SDS-PAGE al 12,5 % teñido con azul de Coomassie en condiciones reductoras. a) Gallina 1 Carril PM: marcador de peso molecular *RGB Plus Prestained Protein Ladder* 10-245 kDa (*MaestroGen*, EE.UU.), carril 1: día 0 de inmunización, carril 2: día 7 de inmunización, carril 3: día 14 de inmunización, carril 4: día 21 de inmunización, carril 5: día 28 de inmunización, carril 6: día 35 de inmunización, carril 7: día 42 de inmunización. b) Gallina 2. Carril PM: marcador de peso molecular *RGB Plus Prestained Protein Ladder* 10-245 kDa (*MaestroGen*, EE.UU.), carril 1: día 0 de inmunización, carril 2: día 7 de inmunización, carril 3: día 14 de inmunización, carril 4: día 21 de inmunización, carril 5: día 28 de inmunización, carril 6: día 42 de inmunización. c) Gallinas 3 y 4. Carril PM: marcador de peso molecular *RGB Plus Prestained Protein Ladder* 10-245 kDa (*MaestroGen*, EE.UU.), carril 1: día 0 de inmunización gallina 3, carril 2: día 0 de inmunización gallina 4, carril 3: día 7 de inmunización gallina 3, carril 4: día 14 de inmunización gallina 3, carril 5: día 21 de inmunización gallina 3, carril 6: día 28 de inmunización gallina 3, carril 7: día 35 de inmunización gallina 3, carril 8: día 42 de inmunización gallina 3.

Figura 15.

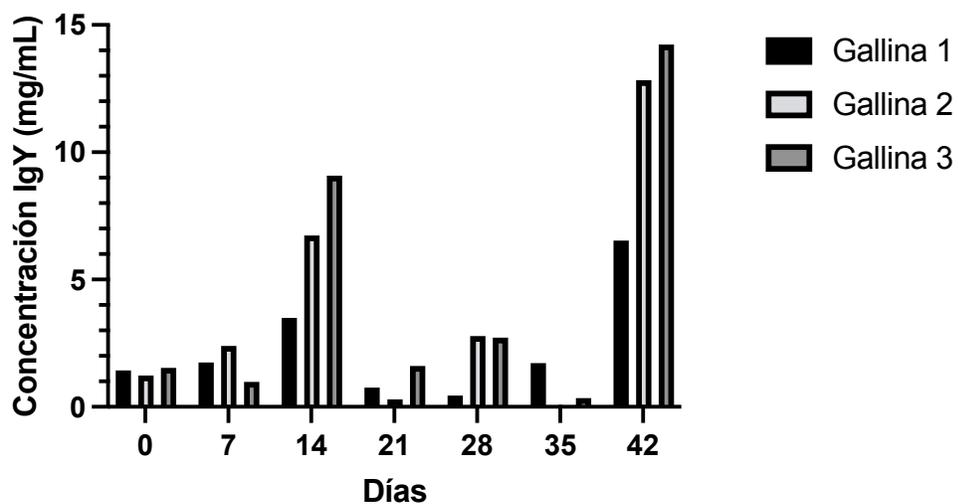
Curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) para cuantificar la concentración de IgY en las muestras de huevos de las gallinas 1, 2 y 3



Nota. Para cada gallina se realizó una curva estándar diferente.

Figura 16.

Concentración de inmunoglobulinas Y totales en las muestras de huevos de las gallinas 1, 2 y 3



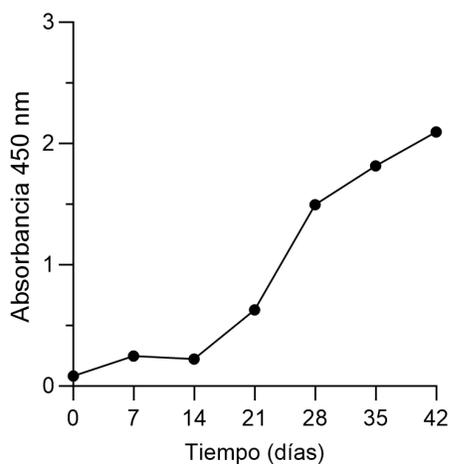
Nota. Concentración de IgY totales extraídas a partir de la yema en los huevos recolectados de tres gallinas ponedoras.

Ensayo de inmun absorción ligado a enzimas (ELISA)

Las inmunoglobulinas Y fueron tituladas por medio de ELISA para lo cuál se fijó el antígeno recombinante Gn/Gc a placas de 96 pocillos de fondo en *U MaxiSorp (Thermo Scientific, EE.UU.)*. Además, se hicieron diluciones seriadas de las muestras de IgY extraídas de suero partiendo de una dilución de 1:1000 hasta 1:512000. Mientras que, para las inmunoglobulinas Y extraídas de la yema de los huevos se partió de una dilución de 1:500 hasta 1:256000. Por medio de un test de comparación de medias de Tukey se evidenció que los títulos de anticuerpos presentaron diferencias significativas entre tratamientos además, el mayor título obtenido tanto en las muestras de suero como en la yema fue 42 días después de realizada la primera inmunización y la dilución máxima a la que se alcanzaron títulos fue 1:256000 (Figura 17 y Figura 18).

Figura 17.

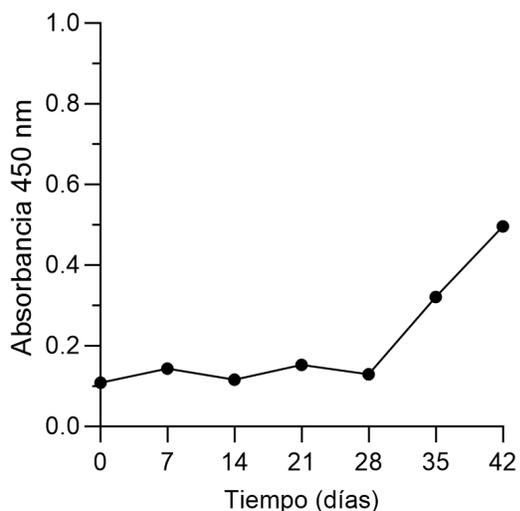
Títulos de inmunoglobulinas Y en suero



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

Figura 18.

