

Desarrollo de un candidato vacunal contra la anaplasmosis bovina utilizando baculovirus como vector

**Informe final correspondiente a la
Beca de Entrenamiento CIC**

Christian Leandro Macoretta

**Directora Dra. Marisa Farber
Co-Directora Dra Paula Molinari**

Período: 1 de Octubre de 2014 - 30 de Septiembre de 2015

Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar.



Resumen

La anaplasmosis bovina es una enfermedad infecciosa causada por *Anaplasma marginale*, una bacteria que invade y se replica dentro de los eritrocitos causando anemia hemolítica y frecuentemente la muerte del ganado. En Argentina, la población de garrapatas que afecta al ganado bovino pertenece a la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y es uno de los vectores que media la transmisión de esta enfermedad. Dado que la anaplasmosis causa grandes pérdidas económicas, la vacunación constituiría el método más eficiente para su prevención. Se ha visto que la inoculación con MSP1a (*Major Surface Protein*) de *A. marginale* confiere inmunidad protectora. Por otro lado, diversos estudios han demostrado que las proteínas GSTs (*Glutathione S-transferases*) son un blanco adecuado para el desarrollo de vacunas contra las garrapatas.

Los baculovirus son una familia de virus que infectan artrópodos. Los virus brotados (BVs, *budded viruses*) no pueden replicar en mamíferos y se demostró que poseen fuertes propiedades adyuvantes, promoviendo respuestas humorales y celulares contra antígenos coadministrados. Entonces, en este trabajo se evaluó la hipótesis de que los baculovirus son capaces de potenciar la inducción de una respuesta inmune específica humoral contra los antígenos heterólogos GST de *Rhipicephalus microplus*, y MSP1a de *Anaplasma marginale*.

Para el diseño del multiantígeno GST-MSP1a se realizó un análisis bioinformático de la secuencia de MSP1a y se seleccionó una región enriquecida en epitopes B y T. Mientras que la proteína GST fue incluida en forma completa debido a su corta extensión. Para la expresión de este multiantígeno en la superficie del baculovirus se clonaron, bajo el promotor de poliedrina, ambos fragmentos bajo la secuencia señal de exportación de GP64 (proteína mayoritaria de la envoltura de los BV) seguidos de la secuencia codificante para la región transmembrana y citoplasmática de la proteína G del virus de estomatitis vesicular (VSV). Mediante el sistema "Bac to Bac" se obtuvo el baculovirus recombinante BV GST-MSP1a que expresó en su superficie GST MSP1a.

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune capaz de ser inducida por el baculovirus recombinante, ya sea transportando el antígeno en sí mismo o acompañando al antígeno en la misma formulación vacunal, se procedió a realizar un ensayo utilizando el modelo murino.

Se inocularon ratones BALB/c con BV *wt*, con BV recombinante o con BV *wt* coadministrado con la proteína de fusión expresada en *E.coli*. Se tomaron muestras de suero a distintos tiempos post inmunización y se evaluó la producción de anticuerpos específicos contra GST mediante Western Blot y ELISA. Los ensayos mostraron que el baculovirus recombinante y la coadministración de baculovirus *wild type* con el multiantígeno expresado en bacterias fueron capaces de inducir la respuesta inmune humoral específica contra GST.

En conjunto, estos resultados demuestran que el baculovirus es una posible herramienta a ser utilizada para el desarrollo de un vector vacunal para la anaplasmosis.

Índice

Introducción	5
Materiales y métodos	7
- Virus	7
- Células de lepidóptero	7
- Cepa de ratones	7
- Cepas bacterianas	7
- Análisis bioinformático de secuencias de ADN	8
- Diseño del clonado	8
- Amplificación de secuencias de PCR	8
- Purificación de los productos de amplificación	8
- Método del ADN recombinante	8
- Preparación de ADN plasmídico de alta calidad	8
- Digestión con enzimas de restricción	8
- Desfosforilación de los extremos 5' fosfato	9
- Electroforesis en geles de agarosa	9
- Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	9
- Reacciones de ligado molecular	9
- Transformación de bacterias	9
- Minipreparaciones de ADN	9
- Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	10
- Tinción de proteínas en SDS-PAGE con azul de Coomassie	10
- Identificación de proteínas mediante Western Blot	10
- Electrotransferencia	10
- Detección inmunológica de las proteínas	10
- Construcción del vector de transferencia	11
- Producción de BV recombinantes	11
- Obtención de bácmidos recombinantes	11
- Obtención de los BV recombinantes	11
- Amplificación de los BV recombinantes	12
- Titulación por dilución a punto final	12
- Evaluación de la expresión de la proteína recombinante en las células de lepidóptero	12
- Producción de proteínas recombinantes en bacterias	13
- Expresión de proteínas recombinantes en bacterias	13
- Purificación de las proteínas expresadas en bacterias	13
- Cuantificación de la proteína recombinante	13
- Remoción de trazas de endotoxinas de la proteína recombinante	13
- Inmunización de los ratones	14
- Obtención de suero	14
- Manejo de animales bajo las normas de buenas prácticas de laboratorio	14
- Evaluación de la respuesta inmune humoral	14

- Evaluación de la producción de anticuerpos específicos para GST mediante Western Blot-----	14
- Evaluación de la producción de anticuerpos específicos para GST mediante ELISA-----	14
Resultados -----	16
Conclusiones -----	33
Bibliografía -----	34

Introducción

La anaplasmosis bovina es una enfermedad infecciosa causada por *Anaplasma marginale* (*A. marginale*) cuyos signos clínicos más frecuentes son ictericia, empaldecimiento de las mucosas, debilidad muscular, depresión, deshidratación, anorexia, aumento de la frecuencia cardíaca e insuficiencia respiratoria (Richey, 1981). *A. marginale* es una bacteria Gram negativa (Amerault *et al.*, 1973) intracelular estricta (Kocan *et al.*, 2003) que invade y se replica dentro de los eritrocitos causando anemia hemolítica y frecuentemente la muerte del ganado (Brown *et al.*, 2001).

La subsistencia de la bacteria depende del establecimiento de infecciones crónicas y de la presencia de los vectores que la vehiculizan, entre los cuales se encuentran las garrapatas. En Argentina, la población de garrapatas que afecta al ganado bovino pertenece a la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y la asociación con la transmisión de *A. marginale* fue establecida a través del estudio de marcadores moleculares (Ruybal *et al.*, 2009). Las zonas tropicales y subtropicales donde impera el clima cálido y una alta humedad relativa, presentan las condiciones óptimas para el desarrollo de las garrapatas, donde las enfermedades transmitidas por estos artrópodos son endémicas (Cabezas-Cruz *et al.*, 2013).

La anaplasmosis además de causar grandes pérdidas económicas representa una limitación para la introducción de bovinos de mayor calidad genética para la mejora de las razas productoras de leche y carne en la región endémica. Estos animales son susceptibles a desarrollar la enfermedad a una edad en la que el riesgo de mortalidad es alta, perjudicando las tasas de productividad en el NOA y el NEA de nuestro país.

La vacunación constituye el método más económico y efectivo para la prevención de las enfermedades infecciosas. En el caso particular de la anaplasmosis el método de control más utilizado consiste en la inoculación con *Anaplasma centrale*, bacteria altamente relacionada de menor virulencia (Abdala *et al.*, 1990; Melendez *et al.*, 2003). Sin embargo, este tipo de vacuna presenta como desventaja el riesgo de transmisión de otras enfermedades ya que su producción se realiza a partir de la sangre de terneros con alta parasitemia.

La identificación de las proteínas inmunogénicas de *A. marginale* así como también los mecanismos efectores de la respuesta inmune son fundamentales para desarrollar nuevas vacunas, seguras y efectivas frente a este patógeno.

Las primeras proteínas que se caracterizaron en la membrana externa de *A. marginale* fueron las Proteínas Mayores de Superficie (MSPs), cinco proteínas inmunodominantes que participan en distintos procesos durante la infección de la bacteria. El complejo proteico MSP1 participa en el proceso de adhesión tanto al eritrocito como a las células de garrapata. La inoculación con MSP1a o epitopes de esta proteína confieren inmunidad protectora (Brown *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2012).

Por otro lado, en los últimos años, diversos estudios han demostrado que existen distintas proteínas que servirían como blanco para la vacunación contra las garrapatas. Esta estrategia vacunal disminuye no solo la alimentación y reproducción de las garrapatas sino también la infección y transmisión de patógenos a los vertebrados de los cuales estas se

alimentan (Merino *et al.*, 2013). Las proteínas GSTs (*Glutathione S-transferases*) juegan un papel fundamental en la detoxificación de compuestos xenobióticos y endógenos (da Silva Vaz Jnr *et al.*, 2004) y ha sido caracterizada como un blanco adecuado para el desarrollo de vacunas contra estos ectoparásitos.

Los baculovirus son una familia de virus que infectan artrópodos. Poseen un ciclo de vida bifásico: por un lado son transmitidos oralmente como virus derivados de cuerpos de oclusión (ODVs, del inglés *occlusion-derived viruses*), los cuales se encuentran incluidos en una matriz de poliedrina (poliedros) y son capaces de infectar las células del intestino; por el otro, los virus brotados (BVs, del inglés *budded viruses*) están especializados en la infección entre células de los tejidos internos. Ambos fenotipos poseen una nucleocápside prácticamente idéntica, pero sus envolturas son distintas.

Los BVs no pueden replicar en mamíferos (Tjia *et al.*, 1983; Volkman *et al.* 1983), y se demostró que poseen fuertes propiedades adyuvantes, promoviendo respuestas humorales y celulares contra antígenos coadministrados, la maduración de células dendríticas (DCs) y la producción de mediadores inflamatorios debido a los motivos CpG presentes en su genoma (Hervas-Stubbs *et al.*, 2007).

Dado que los baculovirus presentan propiedades inmunoestimuladoras, en este trabajo se evaluó la hipótesis de que los baculovirus son capaces de potenciar la inducción de una respuesta inmune específica humoral contra los antígenos heterólogos GST de *Rhipicephalus microplus*, y MSP1a de *Anaplasma marginale*.

Entonces el objetivo general fue evaluar la capacidad inmunoestimuladora de los BV y su posible uso como vector vacunal contra la infección causada por *A. marginale*.

Así, los objetivos específicos planteados fueron:

- El diseño de un multiantígeno optimizado como candidato vacunal para el control de la anaplasmosis bovina
- La construcción y caracterización de un baculovirus recombinante que transporte en su superficie el multiantígeno GST-MSP1a
- La caracterización inmunológica humoral de las formulaciones vacunales en el modelo murino.

