

**Universidad ORT Uruguay**

**Facultad de Ingeniería**

**Generación de inmunoglobulinas Y  
específicas contra rotavirus porcino**

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniería en  
Biotecnología

**Belén Lestido - 212160**

**Agustín Martínez - 209883**


**Tutora: Ana Paula Mulet**

**2021**

# Declaración de autoría

Nosotros, Belén Lestido y Agustín Martínez, declaramos que el trabajo que se presenta en esa obra es de nuestra propia mano. Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el trabajo final de carrera;
- Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;
- Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
- En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por nosotros;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Agustín Martínez



Belén Lestido

10 de agosto de 2021

# Agradecimientos

En primer lugar, quisiéramos agradecer a nuestra tutora PhD Ana Paula Mulet por la dedicación brindada en todo momento. Por su paciencia, disposición y entrega a lo largo de toda la tesis.

A la Universidad ORT Uruguay y a sus colaboradores que siempre se mostraron dispuestos a ayudarnos.

A nuestros compañeros de carrera que transitaron con nosotros a lo largo de todo el proceso académico.

Por último, un agradecimiento especial a nuestras familias y amigos, que estuvieron incondicionalmente durante todo este proceso. Por saber acompañarnos en los momentos difíciles y por celebrar con nosotros nuestros logros. Gracias totales.

## Resumen

La carne porcina es la segunda más producida a nivel mundial con aproximadamente 100 millones de toneladas anuales. Una de las enfermedades más comunes en los criaderos de porcinos es la infección con rotavirus. Si bien la mortalidad de esta enfermedad es baja, tiene una alta tasa de morbilidad y reduce los volúmenes de producción generando pérdidas económicas. El desarrollo de vacunas contra el rotavirus presenta ciertos desafíos, por lo que surge la alternativa de tratamiento por inmunidad pasiva. La misma se genera cuando un individuo recibe anticuerpos preformados. Las gallinas surgen como modelo interesante para la producción de anticuerpos específicos destinados a inmunidad pasiva, debido a que su producción es económica y su obtención a través de sus huevos es sencilla.

En este trabajo se propuso la producción de inmunoglobulinas Y específicas en gallinas anti-rotavirus porcino, capaces de disminuir la infección viral en células intestinales de cerdo. Para ello se elaboró una vacuna experimental conteniendo rotavirus porcino VR-893 con la que se inmunizaron gallinas. Se administraron dos dosis con intervalo de 15 días y se recolectaron los huevos. La fracción proteica de las yemas de huevo se aisló, se cuantificó, se evaluó su citotoxicidad en cultivo celular, y se estudió su perfil proteico. Finalmente se evaluó la capacidad neutralizante frente a rotavirus porcino en cultivos celulares y se comparó la actividad antiviral de huevos puestos en distintas fechas post inoculación, para realizar un seguimiento de la producción de anticuerpos específicos. Las fracciones proteicas de yema obtenidas fueron liofilizadas, y se comparó su perfil proteico y capacidad neutralizante frente a las fracciones proteicas de yema no liofilizadas.

Las proteínas de yema fueron aisladas exitosamente y mediante el uso de una SDS-PAGE se observó la presencia de inmunoglobulinas en la fracción aislada. Mediante un ensayo de neutralización de rotavirus porcino en un cultivo celular se determinó que las fracciones proteicas de yema de las gallinas inoculadas con el virus son capaces de neutralizar la infección viral *in vitro*. La viabilidad de células infectadas por el virus se estableció en 17,17 % y 3,84 % a las 24 y 48 horas respectivamente, mientras que para los mismos tiempos la viabilidad subió a 55,3 % y 51,98% al agregar los extractos proteicos. Este efecto se observó solo con huevos provenientes de gallinas inoculadas con el rotavirus porcino, indicando que se debe a la presencia de anticuerpos específicos. La capacidad protectora de los extractos proteicos se

mantuvo hasta el día 70 luego de la segunda inoculación; sin embargo, no se observó efecto protector en las muestras del día 50.

Se determinó además que la liofilización no afecta la estructura ni la actividad biológica de las proteínas extraídas de la yema de huevo.

En conclusión, se produjeron exitosamente inmunoglobulinas Y específicas anti-rotavirus porcino que disminuyen la infección del rotavirus porcino en células intestinales de cerdo *in vitro*.

## Palabras clave

Rotavirus porcino, enteritis rotaviral, inmunoglobulinas Y, anticuerpo, inmunidad pasiva, vacuna, IPEC-J2, cultivo celular, cerdo, *Gallus gallus domesticus*, huevo.

# Abreviaturas

**°C:** grados Celsius

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**ATCC:** *American Type Culture Collection*

**AUPC:** Asociación Uruguaya de Productores de Cerdo

**BCA:** Ácido bicinconínico (del inglés *bicinchoninic acid*)

**BSA:** seroalbúmina bovina (del inglés *bovine serum albumin*)

**cm<sup>2</sup>:** centímetro cuadrado

**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono

**DLP:** partícula de doble capa (del inglés *double-layered particle*)

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

**ELISA:** ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*)

**FAO:** *Food and agricultural administration*

**FCA:** *Freund's complete adjuvant*

**g:** unidad de fuerza gravitacional

**hEGF:** factor de crecimiento epitelial humano (del inglés *human epithelial growth factor*)

**IC50:** concentración que reduce a la mitad la viabilidad celular

**IgG:** inmunoglobulina G

**IgY:** inmunoglobulina Y

**INAC:** Instituto Nacional de Carnes

**ITS:** Insulina-Transferrina-Selenio (del inglés *Insulin-Transferrin-Selenium*)

**kDa:** kilo Dalton

**M:** molar

**mM:** milimolar

**mbar:** milibar

**Min:** minutos

**mL:** mililitros

**MOI:** multiplicidad de infección (del inglés *multiplicity of infection*)

**NaOH:** hidróxido de sodio

**ng:** nanogramo

**nm:** nanómetro

**NSP:** proteínas no estructurales (del inglés *non structural protein*)

**PBS:** buffer fosfato salino (del inglés *phosphate saline buffer*)

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *polymerase chain reaction*)

**rpm:** revoluciones por minuto

**SDS-PAGE:** electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (del inglés *sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis*)

**SFB:** suero fetal bovino

**ufp:** unidades formadoras de placa

**µg:** microgramo

**µl:** microlitro

**µm:** micrómetro

**V:** Volts

**v/v:** concentración volumen-volumen

**VP:** proteína viral (del inglés *viral protein*)

**w/v:** concentración peso-volumen (del inglés *weight-volume*)

# Índice

<b>1. Introducción .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Carne porcina: consumo y mercado.....</b>	<b>11</b>
1.1.1 Mercado de carne porcina en el Uruguay .....	12
<b>1.2 Enteritis rotaviral .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3 Rotavirus .....</b>	<b>14</b>
1.3.1 Clasificación del virus .....	15
1.3.2 Ciclo replicativo .....	15
1.3.3 Salida del virus.....	18
<b>1.4 Vacunas contra el rotavirus porcino .....</b>	<b>18</b>
<b>1.5 Anticuerpos .....</b>	<b>18</b>
<b>1.6 Inmunidad pasiva .....</b>	<b>20</b>
<b>1.7 Inmunoglobulina Y .....</b>	<b>21</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Objetivo general.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>24</b>
<b>3. Materiales y métodos .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Cultivo celular.....</b>	<b>25</b>
3.1.1 Descongelado .....	25
3.1.2 Curva de crecimiento celular .....	25
3.1.3 Tinción con Giemsa.....	25
<b>3.2 Ensayos con virus.....</b>	<b>26</b>
3.2.1 Activación y amplificación viral.....	26
3.2.2 Cuantificación viral .....	26
<b>3.3 Generación de la vacuna experimental .....</b>	<b>27</b>
3.3.1 Inactivación del virus .....	27
3.3.2 Producción del inóculo .....	27
3.3.3 Inoculación de los animales.....	28
<b>3.4 Purificación y análisis de proteínas .....</b>	<b>28</b>
3.4.1 Delipidación de la yema de huevo .....	28
3.4.2 Purificación de proteínas con sulfato de amonio .....	28
3.4.3 Ensayo de BCA para cuantificación de proteínas .....	29
3.4.4 Gel de proteínas.....	29
<b>3.5 Ensayos celulares .....</b>	<b>30</b>
3.5.1 Efecto citopático del virus en células IPEC-J2 .....	30
3.5.2 Tinción con cristal violeta.....	31
3.5.3 Ensayo de citotoxicidad.....	31
3.5.4 Ensayo de neutralización .....	31
<b>3.6 Liofilización.....</b>	<b>32</b>
<b>4. Resultados y discusión .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Cultivo de células IPEC-J2 .....</b>	<b>33</b>
4.1.1 Caracterización de crecimiento de células IPEC-J2 con y sin ITS .....	34

<b>4.2</b>	<b>Amplificación y cuantificación del rotavirus porcino VR-893 en células MA104.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Efecto citopático del rotavirus VR-893 en células IPEC-J2 .....</b>	<b>37</b>
<b>4.4</b>	<b>Generación de la vacuna experimental .....</b>	<b>39</b>
<b>4.5</b>	<b>Purificación de proteínas.....</b>	<b>41</b>
4.5.1	Obtención de la fracción proteica de la yema de huevo.....	41
4.5.2	Visualización del perfil proteico mediante una SDS-PAGE .....	43
<b>4.6</b>	<b>Evaluación de la citotoxicidad de la fracción proteica de la yema de huevo en células IPEC-J2.....</b>	<b>45</b>
<b>4.7</b>	<b>Evaluación de la capacidad neutralizante de las IgY purificadas de la yema de huevo sobre el rotavirus porcino .....</b>	<b>46</b>
4.7.1	Evaluación de la neutralización con IgY producidas posteriormente .....	4948
<b>4.8</b>	<b>Liofilización de las fracciones proteicas .....</b>	<b>51</b>
4.8.1	Recuperación de proteína de las fracciones liofilizadas .....	52
4.8.2	Visualización de proteínas liofilizadas mediante electroforesis en gel no desnaturizante. ....	53
4.8.3	Evaluación de la capacidad neutralizante de las IgY liofilizadas .....	54
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y perspectivas a futuro .....</b>	<b>56</b>
5.1	Conclusiones.....	56
5.2	Perspectivas a futuro .....	56
<b>6.</b>	<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>58</b>
<b>7.</b>	<b>Anexo.....</b>	<b>66</b>

# 1. Introducción

## 1.1 Carne porcina: consumo y mercado

Una dieta balanceada requiere un consumo mínimo de proteínas diario de 0,8 gramos por kilogramo de peso corporal en un adulto (1). Los alimentos proteicos se pueden diferenciar según su valor nutricional, el cual se determina por el contenido de aminoácidos. Estos, a su vez, se clasifican en esenciales y no esenciales. Los primeros son los que deben ser consumidos en la dieta obligatoriamente, ya que el cuerpo humano no es capaz de sintetizarlos (p. ej. Isoleucina, Leucina, Lisina), mientras que los segundos pueden ser generados de manera endógena (p. ej. Alanina, Tirosina, Ácido aspártico). En este sentido, es importante contar con una dieta que contenga todos los aminoácidos esenciales, ya que sin estos se puede ver disminuida la producción de proteínas que los requieran (2).

Los productos cárnicos, resultado del faenado y eviscerado de un animal en el matadero, son considerados de alto valor nutricional debido a su alta disponibilidad de aminoácidos tanto esenciales como no esenciales. Debido a esto, la proteína de origen animal ocupa un lugar importante en el régimen alimentario de las poblaciones (3). Particularmente la carne porcina tiene un contenido proteico de entre 18 y 20 %, y cuenta con todos los aminoácidos esenciales para el humano. Si bien el contenido graso es algo mayor que el resto de las carnes, su proporción de ácidos grasos monoinsaturados es mayor. A su vez, esta grasa se ubica de manera subcutánea, por lo que es sencillo removerla al momento del consumo (4).

Se estima que en Europa se consumen en promedio entre 80 y 90 kg de carne por persona por año, mientras que en los países de mayor consumo en el mundo alcanzan unos 100 a 150 kg por persona por año (5). Según la FAO, la carne de mayor producción en el mundo es la de ave de corral, de la cual se produjeron 133,3 millones de toneladas en 2020. La carne porcina es la segunda más producida en el mundo, con unos 109,2 millones de toneladas anuales considerando el mismo período. Por último se ubican la carne bovina y ovina con una producción mundial de 71,4 y 16 millones de toneladas respectivamente (6). Esta tendencia se ha mantenido en los últimos años, aunque reportando un incremento en la producción aviar y una contracción de la porcina. Esto se debe a la peste porcina africana que ha generado grandes pérdidas en el sector. De todas maneras, debido a una mejora sanitaria que se ha implementado

en este último período, la incidencia de la enfermedad se ha visto reducida, por lo que se cree que pueda haber una nueva alza en la producción mundial porcina para el próximo año (6-8). Se espera que la producción de carne de cerdo se duplique para el año 2050 en los países desarrollados (9).

### **1.1.1 Mercado de carne porcina en el Uruguay**

El consumo de carne de cerdo en Uruguay ha visto un aumento en los últimos años. Por ejemplo, el consumo anual por habitante de carne porcina aumentó un 73% entre los años 2002 y 2012, alcanzando los 14,2 kg por persona (10). Estudios más recientes revelaron que el consumo de carne porcina sigue en aumento, con 18 kg de carne porcina consumida por habitante en el 2019. Si bien la tendencia en consumo de carne porcina es creciente, se observó un pequeño descenso de consumo en el 2020, con 16,6 kg consumidos por habitante. De cualquier manera, la carne porcina es el tercer tipo de carne más consumida en el Uruguay, ocupando un 19,3% del consumo total por habitante en el país, detrás de la vacuna y la aviar (11).

Desde la creación de la Asociación Uruguaya de Productores de Cerdo (AUPC) en el 2004 se registró un aumento de 150 a 382 productores en 2019 (12). Según el Instituto Nacional de Carnes (INAC), en 2020 se faenaron unos 145 mil animales en Uruguay, los cuales se destinaron casi exclusivamente al mercado doméstico. La exportación de carne porcina en el país es mínima ya que la demanda de esta carne es mayor que la producción, que apenas llega a satisfacer un cuarto de esta, por lo que el consumo de carne porcina en el Uruguay es mayoritariamente sobre productos importados. En 2020 se registró una comercialización de aproximadamente 11 mil toneladas (13).

## **1.2 Enteritis rotaviral**

Una de las enfermedades más comunes en los criaderos de porcinos es la infección con rotavirus. La transmisión del virus se da por vía fecal-oral y una vez que llega hasta el intestino delgado, se aloja allí dañando las vellosidades intestinales. Genera un cuadro de diarrea tanto en cerdos lactantes como destetados. Como síntomas asociados puede aparecer una leve deshidratación, así como también vómitos. Si bien la mortalidad de la infección es baja, tiene una alta tasa de morbilidad y reduce los volúmenes de producción. Además, en el caso de que

se combine con otras patologías diarreicas, o factores como una mala nutrición o desbalance de electrolitos, puede llegar a ocasionar la muerte (14).

Se puede encontrar rotavirus en cualquier parte del mundo, y es muy probable encontrarlo en gran cantidad de criaderos debido al mecanismo de transmisión y a las condiciones sanitarias de los sitios de crianza de estos animales. Además, algunos individuos pueden mantenerse como portadores asintomáticos, por lo que es difícil de identificarlos para aislarlos. La ganadería intensiva genera una mayor tasa de contagios ya que en estos casos se encuentra el ambiente propicio para su supervivencia: los animales se mantienen juntos en espacios confinados, comiendo de lugares comunes y entre las heces de otros individuos (15).

La probabilidad de contagio aumenta frente a una deficiente ingesta de calostro por parte de los lechones, que es la manera que tienen estos animales de temprana edad para inmunizarse frente a patógenos, generando que los individuos se enfrenten a una cantidad de virus para la cual no tienen las defensas suficientes (14). La infección con rotavirus en el periodo lactante podría resultar en problemas futuros que incluyen problemas en la piel, respiratorios y pérdida de peso, además de la diarrea asociada (16). Usualmente las lesiones a nivel intestinal causadas por el virus son reparadas al terminar el ciclo de infección; sin embargo, debido a estrés externos, la reparación podría no completarse. En este caso, el cerdo podría desarrollar problemas nutricionales crónicos, bajando su eficiencia de producción (17).

La infección con este tipo de virus implica un problema serio para los productores, ya que si bien no es una limitante al momento de vender, puede traer problemas debido a su recurrencia y reducción de la productividad (18). Cuantificar estas pérdidas es difícil dado que generalmente no surge directamente por la muerte del animal. Al ser una enfermedad que afecta el aparato digestivo, tiene incidencia directa sobre el engorde. Para intentar recuperar a aquellos cerdos que la padecen, se gastan recursos en medicamentos y en alimento o suplementos nutricionales para intentar contrarrestar los síntomas. En caso de que no logre alcanzar un peso mínimo adecuado para el momento del desarrollo en el que se encuentra, ese animal se sacrifica. Incluso aquellos que logran recuperarse, muchas veces no alcanzan el desarrollo óptimo, por lo que la pérdida viene dada por la diferencia de peso que no lograron engordar debido a la enfermedad (19).

Los métodos de diagnóstico existentes incluyen la identificación del virus mediante microscopía electrónica, inmunohistoquímica, PCR, ELISA o el uso de microscopía óptica para determinar la apariencia de los tejidos intestinales. Estos métodos son complejos y requieren de personal capacitado para su realización (14).

Es prácticamente imposible prevenir la infección con rotavirus. Aún no existen tratamientos específicos y el foco está principalmente en mejorar los signos que podrían generar complicaciones en la enfermedad (17). Por ejemplo, suelen administrarse formulaciones que previenen la deshidratación, restaurando el equilibrio de agua y electrolitos en el sistema digestivo del animal (20).