Títulos de inmunoglobulinas Y en yema de huevo



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

En base a los resultados descritos anteriormente se logró expresar y aislar las proteínas antigénicas del Hantavirus Gn y Gc a partir del clon 11 G1+G2 con una concentración de entre 1,30 a 1,80 mg/mL. Los antígenos aislados fueron utilizados para realizar formulaciones con el adyuvante completo de Freund y el adyuvante incompleto de Freund para inmunizar a cuatro gallinas ponedoras durante los días (0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42).

Se recolectaron muestras de sangre y huevos para la extracción de inmunoglobulinas Y (IgY). Finalmente, para determinar la antigenicidad de las proteínas aisladas se realizó el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas donde se evaluaron los títulos de anticuerpos obteniendo como resultado que el mayor título se obtuvo luego de 42 días de realizada la inmunización. Resultado favorable que correspondió con la especificidad de los antígenos recombinantes Gn y Gc.

Capítulo 5

Discusión

Las levaduras son células eucariotas con amplio uso en el desarrollo de fármacos y vacunas por su capacidad de expresar proteínas de manera similar a las células de mamíferos, gran velocidad de crecimiento, mejor expresión de proteínas heterólogas, modificaciones postraduccionales, manipulación genética relativamente sencilla y menores costos (Karbalaie et al., 2020). Las vacunas de subunidades recombinantes presentan al menos un tipo de antígeno viral que se puede expresar en sistemas heterólogos siendo más seguras que las vacunas vivas atenuadas y las vacunas inactivadas (M. Wang et al., 2016). En el presente estudio se utilizó la levadura metilotrófica *P. pastoris* para la expresión de una proteína recombinante que se fundamenta en las glicoproteínas de superficie Gn y Gc, utilizadas como antígeno recombinante, del virus Andes causante del SCPH en Sudamérica.

El proceso de producción de proteínas recombinantes independientemente del sistema de expresión que se utilice requiere en una etapa inicial pasar por un proceso de fermentación el cual necesita un control riguroso de condiciones como, concentración de la fuente de carbono, temperatura, pH, agitación y aireación (Graumann & Premstaller, 2006). El uso de *P. pastoris* como sistema de expresión presenta la ventaja de generar altas densidades celulares de aproximadamente 200 g de peso húmedo por litro de fermentación (Kastilan et al., 2017). *P. pastoris* tiene el promotor de la alcohol oxidasa (AOX1) que al ser inducido por metanol puede incrementar la fracción soluble de la proteína hasta el 30 % (P. Li et al., 2007). La fase de inducción con metanol desarrollada en este estudio duró 72 horas (figura 4) obteniéndose una densidad celular desde aproximadamente 150 g/L hasta 211 g/L lo que concuerda con lo descrito en la bibliografía (Kastilan et al., 2017; P. Li et al., 2007). Una investigación de proteínas recombinantes producidas en *P. pastoris* desarrollado por Öberg y colaboradores (2011) señalan que las proteínas solubles que se expresan y se purifican a partir de esta levadura tienen rendimientos elevados

de entre 3 a 6 g/L. Esto indica una aproximación acertada con lo obtenido en la experimentación puesto que el rendimiento que presentó la expresión de los antígenos recombinantes Gn y Gc fue de 2 g de antígeno por L de fermentación (2 g/L).

Otra de las ventajas de usar a *P. pastoris* como sistema de expresión de proteínas recombinantes es la secreción de la proteína al exterior de la célula (Karbalaeei et al., 2020) sin embargo, tras realizar el proceso de fermentación se observó que las proteínas no habían sido secretadas hacia el medio de cultivo, sino que se encontraban al interior de la célula formando cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión son conglomerados de proteínas que se expresan a partir de genes extraños que no han tenido correctas modificaciones postraduccionales ni plegamiento (Bhatwa et al., 2021). Estas moléculas se localizan principalmente en el citoplasma de las células y su alta densidad permite que se puedan separar de manera sencilla mediante lisis celular (Kumar, 2011). La ruptura celular con molino de bolas es uno de los métodos mecánicos más comunes, el choque entre las células y las perlas que conforman al equipo produce una tensión lo suficientemente fuerte como para romper la pared celular de la levadura (Ho et al., 2008). Por tal motivo en este estudio se decidió pasar por un proceso de ruptura mecánica a la biomasa obtenida durante la fermentación de *P. pastoris* dando como resultado la fracción insoluble de ruptura de los antígenos proteicos Gn y Gc.

Aproximadamente el 70 % de las proteínas recombinantes se expresan como cuerpos de inclusión por lo que requieren ser solubilizadas antes de purificarse por medio de cromatografía y después replegarse en una proteína que tenga forma activa (Hadj Sassi et al., 2017). En este estudio para solubilizar los antígenos recombinantes Gn y Gc se tomó el pellet insoluble proveniente de la ruptura y se resuspendió en tampón de solubilización a continuación se confirmó la expresión de las proteínas recombinantes mediante SDS-PAGE y *Western Blot* por lo que el proceso de solubilización fue adecuado.