Materiales y métodos

- Virus

El BV utilizado en este trabajo fue el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (*Autographa californica nuclear multiple polyhedrosis virus* - Ac NMPV). Su multiplicación se realizó en células Sf9 crecidas en monocapa a 27 °C.

- Células de lepidóptero

Los BV de este trabajo fueron propagados en la línea celular de insecto Sf9 (ATCC), derivada de tejido ovárico de *Spodoptera frugiperda*. Se creció en monocapa a 27 °C, en botellas Cellstar de 25, 75 o 175 cm² (Greiner Bio-One), utilizando EX-CELL 420 (Sigma) con el agregado de una solución de antibiótico-antimicótico (Gibco). Este medio de cultivo se encuentra optimizado para el crecimiento de estas células y no requiere la adición de suero fetal bovino. La solución que se le agregó contiene 10,000 U/ml de penicilina, 10,000 µg/ml de estreptomycin y 25 µg/ml de anfotericina B. Para la titulación de BVs se utilizó la línea celular Sf9-pXXLGFP, construida en este laboratorio, que expresa GFP bajo el promotor de poliedrina (inducible por infección). La misma se creció bajo la presión de selección del antibiótico blastidina (Life Technologies), a una concentración final de 10 µg/ml.

- Cepa de ratones

Se utilizaron ratones hembras de 12 semanas de edad, libres de patógenos especificados (SPF, del inglés Specific Pathogen Free), de la cepa BALB/c. Los ratones se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (progenitores procedentes del Jackson Laboratory, USA).

- Cepas bacterianas

Para las estrategias de clonado molecular se utilizó la cepa DH5α de *Escherichia coli*, cuyo genotipo es F⁻ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻m_K⁺), λ⁻. Para la generación de bácmidos recombinantes se utilizó la cepa DH10B de *Escherichia coli*, cuyo genotipo es F⁻ *endA1 deoR⁺ recA1 galE15 galK16 nupG rpsL Δ(lac)X74 φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Str^R λ⁻. Y para la expresión de proteínas recombinantes se utilizó la cepa BL21 de *Escherichia coli* cuyo genotipo es F⁻ *ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) [malB⁺]_{K-12}(λ^S)*. Los cultivos bacterianos se realizaron en medio LB (triptona 5 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH 7 con NaOH). En el caso de requerirse un medio semisólido, se le agregó agar a una concentración final de 1,5 g/100 ml. Los cultivos líquidos se realizaron en tubos o erlenmeyers con un volumen no mayor al 10 % de su capacidad total, con agitación constante de 200 rpm a 37 °C. Las cepas bacterianas transformadas con un vector plasmídico se crecieron en medio de cultivo con el agregado del antibiótico de selección adecuado.**

- **Análisis bioinformático de secuencias de ADN**

Se emplearon los programas Bepipred, Paratome y Lbtope para predecir epitopes sobre la secuencia de la proteína MSP1a con el fin de seleccionar la región que formaría parte del multiantígeno.

- **Diseño del clonado**

Se emplearon los programas VectorNTI y SnapGene para corroborar la presencia y cantidad de sitios de restricción de las enzimas que fueron utilizadas en los distintos pasos del clonado. A su vez se corroboró también el tamaño esperado de las distintas porciones de ADN producto de las reacciones de amplificación por PCR o digestión con enzimas de restricción. Además estos programas se utilizaron para confirmar el marco de lectura correspondiente para la expresión de las proteínas recombinantes como así también el tamaño esperado de las mismas.

- **Amplificación de secuencias por PCR**

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar por PCR las secuencias de interés que forman el multiantígeno GST MSP1a. A los oligonucleótidos se les incorporaron sitios para enzimas de restricción que permitieron el clonado direccional en el vector de transferencia (pFastBacSD) o en el vector de expresión (pRSET C). Para la amplificación del fragmento correspondiente a GST se utilizó como templado el plásmido pet43a GST (con el que ya se contaba en el laboratorio). Y para la amplificación de la región seleccionada de MSP1a se utilizó como templado ADN extraído de eritrocitos bovinos infectados con *Anaplasma marginale* provenientes del aislamiento de Mercedes (Provincia de Corrientes, Argentina). Para la amplificación de GSTMSP1a se empleó como templado el plásmido pFastBacSD construido en este mismo trabajo. Se probaron distintos ciclos de amplificación hasta hallar el más conveniente.

- **Purificación de los productos de amplificación**

Los productos de amplificación de GST y GSTMSP1a se purificaron empleando el kit comercial "QIAquick PCR Purification Kit" (Qiagen).

- **Metodología del ADN recombinante**

- **Preparación de ADN plasmídico de alta calidad**

Se utilizaron las columnas de intercambio aniónico comerciales "Qiaprep spin miniprep kit" (Qiagen). La purificación del ADN plasmídico se realizó a partir de 3 ml de cultivo saturado de bacterias transformadas y el ADN se eluyó con agua.

- **Digestión con enzimas de restricción**

Para las digestiones de los diferentes plásmidos se utilizaron 500 ng de ADN, 5 unidades de enzima de restricción (New England Biolabs), buffer apropiado y un volumen final de 20 µl. Las reacciones se incubaron 2 hs a 37 °C.

- **Desfosforilación de los extremos 5'fosfato**

La remoción de los grupos fosfato de los extremos 5' de los plásmidos digeridos se realizó utilizando la enzima fosfatasa alcalina de camarón (SAP, New England Biolabs), siguiendo las indicaciones del fabricante. La reacción se incubó por 45 min a 37 °C y la enzima fue inactivada por incubación a 65 °C durante 5 min.

- **Electroforesis en geles de agarosa**

Se emplearon geles de agarosa de concentraciones 1 y 1,5 %. Los geles se corrieron en buffer TAE (Tris-acetato 10 mM, EDTA 1 mM) a 5-10 V/cm a temperatura ambiente. Con el fin de visualizar las bandas de ADN, se utilizó el agente intercalante bromuro de etidio a una concentración de 0,5 g/ml de gel. Para sembrar las muestras, se utilizó un buffer de siembra de concentración 10X (glicerol 50 %, TAE 10X, azul de bromofenol 1 %). Los geles se fotografiaron utilizando un equipo Gel Doc (Bio-Rad) y el software Gel Doc XR.

- **Purificación de ADN a partir de geles de agarosa**

Las bandas de ADN resueltas mediante geles de agarosa se escindieron del gel mediante el uso de bisturí y se purificaron utilizando los kits comerciales "Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (GE Healthcare) o "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen).

- **Reacciones de ligado molecular**

Para el ligado molecular de los diferentes insertos a los plásmidos correspondientes, se utilizaron 100 ng de vector y una relación molar vector:inserto 1:3. Se utilizó la enzima T4 ligasa (Promega) y el buffer correspondiente. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 10 µl y se incubó a 16 °C toda la noche, incluyendo un control de vector sin inserto.

- **Transformación de bacterias**

Las bacterias se hicieron competentes para la transformación mediante el método de Hanahan (1985) y se mantuvieron congeladas a -70 °C hasta su uso. Entonces, se descongelaron en hielo y a 50 µl de bacterias se les agregaron entre 5 µl del producto de ligado, se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 40 min. A continuación, se realizó un choque térmico a 42 °C por 90 s y se dejó en hielo por 2 min adicionales. Luego, se agregaron 200 µl de medio LB, se incubó a 37 °C durante 40 min con agitación suave y se plaqueó en medio LB agarizado con ampicilina a una concentración final de 100 g/ml. Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche, las colonias se picaron y se usaron para inocular cultivos de 3 ml de LB con ampicilina.

- **Minipreparaciones de ADN**

Se utilizó el método de Birnboim y Doly (1979) con ligeras modificaciones. Se partió de 3 ml de cultivo de bacterias en medio LB con ampicilina, crecido toda la noche a 37 °C. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 10.000 x g en una microcentrífuga de mesa y se resuspendieron en 200 µl de Solución I (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM). Luego, se agregaron 200 µl de Solución II (NaOH 0,2 N, SDS 1 %), se mezcló suavemente por inversión y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 200 µl de Solución III (acetato de potasio 3 M) y se mezcló por inversión. El

floculado se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min, se tomó el sobrenadante libre de floculado y se traspasó a un tubo de microcentrifuga limpio, donde se precipitó el ADN plasmídico por el agregado de 0,6 volúmenes de isopropanol y centrifugación a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C. Se lavó el precipitado con etanol 70 %, se dejó secar y se resuspendió en 50 µl de agua con ARNasa A (100 g/ml). Para verificar la presencia de los diferentes insertos en cada estrategia de clonado, se digirieron 5 µl de esta solución con las enzimas de restricción apropiadas.

- **Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida**

Se utilizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida de concentraciones 12 y 15 %. El grado de entrecruzamiento acrilamida:bisacrilamida utilizado fue 29:1. Se utilizaron minigeles de 6 x 9 cm (Miniprotean III, Biorad), los que se corrieron a una corriente constante de 100 V en buffer Tris-glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, SDS 0,1 %).

- **Tinción de proteínas en SDS-PAGE con azul de Coomassie**

Los geles de poliacrilamida se incubaron en una solución del colorante azul de Coomassie 0,05 % (Coomassie Brilliant Blue R250 0,05 %, metanol 50 %, ácido acético 10 %) durante 40 min con agitación suave. Se retiró la solución de tinción y se decoloró el exceso de colorante por incubación, con agitación suave, con solución de lavado (metanol 50 %, ácido acético 10 %).

- **Identificación de proteínas mediante Western Blot**

- **Electrotransferencia**

Luego de la electroforesis, los geles de poliacrilamida se equilibraron durante 2 min con buffer de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, metanol 20 %). Entonces, se recortaron rectángulos de nitrocelulosa (S&S BA 0,45 m, Schleicher & Schuell) de tamaño algo mayor al de los geles y se hidrataron durante 5 min. Se dispuso sobre la cara del cassette de transferencia correspondiente al electrodo negativo (Bio-Rad): una esponja de tipo Scotch Brite (Bio-Rad), un papel de filtro Whatmann 3 mm, el gel de poliacrilamida, el filtro de nitrocelulosa, un papel de filtro Whatmann 3 mm y una esponja del tipo Scotch Brite. Los cassettes se montaron dentro de la cuba de transferencia (Bio-Rad), se llenó con buffer de transferencia y se transfirieron las proteínas de los geles a los filtros de nitrocelulosa aplicando una corriente constante de 200 mA a 10 °C durante 90 min.