Por otra parte, se recomienda tener buenas prácticas de higiene del criadero, desinfectando regularmente para limitar la circulación del virus (14). Se debe elegir rigurosamente el método de desinfección ya que el virus es resistente a bajos niveles de pH, solventes lipídicos y muchos de los desinfectantes comúnmente usados (21). Sí son efectivos los desinfectantes a base de peróxido y cloro (22).

Otra forma de disminuir los contagios es mediante el uso de la técnica del “*all in/ all out*”, la cual establece que debe hacerse un recambio completo de todos los cerdos tras cada ciclo de producción. Este sistema funciona por tandas, por lo que, al momento de introducir nuevos animales, los anteriores deben ser previamente removidos. Antes de la introducción de esta nueva tanda de animales se debe hacer una desinfección completa del lugar. Esto genera que no se mantenga el virus circulando de la misma manera que con flujo continuo, pero el rendimiento de la producción en este caso es menor (14).

### **1.3 Rotavirus**

El rotavirus es un virus no envuelto de ARN bicatenario (grupo III) perteneciente a la familia Reoviridae. Se denomina de esa manera dada su morfología similar a una rueda (del latín: *rota*=rueda) (23).

La estructura del virus se conforma de tres niveles distintos. En la capa inferior se encuentran los 11 segmentos de ARN doble hebra que en sus 18,5 kpb codifica para seis proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, y VP7) y cinco proteínas no estructurales (NSP1–

NSP5). La proteína VP2 es la que recubre el material genético y a las proteínas VP1 y VP3 (ARN polimerasa ARN dependiente y guanililtransferasa y metilasa respectivamente) en esta primera capa. Luego, por fuera de este núcleo se encuentra una estructura formada por trímeros de VP6. La capa exterior, que consiste en trímeros de VP7 y dímeros de VP4 se ensambla junto a la estructura inferior para determinar la conformación de la cápside del virus (24).

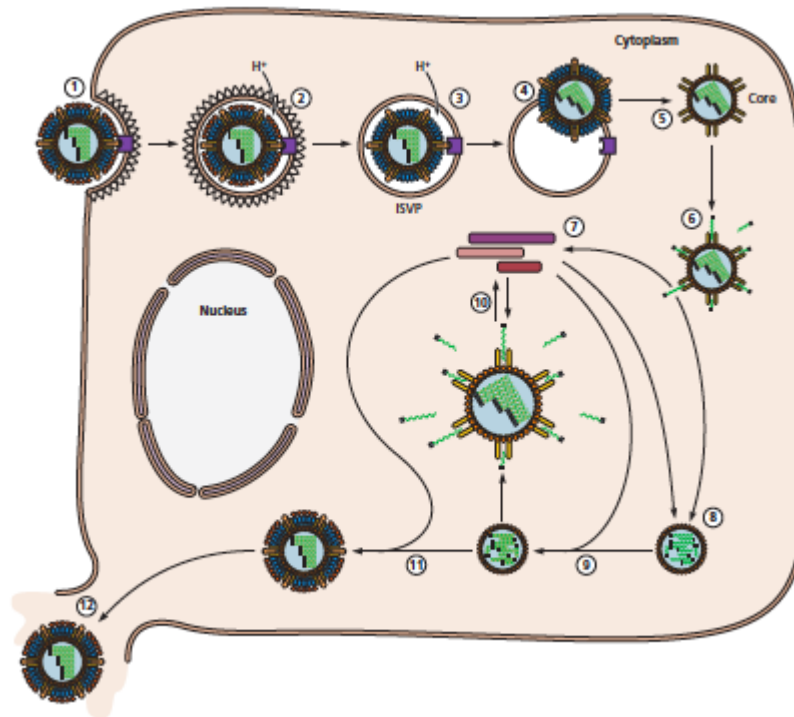
### **1.3.1 Clasificación del virus**

Los rotavirus se clasifican en diez serogrupos diferentes (A-J), de acuerdo a la variabilidad genética y la reactividad serológica frente a la proteína VP6 (25). De estos, cuatro afectan a los porcinos (A, B, C y E), siendo el A el más predominante (23). A su vez, gracias a sus proteínas exteriores VP4 (proteína sensible a proteasas) y VP7 (glicoproteína) surge una doble clasificación en P-tipo y G-tipo respectivamente. Existen 32 G-tipos y al menos 47 P-tipos identificados (25). Como las proteínas VP4 y VP7 se encuentran codificadas por segmentos distintos de ARN y el evento de reordenamiento es frecuente, se puede ver en una misma población diferentes combinaciones de serotipos (24,26).

Para el G-tipo, genotipo y serotipo son sinónimos, pero en el caso del P-tipo, existen más genotipos que serotipos, por lo que para identificar una cepa particular del virus se creó una doble nomenclatura. Primero se indica el P-tipo, para el cual se menciona el serotipo y luego el genotipo entre corchetes, y después se indica el G-tipo. Por ejemplo, la cepa de rotavirus humano Wa, se define como P1A[8]G1 (24). El P-tipo presenta el serotipo 1A y el genotipo 8, mientras que el G-tipo es el 1. En el caso de que un serotipo corresponda a un único genotipo, se indica una sola vez. Por ejemplo, la nomenclatura de la cepa de rotavirus porcino OSU, con el cual se desarrollan las actividades en este trabajo, es P[7]G5 (27).

### **1.3.2 Ciclo replicativo**

En general, se tiene un buen conocimiento del ciclo replicativo de los virus de la familia Reoviridae (Figura 1). Sin embargo, hay detalles de la entrada del virus a la célula y de los mecanismos de maduración que aún no se comprenden por completo (25).



**Figura 1.** Esquema del ciclo viral de un virus de la familia Reoviridae. Unión del virus con el receptor celular (1) y entrada a la célula por endocitosis (2). Desprendimiento de la capa proteica exterior y liberación al citoplasma (3, 4 y 5). Síntesis de los ARNm (6), traducción de los mismos (7) y formación del viroplasma (8). Síntesis de la cadena negativa de ARN (9) y ensamblaje de la primera capa de la partícula viral (10). Ensamblaje de las capas proteicas exteriores (11) y liberación de las partículas virales maduras mediante lisis celular (12). Imagen adaptada de Flint J, 2015 (28).

### 1.3.2.1 Adhesión y entrada

En una primera instancia, el virus interactúa con el receptor de membrana de la célula con ácido siálico, mediante la proteína *spike* VP4. Una vez dada esta unión, se produce el clivaje de la proteína, dando lugar a dos fragmentos llamados VP5 y VP8 (25). Este último será el encargado de mantener unida la partícula viral con la membrana celular (26).

El ingreso a la célula puede ocurrir tanto por endocitosis mediada por receptor o por penetración directa de la membrana. Esto último se ha observado en ensayos *in vitro* bajo determinadas condiciones, aunque es mayormente aceptado que *in vivo* el ingreso a la célula se da mediante endocitosis. De todas maneras, no se tiene muy claro este mecanismo de entrada (25).

Se conoce que una vez en la célula, dentro del endosoma y gracias a la baja concentración de calcio en este, se desprende la capa proteica exterior del virus (VP7 y VP4), dejando al descubierto a VP6. En este punto, se denomina a la partícula viral como DLP (*double-layered particle*) (25).

### **1.3.2.2 Síntesis de ARNm**

Una vez liberada esta estructura al citosol, comienza la transcripción de las cadenas positivas de ARN mediante VP1 y VP3. Durante este proceso, el material genético del virus permanece dentro de la partícula para no activar los mecanismos de defensa celular frente a la presencia de ARN doble hebra. Mientras que VP1 replica el material genético (ARN polimerasa ARN dependiente), VP3 se encarga de agregarle la caperuza al extremo 5' de la cadena. La cadena de ARN, a medida que se genera, se va liberando al citosol a través de canales de clase I ubicados en los vértices de la DLP (25).

### **1.3.2.3 Síntesis de la cadena negativa de ARN y ensamblaje de la DLP**

Esta etapa del proceso de la replicación viral ocurre en los viroplasma, que son sitios en el citoplasma donde se acumulan proteínas y ARN virales. NSP2 y NSP5 son esenciales para la nucleación de este viroplasma, ya que son responsables de agrupar las hebras de ARN del virus y las proteínas de la cápside viral para formar los nuevos viriones (29).

Por otra parte, una fracción de las hebras positivas de ARN viral generadas seguirá en el citoplasma para que se traduzcan por la maquinaria celular y así dar lugar a nuevas proteínas virales, mientras que otra parte se agrupará en los viroplasma para replicarse y producir cadenas de ARN negativo, formando la doble hebra de las nuevas partículas virales (25,29).

Una vez ensamblada la DLP con las 11 hebras de ARN correspondientes y las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP6, se dirige hacia el retículo endoplasmático. En la membrana de este se encuentran ancladas las proteínas virales NSP4, VP4 y VP7. NSP4 interactúa con VP6, formando una estructura transiente en la cual el virus está envuelto. Una vez en el lumen del retículo endoplasmático, la alta concentración de calcio desencadena cambios conformacionales en estas proteínas adheridas a la membrana que genera que interaccionen

con VP6, liberando a NSP4 y la membrana para dar lugar a la partícula viral con tres capas (TLP) (25).

### **1.3.3 Salida del virus**

Por último, si bien es aceptado que rotavirus es liberado mediante lisis celular una vez que se acumulan suficiente cantidad de partículas virales, se ha visto que en células intestinales, ocurre en un principio una liberación por exocitosis mediante transporte vesicular (30).

## **1.4 Vacunas contra el rotavirus porcino**

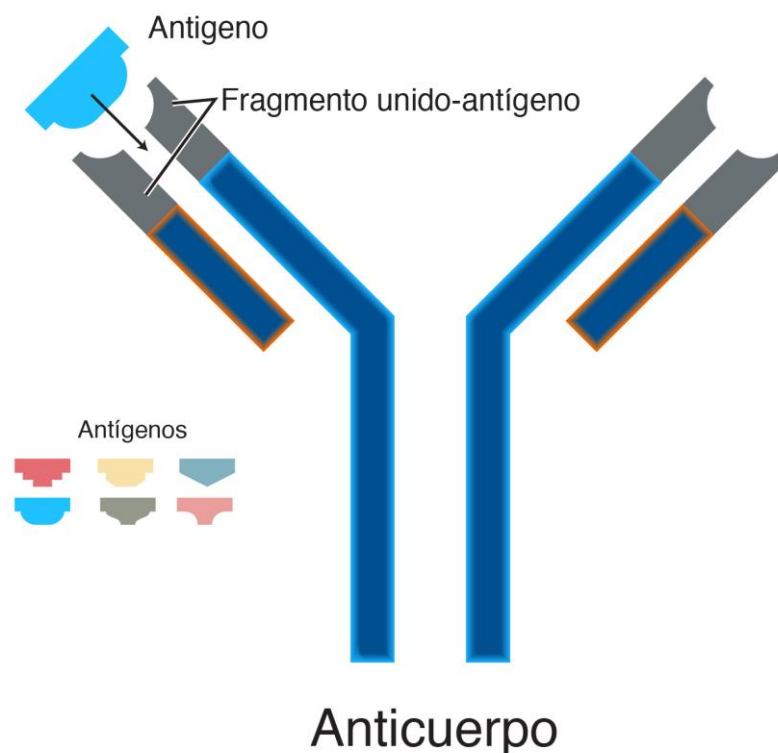
El desarrollo de vacunas contra el rotavirus porcino presenta ciertos desafíos, puesto que este virus afecta principalmente a cerdos muy jóvenes. Esto obliga a administrar la vacuna antes del destete, cuando el sistema inmune del animal no está del todo desarrollado, por lo que puede haber casos en los que no se desarrolle o no se mantenga una respuesta inmune adecuada. Además, dicha respuesta puede verse afectada frente a otros factores como que esté cursando otra enfermedad infecciosa, presente parásitos, esté mal nutrido, estresado o bajo condiciones ambientales desfavorables (31,32).

Como alternativa, se puede inocular a las cerdas para que estas sean quienes generen inmunidad frente al virus, y de esa forma puedan transmitir los anticuerpos a los lechones a través de la leche materna (33). Este mecanismo se denomina inmunidad pasiva, ya que no es el propio individuo quien la genera, sino que los anticuerpos son desarrollados por otro individuo. La ventaja principal es que no depende del sistema inmune del individuo que se quiere proteger, sino que los anticuerpos son provistos de manera exógena (34).

## **1.5 Anticuerpos**

Los anticuerpos son proteínas producidas por el sistema inmune de un individuo ante el ingreso al organismo de elementos no reconocidos como propios. Estos se denominan antígenos, y pueden ser bacterias, hongos, virus, proteínas o cualquier otra sustancia química capaz de ser reconocida por el sistema inmune y generar respuesta frente a esta (35). Se considera a los anticuerpos como uno de los principales efectores de la respuesta inmune adaptativa (36).

Pueden desencadenar diversas respuestas tanto en la presencia como en la ausencia de moléculas o células efectoras (37). Cuando se trata de una infección bacteriana, los anticuerpos son capaces de unirse a adhesinas, promover la aglutinación, neutralizar la actividad enzimática, promover la fagocitosis y activar el complemento desencadenando la lisis bacteriana. En el caso de que la infección sea mediada por un virus, pueden neutralizar el virus y así evitar la entrada de los virus a las células susceptibles, eliminar el efecto “tipo-toxina” de algunos virus y promover la acción de las células *Natural Killers* (38).



**Figura 2.** Estructura de un anticuerpo, inmunoglobulina G (IgG). En azul se representa la región conservada y en gris la hipervariable. Las cadenas con borde celeste son denominadas pesadas y las de borde naranja son las livianas. El antígeno celeste es el que reconoce específicamente ese anticuerpo (39).

La estructura tridimensional de un anticuerpo se asemeja a la letra Y (Figura 2). Esta forma es el resultado de la unión de las cuatro cadenas que componen a la proteína. De estas, dos son denominadas cadenas pesadas, mientras que a las otras dos se las conoce como cadenas livianas. En uno de los extremos de cada cadena se encuentra una región hipervariable, que

cambia de un anticuerpo a otro, permitiendo poder reconocer específicamente una gran cantidad de antígenos diferentes que se puedan presentar. En el resto de la cadena se encuentra una región de dominio conservado, idéntica para todas las inmunoglobulinas de un tipo (39). Las dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante puentes disulfuro, y a su vez, cada cadena pesada está unida a una cadena liviana también por puentes disulfuro. La unión se da de manera tal que las regiones variables de ambas cadenas se orienten en los brazos superiores de la molécula, mientras que las regiones constantes se localizan en la base. La región variable de la molécula es la región que reconoce a los antígenos, mientras que la región constante interactúa con las células y moléculas efectoras del sistema inmune (40).

## **1.6 Inmunidad pasiva**

La inmunidad pasiva es el proceso por el cual un individuo recibe anticuerpos generados por otro, permitiendo la protección del individuo sin necesidad de que él mismo sea quien los genera (35). La protección generada por inmunidad pasiva no es duradera, ya que con el tiempo esos anticuerpos se degradan, disminuyendo su título en el organismo (41).

A principios del siglo XX, la terapia con sueros inmunes era muy utilizada, en donde se inyectaba suero de una persona o animal inmunizado frente a cierto patógeno a otro individuo que estaba transcurriendo la enfermedad (42). La terapia cayó en desuso luego de la aparición de los antibióticos en la década del 40, pero debido a inconvenientes como la resistencia desarrollada por las bacterias, se volvió a considerar su uso en la segunda mitad del siglo (38). Hasta el día de hoy, la técnica es muy utilizada para tratar una gran cantidad de enfermedades, sobre todo las enfermedades virales que no pueden ser tratadas mediante antibióticos (43).

Tras la gran variedad de estudios realizados en el principio del siglo pasado sobre los anticuerpos y su posible utilización, el médico y bacteriólogo Paul Ehrlich descubrió que los anticuerpos del ratón eran traspassados al feto mediante la circulación sanguínea, y apenas nace mediante la ingesta del calostro (38). Esto se denomina inmunidad pasiva natural, y abarca el pasaje de anticuerpos de una madre a su infante mediante la placenta y/o la leche materna (41). Por ejemplo, los humanos y los monos transfieren sus anticuerpos de manera prenatal mediante la placenta y post natal mediante el calostro, mientras que los visones, vacas, caballos, ovejas, cabras y cerdos lo hacen exclusivamente a través del calostro y la leche materna. Estos animales

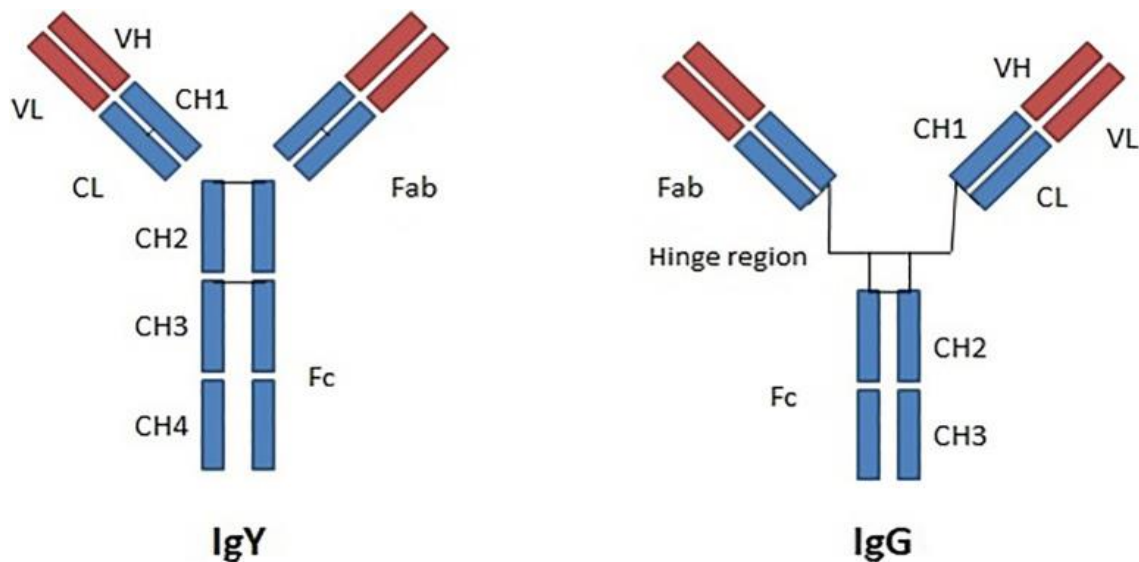
deben consumir el calostro de la madre durante las primeras 24 a 48 horas de vida, ya que su intestino es lo suficientemente permeable en ese período para permitir la transferencia de los anticuerpos al torrente sanguíneo. Si no ingieren la cantidad de leche materna necesaria en este período no sólo sufrirán por la malnutrición, sino que también quedarán expuestos a los patógenos sin defensas y con un sistema inmune aún inmaduro (43).