El pellet resultante del proceso de ruptura en molino de bolas aún posee gran cantidad de impurezas como la pared celular, membrana plasmática, ADN, ARN, proteínas unidas a la membrana y

demás restos celulares (García-Fruitós, 2010). Esto se evidenció al evaluar mediante SDS-PAGE la expresión de los antígenos Gn y Gc tras la ruptura celular (Figura 5). Por lo que el siguiente paso para la producción de proteínas recombinantes incluye un proceso de purificación de la fracción soluble recuperada de la solubilización (Ryan et al., 2023). Una técnica que se utiliza comúnmente para realizar la purificación de proteínas recombinantes que tienen un *tag* de histidinas 6X, es la cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados, donde las proteínas que tienen este *tag* permanecen retenidas en la matriz de la columna (Bornhorst & Falke, 2000). En este estudio los antígenos recombinantes Gn y Gc fueron diseñados con un *tag* de histidina se obtuvo un cromatograma medido a una absorbancia de 280 nm (figura 7). La tecnología de cromatografía de afinidad por metales inmovilizados puede obtener porcentajes de pureza entre 40 a 90 %, en este estudio el porcentaje de pureza de los antígenos recombinantes después de la purificación en IMAC fue del 71% lo cual corresponde con lo descrito por los autores (Alsaadi et al., 2023; Carratalá et al., 2023; Haridhasapavalan et al., 2022).

Como se mencionó anteriormente, previo a utilizar las proteínas recombinantes como fármacos terapéuticos es necesario que se encuentren biológicamente activas, cuando se forman cuerpos de inclusión en el sistema de expresión el plegamiento de las proteínas no resulta adecuado (Yamaguchi & Miyazaki, 2014). Por tal razón en esta investigación se decidió replegar la proteína y además concentrarla mediante un sistema de diafiltración dando como resultado las concentraciones y volúmenes descritos en la tabla 2.

A partir de la fermentación, ruptura, solubilización, purificación, replegamiento y concentración de los antígenos recombinantes Gn y Gc con su respectiva evaluación de la expresión proteica en cada etapa, se procedió a elaborar formulaciones con los antígenos recombinantes para inmunizar gallinas ponedoras.

Con la finalidad de producir inmunoglobulinas Y específicas contra un antígeno diana se puede inmunizar gallinas ponedoras y la respuesta inmune que se produce depende principalmente de los

siguientes factores: dosis del antígeno, adyuvante con el que se realizan las formulaciones, la vía por la cuál se administra el antígeno, el intervalo de tiempo entre cada inmunización y las condiciones propias de las gallinas (edad, raza, peso, capacidad de puesta de huevos) (Schade et al., 2005). En base a ello en el estudio se decidió inmunizar a cuatro gallinas ponedoras de la raza Leghorn Brown, de un año de edad, 1,8 kg de peso, sanas y en condiciones de crianza apropiadas.

Estudios realizados por (Camenisch et al., 1999; Tini et al., 2002) señalan que la dosis de antígeno proteico adecuada para administrar a los animales es de entre 10 a 100 μg . En la presente investigación se inmunizó a cada gallina con una dosis inicial de 100 μg de la proteína recombinante y para los refuerzos se utilizó la mitad de la dosis, es decir 50 μg del antígeno. La mejor vía para inyectar el antígeno es intramuscular en el músculo pectoral puesto que al inyectar en las patas puede provocar cojera (Schade et al., 2005). En este estudio el volumen que se administró a cada gallina fue de 250 μL de la formulación a cada lado del músculo pectoral por vía intramuscular de tal modo que se genere el menor estrés para el animal.

Cada una de las cuatro gallinas utilizadas en este estudio fueron conservadas en jaulas de crianza individuales, con suministro alimenticio especializado, agua estéril y ambiente climatizado. Sin embargo, llama la atención que la gallina número cuatro no puso huevos después de la primera inmunización. El ciclo de puesta en alta producción de las gallinas ponedoras dura aproximadamente 20 semanas a partir de las 50 semanas empieza a disminuir de manera gradual (S. Wang et al., 2019). Además la puesta de huevos en las gallinas ponedoras se ve influenciada por una mezcla de factores genéticos, endocrinos y ambientales (Du et al., 2020). El ciclo de postura en el que se encontraba la gallina número 4, factores endocrinos, ambientales y genéticos son una posible causa para que no pusiera huevos a partir de la inmunización y no existe evidencia en la bibliografía que indique que el antígeno suministrado puede ser una posible causa de este hecho.

El sistema inmunológico de las aves está formado por órganos linfoides primarios y secundarios, los órganos primarios incluyen al timo y la bolsa de Fabricio mientras que, los órganos secundarios son el bazo, la médula ósea, glándula de Harder, entre otros (Chalghoumi et al., 2009). El uso de antígenos proteicos estimula al sistema inmune para producir anticuerpos contra esas moléculas, esto se evidenció durante la experimentación puesto que se pudo extraer a partir del huevo de las gallinas los anticuerpos IgY cuya expresión se evaluó en SDS-PAGE observándose las cadenas pesadas y ligeras que conforman las inmunoglobulinas Y (figura 14).

Existen varios métodos para extraer y purificar IgY a partir de la yema del huevo de gallinas ponedoras (extracción con ácido caprílico, PEG y propanol-acetona), en su mayoría estos métodos se basan en el uso de polietilenglicol para precipitar los anticuerpos y además, eliminar la mayor parte de las lipoproteínas para conseguir una fracción hidrosoluble donde se encuentran IgY concentradas (De Meulenaer & Huyghebaert, 2001). Según (Amro et al., 2018; Redwan et al., 2021) la extracción de inmunoglobulinas Y con PEG 6000 resulta un proceso con altos rendimientos y bajos costos, los autores estiman que la concentración de IgY totales usando esta técnica de purificación es de entre 3 a 25 mg/mL. En el presente estudio la concentración de IgY que se obtuvo en tres gallinas inmunizadas con los antígenos recombinantes Gn y Gc se encuentra entre 7 y 14 mg/mL después de 42 días de inmunización (figura 17).