- **Detección inmunológica de las proteínas**

Los filtros de nitrocelulosa se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en TBS-Tween leche 5 % (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,005 %, leche descremada 5 %). Luego, se lavaron con TBS-Tween y se incubaron con la dilución apropiada del anticuerpo específico (1:500 suero de conejo anti GST) en TBS-Tween-leche 3 %. Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, se lavaron los filtros tres veces con solución de lavado TBS-Tween por 5 min y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en TBS-Tween-leche 3 % (1:3000 para el anticuerpo anti conejo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina). Tras 1 hora de incubación a

temperatura ambiente con agitación suave, se lavaron los filtros tres veces con solución de lavado por 5 min. Por último se procedió al revelado con 10 ml del buffer de revelado de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM) conteniendo 66 µl de Nitro blue tetrazolium (NBT, 50 mg/ml en dimetilformamida 70 %, Promega) y 33 µl de bromo-cloro-indoil-fosfato (BCIP, 50 mg/ml en dimetilformamida 100 %, Promega). Se incubó con agitación suave por 3 a 15 min a resguardo de la luz, hasta visualizar las bandas de interés. La reacción de revelado se detuvo con lavados con agua y los filtros se secaron al aire y se protegieron de la luz.

- **Construcción del vector de transferencia**

Con el fin de producir BV recombinantes mediante el uso del sistema “Bac to Bac” (Invitrogen), se clonaron GST y MSP1a en el plásmido de transferencia pFastBacSD (construido en el laboratorio). Para ello, se digirieron los plásmidos pGEM-T GST con las enzimas XmaI y EcoRI; pGEM-T MSP1a con EcoRI y PstI; y el pFastBacSD con XmaI y PstI y luego se le removieron los grupos 5'fosfato. Las bandas de ADN, producto de las digestiones, se separaron por electroforesis y se purificaron. Luego, el vector pFastBac y los insertos GST y MSP1a se ligaron toda la noche a 16 °C. Con el producto de ligación se transformaron bacterias *E. coli DH5α* que fueron seleccionadas con ampicilina. Se corroboró la presencia y orientación de los fragmentos por PCR y digestión con las enzimas XmaI y PstI. Se obtuvo así el plásmido de transferencia pFastBacSD GST MSP1a.

- **Producción de BV recombinantes**

- **Obtención de bácmidos recombinantes**

Se transformaron 50 µl de *E. coli* DH10B competentes con el plásmido de transferencia obtenido. La selección de las bacterias que incorporaron el plásmido se realizó en placas de LB agar con kanamicina 50 µg/ml, tetraciclina 10 µg/ml y gentamicina 7 µg/ml; el evento de transposición fue seleccionado por el color de la colonia (fenotipo blanco) en presencia de IPTG 40 µg/ml y Bluo-gal 100 µg/ml (Sigma-Aldrich). Se realizó la purificación del bácmido según se describe en el manual expresión en baculovirus (O'Reilly, 1994). A continuación, se confirmó la presencia del cassette de interés en el bácmido recombinante mediante PCR con los oligonucleótidos específicos universales M13 Forward y M13 Reverse que flanquean el sitio de transposición. Para esta reacción se utilizó la enzima Platinum DNA polimerasa (Invitrogen) y el ciclo de amplificación fue 95 °C 5 min, (94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 5 min) x 30 ciclos, 72 °C 7 min (O'Reilly, 1994).

- **Obtención de los BV recombinantes**

Se obtuvieron BV recombinantes mediante el método de transfección de células con lípidos catiónicos. Se mezclaron, en un tubo de 1,5 ml, 100 µl de medio EX-CELL 420 con 2,5 µg de ADN del bácmido recombinante y 100 µl de medio EX-CELL 420 con 10 µl de Cellfectina (Invitrogen). La mezcla se incubó 15-45 min a temperatura ambiente, se agregaron 0,8 ml de medio EX-CELL 420 y se agregó sobre una monocapa de células Sf9 crecida en placas de seis pocillos a una densidad de 1x10⁶ células/pocillo. Las placas se incubaron por 4 hs a 27 °C. Luego se removió el medio de transfección y se agregaron 3 ml de medio EX-CELL 420. Tras 6 días de incubación a 27 °C, se colectaron los sobrenadantes en forma estéril,

se clarificaron por centrifugación a 1200 rpm durante 10 min a 4°C y se conservaron refrigerados y protegidos de la luz. Se obtuvo así el BV recombinante GST MSP1a.

- **Amplificación de los BV recombinantes**

Se realizaron dos pasajes ciegos de los BV obtenidos, en células Sf9. Para ello se infectaron 1×10^6 células crecidas en botellas Cellstar de 25 cm² con 100 µl de los sobrenadantes de transfección o infección. Luego de 1 hora de adsorción, se agregaron 4 ml de medio EX-CELL 420 y se incubaron las células por 6 días a 27 °C. Los sobrenadantes de infección se colectaron de forma estéril, se clarificaron por centrifugación a 1200 rpm durante 10 min a 4 °C y se mantuvieron refrigerados y protegidos de la luz. Se realizó un tercer pasaje en una botella de 175 cm², que constituyó el stock viral.

Para obtener el stock viral se sembraron $2,5 \times 10^7$ células Sf9 por botella Cellstar de 175 cm² (Greiner Bio-One) y se dejó reposar horizontalmente durante 20 minutos a temperatura ambiente permitiendo la adhesión de las células a la superficie. Luego, se le quitó el medio de cultivo y se infectó con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1. Se incubó la infección durante 1 hora a temperatura ambiente, agitando suavemente la botella cada 10 minutos para asegurar la distribución equitativa de virus en toda la monocapa celular. Una vez finalizada la incubación se retiró el inóculo viral y se volvió a agregar medio de cultivo EX-CELL. Las botellas se incubaron en la cámara de 27°C. El día 5 post-infección se retiró el medio de cultivo de las botellas, se clarificó por centrifugación a 1200 rpm 10min 4°C y se guardó el sobrenadante en tubos Falcon de 50 ml a 4°C. Del mismo modo se procedió para la amplificación del BV AcMNPV wt. Además, a fin de optimizar la producción de la proteína recombinante GST MSP1a se realizó un ensayo en botellas de 75 cm², donde se sembraron 1×10^7 células Sf9 y se las infectó con una MOI de 0,05, 0,5 o 3,6 de BV GST MSP1a. La cosecha en este caso fue a los 3 o a los 5 días post infección.

- **Titulación por dilución a punto final**

La titulación de virus infectivo se realizó siguiendo el protocolo propuesto por O'Reilly (O'Reilly 1994), utilizando la línea celular Sf9-pXXLGFP que fluoresce sólo en presencia de replicación viral. Brevemente, se agregaron 300 µl de diluciones desde 10^{-4} a 10^{-10} de los stocks virales a 2,7 ml de células Sf9-pXXLGFP a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/ml para la pre-adsorción del virus a las células. Luego, 200 µl de cada una de estas siete suspensiones fueron colocados en 12 pocillos (una fila) de una placa de 96 pocillos, mientras que en la fila restante se colocaron células sin infectar (control negativo). La placa se incubó durante 7 días en cámara húmeda a 27°C y se contaron, pasado este tiempo, pocillos infectados (fluorescentes) por visualización al microscopio en presencia de luz azul. Los títulos virales se calcularon según el método descrito por Reed y Muench (Reed and Muench 1938).

- **Evaluación de la expresión de la proteína recombinante en las células de lepidóptero**

Para esto, se infectaron monocapas de células Sf9 con el BV recombinante GST MSP1a a distintas multiplicidades de infección. A los 3 o 5 días post infección se cosecharon los sobrenadantes de infección. Se obtuvo un pellet de los BV por centrifugación a 12800 rpm

durante 1 hora a 4 °C. Los BV se mezclaron con buffer de siembra (Tris-HCl 100 mM pH 6,8, SDS 4 %, azul de bromofenol 0,02 %, β-mercaptoetanol 1,8 %, glicerol 20 %). Estas muestras se hirvieron por 5 min y se resolvieron por SDS-PAGE (12 o 15 %). La proteína recombinante se detectó por Western blot. Se empleó un suero de conejo anti-GST en dilución 1:500 en solución de bloqueo (TBS 1X Tween 20 0,05% Leche 3%). Y como anticuerpo secundario, un anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich) en dilución 1:3000, también en solución de bloqueo.

- **Producción de proteínas recombinantes en bacterias**

- **Expresión de proteínas recombinantes en bacterias**

Se transformaron bacterias *E. coli* BL21 con el plásmido pet43a GST (con el que ya se contaba en el laboratorio) o con el pRSET C GSTMSP1a (contruido en este trabajo). Las bacterias se sembraron en placas de Petri con LB Agar, seleccionadas con ampicilina e incubadas toda la noche a 37 °C. A partir de las colonias obtenidas se realizaron cultivos líquidos de 3 a 5 ml de LB-Ampicilina, que fueron crecidos toda la noche a 37 °C y 200rpm de agitación. Estos cultivos fueron utilizados como inóculo para cultivos mayores realizados en un volumen de 50ml en erlenmeyer. Se realizó la inducción de la expresión de las proteínas recombinantes con IPTG 1mM cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica (DO) a 600nm entre 0,4 y 0,6. La inducción duró 4 hs y se tomaron alícuotas cada 1 hora para evaluar la expresión de las proteínas recombinantes en función del tiempo por tinción en SDS-PAGE con azul de Coomassie y por detección de la proteína por Western Blot.

- **Purificación de las proteínas recombinantes expresadas en bacterias**

Finalizadas las 4hs de inducción se cosecharon las bacterias por centrifugación a 8000 rpm durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en PBS 1X a razón de 50 µl de PBS 1X por cada mililitro de cultivo bacteriano. Las bacterias resuspendidas fueron sonicadas en hielo y centrifugadas a 12000 x g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante resultante fue purificado empleando la columna "Glutathione - Sepharose 4B resin" (GE Healthcare). El eluido de la proteína se realizó con 60 µl del buffer de elución (Tris-HCl 50 mM, Glutatió n 10 mM, pH 8). Se tomaron alícuotas de cada paso de la purificación. Se evaluó la purificación obtenida por tinción en SDS-PAGE con azul de Coomassie y por detección de la proteína por Western Blot.

- **Cuantificación de la proteína recombinante**

A fin de conocer la concentración de la proteína purificada se realizó una curva de BSA de concentración conocida (entre 2 y 0,015 mg/ml) empleando el kit comercial "Micro BCA Protein Assay Kit" (Thermo Scientific).