Por otra parte, la transferencia de anticuerpos en las aves se produce a través de la yema del huevo. Este proceso se da de manera basal hasta el día número 14 desde el inicio de la embriogénesis, luego se ve un aumento del pasaje de anticuerpos al embrión (44). Gracias a este proceso, el individuo alcanza títulos de anticuerpo similares a los de la madre. En ese sentido, la protección que le otorgan al recién nacido es suficiente hasta que madure su propio sistema inmune, ya que estos anticuerpos son específicos frente a los microorganismos que se encuentran en el ambiente donde habitan los animales. Eventualmente, si hay algún patógeno que pueda causar problemas mayores, y se estima que la duración de los anticuerpos en el torrente sanguíneo de la cría no será suficiente como para protegerlo, se puede vacunar a la madre múltiples veces para que el título de anticuerpos aumente, y de ese modo se mantenga por encima del umbral de protección durante más tiempo (45).

## **1.7 Inmunoglobulina Y**

La yema de huevo está compuesta por una gran cantidad de lípidos y proteínas que tienen como función principal el aporte de nutrientes y componentes bioactivos para el correcto desarrollo del embrión (46). Tanto en la yema de huevo como en el suero de las aves, la inmunoglobulina más predominante es la inmunoglobulina Y (IgY), una clase de inmunoglobulina precursora evolutivamente de la inmunoglobulina G (IgG), presente en aves, reptiles y anfibios (46,47). Las IgY producidas son específicas a los patógenos a los que se ha enfrentado el ave a lo largo de su vida, y al ser pasadas a la yema de huevo le confieren inmunidad pasiva a los embriones (46).

La estructura de las IgY presenta tres dominios constantes en la cadena pesada y no presenta una región bisagra como sí se aprecia en las IgG (Figura 3) (46). Sus cadenas pesadas tienen un peso molecular de 67 a 70 kDa, mientras que las cadenas livianas pesan 25 kDa (47).



**Figura 3.** Comparación de la estructura de una IgY con la de una IgG. En azul se muestran las regiones conservadas mientras que en rojo las hipervariables (47).

En los últimos años ha crecido el interés del uso de gallinas como productoras de anticuerpos para ser utilizados en tratamientos de inmunidad pasiva (48). Este interés se debe a las ventajas que presenta este modelo de producción frente al uso de otros animales. Por ejemplo, el uso de conejos, ratones o caballos para la producción de anticuerpos es más complejo ya que el método de obtención de estos es el sangrado, proceso invasivo que en algunas especies requiere del sacrificio del animal para poder tener acceso al suero inmune (49). Sin embargo, puesto que la inmunoglobulina es acumulada en la yema de huevo, no es necesario sangrar al animal ni sacrificarlo (50). Por otra parte, el costo de mantenimiento de una gallina es mucho menor al de los otros animales comúnmente utilizados, y la cantidad de inmunoglobulinas obtenidas es comparable en ambos casos (48).

Se estima que la producción anual de una gallina es de aproximadamente 300 huevos al año, lo que se traduce en aproximadamente 18-25 g de IgY (47). Dada la distancia filogenética que presentan las gallinas con los mamíferos, es posible generar inmunoglobulinas que no se unan con los receptores de anticuerpos en mamíferos, ni produzcan la activación del complemento. La purificación del anticuerpo de la yema de huevo requiere un procedimiento más rápido, más fácil y menos costoso que la purificación desde el suero animal, lo que aporta también a la eficiencia del modelo (50).

Debido a lo explicado anteriormente, creemos que es posible la generación de inmunoglobulinas Y capaces de reconocer el rotavirus porcino y disminuir su ataque frente a células epiteliales intestinales de cerdo.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Producir IgY específicas en gallinas que confieran inmunidad contra rotavirus porcino y probar su capacidad neutralizante.

### 2.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos de este trabajo son los siguientes:

- Fabricar una vacuna con el rotavirus porcino VR-893 inactivado.
- Obtener anticuerpos específicos de los huevos de las gallinas inoculadas con la vacuna fabricada en el punto anterior.
- Determinar *in vitro* la capacidad neutralizante de los anticuerpos obtenidos en la yema de huevos de gallinas inoculadas. Esto incluye:
  - Poner a punto la infección de células con rotavirus porcino.
  - Realizar un estudio de viabilidad celular para evidenciar la neutralización del virus.
- Liofilizar las fracciones proteicas y analizar su capacidad neutralizante.

## **3. Materiales y métodos**

### **3.1 Cultivo celular**

Durante esta tesis se utilizaron células MA104 (ATCC, CRL-2378.1) originarias de tejido epitelial de riñón de mono e IPEC-J2 (DSMZ, ACC 701), provenientes del intestino delgado de cerdo. Ambas líneas celulares fueron cultivadas a 37°C, con atmósfera controlada de 5% de CO<sub>2</sub> y humedad saturada.

Las células MA104 fueron crecidas en medio DMEM + 10 % de suero fetal bovino (51) en tanto la línea IPEC-J2 fue cultivada con medio DMEM/HAM's F-12 (50/50 v/v) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), 5 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (hEGF) y en algunos casos con 1 % v/v de Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) (61).

#### **3.1.1 Descongelado**

Los crioviales conteniendo 1 mL de células fueron descongelados en un baño de agua a 37 °C. Luego se mezcló con 9 mL del medio de cultivo correspondiente, previamente termostatzado a 37 °C. Seguido a esto, se centrifugaron las células a 300 g durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* celular en medio de cultivo fresco. Se tomó una alícuota y se realizó un recuento celular para determinar densidad celular y viabilidad.

#### **3.1.2 Curva de crecimiento celular**

Para la realización de la curva de crecimiento de las células IPEC-J2 se sembraron 1E4 células/pocillo en placa de 48 pocillos en medio completo con y sin ITS. Se tomaron muestras diariamente por duplicado durante 11 días y se midió la densidad y la viabilidad celular.

#### **3.1.3 Tinción con Giemsa**

Se removió el medio de cultivo y se agregó formaldehído al 10 % v/v en agua destilada para fijar las células a la placa, dejando incubar por 10 min a temperatura ambiente. Se procedió a realizar dos lavados con PBS para remover completamente el formaldehído. Luego, se adiciona

metanol 100 % y se deja actuar durante 2 min. Se descarta el metanol e inmediatamente se agrega una solución compuesta por 0,5 % v/v de Giemsa en PBS pH 6,8, dejando actuar durante 2 min. Se diluye esta solución en un volumen de agua destilada 4 veces mayor al de Giemsa, y se incuba por 2 min. Luego, se retira esta solución y se lava con agua destilada hasta que no se desprenda más colorante de la placa. A continuación, se procede a observar la placa al microscopio.

## **3.2 Ensayos con virus**

### **3.2.1 Activación y amplificación viral**

El virus utilizado para los ensayos fue el rotavirus porcino OSU atenuado (ATCC, VR-893). Se amplificó el vial recibido del proveedor y se generó un banco viral de trabajo a partir del cual se realizaron los experimentos (51).

La amplificación viral se realizó en un cultivo de células MA104. Dos botellas T75 con células confluentes fueron infectadas con el virus. Previamente, se activaron 200  $\mu$ L de virus en DMEM con 10  $\mu$ g/mL de tripsina durante 1 hora a 37 °C. A continuación, se agregó al cultivo de células, el cual fue previamente lavado con buffer fosfato salino (PBS) para remover los posibles restos de SFB. Las células se incubaron junto con el virus activado durante 1 hora a 37 °C, agitando cada 10 min. Luego, se removió el medio con virus, se adicionó DMEM suplementado con 0,125  $\mu$ g/mL de tripsina y se incubó a 37 °C.

Una vez observada la interrupción de la monocapa celular se cosechó el virus. Para esto se realizaron tres ciclos de congelado y descongelado a -80 °C, se centrifugó el cultivo a 300 g durante 10 min a 4 °C y se fraccionó el sobrenadante en alícuotas de 1 mL. Estas fueron almacenadas a -80 °C para su uso en futuros ensayos (51).

### **3.2.2 Cuantificación viral**

Se sembraron células MA104 en tres placas de 6 pocillos a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/pocillo. El cultivo se incubó a 37 °C hasta alcanzar una confluencia de 100 %.

Se removió el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS. El virus fue activado según lo descrito en el punto 3.2.1 y se realizaron diluciones seriadas del mismo en DMEM, de  $10^{-3}$  a  $10^{-8}$ . Se sembró cada una de estas diluciones por duplicado y se incubaron las células con el virus durante una hora a 37 °C, agitando la placa cada 10 min. Luego se removió el medio con virus y se adicionaron 3 mL de DMEM con 0,6 % de agarosa y tripsina 0,5 µg/mL, cuidando de no mover la placa hasta que se gelifique la agarosa. Las placas se incubaron durante 7 días a 37 °C y atmósfera controlada de 5 % CO<sub>2</sub> (51).

Al término del tiempo de incubación se fijaron las células con formaldehído al 10 % durante 16 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó el cultivo con PBS y se removió cuidadosamente la agarosa de cada pocillo, cuidando de no levantar la monocapa.

Se cubrió el pocillo con cristal violeta y se incubó 15 min a temperatura ambiente. El cristal violeta fue lavado luego con agua y la placa se dejó secar. Al secarse se pudieron apreciar los pequeños espacios sin teñir que corresponden a los sitios donde sucedió la infección viral. De todas las diluciones, se seleccionaron aquellas que tuvieran una cantidad de placas adecuada, se contó la cantidad por pocillo y ese valor se multiplicó por el factor de dilución, para así llegar a la concentración del virus (51).

### **3.3 Generación de la vacuna experimental**

#### **3.3.1 Inactivación del virus**

La inactivación viral fue realizada mediante shock térmico. Se incubó el virus a 50 °C durante 5 min y luego se enfrió el vial utilizando un baño de hielo (53).

#### **3.3.2 Producción del inóculo**

Se formuló la vacuna experimental con 2E5 y 2E6 ufp/mL de virus inactivado y adyuvante completo de Freund (FCA) en una relación 1:1 (54). A su vez se preparó un control negativo de inóculo con FCA y agua destilada estéril. Se prepararon inóculos para las dos dosis (1 mL de cada condición) y fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso.

### **3.3.3 Inoculación de los animales**

Se contó con cuatro gallinas (*Gallus gallus domesticus*) HN Brown Nick adultas, de treinta semanas de edad, las cuales fueron mudadas al criadero 15 días antes de la primera inoculación. Los animales fueron alimentados diariamente *ad libitum*. El alimento que se utilizó se detalla en el Anexo.

Se inyectaron 0,5 mL por ave con una aguja de 25G de manera intramuscular. El procedimiento fue llevado a cabo por un profesional veterinario (55).

Las gallinas fueron inoculadas con 5E4 ufp y 5E5 ufp. Además, se inyectó un animal con el control negativo de inóculo (agua y adyuvante) y una gallina no fue inyectada (54).

A los 15 días de la primera dosis se administró la segunda y 15 días después se comenzó con la recolección de los huevos.

## **3.4 Purificación y análisis de proteínas**

### **3.4.1 Delipidación de la yema de huevo**

Para delipidar los huevos se comenzó separando la yema de la clara, y se recolectó el líquido de la yema con cuidado de no tomar la membrana que lo contiene. Se diluyó el líquido obtenido en agua destilada en un volumen tres veces mayor al de la yema y se incubó la mezcla a -20 °C por un mínimo de 24 horas. Luego se descongeló y se centrifugó a 4000 g y 4 °C durante 24 min. Al término de la centrifugación, se recolectó el sobrenadante y se guardó en alícuotas de 15 mL a -20 °C hasta su uso (56).

### **3.4.2 Purificación de proteínas con sulfato de amonio**

Se preparó una solución de sulfato de amonio saturada, disolviendo 74,4 g en 100 mL de agua destilada, y se ajustó el pH a 7,8 con NaOH 2 M. Luego se esterilizó pasando la solución por un filtro de 0,2 µm. Se agregó el sulfato de amonio a la yema delipidada en una relación 1:3, de manera de alcanzar una solución 33 %, y se incubó a temperatura ambiente con agitación

durante 15 min. Se centrifugó a 3500 rpm y 4 °C durante 15 min y el sobrenadante fue descartado. El pellet conteniendo las proteínas precipitadas fue resuspendido en 1 mL de PBS (57).

### **3.4.3 Ensayo de BCA para cuantificación de proteínas**

La concentración de proteínas fue determinada mediante un ensayo de ácido bicinonónico (BCA) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Se incluyó una curva estándar con las siguientes concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA): 0,10, 0,20, 0,25, 0,30, 0,40, 0,50, 0,75, 1,0, 1,25 y 1,40 mg/mL. Se sembró la curva en una placa de 96 pocillos junto con las muestras a analizar. Para asegurarnos que estas entren en el rango de linealidad de la curva, se realizaron diluciones de 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 y 1/320.

La reacción se lleva a cabo mediante la previa mezcla de 50 partes de ácido bicinonónico (Reactivo A, B9643 Sigma-Aldrich), con 1 parte de sulfato de cobre pentahidratado 4% (Reactivo B, C2284 Sigma-Aldrich). Una vez realizada la mezcla, se agregaron a la placa 10 µL de la muestra y 200 µL de la mezcla de reactivos. A continuación, se incubó la placa a 60 °C durante 15 min, y se midió la absorbancia a 562 nm.

### **3.4.4 Gel de proteínas**

#### **3.4.4.1 SDS-PAGE**

Para poder visualizar la presencia de las proteínas, se realizó un SDS-PAGE. Se utilizó un gel de poliacrilamida al 12 %, y se sembró junto con las muestras el marcador de peso molecular HiMark™ Pre-Stained Protein Standard (Invitrogen, Estados Unidos).

Las muestras se mezclaron con *buffer* de carga 2x, el cual estaba compuesto por 12 % w/v de SDS, 10 % v/v de glicerol, 0,6 % de azul de bromofenol y β-mercaptoetanol 12 mM, disueltos en buffer Tris pH 6,8, 300 mM. Luego, se las incubó a 100 °C durante 5 min. Las muestras se corrieron durante 60 min a 120 V.

La visualización de las bandas fue posible mediante la tinción del gel con el colorante azul de Coomassie. Este se preparó disolviendo 0,25 g en 100 mL de una solución compuesta por 50 mL de metanol, 40 mL de agua destilada y 10 mL de ácido acético glacial. Se coloca el gel en la solución de colorante y se deja teñir *overnight*, luego se coloca en solución decolorante 30 % v/v de metanol y 10 % v/v de ácido acético glacial en agua destilada hasta que se visualicen con claridad las bandas.

#### **3.4.4.2 Electroforesis nativa**

Con el objetivo de observar el perfil de bandas de las proteínas extraídas sin desnaturalizar, se realizó una electroforesis nativa. Se utilizó un gel de poliacrilamida al 12 %.

El *buffer* de carga se compuso de glicerol 10 % v/v y 0,6 % de azul de bromofenol, disueltos en Tris pH 6,8, 300 mM. Las muestras se corrieron durante 60 min a 140 V.

La tinción se realiza de la misma manera que lo descrito en el punto 3.4.4.1

### **3.5 Ensayos celulares**

#### **3.5.1 Efecto citopático del virus en células IPEC-J2**

Con el fin de analizar la sensibilidad frente al virus, se realizó un cultivo de células IPEC-J2 en una placa de 96 pocillos. Se sembraron  $10E4$  células por pocillo y se esperaron 24 horas para iniciar la infección, de manera que las mismas alcancen una confluencia de 90% aproximadamente.

Se lavaron las células con PBS y se agregó el virus previamente activado con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01, 0,05, 0,1 y 0,5 ufp/célula. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante una hora, y una vez finalizada la incubación se removió el virus de la placa y se agregó medio de cultivo DMEM/HAM's F-12, suplementado con 5 ng/mL de hEGF y tripsina en concentraciones de 0, 0,1, 0,25 y 0,5 µg/mL.

Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Al finalizar el ensayo, se realizó una tinción con cristal violeta para determinar la viabilidad celular transcurrido ese tiempo.

### **3.5.2 Tinción con cristal violeta**

Se removió el medio de cultivo de las placas y se realizaron dos lavados con PBS. A continuación, se agregaron 50 µL de cristal violeta 0,75 % diluido en metanol 40 % y se dejaron incubar a 37 °C durante 20 min. Al término de la incubación, el cristal violeta fue removido sumergiendo la placa en un recipiente con agua, hasta que no desprenda más colorante. Se secaron con papel absorbente, y luego se les agregó 250 µL de ácido acético glacial 20 %. Se midió absorbancia a 590 nm.

### **3.5.3 Ensayo de citotoxicidad**

Células IPEC-J2 fueron cultivadas en una placa de 96 pocillos a una concentración de 10E4 células/pocillo. A las 24 horas se agregaron las proteínas de huevo purificadas. Se realizó el ensayo utilizando los huevos únicamente de las gallinas 2 y 3. De ambas fracciones proteicas, cuya concentración de proteínas correspondía a 31,43 mg/mL (huevo 2.18a) y 34,71 mg/mL (huevo 3.18), se realizaron diluciones 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 y de la gallina 3 también se probó la dilución 1/160. A su vez se realizó un control en el que se crecieron células sin ningún agregado proteico, y un control al que únicamente se les agregó medio de cultivo (sin células) y la fracción proteica de la gallina 3 en una dilución de 1/5.