Las inmunoglobulinas Y obtenidas a partir del suero y la yema del huevo de tres gallinas ponedoras inmunizadas con los antígenos recombinantes Gn y Gc dieron títulos a una dilución de 1:256000 42 días después de realizada la primera inmunización. De acuerdo a Gutiérrez y colaboradores (2010) las gallinas ponedoras después de ser inmunizadas pueden obtener títulos altos de hasta 1:1000000 a partir de la tercera o cuarta inmunización de refuerzo. En este estudio se realizaron únicamente dos inmunizaciones de refuerzo sin embargo, el título obtenido en la experimentación es aproximado a lo que se esperaría después de aplicar dos refuerzos a las gallinas.

La obtención de inmunoglobulinas IgY específicas contra las glicoproteínas recombinantes Gn y Gc se presenta como un posible método terapéutico para el Hantavirus causante del SCPH en Sudamérica. Los anticuerpos obtenidos en el presente estudio pueden utilizarse en análisis posteriores para tratar al hámster sirio, el modelo animal de la enfermedad y en un futuro ser un método efectivo de tratamiento del virus.

Capítulo 6

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.

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.

Capítulo 7

Referencias

- Abbas, A. T., El-Kafrawy, S. A., Sohrab, S. S., & Azhar, E. I. A. (2019). IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *15*(1), 264. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1514224>
- Agurto-Arteaga, A., Poma-Acevedo, A., Rios-Matos, D., Choque-Guevara, R., Montesinos-Millán, R., Montalván, A., Isasi-Rivas, G., Cauna-Orocollo, Y., Cauti-Mendoza, M. de G., Pérez-Martínez, N., Gutierrez-Manchay, K., Ramirez-Ortiz, I., Núñez-Fernández, D., Salgado-Bohorquez, M. I., Quiñones-García, S., Fernández Díaz, M., Guevara Sarmiento, L. A., & Zimic, M. (2022). Preclinical Assessment of IgY Antibodies Against Recombinant SARS-CoV-2 RBD Protein for Prophylaxis and Post-Infection Treatment of COVID-19. *Frontiers in Immunology*, *13*, 881604. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.881604/BIBTEX>
- Akram, S. M., Mangat, R., & Huang, B. (2023). Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459378/>
- Alsaadi, E., Algezi, D., & Jones, I. (2023). Expression and purification of MERS-CoV envelope protein, an essential viroporin, using the baculovirus expression system. *Iranian Journal of Microbiology*, *15*(1), 121. <https://doi.org/10.18502/IJM.V15I1.11926>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.JGEB.2017.10.003>
- Aston, E. J., Wallach, M. G., Narayanan, A., Egaña-Labrin, S., & Gallardo, R. A. (2022). Hyperimmunized Chickens Produce Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2. *Viruses*, *14*(7). <https://doi.org/10.3390/V14071510>

- Avšič-Županc, T., Saksida, A., & Korva, M. (2019). Hantavirus infections. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21S, e6–e16. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12291>
- Barry, P., Marthas, M., Lerche, N., McChesney, M. B., & Miller, C. J. (2005). Virology Research. *The Laboratory Primate*, 561–578. <https://doi.org/10.1016/B978-012080261-6/50034-9>
- 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>
- Bellomo, C. M., Alonso, D. O., Pérez-Sautu, U., Prieto, K., Kehl, S., Coelho, R. M., Periolo, N., Paola, N. Di, Ferressini-Gerpe, N., Kuhn, J. H., Sanchez-Lockhart, M., Palacios, G., & Martínez, V. P. (2023). Andes Virus Genome Mutations That Are Likely Associated with Animal Model Attenuation and Human Person-to-Person Transmission. *MSphere*, 8(3). <https://doi.org/10.1128/MSPHERE.00018-23>
- Beltrán-Ortiz, C. E., Starck-Mendez, M. F., Fernández, Y., Farnós, O., González, E. E., Rivas, C. I., Camacho, F., Zuñiga, F. A., Toledo, J. R., & Sánchez, O. (2017). Expression and purification of the surface proteins from Andes virus. *Protein Expression and Purification*, 139, 63–70. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2015.09.013>
- Bhatwa, A., Wang, W., Hassan, Y. I., Abraham, N., Li, X. Z., & Zhou, T. (2021). Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.630551>
- Bi, Z., Formenty, P. B. H., & Roth, C. E. (2008). Hantavirus infection: a review and global update. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2(1), 3–23. <https://doi.org/10.3855/JIDC.317>
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). [16] Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods in Enzymology*, 326, 245. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)26058-8)

- 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). <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). <https://doi.org/10.3390/V11070610>
- Camenisch, G., Tini, M., Chilov, D., Kvietikova, I., Srinivas, V., Caro, J., Spielmann, P., Wenger, R. H., & Gassmann, M. (1999). General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1alpha. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(1), 81–88. <https://doi.org/10.1096/FASEBJ.13.1.81>
- Carratalá, J. V., Atienza-Garriga, J., López-Laguna, H., Vázquez, E., Villaverde, A., Sánchez, J. M., & Ferrer-Miralles, N. (2023). Enhanced recombinant protein capture, purity and yield from crude bacterial cell extracts by N-Lauroylsarcosine-assisted affinity chromatography. *Microbial Cell Factories*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/S12934-023-02081-7>
- Chalghoumi, R., Beckers, Y. U. de L.-Ul. > S. agronomiques > Z., Portetelle, D. U. de L.-Ul. > C. et bio-industries > B. animale et microbienne, & Thewis, A. U. de L.-Ul. > S. agronomiques > Z. (2009). Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken : a review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(3). <https://orbi.uliege.be/handle/2268/117115>
- Chang, B., Crowley, M., Campen, M., & Koster, F. (2007). Hantavirus cardiopulmonary syndrome. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 28(2), 193–200. <https://doi.org/10.1055/S-2007-976491>
- Cid, R., & Bolívar, J. (2021). Platforms for Production of Protein-Based Vaccines: From Classical to Next-Generation Strategies. *Biomolecules*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/BIOM11081072>