- **Remoción de trazas de endotoxinas de la proteína recombinante**

Con el objetivo de remover las trazas de endotoxinas provenientes del cultivo bacteriano, la solución de proteína GSTMSP1a purificada fue tratada con Polimixina B - Sepharosa (Biorad) siguiendo las especificaciones del fabricante. A 100µl de eluido proteico se le

agregaron 50 µl de Polimixina B y se incubó 40 minutos en hielo. Esta proteína fue empleada para inocular ratones.

- **Inmunización de los ratones**

Se inyectaron por vía intraperitoneal grupos de cuatro (n=4) ratones con 7×10^7 pfu de BV wt, BV GST MSP1a o BV WT + proteína recombinante GSTMSP1a (en masa equivalente a la administrada en la inmunización con el BV recombinante). Se realizaron 2 inmunizaciones a los 0 y 24 días.

- **Obtención de suero**

A distintos tiempos, se tomaron muestras de sangre mediante el corte en venas de la cola. La sangre fue colectada en tubos sin heparina, incubada primero 1 hora a 37 °C y luego 1 hora a 4°C. Pasado este tiempo se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante (suero) fue trasvasado a un nuevo tubo y conservado a -20 °C.

- **Manejo de animales bajo las normas de buenas prácticas de laboratorio**

Este estudio fue llevado a cabo en estricta concordancia con las normas del comité de ética institucional para cuidado y uso de animales de experimentación del INTA. Los animales fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂.

- **Evaluación de la respuesta inmune humoral**

- **Evaluación de la producción de anticuerpos específicos para GST mediante Western Blot**

Se realizó un gel preparativo de poliacrilamida donde se sembró GST recombinante expresada en bacterias. Luego de la electroforesis se transfirió a un filtro de nitrocelulosa. Este filtro se cortó en bandas de aproximadamente 0,5cm de ancho que se emplearon para realizar el Western Blot. Se evaluó la presencia de anticuerpos específicos contra GST en los sueros de los ratones a 10 días de la segunda inoculación utilizando una dilución xxx.

- **Evaluación de la producción de anticuerpos específicos para GST mediante ensayos de ELISA**

Se realizaron ensayos de ELISA indirecto y de ELISA "Sandwich". Para ello se emplearon placas de ELISA de 96 wells de fondo plano y alto pegado. Se ensayaron distintas condiciones de bloqueo y lavado encontrándose que la más eficiente fue la que se presenta a continuación. Las placas se sensibilizaron con buffer carbonato 0,1M pH 9,6 con distintas cantidades de GST (500, 1500 o 4500 ng/well) o con una dilución 1:100 de suero de conejo anti-GST. Las placas se incubaron toda la noche a 4 °C. Se retiró el buffer carbonato y se procedió a realizar el bloqueo con PBS 1X Tween 20 0,05% leche 5% Suero normal equino 5%. El bloqueo se realizó durante 1 hora a 37 °C. A continuación se realizaron 3 lavados con PBS 1X Tween 20 0,05%. Luego de los lavados, en el caso del ELISA "Sandwich" se incubó durante 1 hora a 37°C con 500ng GST/well diluída en la solución de bloqueo. Pasado ese tiempo se realizaron 3 lavados con PBS 1X Tween 20 0,05%. Los sueros de los ratones se emplearon en una dilución 1:100 en solución de bloqueo y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Se repitieron los 3 lavados con PBS 1X Tween 20 0,05% y se procedió a incubar

por 1 hora a 37°C con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a HRP en dilución 1:3000 en solución de bloqueo. Finalmente se repitieron los lavados con PBS 1X Tween 20 0,05% y se reveló con TMB. Se incubó con una leve agitación y a resguardo de la luz. Alrededor de los 10 minutos de comenzado el revelado y tras la aparición de color, se frenó la reacción por el agregado de ácido sulfúrico 2N. Se midió la absorbancia a 450nm.

Resultados

Se diseñó un multiantígeno conteniendo la proteína GST de la garrapata *Rhipicephalus microplus* y una región de MSP1a de *Anaplasma marginale*. La proteína GST fue incluida en forma completa debido a su corta extensión. Mientras que para la proteína MSP1a se realizó un análisis bioinformático de su secuencia y se seleccionó una región enriquecida en epítopes B y T.

Para la construcción de este multiantígeno se clonaron GST y la región de MSP1a, por separado, en el vector pGEM-T. Previamente esos fragmentos fueron amplificados por PCR con oligonucleótidos específicamente diseñados para las regiones de interés (tabla 1).

For GST XmaI	5'- A GAC CCG GGA ATG GCT CCT ATT CTC GGC -3'
Rev GST EcoRI	5'- A CAG AAT TCC CAG CCT GCT GCC GAA GCT -3'
For MSP1a EcoRI	5'- A GGA ATT CTG ATG TCA GAG TGT GTG TCC -3'
Rev MSP1a PstI	5'- A CTG CAG GTA CTC AAC ACT CGC AAC -3'

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las porciones de GST y de MSP1a que componen el multiantígeno, para su clonado en el vector de destino pFastBacSD. Las bases indicadas en **negrita** hacen referencia al sitio de restricción de la enzima mencionada en el nombre del oligonucleótido en cuestión.

Para la amplificación de los fragmentos se utilizó el ciclado presentado en la tabla 2.

95°C 2min	} 35 ciclos
95°C 45seg	
64°C 45seg	
72°C 45seg	
72°C 10min	

Tabla 2. Ciclado empleado para la amplificación de GST y de MSP1a.

Como templado para la reacción de amplificación se utilizó el vector pet43a GST, con el que ya se contaba en el laboratorio y ADN de *Anaplasma marginale* extraído de eritrocitos bovinos infectados (figura 1).

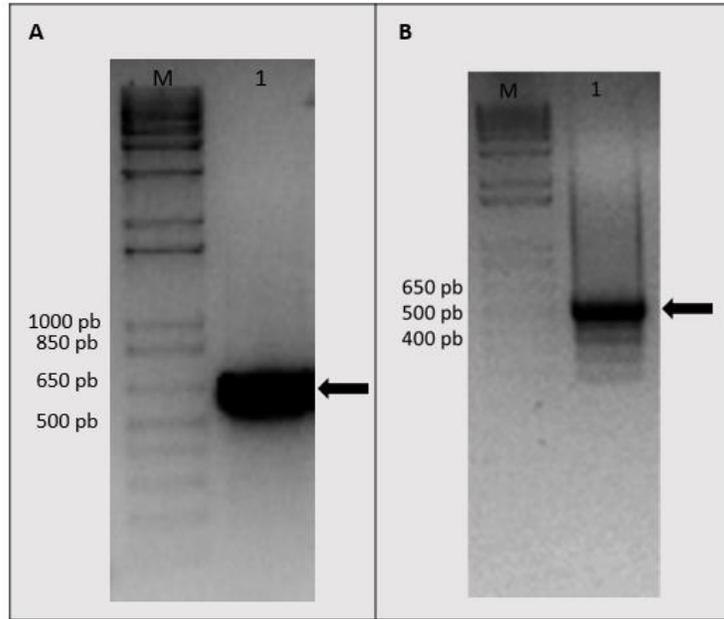


Figura 1. Amplificación de GST y MSP1a - Electroforesis en gel de agarosa 1,5%. **A.** Amplificación de GST
M: Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen); 1: Producto de amplificación. **B.** Amplificación de MSP1a
M: Marcador de peso molecular 1kb Plus; 1: Producto de amplificación.

Se obtuvieron productos de amplificación para GST y Msp1a de los tamaños esperados (677 y 518 pb respectivamente). Estos fragmentos fueron purificados utilizando los kits comerciales QIAquick PCR Purification Kit para el caso del producto de amplificación de GST e Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit para el caso de la banda mayoritaria del producto de amplificación de MSP1a. Ambos productos de amplificación se clonaron en el vector pGEM-T Easy Vector (figura 2).

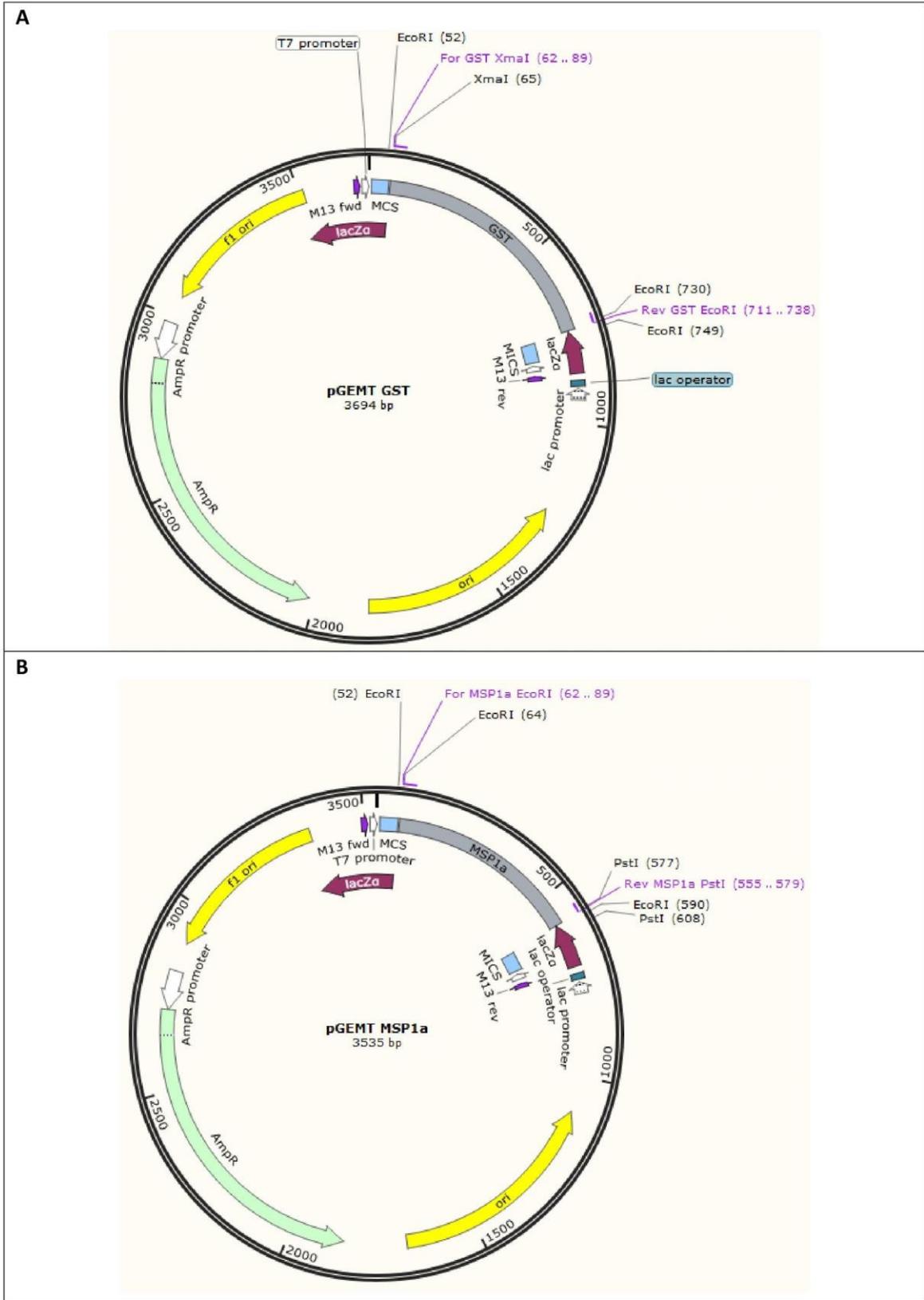


Figura 2. Vector pGEM-T GST (A) y pGEM-T MSP1a (B).