A las 24 horas se realizó una tinción con cristal violeta para determinar la viabilidad celular.

### **3.5.4 Ensayo de neutralización**

Se sembraron 10E4 células IPEC-J2 por pocillo en cuatro placas de 96 pocillos, y a las 24 horas se procedió con la infección. Se removió el medio de cultivo de las células, se realizaron dos lavados con PBS y se agregó el virus previamente activado a la mitad de los pocillos de la placa. Se incubaron el virus y las células durante 1 hora a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Una vez finalizada la incubación, se descartó el medio con virus. Se añadieron las fracciones proteicas de las gallinas 1, 2, 3 y 4 en una concentración de 0,2 mg/mL, en medio de cultivo DMEM/HAM 's

F-12 suplementado con 5 ng/mL de hEGF. Se incluyó también un control al que no se agregaron proteínas. Se realizaron doce réplicas por condición.

Dos placas fueron incubadas por 24 horas y dos por 48 horas a 37 °C, y al fin de la incubación se revelaron mediante tinción con cristal violeta para determinar la viabilidad celular.

### **3.6 Liofilización**

El programa utilizado para la liofilización consistió de varias etapas. En primera instancia, se aplicó un gradiente de temperatura de -50 °C a 20 °C que aumentó de manera constante en un lapso de 20 horas, a una presión de 0,16 mbar. Seguido a esto, las muestras se incubaron a una temperatura de 20 °C por 20 horas. Luego se realizó otro gradiente de temperatura de 20 °C a 30 °C que duró 2 horas, a una presión de 0,025 mbar. Por último, se mantuvo la temperatura de 30 °C por 3 horas (58). Una vez finalizado el proceso de liofilización, se resuspendieron las fracciones proteicas en 1 mL de PBS.

## 4. Resultados y discusión

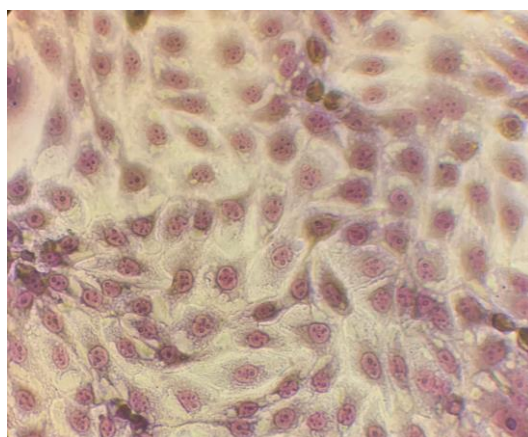
La infección con rotavirus porcino es causante de grandes pérdidas económicas debido a la pérdida de producción. Actualmente no existen tratamientos específicos contra el virus, por lo que se decidió desarrollar una técnica haciendo uso de IgY provenientes de gallinas para poder disminuir su incidencia. La principal ventaja de este modelo animal para la producción de anticuerpos es que el proceso de obtención de las inmunoglobulinas es más barato y menos invasivo que en otras especies animales, dado que en este caso las proteínas son acumuladas en la yema del huevo y fácilmente purificables desde la misma.

Para lograr la generación de anticuerpos en las gallinas, se partió de un vial con virus, que se amplificó y cuantificó. Una vez que fue determinada la concentración viral, se elaboró la vacuna para inmunizar los animales. Tras 15 días de la segunda dosis, esperamos que los animales hayan podido desarrollar correctamente la inmunidad frente al virus, por lo que se realizan ensayos para evaluar la capacidad neutralizante de las IgY de los huevos generados a partir de ese momento.

### 4.1 Cultivo de células IPEC-J2

La línea celular IPEC-J2 es la única línea celular permanente no transformada derivada de intestino delgado. Además, su origen porcino la hace un modelo ideal para nuestros experimentos, en los cuales estudiamos un rotavirus porcino que precisamente infecta este tipo de células *in vivo* (59).

Luego de establecer las condiciones óptimas del cultivo de las células IPEC-J2, se procedió a realizar una tinción con el colorante Giemsa para poder visualizar la morfología celular (Figura 4), pudiéndose observar una forma de cuboidea a columnar, correspondiente a lo descrito para esta línea celular (60).



**Figura 4.** Células IPEC-J2 teñidas con Giemsa visualizadas mediante microscopio óptico x40, luego de 24 horas de cultivo.

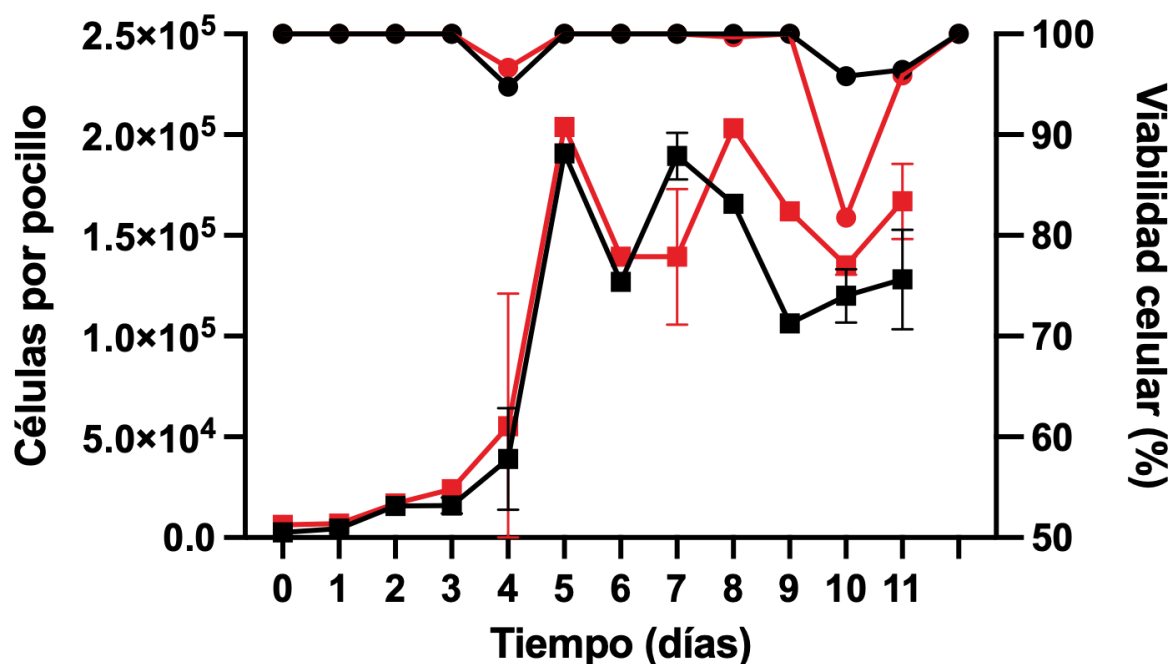
#### **4.1.1 Caracterización de crecimiento de células IPEC-J2 con y sin ITS**

En bibliografía encontramos diversos autores que cultivan las células IPEC-J2 en un medio suplementado con ITS (61-63), mientras que otros prescinden de este compuesto (64-66). Dicho suplemento se compone de insulina, que promueve la absorción de glucosa y aminoácidos, la lipogénesis, el transporte intracelular y la síntesis de proteínas; transferrina, la cual es una proteína que transporta hierro y puede ayudar a reducir el efecto tóxico de los radicales de oxígeno; y selenio que es un cofactor para la enzima glutatión peroxidasa, y se utiliza como un antioxidante (67). Para determinar la relevancia de este suplemento en nuestro contexto se realizó una curva de crecimiento de las células IPEC-J2 con y sin ITS.

Se realizó un cultivo con células IPEC-J2 en dos placas de 48 pocillos; la mitad se suplementó con ITS, mientras que la otra mitad no. Diariamente durante 11 días, se realizó el recuento celular de los pocillos por duplicado, con el fin de monitorear la densidad y la viabilidad celular a lo largo del tiempo (Figura 5).

Los tres primeros días de cultivo se observó muy poco crecimiento celular. Esto es de esperarse, debido a que este periodo corresponde a la fase *lag* o de adaptación del cultivo celular, por lo que la reproducción es baja (64). A partir del tercer día hubo un aumento en la cantidad de células que corresponde con el comienzo de la fase de crecimiento exponencial, la cual se extiende hasta el quinto día. En este día es cuando se encuentra la densidad máxima de células

en ambos casos, que corresponde a  $2,1E5$  células/cm<sup>2</sup> y  $2,0E5$  células/cm<sup>2</sup> para las condiciones con y sin ITS respectivamente. Estos valores son levemente diferentes a lo reportado previamente, donde se muestra una densidad máxima de crecimiento de aproximadamente  $1,3E5$  células/cm<sup>2</sup> en condiciones similares (64). Entre la siembra y la densidad máxima alcanzada, las células se duplicaron 4,5 veces en ambas condiciones, lo que representa una duplicación cada 26,7 horas. Estos resultados no se condicen con lo reportado por el proveedor, que informa un tiempo de duplicación de entre 40 y 50 horas (68).



**Figura 5.** Curva de crecimiento de células IPEC-J2, con y sin ITS. Se presenta en negro la condición sin ITS, y en rojo la condición con ITS. Los cuadrados muestran el crecimiento celular, y los círculos muestran la viabilidad celular.

Luego de la fase de crecimiento exponencial, a partir del día 5, se observa una meseta que corresponde a la fase estacionaria del crecimiento del cultivo. Esto ocurre debido a que la cantidad de células que están resultando de la reproducción celular es similar al de las células que están muriendo, ya sea por disminución de la concentración de nutrientes o por toxicidad de los desechos metabólicos liberados al medio de cultivo (64).

Al comparar las curvas de crecimiento entre las condiciones con agregado de ITS y sin él, se puede observar que no hay una diferencia significativa en el crecimiento celular ( $p > 0,05$ ), tanto

para la densidad máxima de células como para la velocidad máxima de crecimiento. Otro estudio que evaluó el efecto del compuesto sobre el cultivo de IPEC-J2, también reportó que no se observan diferencias significativas en el crecimiento celular (69). Debido a esto, se decidió no utilizar ITS en los cultivos celulares de ensayos futuros.

## **4.2 Amplificación y cuantificación del rotavirus porcino VR-893 en células MA104**

Fue recibido de ATCC 1 mL de rotavirus porcino VR-893 con un título no determinado. Se tomaron 200  $\mu$ L de virus para amplificarlo en células MA104. Las células se mantuvieron en cultivo hasta observar el desprendimiento completo de la monocapa celular, el cual ocurrió a las 48 horas. Luego, se cosechó el virus contenido en el sobrenadante, del cual se obtuvieron 25 crioviales con 1 mL. Estas alícuotas fueron cuantificadas y almacenadas a  $-80$  °C hasta su utilización.

Para determinar el título viral se utilizó un ensayo de placa. En este ensayo la movilidad del virus se ve reducida debido a que se encuentra en una matriz de agarosa gelificada. De esta manera, una partícula viral que infecta una célula, en los siguientes ciclos de replicación sólo podrá infectar las células adyacentes, por lo que se forman pequeñas placas en las zonas donde se encuentra el virus debido a la lisis generada con su salida de la célula. Ante el supuesto de que cada una de estas placas formadas surgen a partir de un único virión, realizando diluciones seriadas en base 10 de la solución a titular (de  $10^{-3}$  a  $10^{-8}$ ) se puede determinar la concentración viral. Para ello, de alguna de las diluciones que resulte con un número de placas adecuado, se cuentan la cantidad generadas sobre el cultivo y ese número es multiplicado por el factor de dilución (51,70).

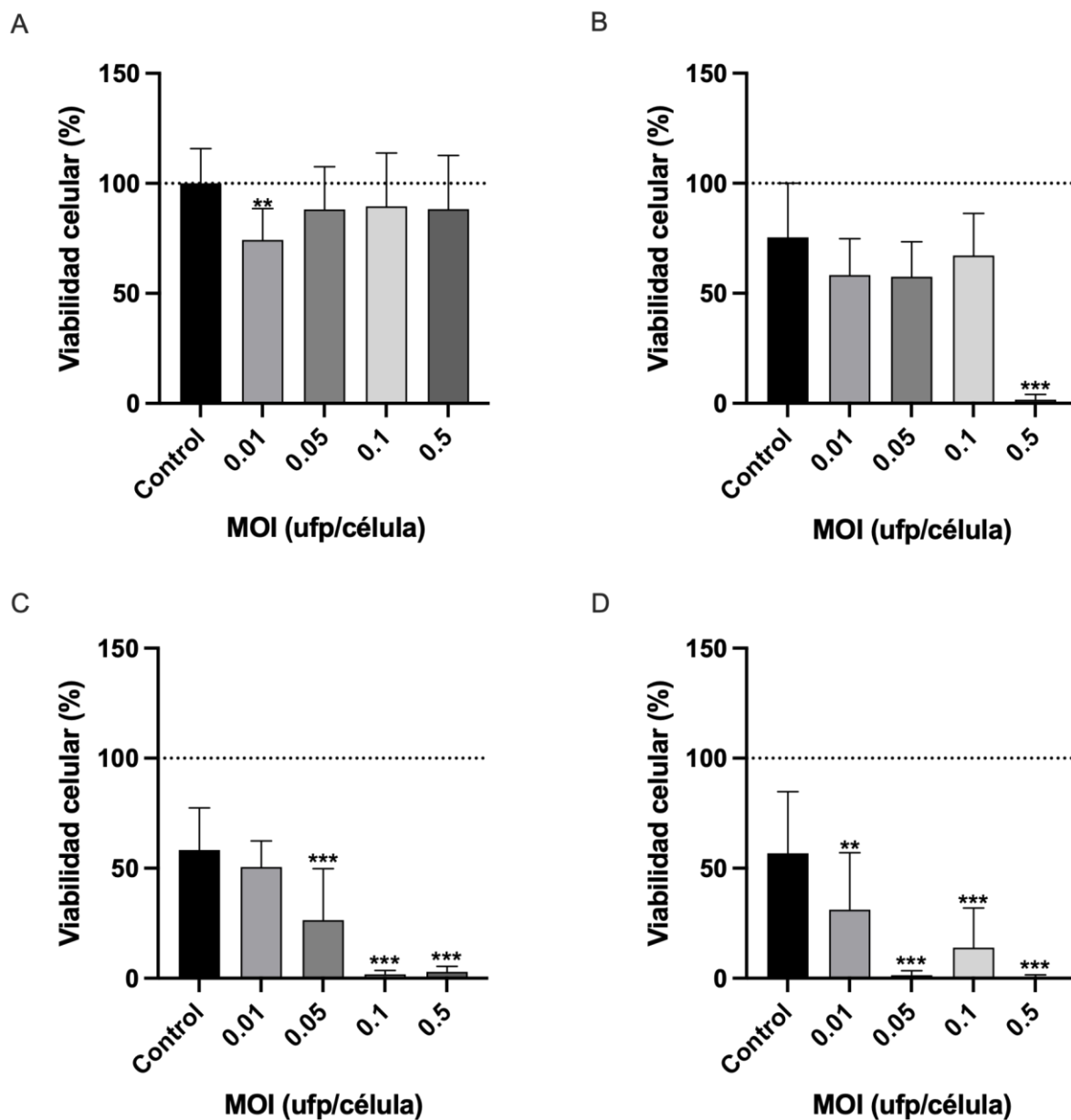
A los seis días de infectadas las células, se pudieron apreciar placas contables en los pocillos correspondientes a las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  con un promedio de 14,5 y 2,5 placas por pozo respectivamente. En las placas menos diluidas ( $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ ), el daño en la monocapa no permitió contar placas individuales, mientras que en los pozos con diluciones mayores ( $10^{-7}$  y  $10^{-8}$ ) no se observó ninguna placa. De esa manera, llegamos a obtener un valor estimado de  $2E6$  ufp/mL. Este valor es consistente con lo reportado previamente por otros autores al titular rotavirus porcino en células MA104 (71,72).

### 4.3 Efecto citopático del rotavirus VR-893 en células IPEC-J2

Para determinar la susceptibilidad de las células IPEC-J2 frente al virus, se expuso un cultivo celular a diferentes concentraciones de este y se evaluó la respuesta frente a las diferentes condiciones. Hay que tener en cuenta que el medio de cultivo con el que se incuba el virus contiene tripsina, proteína necesaria para que este pueda infectar a las células *in vitro*, pero que reduce la viabilidad celular por su actividad proteolítica (73). Por lo tanto, determinamos en paralelo la concentración de tripsina óptima que permita la infección del virus con un mínimo impacto sobre las células. Se utilizaron MOI de 0, 0,01, 0,05, 0,1 y 0,5 ufp/célula, y en cada caso se evaluaron a su vez con concentraciones de tripsina de 0 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,25 µg/mL y 0,5 µg/mL. A las 48 horas de incubación, se midió la viabilidad celular mediante un ensayo con cristal violeta (Figura 6).

La viabilidad de las células no infectadas con virus (condición control) bajó a medida que aumenta la concentración de tripsina. Esto permite afirmar que la tripsina tiene un efecto desfavorable sobre las células. La función proteolítica de esta enzima evita la adhesión celular, tanto célula-célula como célula-placa, ya que cliva las proteínas que mantienen estas uniones, y por lo tanto la monocapa se desprende (74). Se puede apreciar que la viabilidad celular en los pocillos control desciende de un 100 % a un 75,44 % cuando se aumenta la concentración de tripsina de 0 µg/mL a 0,1 µg/mL. Cuando se aumenta a 0,25 µg/mL la viabilidad celular en los pocillos control decae al 58,36 %, mientras que con una concentración de tripsina de 0,5 µg/mL resulta en 56,82 %.