- 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>
- 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.
<https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2009.12.011>
- D'Souza, M. H., & Patel, T. R. (2020). Biodefense Implications of New-World Hantaviruses. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 565602. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.00925/BIBTEX>
- Du, Y., Liu, L., He, Y., Dou, T., Jia, J., & Ge, C. (2020). Endocrine and genetic factors affecting egg laying performance in chickens: a review. <https://doi.org/10.1080/00071668.2020.1758299>, 61(5), 538–549. <https://doi.org/10.1080/00071668.2020.1758299>
- 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. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1065353>
- Ellis, R. W., Rappuoli, R., & Ahmed, S. (2013). Technologies for making new vaccines. *Vaccines: Sixth Edition*, 1182–1199. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0090-5.00013-6>
- Engdahl, T. B., Binshtein, E., Brocato, R. L., Kuzmina, N. A., Principe, L. M., Kwilas, S. A., Kim, R. K., Chapman, N. S., Porter, M. S., Guardado-Calvo, P., Rey, F. A., Handal, L. S., Diaz, S. M., Zagol-Ikapitte, I. A., Tran, M. H., McDonald, W. H., Meiler, J., Reidy, J. X., Trivette, A., ... Crowe, J. E. (2023). Antigenic mapping and functional characterization of human New World hantavirus neutralizing antibodies. *ELife*, 12. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.81743>
- 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), 109086.

<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)

Ermonval, M., Baychelier, F., & Tordo, N. (2016). What Do We Know about How Hantaviruses Interact with Their Different Hosts? *Viruses*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/V8080223>

Ferré, H., Ruffet, E., Nielsen, L.-L. B., Nissen, M. H., Hobley, T. J., Thomas, O. R. T., & Buus, S. (2005). A novel system for continuous protein refolding and on-line capture by expanded bed adsorption. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 14(8), 2141.

<https://doi.org/10.1110/PS.051396105>

Ferrés, M., Vial, P., Marco, C., Yañez, L., Godoy, P., Castillo, C., Hjelle, B., Delgado, I., Lee, S. J., & Mertz, G. J. (2007). Prospective Evaluation of Household Contacts of Persons with Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome in Chile. *The Journal of Infectious Diseases*, 195(11), 1563–1571.

<https://doi.org/10.1086/516786>

Figueiredo, L. T. M., Souza, W. M. de, Ferrés, M., & Enria, D. A. (2014). Hantaviruses and cardiopulmonary syndrome in South America. *Virus Research*, 187, 43–54.

<https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2014.01.015>

Galeno A., T. M. H., Villagra C., E., Fernandez O., B. Q. J., Ramirez V., B. Q. E., & Mora R., M. V. J. (2000). Técnicas diagnósticas de infección humana por hantavirus. *Revista Chilena de Infectología*, 17(3), 211–215. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182000000300004>

Galeno, H., Mora, J., Villagra, E., Fernandez, J., Hernandez, J., Mertz, G. J., & Ramirez, E. (2002). First Human Isolate of Hantavirus (Andes virus) in the Americas. *Emerging Infectious Diseases*, 8(7), 657.

<https://doi.org/10.3201/EID0807.010277>

García-Fruitós, E. (2010). Inclusion bodies: a new concept. *Microbial Cell Factories*, 9, 80.

<https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-80>

Gavrilovskaya, I. N., Shepley, M., Shaw, R., Ginsberg, M. H., & Mackow, E. R. (1998). β 3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 7074.

<https://doi.org/10.1073/PNAS.95.12.7074>

Gorbunova, E., Gavrilovskaya, I. N., & Mackow, E. R. (2010). Pathogenic Hantaviruses Andes Virus and Hantaan Virus Induce Adherens Junction Disassembly by Directing Vascular Endothelial Cadherin Internalization in Human Endothelial Cells. *Journal of Virology*, 84(14), 7405–7411.

<https://doi.org/10.1128/JVI.00576-10/ASSET/65D9EB6C-69F4-4E31-A60D-B295B2591027/ASSETS/GRAPHIC/ZJV9990934190004.JPEG>

Graumann, K., & Premstaller, A. (2006). Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnology Journal*, 1(2), 164–186. <https://doi.org/10.1002/BIOT.200500051>

Gutiérrez Calzado, E. J., Chacana, P. A., Pauly, D., & Schade, R. (2010). *IgY-technology, the immunization of laying hen and the extraction of antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. Tecnología IgY, la inmunización de gallinas ponedoras y la extracción de anticuerpos de la yema por el método de precipitación con polietilenglicol (PEG).*

Hadj Sassi, A., Trigui-Lahiani, H., Abdeljalil, S., & Gargouri, A. (2017). Enhancement of solubility, purification and inclusion-bodies-refolding of an active pectin lyase from *Penicillium occitanis* expressed in *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 256–262.