Con el producto de la ligación pGEM-T GST y pGEM-T MSP1a se transformaron bacterias competentes químicas *E. coli* DH5 α y a partir de los cultivos líquidos de las bacterias transformadas se purificaron los plásmidos en cuestión.

Luego, para confirmar la presencia de los insertos GST y Msp1, los clones fueron digeridos con la enzima de restricción EcoRI. Los resultados mostraron que los clones 1, 3 y 5 (panel A de la figura 3) y los clones 1 y 3 (panel B de la figura 3) poseen el inserto del tamaño esperado (697 y 538 pb respectivamente).

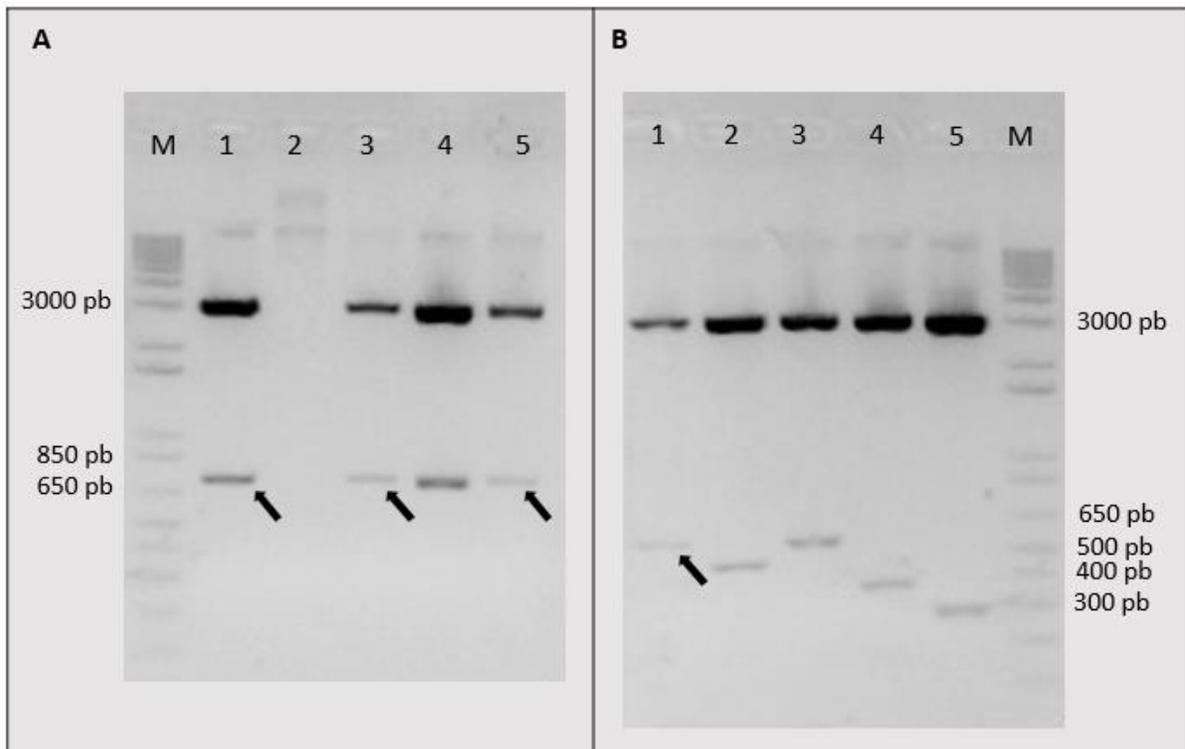


Figura 3. Digestión de pGEM-T GST y pGEM-T MSP1a con la enzima de restricción EcoRI - Electroforesis en gel de agarosa 1,5%. A. Digestión de los clones pGEM-T GST, M: Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen); 1 al 5: Producto de digestión con EcoRI de los distintos clones pGEM-T GST. **B.** Digestión de los clones pGEM-T MSP1a, M: Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen); 1 al 5: Producto de digestión con EcoRI de los distintos clones pGEM-T MSP1a.

Los clones 1 y 3 de pGEM-T GST fueron digeridos con las enzimas de restricción XmaI y EcoRI (panel A de la figura 4). Mientras que el clon 1 de pGEM-T MSP1a fue digerido con EcoRI y PstI (panel B de la figura 4). En ambos casos, el fragmento liberado presentó el peso esperado (665 y 513pb respectivamente) y se procedió a purificarlo empleando un kit comercial (QIAEx II Gel Extraction Kit).

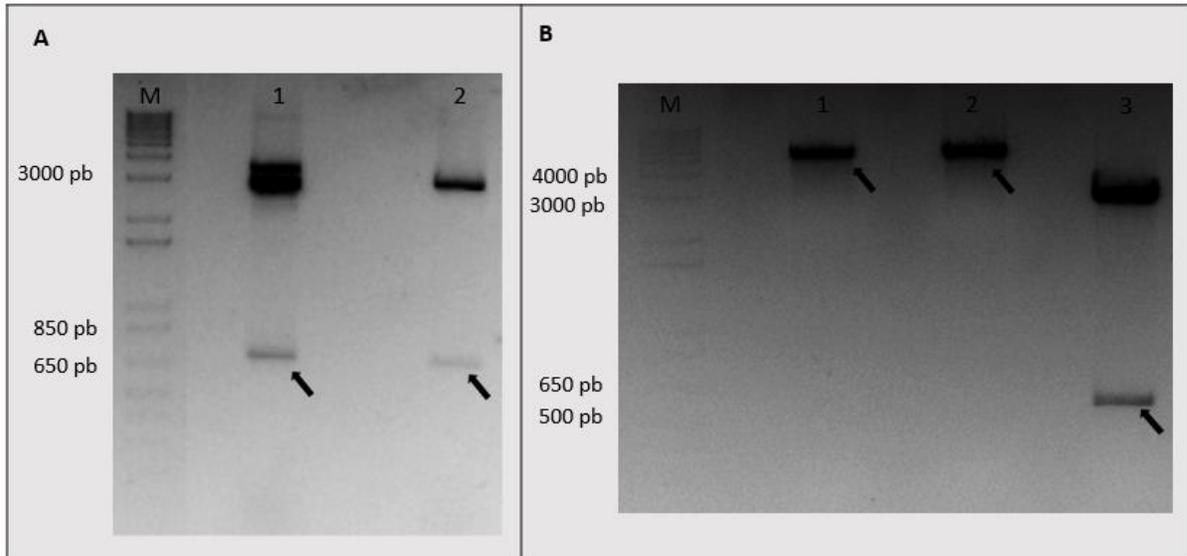


Figura 4. Digestión de los vectores pGEM-T GST, pGEM-T MSP1a y pFastBacSD - Electroforesis en gel de agarosa 1,5%. A. Digestión de clones pGEM-T GST con las enzimas de restricción XmaI y EcoRI, M: Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen); 1: Producto de la digestión simultánea del clon 1 de pGEM-T GST con las enzimas XmaI y EcoRI; 2: Producto de la digestión simultánea del clon 3 de pGEM-T GST con las enzimas XmaI y EcoRI. **B.** Digestión del vector pFastBac con las enzimas XmaI y PstI y del vector pGEM-T MSP1a con EcoRI y PstI, M: Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen); 1: Producto de la digestión con XmaI de pFBsd digerido previamente con PstI; 2: Producto de la digestión con PstI de pFBsd digerido previamente con XmaI; 3: Producto de la digestión simultánea del clon 1 de pGEM-T MSP1a con EcoRI y PstI.

Los fragmentos resultantes de la digestión conjunta de los plásmidos pGEM-T GST y pGEM-T MSP1a con las enzimas XmaI/EcoRI y EcoRI/PstI, respectivamente, fueron subclonados en el vector de transferencia pFastBacSD (previamente construido y caracterizado en el laboratorio). En dicho vector tuvo lugar la fusión de ambos fragmentos mediante una ligación triple. Este vector presenta bajo el promotor de poliedrina una secuencia señal de exportación de GP64 (proteína mayoritaria de la envoltura de los baculovirus) y la secuencia de la región transmembrana y citoplasmática de la proteína G del virus de estomatitis vesicular (VSV). Las dos secuencias mencionadas flanquean el sitio de inserción del multiantígeno GST-MSP1a (figura 5). Para realizar dicho clonado, el vector pFastBacSD fue digerido secuencialmente con las enzimas XmaI y PstI (panel B de la figura 4), y posteriormente, se desfosforilaron los extremos 5'fosfato. Por último, se procedió a realizar una ligación entre el vector, y los dos fragmentos obtenidos previamente.