Por otra parte, si se incuba el virus sin tripsina (Figura 6A) no se observa efecto citopático, ya que la pérdida de viabilidad celular ante la exposición con diferentes concentraciones de virus no es significativa con respecto al control ( $p > 0,05$ ). Se observó un leve descenso en la condición con una MOI de 0,01 ufp/célula, pero lo atribuimos a una diferencia eventual, ya que esa tendencia no se mantiene en las condiciones con mayor cantidad de virus. La ausencia de efecto del virus en este caso es esperable, puesto que la tripsina cliva la proteína VP4 de la cápside viral, proceso esencial para que el virus sea capaz de ingresar a las células *in vitro* (75).



**Figura 6.** Cultivo de células IPEC-J2 infectadas con una MOI de 0 (control), 0,01, 0,05, 0,1 y 0,5 ufp/célula en medio con: (A) 0 µg/mL de tripsina; (B) 0,1 µg/mL de tripsina; (C) 0,25 µg/mL de tripsina; (D) 0,5 µg/mL de tripsina.

Además, se observó que a medida que aumenta la concentración de tripsina en el medio de cultivo, el efecto del virus es mayor. Por ejemplo, en la condición con 0,25 µg/mL de tripsina (Figura 6C), se observa que con una MOI de 0,1 ufp/célula la viabilidad celular cae a 1,84 %, mientras que en la misma condición de MOI pero con 0,1 µg/mL tripsina (Figura 6B), se mantiene en un valor de 67,2 %, aproximadamente al mismo nivel que los pocillos control sin virus para esa condición (75,44 %). Este decaimiento en la viabilidad no viene dado solo por

la tripsina, sino que es a raíz de un efecto potenciador de la proteína sobre la acción del virus, ya que si comparamos el control sin virus entre ambas condiciones hay una diferencia de un 17,08 %, mientras que al agregarle 0,1 ufp/célula, la diferencia del descenso de la viabilidad es de un 65,36 % entre ambas condiciones. Esta observación es consistente con lo reportado previamente en bibliografía, donde también se observa un efecto potenciador de la tripsina en la acción de rotavirus en células (73, 75-77).

Se decidió utilizar para los siguientes ensayos una concentración de tripsina de 0,1 µg/mL y una MOI de 0,5 ufp/célula. En esta condición se observó una gran incidencia del virus sobre la viabilidad celular, con una concentración baja de tripsina. Mantener lo más baja posible la concentración de tripsina, no solo disminuye el efecto de esta proteína en las células, sino que minimiza la posible acción proteolítica sobre los anticuerpos a ser agregados en los futuros ensayos. Otra de las ventajas observadas del uso de esta concentración de tripsina, es que, en este punto, el cultivo es muy sensible ante un cambio de concentración de virus, ya que existe una gran diferencia entre el efecto del virus con una MOI de 0,5 ufp/célula y 0,1 ufp/célula (1,65% y 67,2% respectivamente). Esto permite suponer que con estas condiciones de tripsina y MOI, será posible observar de manera notoria si existiera una acción neutralizadora de los anticuerpos agregados al cultivo.

#### **4.4 Generación de la vacuna experimental**

Se generó una vacuna inactivada de rotavirus porcino para inocular gallinas. Las concentraciones de virus utilizadas y el volumen inyectado fueron determinados en base a la información obtenida de otras vacunas comerciales para aves de corral (54). Se inoculó un animal con 5E4 ufp/dosis y otro con 5E5 ufp/dosis. Además, se contó con un control al que se le inyectó adyuvante con agua y otro que no fue inyectado (Tabla 1). Se mezcló con FCA con una razón de 1:1, preparando una cantidad suficiente para las dos dosis, y se almacenaron las alícuotas a 4 °C hasta su uso. Se administraron dos dosis de 0,5 mL con un lapso de 15 días entre ellas.

**Tabla 1.** Identificación del animal según el inóculo administrado

Animal	Inóculo utilizado
1	5E4 ufp
2	5E5 ufp
3	Solo adyuvante
4	Sin inyección

Las gallinas no pusieron huevos entre la primera y segunda dosis. La puesta comenzó unos días después de la última. Además, la producción de huevos al principio fue baja, dando un huevo cada 4 o 5 días. En el caso particular de la gallina 1, el primer huevo obtenido fue el día 13 luego de la segunda dosis, y la misma continuó con una puesta más espaciada que el resto de los animales durante la duración del ensayo.

La producción de huevos depende de factores como la raza, la cantidad de horas de exposición a la luz, el espacio disponible y el alimento utilizado (78). Este último también influye en la composición del huevo; es decir, que los compuestos presentes en el huevo pueden variar según el alimento proporcionado a las gallinas (79). A su vez, la puesta de huevos puede verse disminuida por diversas enfermedades que afectan al animal. Ejemplos de esto son la bronquitis infecciosa, el síndrome de la caída de postura, la enfermedad de Newcastle, influenza, entre otros. En todos estos casos la postura se ve afectada, observándose descensos de hasta un 100 % de la producción en algunos casos (80).

Se recolectaron huevos en distintas fechas para poder realizar un seguimiento de los anticuerpos producidos a lo largo del tiempo. Para identificar a los huevos se utiliza la nomenclatura **X.A**, donde **X** es el número del animal y **A** los días transcurridos entre la segunda dosis y la puesta del huevo.

## **4.5 Purificación de proteínas**

### **4.5.1 Obtención de la fracción proteica de la yema de huevo**

Todos los huevos recolectados fueron delipidados y se realizó la precipitación de proteínas totales de la yema de huevo con sulfato de amonio. Seguido a esto se realizó una cuantificación proteica mediante el ensayo de BCA. Para obtener los valores de proteína totales, se dividió la concentración obtenida en el ensayo entre el factor de concentración, y luego se multiplicó por la cantidad de yema obtenida de los huevos (Tabla 2).

Se observa una tendencia hacia el aumento de la cantidad total de proteína con el paso del tiempo, que puede venir dado por diferencias en la cantidad de alimento consumido por día, el estado de salud de los animales o por diferentes condiciones ambientales (78,79). De todas maneras, este patrón no es del todo claro ya que se observa mucha variación entre las gallinas e incluso entre los huevos de las mismas gallinas.

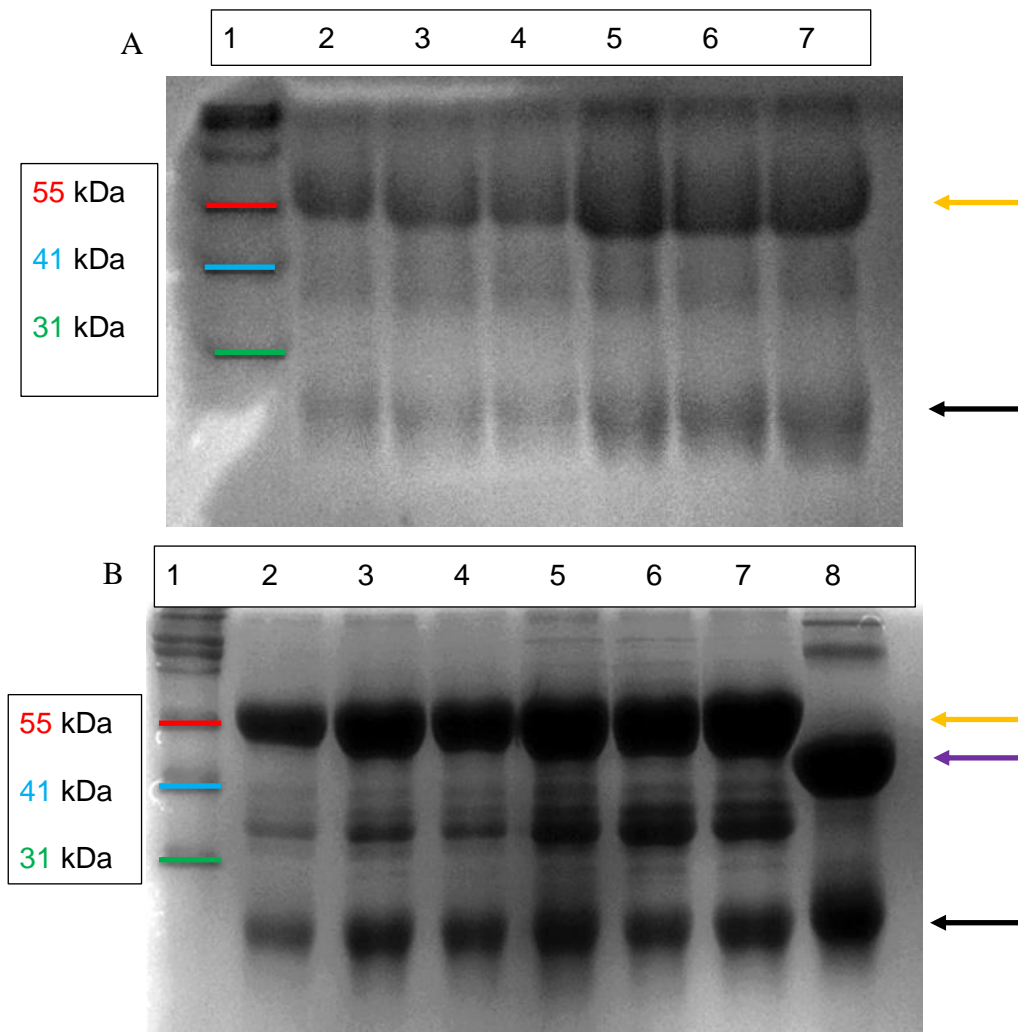
Por otra parte, no se observó relación entre la cantidad de proteína presente en el huevo y el hecho de si el animal fue expuesto al rotavirus. Debido a que no se realizó una purificación de los anticuerpos específicos contra el virus, en las fracciones recolectadas se encuentran todas las proteínas propias del ave, incluyendo IgY que reconocen otros antígenos. Según lo consultado en bibliografía, la cantidad generada de IgY específicas tras una vacunación a virus inactivado, ronda entre 4 mg/mL y 7 mg/mL (81-84), por lo que es difícil ver una diferencia clara cuantificando proteínas totales. A futuro podría realizarse una purificación específica para evaluar la producción de anticuerpos frente a rotavirus de las diferentes gallinas inmunizadas.

**Tabla 2.** Concentración de proteína, y cantidad total de proteína recuperada de la yema de huevo en distintas fechas y animales.

<b>Huevo</b>	<b>Concentración de proteínas (mg/mL)</b>	<b>Proteína total (mg)</b>
1.13a	32,96	32,96
1.13b	39,52	39,52
1.70	82,04	492,24
2.4	46,80	46,80
2.18a	32,14	32,14
2.18b	31,43	31,43
2.28	14,76	88,56
2.36	29,08	174,48
2.37	11,94	71,64
2.50	38,58	231,48
2.70	59,71	358,26
3.8	24,05	24,05
3.13	29,68	29,68
3.18	34,71	34,71
3.50	28,66	171,96
3.70	36,28	217,68
4.5	18,93	18,93
4.29	9,49	56,94
4.35	11,72	70,32
4.36	14,94	89,64
4.50	41,78	250,68
4.70	67,12	402,72

## 4.5.2 Visualización del perfil proteico mediante una SDS-PAGE

Es posible ver el patrón de proteínas de una muestra mediante una electroforesis SDS-PAGE. Al ser una técnica que se realiza con las proteínas desnaturalizadas, estas son separadas de acuerdo a su tamaño en un gel de poliacrilamida.



**Figura 7.** (A) SDS-PAGE de las fracciones recuperadas tras extracción proteica. (1) Marcador de peso molecular. (2) Fracción proteica recuperada de 4.5. (3) Fracción proteica recuperada de 3.18. (4) Fracción proteica recuperada de 2.18b. (5) Fracción proteica recuperada de 1.13a. (6) Fracción proteica recuperada de 3.8. (7) Fracción proteica recuperada de 2.4. (B) (1) Marcador de peso molecular. (2) Fracción proteica recuperada de 4.50. (3) Fracción proteica recuperada de 3.50. (4) Fracción proteica recuperada de 2.50. (5) Fracción proteica recuperada de 4.50 liofilizado. (6) Fracción proteica recuperada de 3.50 liofilizado. (7) Fracción proteica recuperada de 2.50 liofilizado. (8) Anticuerpo humano (IgG). Las flechas amarillas indican la cadena pesada de la IgY, las flechas negras indican las cadenas livianas de IgY e IgG, la flecha violeta indica la cadena pesada de la IgG.

Se realizaron dos electroforesis, de manera de evaluar fracciones recuperadas de distintas fechas (Figura 7). Se lograron observar los patrones de migración esperados según lo reportado en bibliografía (85-87). Al analizarse la migración de las fracciones proteicas con anticuerpos mediante una SDS-PAGE, se pueden observar dos bandas principales, que corresponden a la cadena liviana y pesada. En estado nativo, estas cadenas se encuentran unidas por puentes disulfuro, pero en condiciones reductoras, se separan y migran diferencialmente. La cadena pesada de las IgY tiene un peso molecular de 67 kDa aproximadamente, mientras que la cadena liviana tiene un peso molecular de 25 kDa (85-87). La presencia de estas bandas se pudo confirmar en todas las condiciones, observando la primera a la altura de los 55 kDa, y la segunda se aprecia por debajo de los 31 kDa. Si bien el peso no coincide con lo reportado en bibliografía, asumimos que las bandas corresponden a las cadenas de IgY debido a que la cadena pesada del IgG tiene un peso molecular de aproximadamente 50 kDa, y en el gel se muestra casi a la altura de 41, y la cadena liviana que presenta el mismo peso en ambos casos, migró a la misma altura (Figura 7B).

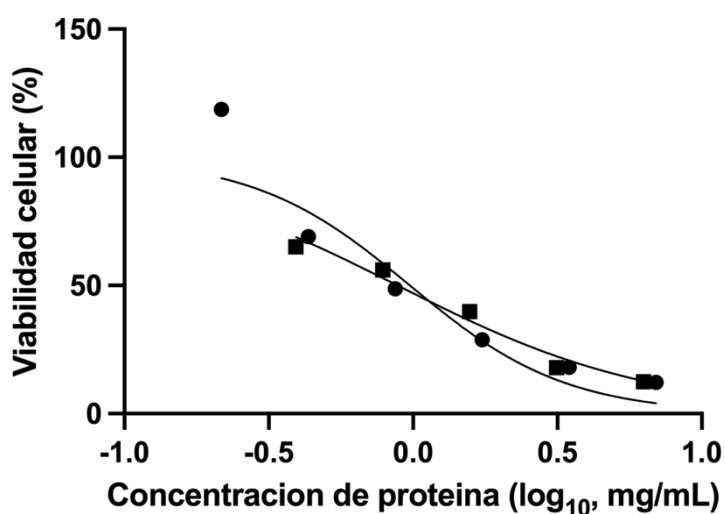
Entre las bandas correspondientes a las dos cadenas de las IgY, se aprecia en ambos geles la aparición de otra banda de un peso molecular aproximado de 36 kDa. La misma se presenta en todas las fracciones de yema de huevo, pero no se aprecia en el carril que contiene el anticuerpo humano (Figura 7B). Esto da a entender que la banda viene dada por una proteína propia de la yema de huevo, que según lo consultado en bibliografía puede corresponder a la  $\beta$ -livetina o a la fosvitina (36 kDa y 40 kDa respectivamente) (88-90). Otras proteínas abundantes en la yema del huevo son la lipovitelina y la lipovitelenina, pero las mismas no se aprecian en el gel debido a que son hidrofóbicas y se espera que hayan sido separadas durante la delipidación (91).

No se observó una relación entre la cantidad de IgY presente por mg de proteínas y ninguno de los tratamientos o edad de los huevos. Dado que se sembró la misma cantidad de proteínas totales en todos los carriles, en caso de estar presentes las IgY específicas para el rotavirus porcino no se encuentran en una concentración suficiente para ser identificadas por esta técnica.

## 4.6 Evaluación de la citotoxicidad de la fracción proteica de la yema de huevo en células IPEC-J2

Se realizó un ensayo de citotoxicidad para evaluar cómo influye la presencia del extracto proteico en el cultivo celular. Esto es debido a que, al momento de realizar un estudio para observar el posible efecto protector del anticuerpo frente al virus, se debe tener en consideración el hecho de que el propio anticuerpo no esté disminuyendo la viabilidad celular, y en caso de que lo haga, cuantificar en qué medida.

Para ello, se cultivaron células IPEC-J2 en placas de 96 pocillos, donde se probaron diferentes concentraciones de las fracciones obtenidas de la yema de huevo de las gallinas 2 y 3 (0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,8 mg/mL, 1,6 mg/mL, 3,2 mg/mL y 6,4 mg/mL).



**Figura 9.** Ensayo de citotoxicidad de la proteína aislada de la yema de huevo sobre las células IPEC-J2. (■) Huevo 2.18a; (●) Huevo 3.18.

El efecto citotóxico se expresa a través de la IC<sub>50</sub>. Esta medida indica qué concentración de proteína disminuye la viabilidad celular al 50 % (92). A partir de un ajuste no lineal, se obtiene que la IC<sub>50</sub> para el caso de la gallina 2 es 0,88 mg/mL (de 0,74 mg/mL a 1,04 mg/mL con un rango de confianza del 95%) y para la gallina 3 es 0,84 mg/mL (0,77 mg/mL a 0,93 mg/mL con un rango de confianza del 95%). Observando los rangos de confianza, concluimos que ambos extractos proteicos presentan una IC<sub>50</sub> estadísticamente similar. Como los protocolos

de extracción y las condiciones de producción de todos los huevos son iguales, podemos asumir que la citotoxicidad para los otros huevos es la misma.

Para ensayos futuros, elegimos trabajar con una dilución de las proteínas de 1/160, correspondiente a 0,2 mg/mL. Dicha decisión se basó en que buscamos minimizar la pérdida de viabilidad celular, manteniendo el mayor título de anticuerpos posible, para de esa forma maximizar la posibilidad de neutralización del virus por parte del anticuerpo.