<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.11.036>

Haridhasapavalan, K. K., Sundaravadivelu, P. K., Joshi, N., Das, N. J., Mohapatra, A., Voorkara, U., Kaveeshwar, V., & Thummer, R. P. (2022). Generation of a recombinant version of a biologically

- active cell-permeant human HAND2 transcription factor from *E. coli*. *Scientific Reports*, *12*(1), 16129. <https://doi.org/10.1038/S41598-022-19745-W>
- Hepojoki, J., Strandin, T., Lankinen, H., & Vaheri, A. (2012). Hantavirus structure - Molecular interactions behind the scene. *Journal of General Virology*, *93*(8), 1631–1644. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.042218-0/CITE/REFWORKS>
- Ho, C. W., Tan, W. S., Yap, W. B., Ling, T. C., & Tey, B. T. (2008). Comparative evaluation of different cell disruption methods for the release of recombinant hepatitis B core antigen from *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *13*(5), 577–583. <https://doi.org/10.1007/S12257-008-0020-9/METRICS>
- Hooper, J. W., Larsen, T., Custer, D. M., & Schmaljohn, C. S. (2001). A lethal disease model for hantavirus pulmonary syndrome. *Virology*, *289*(1), 6–14. <https://doi.org/10.1006/VIRO.2001.1133>
- Hussein, I. T. M., Haseeb, A., Haque, A., & Mir, M. A. (2011). Recent Advances in Hantavirus Molecular Biology and Disease. *Advances in Applied Microbiology*, *74*, 35. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387022-3.00006-9>
- Jeeva, S., Mir, S., Velasquez, A., Weathers, B. A., Leka, A., Wu, S., Sevarany, A. T., & Mir, M. (2019). Hantavirus RdRp Requires a Host Cell Factor for Cap Snatching. *Journal of Virology*, *93*(5). <https://doi.org/10.1128/JVI.02088-18>
- Jonsson, C. B., Hooper, J., & Mertz, G. (2008). Treatment of hantavirus pulmonary syndrome. *Antiviral Research*, *78*(1), 162. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2007.10.012>
- Karachaliou, C.-E., Vassilakopoulou, V., & Livaniou, E. (2021). IgY technology: Methods for developing and evaluating avian immunoglobulins for the in vitro detection of biomolecules. *World Journal of Methodology*, *11*(5), 243. <https://doi.org/10.5662/WJM.V11.I5.243>

- Karbalaei, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of Cellular Physiology*, 235(9), 5867. <https://doi.org/10.1002/JCP.29583>
- Kastilan, R., Boes, A., Spiegel, H., Voepel, N., Chudobová, I., Hellwig, S., Buyel, J. F., Reimann, A., & Fischer, R. (2017). Improvement of a fermentation process for the production of two PfAMA1-DiCo-based malaria vaccine candidates in *Pichia pastoris*. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11819-4>
- Kell, A. M. (2022). Innate Immunity to Orthohantaviruses: Could Divergent Immune Interactions Explain Host-specific Disease Outcomes? *Journal of Molecular Biology*, 434(6), 167230. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2021.167230>
- Kim, W. K., Cho, S., Lee, S. H., No, J. S., Lee, G. Y., Park, K., Lee, D., Jeong, S. T., & Song, J. W. (2021). Genomic Epidemiology and Active Surveillance to Investigate Outbreaks of Hantaviruses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 532388. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.532388/BIBTEX>
- Koehler, F. C., Di Cristanziano, V., Späth, M. R., Hoyer-Allo, K. J. R., Wanken, M., Müller, R. U., & Burst, V. (2022). The kidney in hantavirus infection—epidemiology, virology, pathophysiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Clinical Kidney Journal*, 15(7), 1231–1252. <https://doi.org/10.1093/CKJ/SFAC008>
- Koonin, E. V., Krupovic, M., & Agol, V. I. (2021). The Baltimore Classification of Viruses 50 Years Later: How Does It Stand in the Light of Virus Evolution? *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*, 85(3). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00053-21>
- Kumar, D. (2011). Protein Refolding/Renaturation. *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, 2, 765–784. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00136-7>

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970 227:5259, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Larsson, A., Bålöw, 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>
- Leiva, C. L., Gallardo, M. J., Casanova, N., Terzolo, H., & Chacana, P. (2020). IgY-technology (egg yolk antibodies) in human medicine: A review of patents and clinical trials. *International Immunopharmacology*, 81, 106269. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2020.106269>
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X. G., Ilangovan, K., Suzara, V. V., Düzgüneş, N., & Renugopalakrishnan, V. (2007). Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142(2), 105–124. <https://doi.org/10.1007/S12010-007-0003-X>
- Li, X., Nakano, T., Sunwoo, H. H., Paek, B. H., Chae, H. S., & Simm, J. S. (1998). Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. *Poultry Science*, 77(2), 266–270. <https://doi.org/10.1093/PS/77.2.266>
- 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>
- López, N., Padula, P., Rossi, C., Miguel, S., Edelstein, A., Ramírez, E., & Franze-Fernández, M. T. (1997). Genetic characterization and phylogeny of Andes virus and variants from Argentina and Chile. *Virus Research*, 50(1), 77–84. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(97\)00053-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(97)00053-1)
- Lupi, O., Tying, S. K., Cosenza, P. P., Motta, R. N., Kouri, G., Guzman, M. G., De Aguiar, F. C., Correa, A. R., de Almeida Ferry, F. R., Boleira, M., & Klotz, L. (2017). Hemorrhagic Fever and Arboviruses. *Tropical Dermatology: Second Edition*, 127–151. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-29634-2.00012-2>