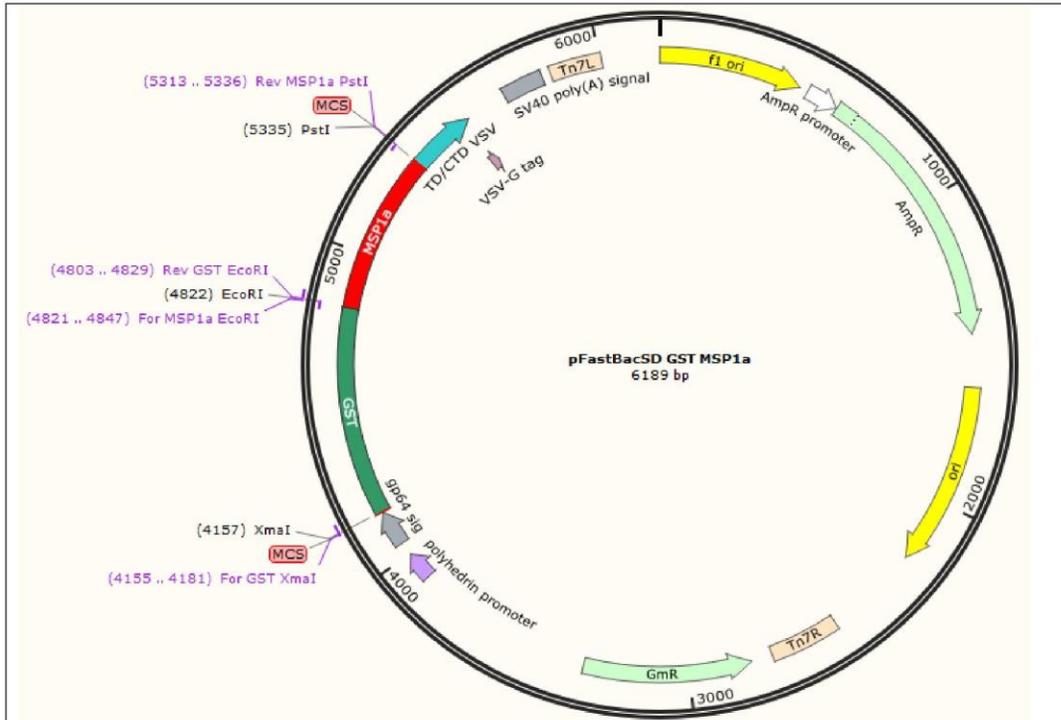


Figura 5. Vector pFastBacSD GST MSP1a.

Con el producto de ligación se transformaron bacterias competentes químicas *E. coli* DH5 α . A partir de distintos clones se purificó el plásmido en cuestión y fue digerido con las enzimas XmaI y PstI para confirmar la inserción de los dos fragmentos de interés. Se liberó un inserto del peso esperado (1178pb - figura 6).

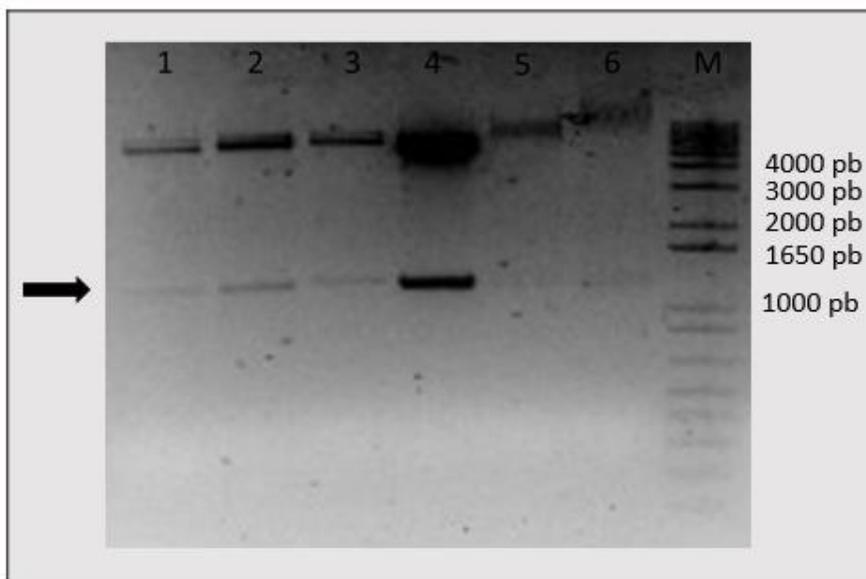


Figura 6. Digestión del pFastBacSD GST MSP1a con XmaI y PstI - Electroforesis en gel de agarosa 1%. 1 al 5: Producto de la digestión mencionada de distintos clones del plásmido de interés; M: Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen).

Con el plásmido pFastBacSD GST MSP1a se transformaron bacterias *E. coli* DH10Bac y se sembraron en placas de Petri conteniendo LB Agar con gentamicina, tetraciclina, kanamicina, BluGal e IPTG. A partir de las colonias blancas obtenidas en esas placas se realizaron cultivos líquidos en LB Gentamicina/Tetraciclina/Kanamicina. A partir de estos cultivos se realizó una purificación de báculo. A los báculos obtenidos se les procedió a realizar una PCR con los primers M13 para verificar la presencia del inserto de interés (figura 7).

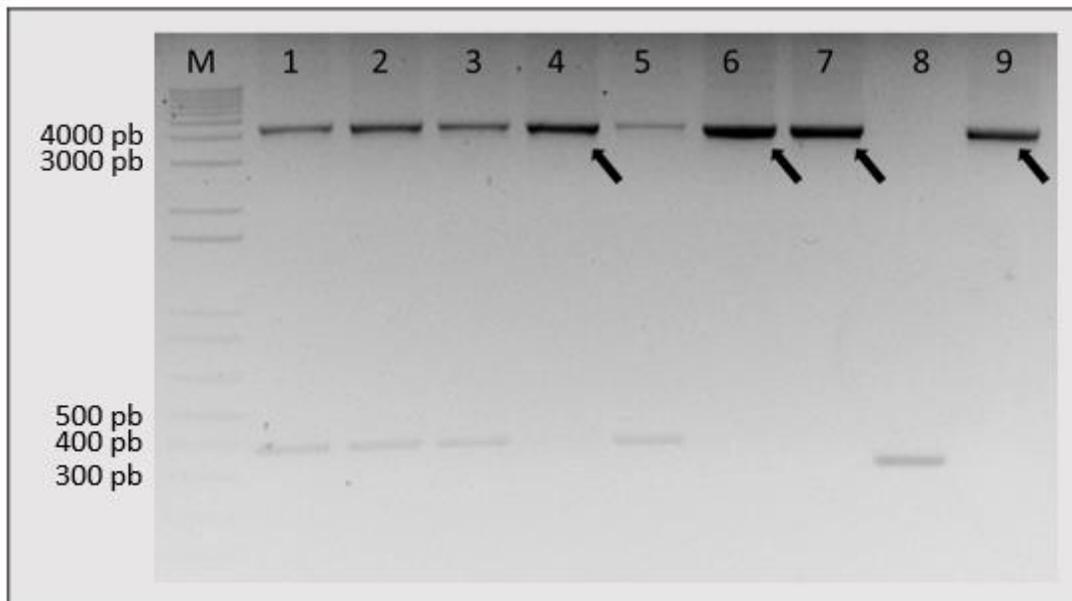


Figura 7. Amplificación del inserto de interés con los oligonucleótidos M13 - Electroforesis en gel de agarosa 1,5%. M: Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen); 1 al 9: Producto de amplificación de la reacción mencionada utilizando como templado los distintos báculos purificados.

Con el báculo recombinante se transfectaron células de lepidóptero Sf9. Luego, se realizaron 3 pasajes hasta obtener el stock viral del BV recombinante GST MSP1a y se evaluó la presencia de la proteína GST MSP1a en los BVs por Western Blot (figura 8).

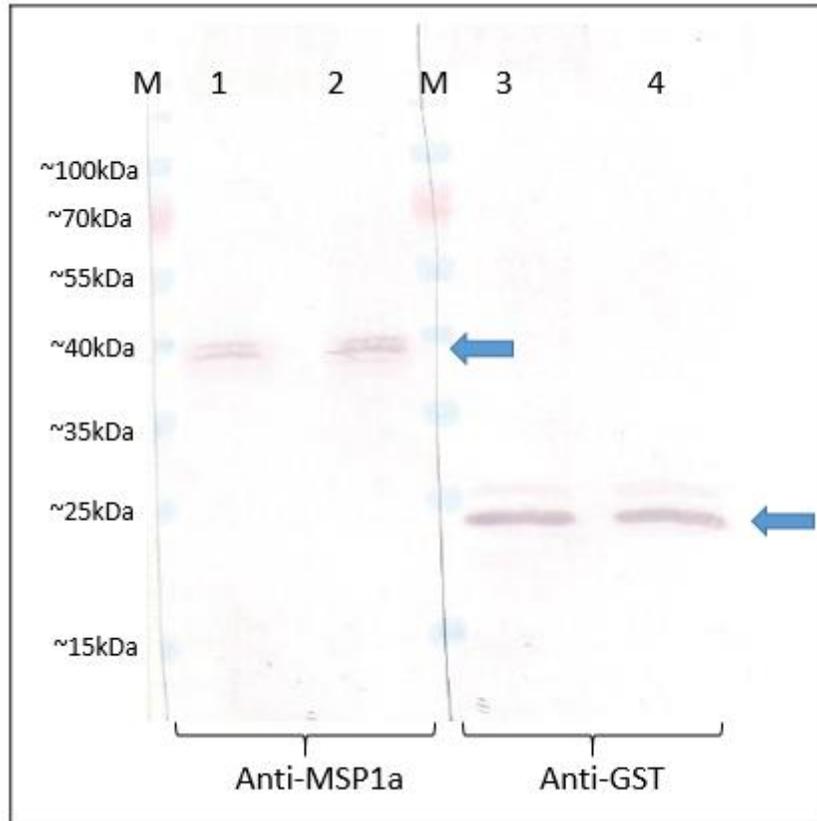


Figura 8. Western Blot del baculovirus recombinante BV GST MSP1a. M: Marcador de peso molecular "Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder"; 1 y 2: BV GST MSP1a Pasaje 2 proveniente de la infección de células sf9 con dos m.o.i. distintas, anticuerpo primario monoclonal Anti-MSP1a; 3 y 4: BV GST MSP1a Pasaje 2 proveniente de la infección de células sf9 con dos m.o.i. distintas, anticuerpo primario policlonal Anti-GST producido en conejo.

Dado que en la figura 8 se observa el clivaje de la proteína GST-MSP1a en sus dos partes constituyentes se realizaron nuevas infecciones. Se probaron distintas m.o.i (0,05, 0,5 y 3,6) y distintos tiempos de cosecha del sobrenadante de infección (3 y 5 días) usando inhibidores de proteasas en el cultivo. Del mismo modo que en la situación anterior se realizó un Western Blot como se muestra en la figura 9.