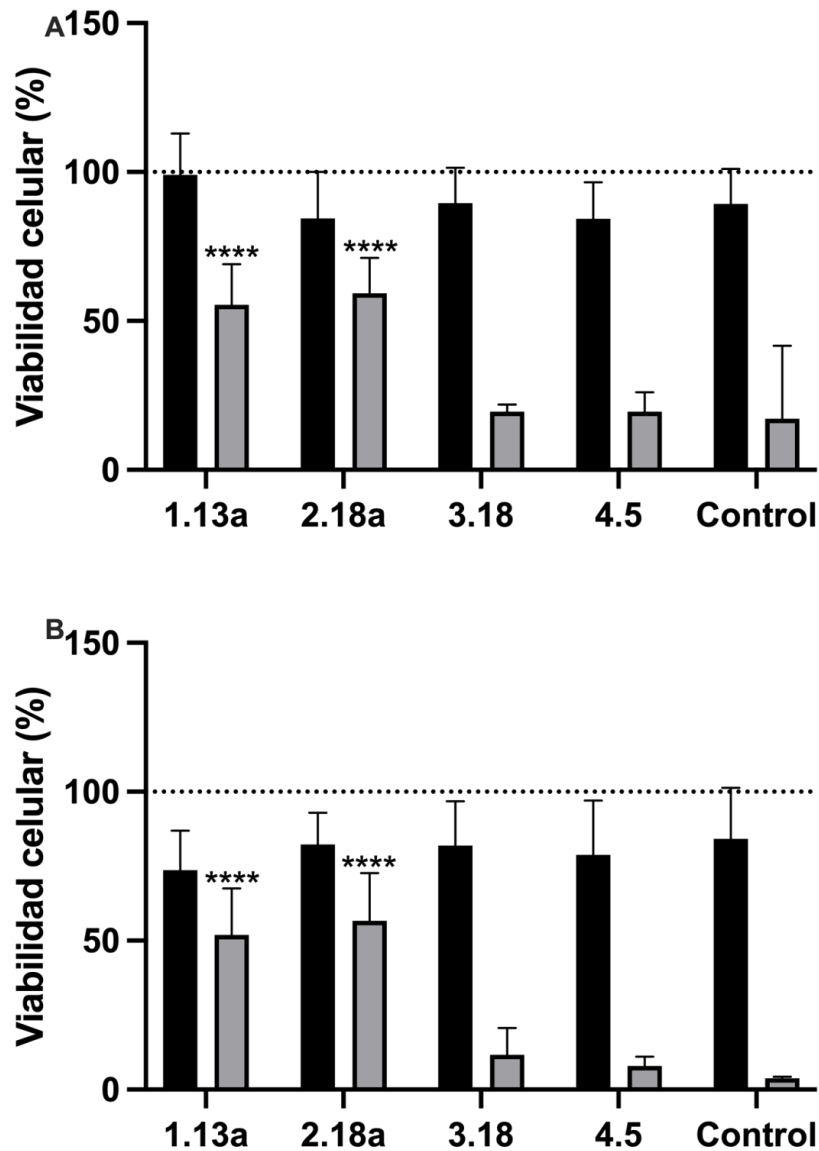
#### **4.7 Evaluación de la capacidad neutralizante de las IgY purificadas de la yema de huevo sobre el rotavirus porcino**

Para poder evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos frente a la infección viral es necesario infectar un cultivo celular con virus y analizar en qué medida se ve afectada la viabilidad celular ante un agregado de estos. En teoría, al adherirse a las proteínas superficiales del virus, los anticuerpos lo neutralizan, evitando que pueda unirse con los receptores celulares para entrar a la célula y replicarse (90).

En primer lugar, se realizaron cultivos celulares en placas de 96 pocillos con células IPEC-J2. Luego de ser activado el virus, se incubaron durante una hora la mitad de los pocillos con el mismo. Posteriormente, se removió el sobrenadante y se agregó medio de cultivo conteniendo las proteínas aisladas de la yema de huevo de los huevos cercanos a los 15 días luego de la segunda inmunización, donde se espera encontrar las IgY específicas contra el rotavirus porcino. La mitad de las placas fueron incubadas durante 24 horas, mientras que la otra mitad fue incubada por 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo se realizó una tinción con cristal violeta para determinar la viabilidad celular (Figura 10).

La viabilidad celular no presenta diferencias significativas en los pocillos donde no se agregó virus, tanto a las 24 como a las 48 horas ( $p > 0,05$ ). Esto indica que, a la concentración de proteínas utilizada, no se observa efecto citotóxico. Cuando se analiza lo sucedido al agregar el virus, como es de esperarse, la viabilidad de la condición control desciende a 17,17% en 24 horas y a 3,85% en 48 horas. Esto indica que el virus fue capaz de infectar a las células y como resultado la viabilidad desciende. También se presenta un patrón similar con las gallinas 3 y 4, donde se ve gran diferencia entre el ensayo con y sin virus. Las condiciones 3.18 y 4.5 alcanzan

unos valores de 19,51% y 19,53 respectivamente a las 24 horas de incubación (Figura 10A), y a las 48 horas de incubación alcanzan un valor de viabilidad de 11,63% y 7,98% respectivamente con respecto a la condición control sin virus (Figura 10B). La pérdida de viabilidad celular indica que no hay componentes propios de las proteínas de la yema de huevo que inhiban de manera inespecífica la infección del virus.



**Figura 10.** Evaluación de la capacidad neutralizante de las IgY, estudiado mediante el cultivo de células IPEC-J2 con las fracciones proteicas recuperadas de las yemas de huevo de los animales, en presencia y ausencia de virus. (A) 24 horas de incubación. (B) 48 horas de incubación. En negro se presentan las fracciones sin virus y en gris las fracciones con virus.

En el caso de las gallinas 1 y 2 se ve que, si bien hay un descenso en la viabilidad celular, es mucho menor que en las demás condiciones, y presenta una diferencia significativa al compararla con el control ( $p < 0,05$ ). Esto indicaría la presencia de IgY con un efecto protector para las células frente a esta cepa de rotavirus porcino. Se ve que la replicación viral no se detiene por completo, ya que en ambos los casos la viabilidad celular es más baja que su condición sin virus correspondiente, pero la misma es significativamente mayor que en los pocillos incubados con las proteínas aisladas de gallinas que no fueron inoculadas con el antígeno. La viabilidad celular en las condiciones 1.13a y 2.18a descienden a un valor de 55,5% y 59,3% respectivamente en las 24 horas de incubación con virus, siendo el valor del control con virus 17,17% en este caso (Figura 10A). Por su parte, con 48 horas de incubación, estas mismas condiciones descienden a valores de 51,98 % (1.13a) y 56,68 % (1.18a), mientras que el control es 3,84% (Figura 10B).

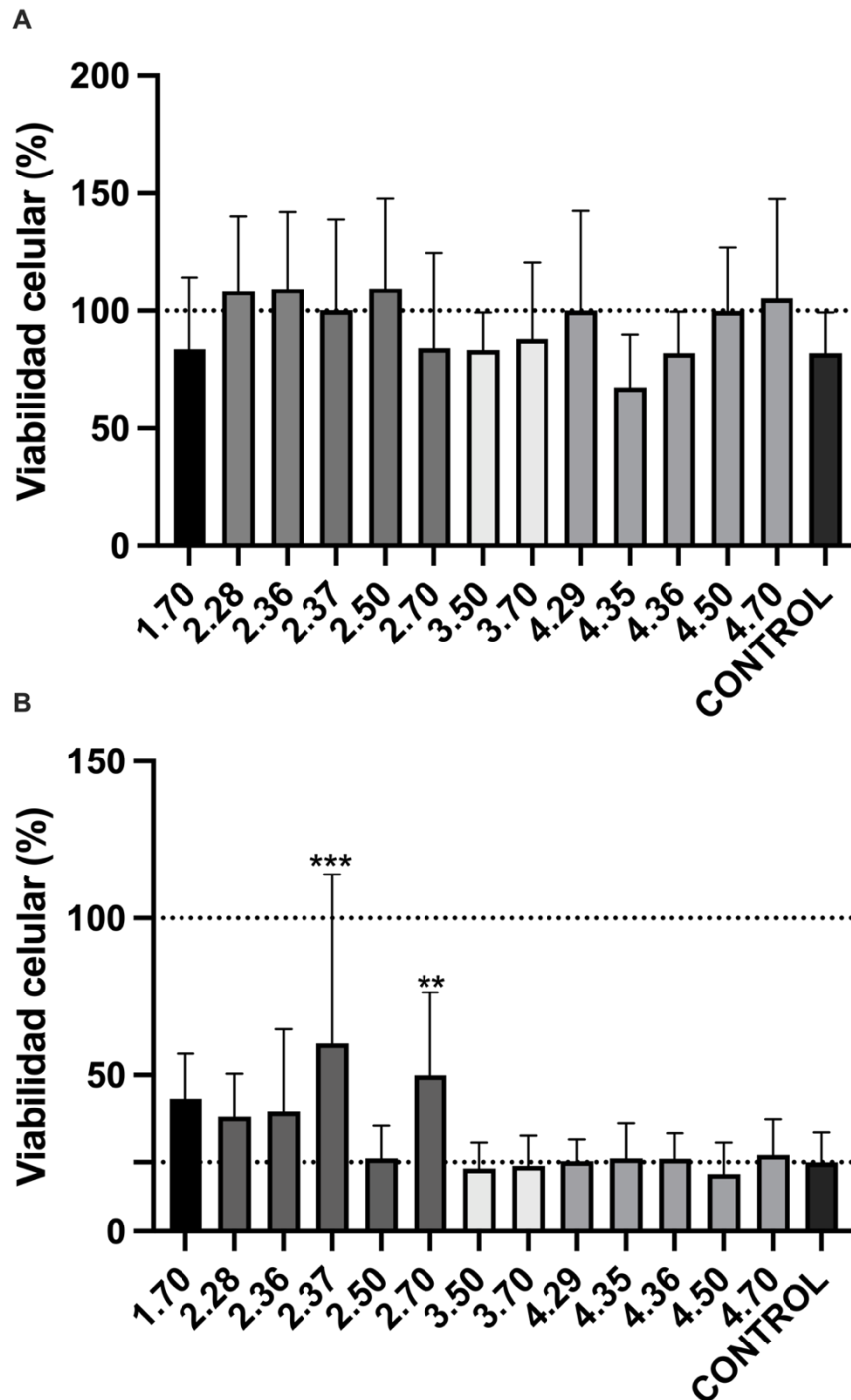
Si bien la gallina 2 fue inoculada con una concentración diez veces mayor de antígeno, no aparenta haber diferencia en la protección que los anticuerpos generan frente al virus con respecto a la gallina 1, debido a que los valores de viabilidad son similares ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, no se puede sacar una conclusión estadísticamente válida, ya que se inmunizó solamente una gallina por condición y esto puede estar sujeto a la variabilidad individual de la respuesta inmune.

Por último, tanto los cultivos que fueron incubados durante 24 horas como los que fueron incubados por 48 horas presentan el mismo patrón de descenso de viabilidad celular en las condiciones con yema de huevo de gallinas que no fueron inoculadas con el antígeno, y también presentan la atenuación del efecto viral con los extractos de las gallinas 1 y 2. Debido a esto, se decide que para futuros ensayos solo se realizará la incubación durante 24 horas.

Se decidió agregar las proteínas luego de infectar las células con el virus para evaluar la capacidad neutralizante de estas como tratamiento una vez ya dada la infección. A futuro se podría probar la opción de agregar las proteínas junto con el virus activado para estudiar el efecto como método preventivo. Esperamos que de esta manera el resultado sea más notorio, ya que en este caso se evitaría el ingreso del virus a la célula.

#### 4.7.1 Evaluación de la neutralización con IgY producidas posteriormente

Las fracciones proteicas que fueron purificadas de las yemas de huevos recolectados posteriormente se cultivaron junto con células IPEC-J2 y el virus, para evaluar si se mantiene una cantidad de anticuerpos específicos suficiente para neutralizar el virus (Figura 11).



**Figura 11.** Evaluación de la capacidad neutralizante de las IgY, estudiado mediante el cultivo de células IPEC-J2 con las fracciones proteicas recuperadas de las yemas de huevo de los animales. (A) Incubado sin virus. (B) Incubado con virus.

En primer lugar, se pudo observar que la viabilidad celular en todas las condiciones sin virus es muy similar a la viabilidad celular en la condición de control. Esto indica que las células pudieron crecer sin problema a pesar de contener las proteínas aisladas de la yema de huevo. Al igual que para las fracciones proteicas analizadas cerca de los 15 días después de la segunda inmunización, no se observó efecto protector de las fracciones recuperadas de las gallinas no inoculadas con el antígeno viral.

Con respecto a la gallina 1, solamente se pudo analizar una fracción de proteínas, correspondiente a 70 días después de la segunda dosis, ya que fue el único huevo que se pudo recuperar de este animal. Si bien la diferencia no es significativa, se puede observar una mayor viabilidad celular al compararla con el control, lo cual indica que incluso 70 días después de la segunda dosis, los huevos producidos contienen IgY capaces de neutralizar la infección viral.

Es posible observar una tendencia de que las fracciones extraídas de la yema de huevo de la gallina 2 protegen a las células frente al virus. Si bien la recuperada a los 50 días después de la segunda dosis (2.50) presenta una viabilidad celular comparable con el control sin anticuerpos, la de los 37 (2.37) y 70 (2.70) días, presenta una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) respecto a este. A su vez, las fracciones recuperadas del mismo animal a los 28 (2.28) y 36 (2.36) días no presentan una diferencia significativa ( $p > 0,05$ ), pero se puede apreciar una diferencia en la viabilidad celular con respecto a la condición control. La viabilidad encontrada para los huevos 2.28 y 2.36 fue de 43,38% y 43,15% respectivamente, mientras que en el caso control se vio un 28,96% de viabilidad.

Según lo reportado en bibliografía, los altos títulos de anticuerpos pueden durar entre 6 y 10 semanas contando a partir de una inmunización de refuerzo (94,95). Las fracciones analizadas entran en ese rango temporal, por lo tanto, era de esperarse que se puedan encontrar IgY capaces de neutralizar al virus. Si bien aún se observan IgY específicas en esa fecha, la protección no es tal como las aisladas anteriormente, por lo que podemos inferir que disminuyó el título de anticuerpos en la yema de huevo. En otro estudio consultado, se reporta que la máxima producción de título de anticuerpo se da cercano a los 21 días después de la primera dosis (81). De todas maneras, para determinar la cantidad de IgY específicas a lo largo del tiempo es necesario realizar un ELISA, que mide el título de anticuerpos específicos frente a un antígeno (94).

Estudios realizados previamente indican que el título y la duración de los anticuerpos en la yema de huevo depende de factores tales como el título viral del inóculo y la cantidad de dosis administradas (81-83). Eventualmente se podría considerar modificar alguna de estas variables con el objetivo de mantener una mayor respuesta inmune durante un tiempo más prolongado.

## **4.8 Liofilización de las fracciones proteicas**

La liofilización es un proceso en el cual se desecan los alimentos, medicamentos u otras sustancias, mediante su congelación y la posterior sublimación del hielo (96). Este proceso se basa en remover el agua presente en una solución, y de esa manera permitir la estabilidad prolongada de distintos compuestos orgánicos o inorgánicos, ya que al reducir el porcentaje de humedad del compuesto, se minimiza el riesgo de colonización de microorganismos, alteraciones fisicoquímicas que desestabilicen el componente activo o degradación del producto. Además, una ventaja para el caso de proteínas es que permite mantener su estructura tridimensional durante un tiempo prolongado sin alterar su función, ya que el proceso de liofilización no requiere de altas temperaturas (97).

El mantenimiento de productos en cadena de frío suele ser muy costoso y complejo desde el punto de vista logístico. Lo ideal cuando se comercializa un producto es que su almacenamiento pueda ocurrir a temperatura ambiente. En el caso de los huevos, se estima que los mismos pueden permanecer en buen estado a temperatura ambiente durante cuatro semanas solamente, mientras que la proteína purificada apenas unas horas (98).

Este proyecto tiene como objetivo a futuro la aplicación de estos anticuerpos en criaderos de cerdo para prevenir la infección del rotavirus porcino. Por lo tanto, la forma de almacenamiento y la estabilidad del producto son factores que se deben tener en cuenta. Por esta razón, se decidió estudiar la liofilización de las yemas de huevo delipidadas y evaluar la actividad de las inmunoglobulinas luego de esta.

Se decidió liofilizar los huevos que fueron recolectados a los 50 y 70 días después de la segunda dosis.

### 4.8.1 Recuperación de proteína de las fracciones liofilizadas

Finalizada la liofilización, se reconstituyeron las fracciones en PBS, y se precipitaron las proteínas. Una vez obtenidas las fracciones, se realizó un ensayo de cuantificación proteica mediante BCA para evaluar la cantidad de proteínas presentes luego del proceso de liofilización (Tabla 3).