- Mackow, E. R., Dalrymple, N. A., Cimica, V., Matthys, V., Gorbunova, E., & Gavrilovskaya, I. (2014). Hantavirus Interferon Regulation and Virulence Determinants. *Virus Research*, *0*, 65.
<https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2013.12.041>
- MacNeil, A., Nichol, S. T., & Spiropoulou, C. F. (2011). Hantavirus pulmonary syndrome. *Virus Research*, *162*(1–2), 138–147. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2011.09.017>
- Mak, T., Saunders, M., & Jett, B. (2014). Chapter 14 - Vaccination. In T. W. Mak, M. E. Saunders, & B. D. Jett (Eds.), *Primer to the Immune Response (Second Edition)* (pp. 333–375). Academic Cell.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385245-8.00014-5>
- Marcotte, H., & Hammarström, L. (2015). Passive Immunization: Toward Magic Bullets. *Mucosal Immunology*, *2–2*, 1403. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00071-9>
- Marcq, C., Marlier, D., & Beckers, Y. (2015). Improving adjuvant systems for polyclonal egg yolk antibody (IgY) production in laying hens in terms of productivity and animal welfare. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *165*(1–2), 54–63. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2015.02.012>
- 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/SUPPL_FILE/NEJMOA2009040_DISCLOSURES.PDF
- Mattar, S., Guzmán, C., & Figueiredo, L. T. (2015). Diagnosis of hantavirus infection in humans. *https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1047825*, *13*(8), 939–946.
<https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1047825>
- Matthys, V. S., Gorbunova, E. E., Gavrilovskaya, I. N., & Mackow, E. R. (2010). Andes Virus Recognition of Human and Syrian Hamster β 3 Integrins Is Determined by an L33P Substitution in the PSI Domain .

- Journal of Virology*, 84(1), 352–360. <https://doi.org/10.1128/JVI.01013-09/ASSET/81DA3B0E-CBE0-44C0-9C3E-5ACEEB0B813E/ASSETS/GRAPHIC/ZJV0011027490010.JPEG>
- Meier, K., Thorkelsson, S. R., Quemin, E. R. J., & Rosenthal, M. (2021). Hantavirus Replication Cycle—An Updated Structural Virology Perspective. *Viruses*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/V13081561>
- Mir, M. A. (2010). Hantaviruses. *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1), 67. <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. <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>
- Müller, S., Schubert, A., Zajac, J., Dyck, T., & Oelkrug, C. (2015). IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. *Nutrition Journal*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S12937-015-0067-3>
- Muranyi, W., Bahr, U., Zeier, M., & Van Der Woude, F. J. (2005). Hantavirus infection. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(12), 3669–3679. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005050561>
- Muyangwa, M., Martynova, E. V., Khaiboullina, S. F., Morzunov, S. P., & Rizvanov, A. A. (2015). Hantaviral Proteins: Structure, Functions, and Role in Hantavirus Infection. *Frontiers in Microbiology*, 6(NOV), 1326. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.01326>
- Narat, M. (2003). *Production of Antibodies in Chickens*.

- National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. (2023). Monoclonal Antibodies. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]*.
- Öberg, F., Sjöhamn, J., Conner, M. T., Bill, R. M., & Hedfalk, K. (2011). Improving recombinant eukaryotic membrane protein yields in *Pichia pastoris*: The importance of codon optimization and clone selection. *Molecular Membrane Biology*, 28(6), 398–411.
https://doi.org/10.3109/09687688.2011.602219/SUPPL_FILE/IMBC_A_602219_SM0001.DOC
- Olano, J. P., & Walker, D. H. (2009). Agents of Emerging Infectious Diseases. *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases*, 1–20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369408-9.00001-9>
- Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. (2019). *Hantavirus*.
https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14911:hantavirus&Itemid=0&lang=es#gsc.tab=0
- Padula, P., Figueroa, R., Navarrete, M., Pizarro, E., Cadiz, R., Bellomo, C., Jofre, C., Zaror, L., Rodriguez, E., & Murúa, R. (2004). Transmission Study of Andes Hantavirus Infection in Wild Sigmodontine Rodents. *Journal of Virology*, 78(21), 11972. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.21.11972-11979.2004>
- Palmer, I., & Wingfield, P. T. (2004). Preparation and Extraction of Insoluble (Inclusion-Body) Proteins from *Escherichia coli*. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al.]*, CHAPTER(1), Unit. <https://doi.org/10.1002/0471140864.PS0603S38>
- Pantaleo, G., Correia, B., Fenwick, C., Joo, V. S., & Perez, L. (2022). Antibodies to combat viral infections: development strategies and progress. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 21(9), 676.
<https://doi.org/10.1038/S41573-022-00495-3>
- 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. <https://doi.org/10.3791/3084>

- Pérez de la Lastra, J. M., Baca-González, V., Asensio-Calavia, P., González-Acosta, S., & Morales-Delanuez, A. (2020). Can Immunization of Hens Provide Oral-Based Therapeutics against COVID-19? *Vaccines* 2020, Vol. 8, Page 486, 8(3), 486. <https://doi.org/10.3390/VACCINES8030486>
- Pizarro, E., Navarrete, M., Mendez, C., Zaror, L., Mansilla, C., Tapia, M., Carrasco, C., Salazar, P., Murua, R., Padula, P., Otth, C., & Rodríguez, E. M. (2019). Immunocytochemical and Ultrastructural Evidence Supporting That Andes Hantavirus (ANDV) Is Transmitted Person-to-Person Through the Respiratory and/or Salivary Pathways. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02992>
- Pollet, J., Chen, W. H., & Strych, U. (2021). Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 170, 71. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2021.01.001>
- Polop, F. J., Provensal, M. C., Pini, N., Levis, S. C., Priotto, J. W., Enría, D., Calderón, G. E., Costa, F., & Polop, J. J. (2010). Temporal and spatial host abundance and prevalence of Andes hantavirus in Southern Argentina. *EcoHealth*, 7(2), 176–184. <https://doi.org/10.1007/S10393-010-0333-Y/METRICS>
- 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>
- Prescott, J., Debuysscher, B. L., Brown, K. S., & Feldmann, H. (2014). Long-Term Single-Dose Efficacy of a Vesicular Stomatitis Virus-Based Andes Virus Vaccine in Syrian Hamsters. *Viruses* 2014, Vol. 6, Pages 516-523, 6(2), 516–523. <https://doi.org/10.3390/V6020516>
- Ray, N., Whidby, J., Stewart, S., Hooper, J. W., & Bertolotti-Ciarlet, A. (2010). Study of Andes virus entry and neutralization using a pseudovirion system. *Journal of Virological Methods*, 163(2), 416–423. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2009.11.004>