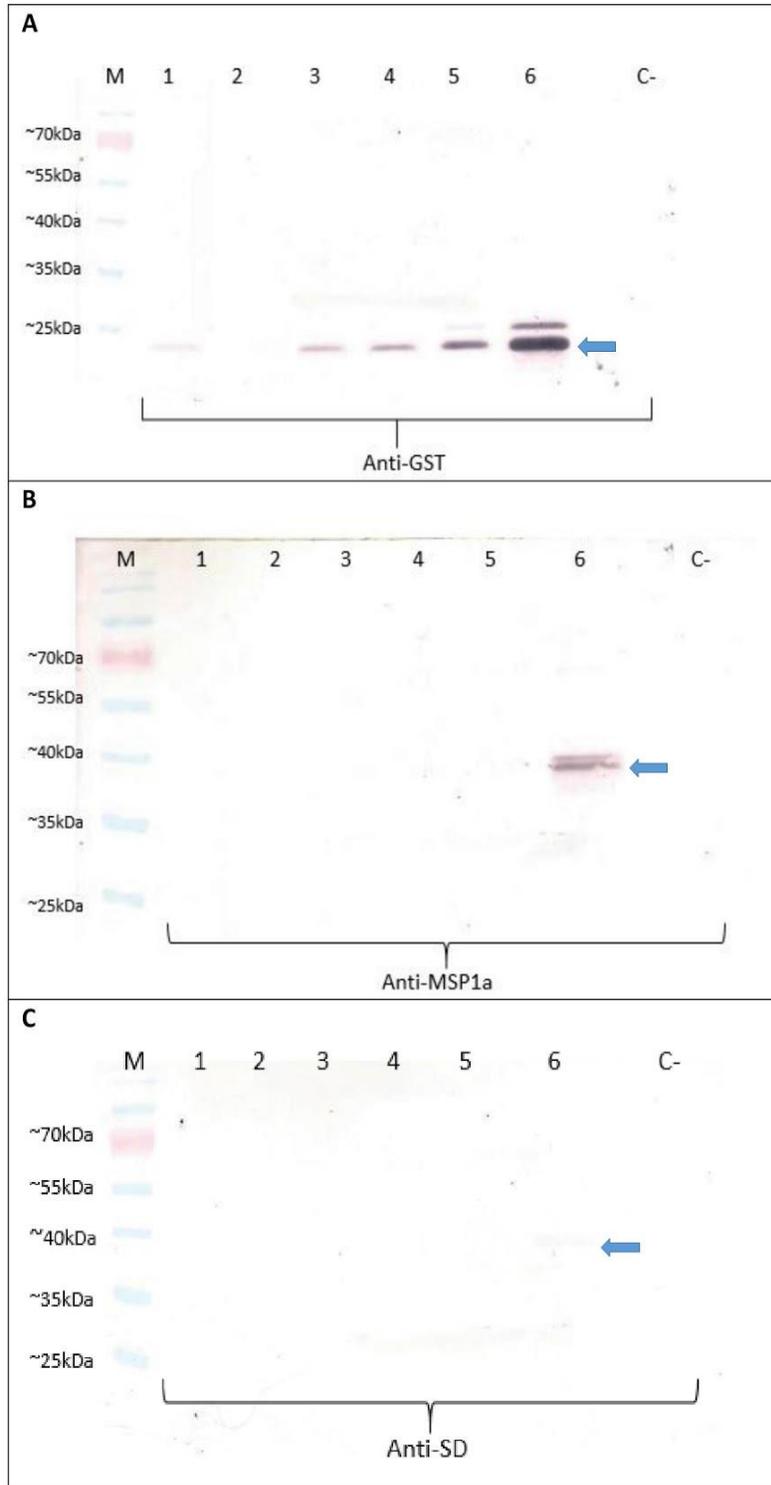


Figura 9. Western Blot del BV GST MSP1a producto de la infección con distintas m.o.i. y distintos tiempos de cosecha. M: Marcador de peso molecular "Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder"; 1: BV GST MSP1a m.o.i 0,05 cosecha 3 días; 2: BV GST MSP1a m.o.i 0,5 cosecha 3 días; 3: BV GST MSP1a m.o.i 3,6 cosecha 3 días; 4: BV GST MSP1a m.o.i 0,05 cosecha 5 días; 5: BV GST MSP1a m.o.i 0,5 cosecha 5 días; 6: BV GST MSP1a m.o.i 3,6 cosecha 5 días; C-: Control negativo, BV AckAG GFP T7 Cherry.

En la figura 9 se observa que aún modificando la multiplicidad de infección empleada y los tiempos de cosecha continúa ocurriendo el clivaje del multiantígeno. Además, se observa que el fragmento que es reconocido por el anticuerpo monoclonal anti-MSP1 (panel B de la figura 9) es del mismo tamaño que el que es reconocido por el anticuerpo anti-proteína G de VSV (panel C de la figura 9). Así, se puede concluir que MSP1a permanece fusionada a la porción transmembrana de la construcción realizada.

Con el objetivo de comparar entre la respuesta obtenida cuando se inocula con el vector viral que transporta al multiantígeno y cuando se coadministran el vector y el multiantígeno, se decidió expresar la proteína de fusión GST-MSP1a en *E.coli*. Para ello se amplificó el fragmento de interés (figura 10) utilizando como templado el vector pFastBacSD GST-MSP1a (figura 5). Se utilizó el ciclado ya mencionado en la tabla 2 y los los oligonucleótidos que se presentan en la tabla 3.

For GST-MSP1a PstI	5'- A CTG CAG ATG GCT CCT ATT CTC GGC -3'
Rev GST-MSP1a HindIII	5'- A AAG CTT GTA CTC AAC ACT CGC AAC -3'

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del inserto GST-MSP1a que componen el multiantígeno para su clonado en el vector de destino pRSET C. Las bases indicadas en **negrita** hacen referencia al sitio de restricción de la enzima mencionada en el nombre del oligonucleótido en cuestión.

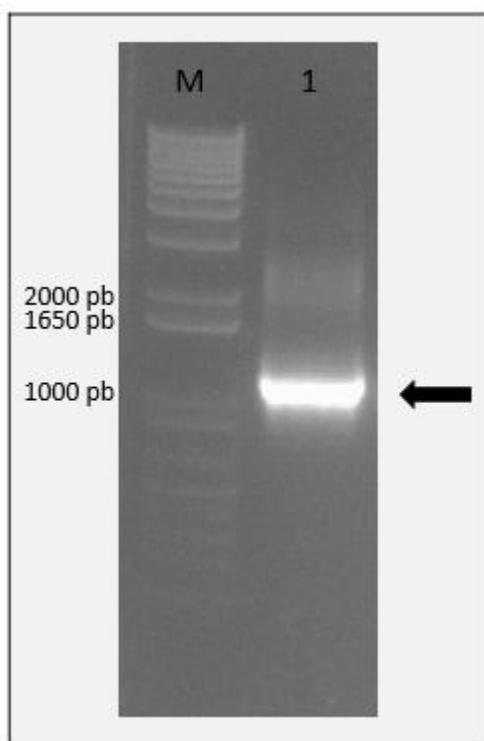


Figura 10. Amplificación del inserto GST-MSP1a – Electroforesis en gel de agarosa 1%. M: Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen); 1: Producto de amplificación.

Se purificó el producto de amplificación empleando un kit comercial (QIAquick PCR Purification Kit) y se clonó en el pGEM-T Easy Vector (figura 11). Con el producto de ligación se transformaron bacterias competentes químicas *E. coli* DH5 α y se realizaron luego cultivos líquidos a partir de los cuales se purificó el plásmido de interés.

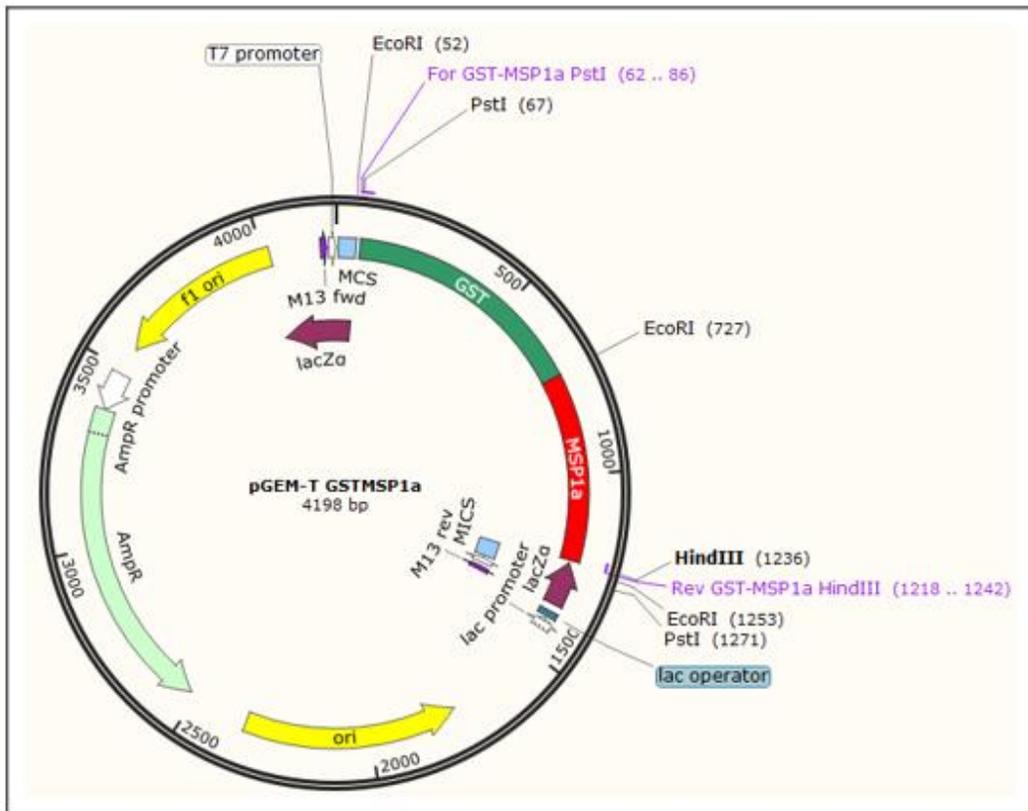


Figura 11. Vector pGEM-T GST MSP1a

Para confirmar la inserción del fragmento de interés se digirió con la enzima de restricción EcoRI los distintos clones del pGEM-T GST MSP1a (figura 12)