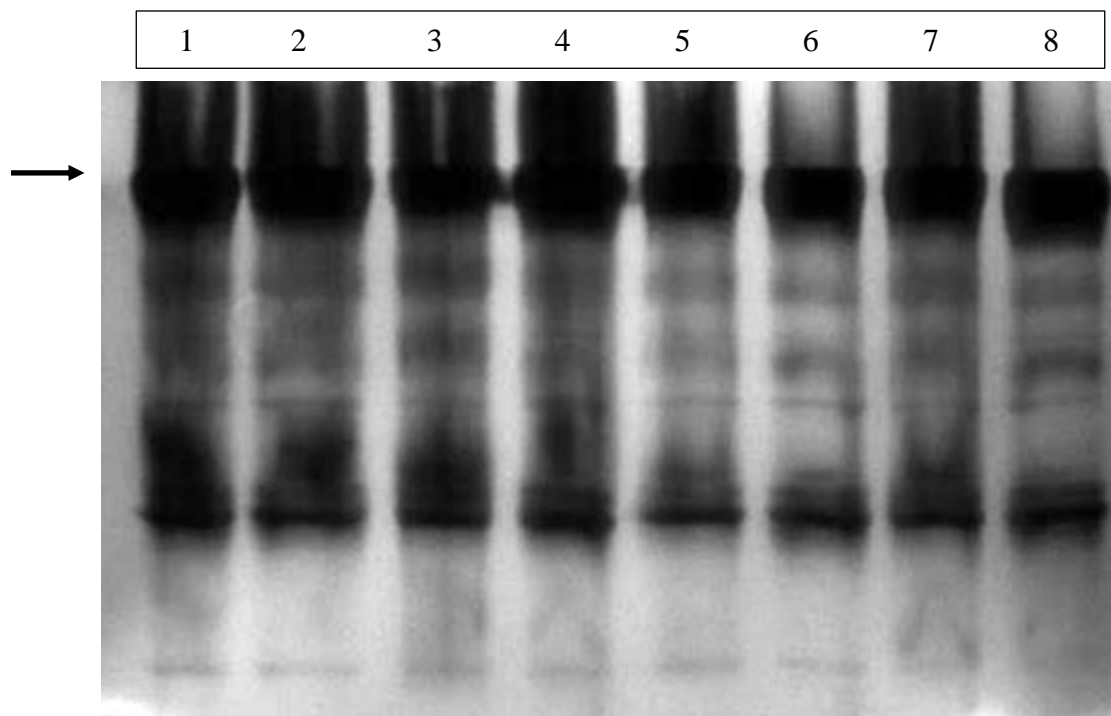
**Tabla 3.** Concentración de proteínas recuperadas de las yemas de huevo liofilizadas.

Huevo	Proteína total previo a la liofilización (mg)	Proteína total luego de la liofilización (mg)
1.70	492,24	27,66
2.50	231,48	38,36
2.70	358,26	35,32
3.50	171,96	45,22
3.70	217,68	63,3
4.50	250,68	43,18
4.70	402,72	40,92

Durante el proceso de liofilización se pierden proteínas, ya que la cantidad recuperada luego del procedimiento es considerablemente menor a la que cada fracción contenía previamente. En algunos casos, el decaimiento alcanzó hasta un 94,37% (1.70). Esto puede deberse a múltiples factores, como por ejemplo la configuración del programa de liofilización, el pH, formación de cristales, entre otras (99). De todas maneras, este porcentaje de recuperación es bajo comparado con lo reportado en otro estudio, donde se muestra que tras el proceso de liofilización se pierde entre un 20 % y un 45 % de actividad biológica (100). El porcentaje de recuperación se puede aumentar agregando crioprotectores tales como glicerol a la solución previo a la liofilización (99).

#### 4.8.2 Visualización de proteínas liofilizadas mediante electroforesis en gel no desnaturizante.

Se realizó una electroforesis no desnaturizante (Figura 12) de manera de evaluar si el proceso de liofilización afecta la estructura de las proteínas, ya que esto podría indicar la pérdida de su función. Como esta técnica separa las proteínas en base a peso molecular y forma, podemos comparar si las fracciones liofilizadas y no liofilizadas mantienen la misma estructura, debido a que el peso no varía ante una desnaturización (101). Si la estructura se mantiene tras la liofilización, se apreciará en el gel una única banda correspondiente a la molécula completa.



**Figura 12.** Electroforesis en gel no desnaturizante. (1) Fracción proteica del huevo 1.70. (2) Fracción proteica del huevo 2.70. (3) Fracción proteica del huevo 3.70. (4) Fracción proteica del huevo 4.70. (5) Fracción liofilizada del huevo 1.70. (6) Fracción liofilizada del huevo 2.70. (7) Fracción liofilizada del huevo 3.70. (8) Fracción liofilizada del huevo 4.70. La flecha indica la banda correspondiente a las IgY.

En todas las condiciones sembradas se aprecian dos bandas de gran intensidad, una en la parte superior del gel y otra en la parte inferior. Según lo consultado en bibliografía (102), la banda superior corresponde a las IgY. El hecho de que el patrón de bandas sea similar en todas las condiciones, independientemente de si fueron liofilizadas o no, indica que el proceso no alteró

la estructura tridimensional de la proteína; por lo tanto, se espera que la misma siga presentando actividad biológica.

Por otra parte, se puede apreciar otra banda de gran intensidad por debajo de la banda correspondiente a las IgY. Según lo reportado en bibliografía esta banda no se relaciona con las inmunoglobulinas, ya que al purificar IgY de manera específica, las otras proteínas desaparecen (102). Probablemente se trate de la  $\beta$ -livetina o la fosvitina, que como mencionamos anteriormente, son proteínas propias de la yema de huevo.

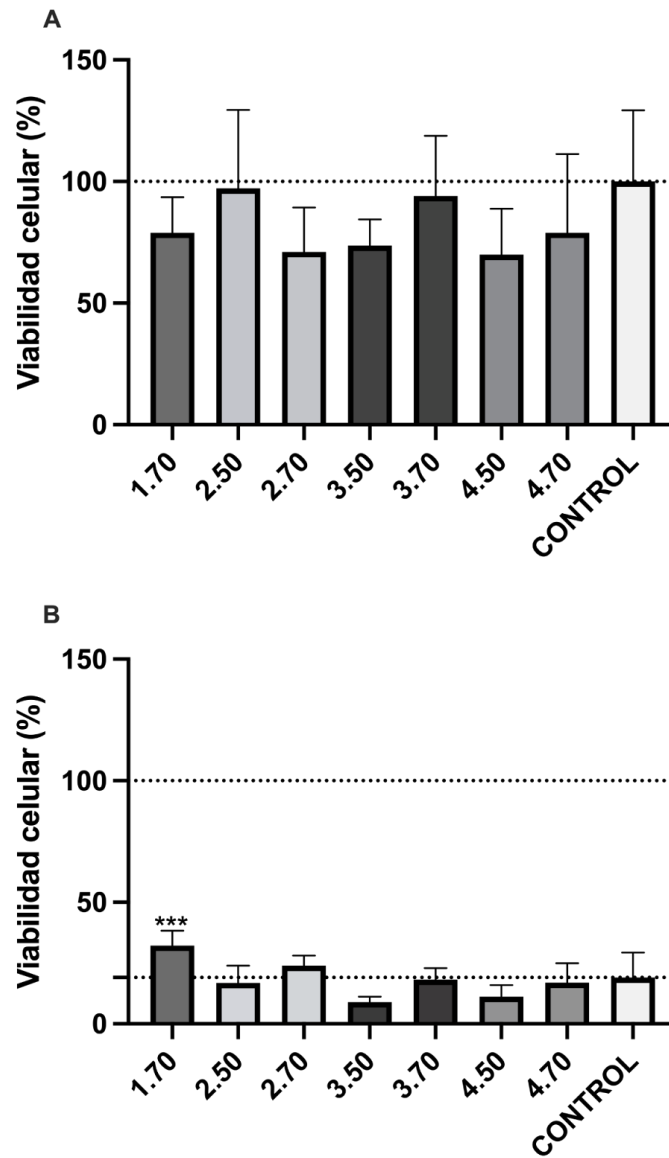
### **4.8.3 Evaluación de la capacidad neutralizante de las IgY liofilizadas**

Luego de la liofilización de las proteínas de los huevos de 50 y 70 días después de la segunda dosis, se estudió si mantienen la capacidad de neutralizar el rotavirus porcino en células IPEC-J2 (Figura 12).

Al comparar la viabilidad celular en las condiciones sin virus (Figura 12A) se ve que es similar en todos los casos, incluyendo la condición control. Es decir, las células crecieron de manera adecuada a pesar de contener las fracciones de yema de huevo.

Cuando se agrega virus al cultivo celular, se puede apreciar un descenso general en la viabilidad; sin embargo, este no se presenta en todos los casos por igual. Las fracciones 1.70 y 2.70 presentan una viabilidad levemente mayor, presentando un aumento significativo para el caso de 1.70 ( $p < 0,05$ ). De todas maneras, este efecto es menor en comparación con el observado en las fracciones sin liofilizar (Figura 10 y 11). Por ejemplo, la fracción 1.70 sin liofilizar dio una viabilidad de 42,39 % con respecto a la condición control cuando se lo expuso al virus, mientras que la fracción liofilizada presentó un 32,15 %.

Si bien la fracción 2.50 no aparenta tener efecto neutralizante, este resultado era esperable, dado que el extracto sin liofilizar de esta fracción tampoco mostró capacidad protectora.



**Figura 13.** Evaluación de la capacidad neutralizante de las IgY liofilizadas, estudiado mediante el cultivo de células IPEC-J2 con las fracciones proteicas recuperadas de las yemas de huevo liofilizadas, en presencia (B) y ausencia de virus (A).

## **5. Conclusiones y perspectivas a futuro**

### **5.1 Conclusiones**

Se logró cultivar el rotavirus porcino VR-893 en células MA104 y producir una vacuna inactivada con el mismo. Esta se inoculó en gallinas, resultando en la producción de IgYs específicas anti-rotavirus porcino VR-893. Se comprobó que estas son efectivas para controlar la acción del virus *in vitro*, mediante el estudio de la viabilidad de células infectadas con rotavirus en presencia de los anticuerpos generados. También se pudo observar que la producción de IgY perdura a lo largo del tiempo, detectando presencia de las mismas incluso 70 días después de la segunda inmunización.

Se evaluó la generación de fracciones liofilizadas observándose que las mismas mantienen efecto protector de las IgY frente al ataque del rotavirus.

### **5.2 Perspectivas a futuro**

A futuro, se debería poner a punto el aislamiento de las IgY, de manera de optimizar la recuperación de las proteínas, eliminando contaminantes que se encontraron en la fracción proteica. Se podría plantear la obtención únicamente de las IgY específicas contra rotavirus, por ejemplo, mediante el uso de una cromatografía de afinidad.

A su vez, creemos que es relevante la cuantificación de los anticuerpos generados. La misma se puede realizar mediante un ELISA y permitirá hacer un seguimiento de la producción de IgY a lo largo del tiempo. Una vez puesta a punto la técnica, se podrá definir la formulación de la vacuna y el esquema de vacunación óptimos, de manera de aumentar y mantener por más tiempo la respuesta inmune, generando mayor cantidad de inmunoglobulinas. Para ello, se propone contar con más animales a futuro, para poder realizar réplicas de diferentes condiciones y así poder evaluar estadísticamente la producción de IgY.

Se deberían estandarizar los procesos de producción de la vacuna. Para ello es necesario establecer una serie de controles que aseguren que la misma es fabricada de igual manera en todos los casos. Como el objetivo de este trabajo fue realizar una prueba de concepto para

evaluar la producción de IgY en gallinas contra un rotavirus porcino, se omitieron dichos controles, pero a futuro es importante tenerlos en cuenta. Un ejemplo de esto es el control de inactivación de virus, el cual asegura que no existen partículas virales infectivas en la vacuna formulada.

Por otro lado, uno de los intereses principales de este trabajo es el posible tratamiento y prevención del virus en cerdos, administrando los anticuerpos producidos como suplementos alimenticios en criaderos. Para ello es necesario realizar pruebas *in vivo* donde se demuestre que los anticuerpos son capaces de reconocer al virus en los animales y de protegerlos frente a una infección. Ya que se desea que el anticuerpo actúe en el intestino del animal, es necesario desarrollar un método de *delivery* adecuado que permita la protección de las proteínas al pasar por el tracto digestivo, y se libere en la zona deseada.

Para que los anticuerpos producidos presenten una buena capacidad neutralizante *in vivo*, es necesario tener en cuenta las cepas circulantes en una región dada. Para ello, se deben realizar estudios de prevalencia de diferentes cepas de rotavirus, y fabricar vacunas a partir de aislados de muestras fecales de cerdos. De esa forma, será más probable disminuir la prevalencia del virus, ya que las IgY generadas serán específicas frente a las cepas circulantes en los criaderos de cerdo.

La técnica implementada en este trabajo de utilizar gallinas como modelo animal para producir anticuerpos, puede aplicarse para otros casos en los que se busquen tratar o prevenir enfermedades por medio de la inmunidad pasiva, tanto para cerdos como para otros animales. También se podrían fabricar a futuro vacunas multivalentes, para de esa manera obtener en una misma formulación, anticuerpos frente a diferentes patógenos.

## 6. Referencias bibliográficas

1. Segura A. Cuánta proteína diaria necesita (realmente) tu cuerpo [Internet]. La Vanguardia; 2019 [citado 2021 Jun 25]. Disponible desde: <https://www.lavanguardia.com/comer/materia-prima/20190129/4680507422/proteinas-comida-salud-calorias-cantidad.html>.
2. Rivera VMR. Bases de la Alimentación Humana. Netbiblo; 2008.
3. Ayala Vargas C. Importancia nutricional de la carne. Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales. 2018; 5: 54–61.
4. Carne de Cerdo [Internet]. INAC; 2013 [citado 2021 Jul 27]. Disponible desde: <https://www.inac.uy/innovaportal/v/8295/19/innova.front/carne-de-cerdo>.
5. Ritchie H. Qué países del mundo consumen más carne (y hay uno de Latinoamérica) [Internet]. Oxford; 2019 [citado 2021 Jun 25]. Disponible desde: <https://www.bbc.com/mundo/noticias-47119001>.
6. Meat market review: Overview of global meat market developments in 2020. FAO; 2021.
7. FAO's Animal Production and Health Division: Meat & Meat Products [Internet]. FAO; 2019 [citado 2021 Jun 26]. Disponible desde: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/home.htm>.
8. Meat market review: Overview of global meat market developments in 2017. FAO; 2018.
9. Meat market review: Overview of global meat market developments in 2018. FAO; 2019.
10. [Internet]. AUPCerdo; 2014 [citado 2021 Jun 27]. Disponible desde: [https://www.aupcerdo.com/quienes\\_somos.php](https://www.aupcerdo.com/quienes_somos.php).
11. Consumo de carnes en Uruguay [Internet]. INAC; 2020. [citado 2021 Jun 27]. Disponible desde: <https://www.inac.uy/innovaportal/v/18275/10/innova.front/consumo>.
12. Samuelle, J. El chancho les gana: ¿por qué hay cada vez más productores?. El observador [Internet]. 2019 [citado 2021 Jun 26]. Disponible desde: <https://www.elobservador.com.uy/nota/el-chancho-va-a-contramano-2019823191222>.
13. Anuario estadístico 2020 [Internet]. INAC; 2020 [citado 2021 Jun 27]. Disponible desde: [https://www.inac.uy/innovaportal/file/19145/1/inac\\_anuario\\_2020\\_version\\_digital-1.pdf](https://www.inac.uy/innovaportal/file/19145/1/inac_anuario_2020_version_digital-1.pdf).
14. Rotaviral Enteritis [Internet]. Iowa State University; 2021 [citado 2021 Jun 27]. Disponible desde: <https://vetmed.iastate.edu/vdpam/FSVD/swine/index-diseases/rotaviral-enteritis>.
15. Rotavirus infections in livestock and poultry [Internet]. CABI; 2019 [citado 2021 Jun 27]. Disponible desde: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/66267>.
16. Dewey C, Carman S, Pasma T, Josephson G, McEwen B. Relationship between group A porcine rotavirus and management practices in swine herds in Ontario. La Revue Veterinaire Canadienne. 2003; 44(8):649.

17. Linden J. Rotaviral Diarrhoea in Pigs [Internet]. 2021 [citado 2021 Jun 26]. Disponible desde: <https://www.thepigsite.com/articles/rotaviral-diarrhoea-in-pigs>.
18. García D, Munguia J, Gonzalez W. Evaluación del impacto productivo en el tratamiento preventivo para Rotavirus Porcino en cerdos de maternidad a base de Inmunoglobulinas de origen aviar específicas para Rotavirus, Isospora suis, E. coli y Gastroenteritis. Trabajo presentado en: XLVIII Congreso Nacional AMVEC; 2013 Oct 21; Mazatlán, México.
19. Rojo LM. Repercusiones económicas debido al aumento de porcentaje de cerdos con afecciones viscerales y de la canal con bajo peso en la planta de sacrificio de Porcicarnes. Antioquia: Aristizabal LMR, editor; 2018.
20. ELECTRODEX® GLN PEDIÁTRICO [Internet]. Pisa Agropecuaria [citado 2021 Jul 21]. Disponible desde: <https://www.ganaderia.com/producto/ELECTRODEX%C2%AE-GLN-PEDIATRICO>.
21. Salf LJ, Viasova AN. Rotaviral Diarrhea in Pigs [Internet]. National Pork Board; 2013 [citado 2021 Jun 26]. Disponible desde: <https://porkgateway.org/resource/rotaviral-diarrhea-in-pigs/>.
22. Rotavirus Infection [Internet]. 2021 [citado 2021 Jun 27]. Disponible desde: <https://www.thepigsite.com/disease-guide/rotavirus-diarrhoea>.
23. Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus. Emerging infectious diseases. 1998; 4(4):561.
24. Gray J, Desselberger U. Rotaviruses: Methods and Protocols. New Jersey: Springer Science & Business Media; 2000.
25. Suzuki H. Rotavirus Replication: Gaps of Knowledge on Virus Entry and Morphogenesis. The Tohoku journal of experimental medicine. 2019; 248(4):285–296.
26. Desselberger U. Rotaviruses. Virus research. 2014; 190:75–96.
27. Rosen BI, Parwani AV, Gorziglia M, Larralde G, Saif LJ. Characterization of full-length and polymerase chain reaction-derived partial-length Gottfried and OSU gene 4 probes for serotypic differentiation of porcine rotaviruses. Journal of clinical microbiology. 1992; 30(10):2644–2652.
28. Flint J, Racaniello VR, Skalka AM, Rall GF. Principles of Virology. 4ta ed. Washington DC: ASM Press; 2015.
29. Rotaviruses. [citado 2021 May 4]. Disponible desde: <https://www.springer.com/gp/book/9780896037366>.
30. Jourdan N, Maurice M, Delautier D, Quero AM, Servin AL, Trugnan G. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. Journal of virology. 1997; 71(11):8268–8278.
31. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Stevenson GW, Schwartz KJ. Diseases of Swine. 14va ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2019.