- Redwan, E. M., Aljadawi, A. A., & Uversky, V. N. (2021). Simple and efficient protocol for immunoglobulin Y purification from chicken egg yolk. *Poultry Science*, *100*(3), 100956.
<https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2020.12.053>
- Rissanen, I., Stass, R., Zeltina, A., Li, S., Hepojoki, J., Harlos, K., Gilbert, R. J. C., Huiskonen, J. T., & Bowden, T. A. (2017). Structural Transitions of the Conserved and Metastable Hantaviral Glycoprotein Envelope. *Journal of Virology*, *91*(21). <https://doi.org/10.1128/JVI.00378-17>
- Ryan, B. J., Kinsella, G. K., & Henehan, G. T. (2023). Protein Extraction and Purification by Differential Solubilization. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *2699*, 349–368.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3362-5_17
- 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>
- Schmaljohn, C. (2009). Vaccines for hantaviruses. *Vaccine*, *27*(SUPPL. 4), D61–D64.
<https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2009.07.096>
- Schmidt, F. R. (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*(4), 363–372. <https://doi.org/10.1007/S00253-004-1656-9/TABLES/3>
- Serris, A., Stass, R., Bignon, E. A., Muena, 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.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.08.023>
- Sethuraman, N., & Stadheim, T. A. (2006). Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*, *17*(4), 341–346. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2006.06.010>

- Slifka, M. K., & Amanna, I. J. (2018). Passive Immunization. *Plotkin's Vaccines*, 84.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35761-6.00008-0>
- Slough, M. M., Herbert, A. S., Kuehne, A. I., Dye, J. M., Chandran, K., & Jangra, R. K. (2020). Mapping the Interface between New World Hantaviruses and Their Receptor, PCDH1. *Proceedings 2020, Vol. 50, Page 8, 50(1)*, 8. <https://doi.org/10.3390/PROCEEDINGS2020050008>
- Tini, M., Jewell, U. R., Camenisch, G., Chilov, D., & Gassmann, M. (2002). Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 131(3), 569–574. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00508-6](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00508-6)
- Tolner, B., Smith, L., Begent, R. H. J., & Chester, K. A. (2006). Production of recombinant protein in *Pichia pastoris* by fermentation. *Nature Protocols*, 1(2), 1006–1021.
<https://doi.org/10.1038/NPROT.2006.126>
- Torres-Pérez, F., Palma, R. E., Hjelle, B., Ferrés, M., & Cook, J. A. (2010). Andes virus infections in the rodent reservoir and in humans vary across contrasting landscapes in Chile. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 10(6), 819. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2009.07.004>
- Tripathi, N. K., & Shrivastava, A. (2019). Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 496566. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2019.00420/BIBTEX>
- Vaheri, A., Strandin, T., Hepojoki, J., Sironen, T., Henttonen, H., Mäkelä, S., & Mustonen, J. (2013). Uncovering the mysteries of hantavirus infections. *Nature Reviews Microbiology* 2013 11:8, 11(8), 539–550. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3066>
- Vergote, V., Laenen, L., Mols, R., Augustijns, P., Van Ranst, M., & Maes, P. (2021). Chloroquine, an Anti-Malaria Drug as Effective Prevention for Hantavirus Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 580532. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.580532/BIBTEX>

- Wahl-Jensen, V., Chapman, J., Asher, L., Fisher, R., Zimmerman, M., Larsen, T., & Hooper, J. W. (2007). Temporal Analysis of Andes Virus and Sin Nombre Virus Infections of Syrian Hamsters. *Journal of Virology*, *81*(14), 7449. <https://doi.org/10.1128/JVI.00238-07>
- Wang, M., Jiang, S., & Wang, Y. (2016). Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris*. *Bioengineered*, *7*(3), 155. <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1191707>
- Wang, S., Liu, M., Tian, D., Su, M., Li, Q., Li, Z., & Zhou, Z. (2019). Identifying Initiation and Aging of Hens During the Laying Period by Raman Analysis of Beaks. *The Journal of Poultry Science*, *56*(3), 159. <https://doi.org/10.2141/JPSA.0180094>
- 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*, *80*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13690-022-00973-5/FIGURES/8>
- Yakhkeshi, S., Wu, R., Chelliappan, B., & Zhang, X. (2022). Trends in industrialization and commercialization of IgY technology. *Frontiers in Immunology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.991931>
- Yamaguchi, H., & Miyazaki, M. (2014). Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. *Biomolecules*, *4*(1), 235. <https://doi.org/10.3390/BIOM4010235>
- Young, J. C., Mills, J. N., Enria, D. A., Dolan, N. E., Khan, A. S., & Ksiazek, T. G. (1998). New World hantaviruses. *British Medical Bulletin*, *54*(3), 659–673. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.BMB.A011718>
- Young, M. K., & Cripps, A. W. (2013). Passive immunization for the public health control of communicable diseases: Current status in four high-income countries and where to next. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *9*(9), 1885. <https://doi.org/10.4161/HV.25311>

Zhang, W., Smith, L. A., Plantz, B. A., Schlegel, V. L., & Meagher, M. M. (2002). Design of methanol Feed control in *Pichia pastoris* fermentations based upon a growth model. *Biotechnology Progress*, 18(6), 1392–1399. <https://doi.org/10.1021/BP025516W>

Zhang, X., Calvert, R. A., Sutton, B. J., & Doré, K. A. (2017). IgY: a key isotype in antibody evolution. *Biological Reviews*, 92(4), 2144–2156. <https://doi.org/10.1111/BRV.12325>