32. Park J-G, Alfajaro MM, Cho E-H, Kim J-Y, Soliman M, Baek Y-B, Park C-H, Lee J-H, Son K-Y, Cho K-O, et al. Development of a live attenuated trivalent porcine rotavirus A vaccine against disease caused by recent strains most prevalent in South Korea. *Veterinary research*. 2019; 50(1):1–16.
33. ProSystem® Rota. PORCINE ROTAVIRUS VACCINE [Internet]. Merck Animal Health; 2013. [Citado 2021 Jun 26]. Disponible desde: [https://www.merck-animal-health-usa.com/offload-downloads/prosystemrota\\_product\\_bulletin\\_tcm96-161597](https://www.merck-animal-health-usa.com/offload-downloads/prosystemrota_product_bulletin_tcm96-161597).
34. Welter MW, Welter CJ. Evaluation of killed and modified live porcine rotavirus vaccines in cesarean derived colostrum deprived pigs. *Veterinary microbiology*. 1990; 22(2-3):179–186.
35. Antibody [Internet]. Medline [citado 2021 Jun 26]. Disponible desde: <https://medlineplus.gov/ency/article/002223.htm>.
36. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*. 2005; 46(3).
37. Forthal DN. Functions of Antibodies. *Microbiology spectrum*. 2014; 2(4):1.
38. Harold Marcotte LH. Passive Immunization: Toward Magic Bullets. *Mucosal immunology*. 2015:1403-1434.
39. Anticuerpo [Internet]. National Human Genome Research Institute [citado 2021 Jul 30]. Disponible desde: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Anticuerpo>.
40. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. The structure of a typical antibody molecule. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. New York: Garland Science; 2001.
41. Passive Immunity [Internet]. National Institutes of Health; 2021 [citado 2021 Jun 27]. Disponible desde: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/glossary/passive-immunity>
42. Inmunización pasiva [Internet]. The College of Physicians of Philadelphia [citado 2021 Jun 27]. Disponible desde: <https://www.historyofvaccines.org/es/contenido/articulos/inmunizaci%C3%B3n-pasiva>.
43. Slifka MK, Amanna IJ. Passive Immunization. *Plotkin's Vaccines*. Stanley A. Plotkin; 2018.
44. Lardinois A, van den Berg T, Lambrecht B, Steensels M. A model for the transfer of passive immunity against Newcastle disease and avian influenza in specific pathogen free chickens. *Avian Pathology*. 2014; 43(2):118–124.
45. Faulkner OB, Estevez C, Yu Q, Suarez DL. Passive antibody transfer in chickens to model maternal antibody after avian influenza vaccination. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2013; 152(3-4).
46. Sullivan CV, Yilmaz O. Vitellogenesis and Yolk Proteins. *Encyclopedia of Reproduction*. 2018: 278–284.

47. Pereira EPV, van Tilburg MF, Florean EOP, Guedes MIF. Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. *International immunopharmacology*. 2019; 73:293.
48. Silva GB da, Faria LS da, Lopes CA, Nunes DS, Ribeiro VS, de Sousa JEN, Paiva GCM, Gonçalves-Pires MRF, Borges IP, Santos MM, et al. Egg yolk immunoglobulin Y as a promising tool to detect immune complexes in neurocysticercosis serum samples. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2020; 114(8):585–592.
49. González-Figueroa J, Rajme-Manzur D. Obtención de anticuerpos policlonales IgY antiparvovirus canino y evaluación en un sistema de aglutinación con látex [Internet]. *Vaccimonitor*; 2015 [citado 2021 Jul 27]. Disponible desde: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=63446>.
50. Bentes GA, Lanzarini NM, Lima LRP, de Abreu Manso PP, da Silva A dos S, da Silva e Mouta S, Junior, Guimarães JR, de Moraes MTB, Pelajo-Machado M, et al. Using immunoglobulin Y as an alternative antibody for the detection of hepatitis A virus in frozen liver sections. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015; 110(4):577.
51. Arnold M, Patton JT, McDonald SM. Culturing, storage, and quantification of rotaviruses. *Current protocols in microbiology*. 2009; 15.
52. Fariñas Guerrero F. Funcionamiento del sistema inmune del ave [Internet]. *Asociación Española de Ciencia Avícola* [citado 2021 Aug 7]. Disponible desde: [https://www.wpsa-aeca.es/aeca\\_imgs\\_docs/16751\\_sistema%20inmune%20del%20ave\\_farinas.pdf](https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/16751_sistema%20inmune%20del%20ave_farinas.pdf)
53. Van Kessel J, Strom S, Deason H, Van Moorlehem E, Berube N, Hauta S, Fernando C, Hill J, Fonstad T, Gerds V. Time and temperature requirements for heat inactivation of pathogens to be applied to swine transport trailers. *Journal of Swine Health and Production*. 2020; 29(1):19-28.
54. Torres JLL. Newcastle disease: Key points about vaccination [Internet]. 2021 [citado 2021 Aug 7]. Disponible desde: <https://www.thepoultrysite.com/articles/newcastle-disease-key-points-about-vaccination>.
55. Vacunación de las aves [Internet]. *Asociación Española de Ciencia Avícola* [citado 2021 Aug 7]. Disponible desde: [https://www.wpsa-aeca.es/aeca\\_imgs\\_docs/05\\_04\\_23\\_Manejo\\_de\\_vacunas\\_y\\_vacunaciones.pdf](https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/05_04_23_Manejo_de_vacunas_y_vacunaciones.pdf).
56. Vega CG, Bok M, Vlasova AN, Chattha KS, Fernández FM, Wigdorovitz A, Parreño VG, Saif LJ. IgY Antibodies Protect against Human Rotavirus Induced Diarrhea in the Neonatal Gnotobiotic Piglet Disease Model. *Public Library of Science*. 2012; 7(8).
57. Wibawan IW, Kristanti ND, Zulfa A, Sasi KD, Permatasari DA, Cahyono MI, Sibit G, Arnafia W. Production of IgY Against Infectious Bursal Disease Virus and Purification of IgY from Egg by Using Biocompatible Technique. *International journal of applied research in veterinary medicine*. 2018;16(3):175–179.
58. Vandeputte J, Martel A, Antonissen G, Verlinden M, De Zutter L, Heyndrickx M, Haesebrouck F, Pasmans F, Garmyn A. Research Note: Lyophilization of hyperimmune egg yolk: effect on antibody titer and protection of broilers against *Campylobacter* colonization. *Poultry science*. 2020; 99(4):2157–2161.

59. Vergauwen H. The IPEC-J2 Cell Line. *The Impact of Food Bioactives on Health*. 2015:125–134.
60. Berschneider HM. Development of normal cultured small intestinal epithelial cell lines which transport Na and Cl. *Gastroenterology*. 1989; 96(2).
61. Liu F, Li G, Wen K, Bui T, Cao D, Zhang Y, Yuan L. Porcine Small Intestinal Epithelial Cell Line (IPEC-J2) of Rotavirus Infection As a New Model for the Study of Innate Immune Responses to Rotaviruses and Probiotics. *Viral Immunology*. 2010; 23(2):135–149.
62. Zakrzewski S, Richter J, Krug S, Jebautzke B, Lee I, Rieger J, Sachtleben M, Bondzio A, Schulzke J, Fromm M, Günzel D. Improved Cell Line IPEC-J2, Characterized as a Model for Porcine Jejunal Epithelium. *Public library of science*. 2013; 8(11): e79643
63. Brosnahan AJ, Brown DR. Porcine IPEC-J2 intestinal epithelial cells in microbiological investigations. *Veterinary microbiology*. 2012;156(3-4):229–237
64. Wang X. Evaluation of Porcine IPEC-J2 Cell Line Growth Rate and Immune Response to *E. Coli* (0111:B4) LPS. *Biology*. 2014.
65. Yu H, Ding X, Shang L, Zeng X, Liu H, Li N, Huang S, Wang Y, Wang G, Cai S, et al. Protective Ability of Biogenic Antimicrobial Peptide Microcin J25 Against Enterotoxigenic *Escherichia Coli*-Induced Intestinal Epithelial Dysfunction and Inflammatory Responses IPEC-J2 Cells. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2018 [citado 2021 Aug 18];0. Disponible desde: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2018.00242/full>
66. Shen C, Christensen LG, Rasmussen PB, Kragh KM. In vitro immunomodulatory effects of thymol and cinnamaldehyde in a pig intestinal epithelial cell line (IPEC-J2). *Journal of Applied Animal Nutrition*. 2020;8(3):127–134.
67. Insulin-Transferrin-Selenium (ITS -G) (100X) [Internet]. Thermo Fisher Scientific [citado 2021 Aug 7]. Disponible desde: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/41400045>
68. IPEC-J2 [Internet]. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures [citado 2021 Aug 7]. Disponible desde: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-701>.
69. Schierack P, Nordhoff M, Pollmann M, Weyrauch KD, Amasheh S, Lodemann U, Jores J, Tachu B, Kleta S, Blikslager A, et al. Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochemistry and cell biology*. 2006; 125(3):293–305.
70. Generic protocol for monitoring impact of rotavirus vaccination on gastroenteritis disease burden and viral strains [Internet]. World Health Organization; 2008 [citado 2021 Jul 31]. Disponible desde: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69913>.
71. Smith EM, Estes MK, Graham DY, Gerba CP. A Plaque Assay for the Simian Rotavirus SA11. *Journal of General Virology*. 1979; 43(3):513–519.
72. Ward RL, Knowlton DR, Pierce MJ. Efficiency of human rotavirus propagation in cell

culture. *Journal of clinical microbiology*. 1984; 19(6):748–753.

73. Almeida JD, Hall T, Banatvala JE, Totterdell BM, Chrystie IL. The Effect of Trypsin on the Growth of Rotavirus. *Journal of General Virology*. 1978; 40(1):213–218.

74. 03-079-1B, 03-079-1C - Reactivo tripsina/EDTA by Biological Industries [Internet]. Biological Industries [citado 2021 Aug 7]. Disponible desde: <https://www.medicalexpo.es/prod/biological-industries/product-121629-875896.html>.

75. Benureau Y, Huet JC, Charpilienne A, Poncet D, Cohen J. Trypsin is associated with the rotavirus capsid and is activated by solubilization of outer capsid proteins. *The Journal of general virology*. 2005; 86(11):3143–3151.

76. Clark SM, Roth JR, Clark ML, Barnett BB, Spendlove RS. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. *Journal of virology*. 1981; 39(3):816–822.

77. Proescholdt TA. Propagation of Porcine Group C Rotavirus in an Intestinal Cell Line [Internet]. Iowa State University; 1992 [citado 2021 Jul 18]. Disponible desde: <https://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=19665&context=rtd>.

78. Jacob J. Raising chickens for egg production [Internet]. Poultry extension [citado 2021 Aug 7]. Disponible desde: <https://poultry.extension.org/articles/poultry-management/raising-chickens-for-egg-production/>.

79. Galea F. Nutrition and food management and their influence on egg quality [Internet]. Asociación Española de Ciencia Avícola [citado 2021 Aug 7]. Disponible desde: [https://www.wpsa-aeca.es/aeca\\_imgs\\_docs/4\\_nutrition\\_and\\_food\\_management\\_and\\_their\\_influence\\_on\\_egg\\_quality..pdf](https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/4_nutrition_and_food_management_and_their_influence_on_egg_quality..pdf).

80. Hassan MSH, Abdul-Careem MF. Avian Viruses that Impact Table Egg Production. *Animals*. 2020; 10(10):1747.

81. Artman C, Brumfield KD, Khanna S, Goepf J. Avian antibodies (IgY) targeting spike glycoprotein of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) inhibit receptor binding and viral replication. *Public Library of Science*. 2021; 16(5).

82. Gordon G, Moran G. Generation and Characterization of IgY antibodies from Lohmann Brown Hens Immunized with *Salmonella* spp. for their Subsequent Application in Nanotherapy. *Biology and Medicine*. 2016; 08(03).

83. Moreno-González P, Díaz G, Ramírez-Hernández M. Producción y purificación de anticuerpos aviares (IgYs) a partir de cuerpos de inclusión de una proteína recombinante central en el metabolismo del NAD<sup>+</sup>. *Revista colombiana de química*. 2013; 42(2):12-20.

84. Wang C, Mo H-M, Cheng Y-L, Wang L, Jiang Z-W, Liu W-Q, Li Y-L. Production and identification of chicken egg yolk antibodies against soluble egg antigen of *Schistosoma japonicum*. *Chinese journal of parasitology & parasitic diseases*. 2007; 25(3):193–197.

85. Zhu Y, Ma Y, Lu M, Zhang Y, Li A, Liang X, Li J. Efficient Production of Human Norovirus-Specific IgY in Egg Yolks by Vaccination of Hens with a Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Expressing VP1 Protein. *Viruses*. 2019; 11(5).

86. Goldring JPD, Dean Goldring JP, Coetzer THT. Isolation of chicken immunoglobulins (IgY) from egg yolk. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2003; 31(3):185–187.
87. Li X-Y, Jin L-J, Lu Y-N, Zhen Y-H, Li S-Y, Wang L-H, Xu Y-P. Chitosan–Alginate Microcapsules for Oral Delivery of Egg Yolk Immunoglobulin (IgY): Effects of Chitosan Concentration. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009; 159(3):778–787.
88. Chalamaiah M, Esparza Y, Temelli F, Wu J. Physicochemical and functional properties of livetins fraction from hen egg yolk. *Food Bioscience*. 2017; 18:38–45.
89. Shainkin R, Perlmann GE. Phosvitin, a phosphoglycoprotein: composition and partial structure of carbohydrate moiety. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1971; 145(2):693–700.
90. Duque Restrepo AM, Hernández Castillo LM, Martínez Delgado CM. Tecnología IgY para el control de enfermedades infecciosas como la caries dental [Internet]. Universidad CES [citado 2021 Aug 7]. Disponible desde: [https://repository.ces.edu.co/bitstream/10946/390/1/Tecnologia\\_IGY.pdf](https://repository.ces.edu.co/bitstream/10946/390/1/Tecnologia_IGY.pdf).
91. Vandegaer JE, Reichmann ME, Cook WH. Preparation and molecular weight of lipovitellin from egg yolk. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1956; 62(2):328–337.
92. Aguirre OE, Barreiro WA, Lopez FE. Actividad antioxidante de extractos de hojas de *Bocconia frutescens* L. (Papaveraceae). *Revista de Tecnología*. 2016;14(2).
93. Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant ( $K_1$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochemical pharmacology*. 1973; 22(23):3099–3108.
94. Gutiérrez Calzado EJ, Heredia MT, Bäumlér H, Schade R. Producción de un anticuerpo IgY específico contra el antígeno CD41 humano. *Revista CENIC*. 2009; 40(3):167–171.
95. Wen J, Zhao S, He D, Yang Y, Li Y, Zhu S. Preparation and characterization of egg yolk immunoglobulin Y specific to influenza B virus. *Antiviral research*. 2012; 93(1):154–159.
96. Parzanese M. Liofilización de alimentos [Internet]. Argentina: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca [citado 2021 Aug 7]. Disponible desde: <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Publicaciones/revistas/nota.php?id=209>.
97. Luo W, Xue H, Xiong C, Li J, Tu Y, Zhao Y. Effects of temperature on quality of preserved eggs during storage. *Poultry science*. 2020; 99(6):3144–3157.
98. Morán I. ¿Cuánto tiempo aguantan los huevos fuera de la nevera? [Internet]. *La Vanguardia*; 2019 [citado 2021 Aug 7]. Disponible desde: <https://www.lavanguardia.com/comer/tendencias/20190603/462644918911/huevos-caducidad-conservacion-nevera.html>.
99. Johnson M. Antibody Storage and Antibody Shelf Life. *Mater Methods*. 2012; 2:120.
100. Simon N, Sperber C, Voigtländer C, Born J, Gilbert D, Seyferth S. Improved stability of polyclonal antibodies: A case study with lyophilization-conserved antibodies raised against

epitopes from the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *European Journal of Pharmaceutics Sciences*. 2020; 142:105086

101. Wittig I, & Schägger H. Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics*. 2008; 8(19):3974–3990.

102. Mendoza JC, Vivas D, Rodríguez E, Inga R, Sandoval G, Lazo F, Yarlequé A. Eficacia experimental de anticuerpos IgY producidos en huevos, contra el veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2014;29(1).

## 7. Anexo

**Tabla 4.** Composición del alimento proporcionado a los animales.

<b>Componentes de la ración administrada al animal</b>
Maíz
Cebada
Sorgo
Trigo
Harina de trigo
Germen de trigo
Gluten meal
Oleína
Harina de soja
Harina de girasol
Harina de canola
Harina de pescado
Harina de alfalfa
Sal
Fosfato bicálcico
Bicarbonato de sodio
Aminoácidos
Carbonato de calcio
Suplemento vitamínico mineral
Antioxidantes
Conservantes
Pigmentos carotenoides
Complejo enzimático (proteasa, amilasa, celulasa)

**Tabla 5.** Composición química porcentual del alimento

Composición química	Mínimo (%)	Máximo (%)
Proteína	15	
Extracto al éter	2,5	
Humedad		12
Fibra cruda		7
Minerales totales		16
Cenizas insolubles al HCl		3
Cloruro de sodio		0,5
Calcio	3,3	4,3
Fósforo	0,5	0,9

**Tabla 6.** Aditivos del alimento utilizado

Aditivo	Compuesto	Cantidad (g/kg)
Suplemento vitamínico mineral	VM-P	0,0015 (ng/kg)
Antioxidante	Oxicap	0,1
Pigmentante	Carophill	0,02
Conservante	Fungicap	1