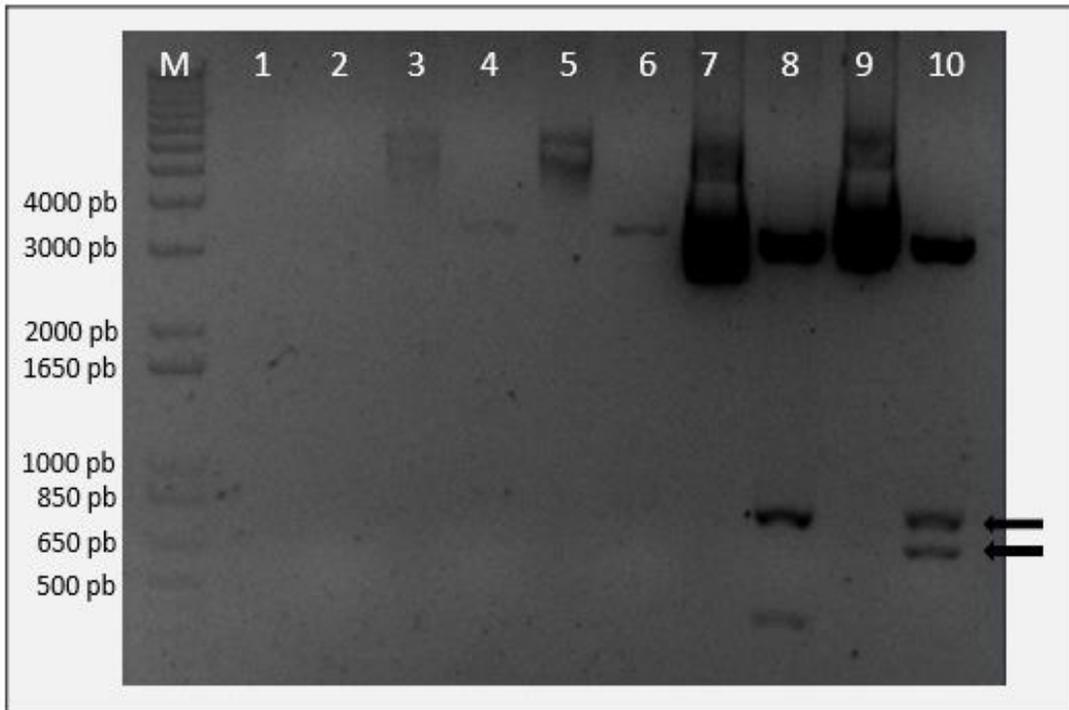


Figura 12. Digestión de los clones del pGEM-T GST MSP1a con EcoRI - Electroforesis en gel de agarosa 1%. M: Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen); 1, 3, 5, 7, 9: Clones 1, 2, 3, 4 y 5 sin digerir, respectivamente; 2,4,6,8,10: Producto de digestión de los clones 1,2, 3, 4 y 5 con EcoRI.

Teniendo en cuenta la figura 12 solo el clon 5 presenta el inserto de interés (fragmentos de 675 y 526 pb correspondientes a GST y MSP1a, respectivamente).

Para la expresión de GST MSP1a, el vector pGEM-T GST MSP1a y el vector de destino pRSET C fueron digeridos con las enzimas de restricción PstI y HindIII. El fragmento liberado en el primer caso y el vector linealizado en el segundo fueron purificados con un kit comercial (QIAquick Gel Extraction Kit). El fragmento GST MSP1a se subclonó en pRSET C (figura 13). Con el producto de ligación se transformaron una vez más bacterias competentes química *E. coli* DH5 α .

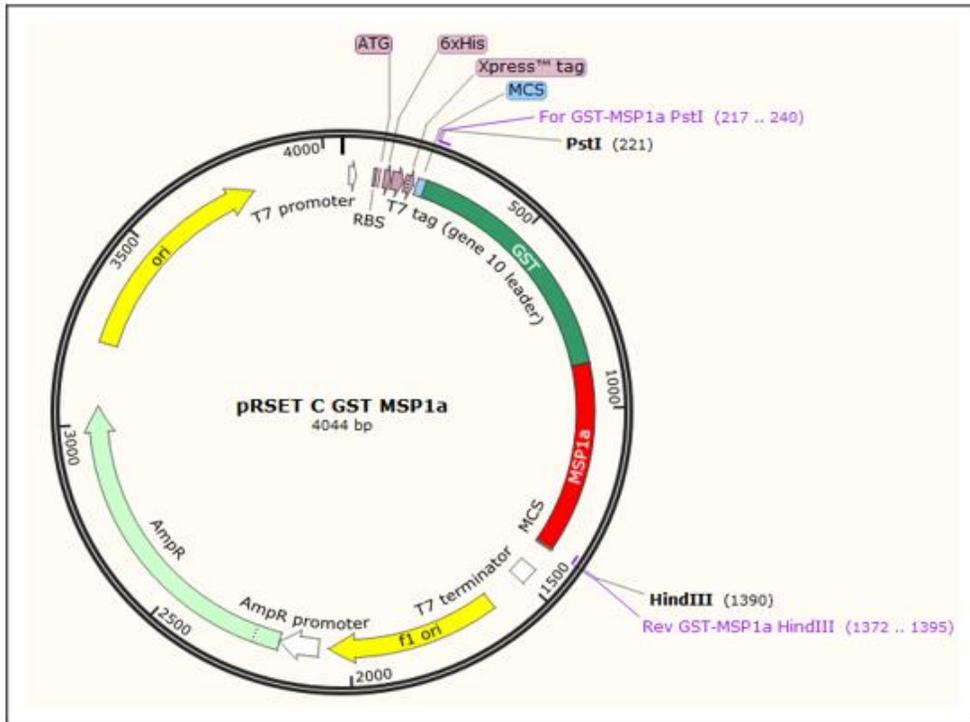


Figura 13. Vector pRSET GST MSP1a

Para confirmar la inserción del fragmento de interés en los clones de pRSET C GST MSP1a se realizó una reacción de PCR empleando el ciclo de la tabla 2 y los primers de la tabla 3 (figura 14).

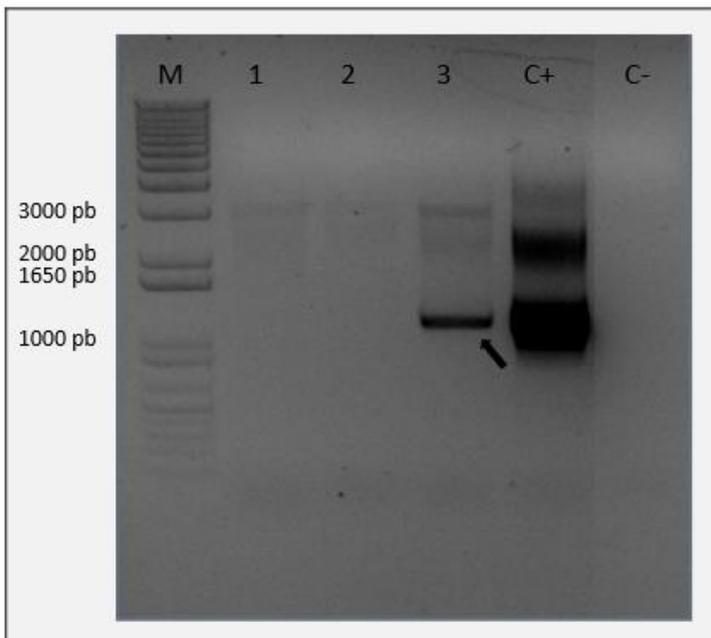


Figura 14. Amplificación del fragmento GST MSP1a - Electroforesis en gel de agarosa 1%. M: Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen); 1, 2, 3: Producto de amplificación a partir de distintos clones de pRSET C GST MSP1a; C+: Control positivo de la reacción, producto de amplificación a partir de un b acmido recombinante GST MSP1a; C-: Control negativo de la reacci on, no se coloc o templado.

Con el objetivo de expresar el multiantígeno en bacterias, se transformó la cepa *E. coli* BL21 con el vector pRSET C GST MSP1a y se indujo la producción de la proteína de interés con IPTG. Se realizó un SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie y un Western Blot contra GST (figura 15).

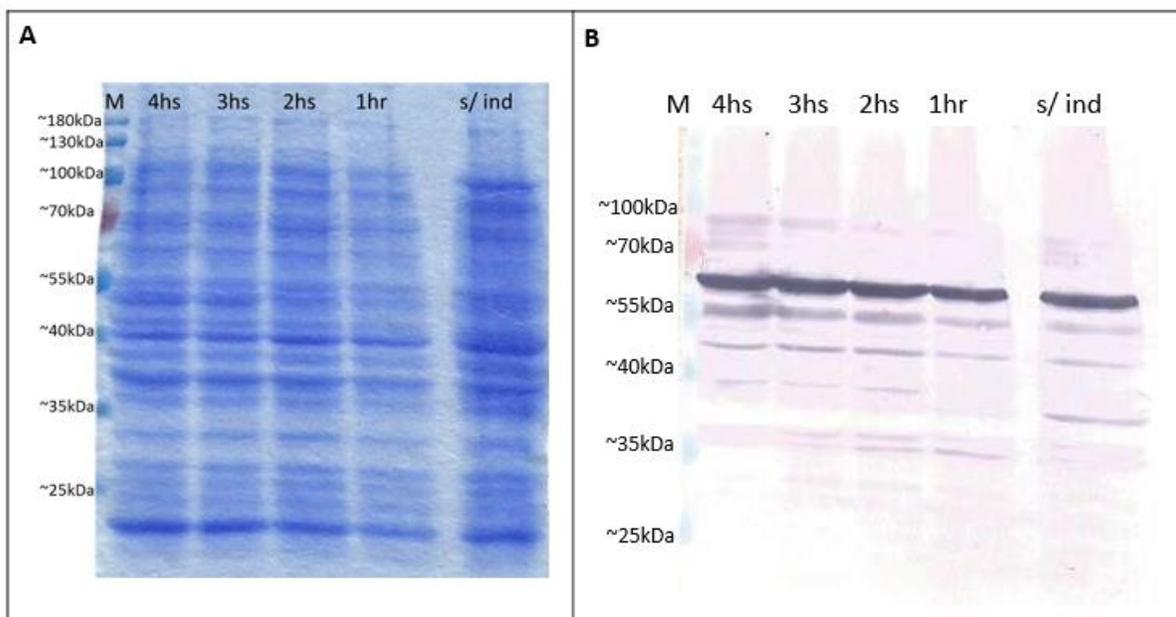


Figura 15. Cinética de la expresión de GST-MSP1a en *E. coli* BL21. (A) SDS-PAGE con tinción de Coomassie Blue y (B) Western Blot de la inducción de la proteína GST-MSP1a - Gel de poliacrilamida 12%.

Se realizó la purificación de la proteína recombinante y se evaluó el contenido de proteínas totales mediante la tinción del SDS-PAGE con azul de Coomassie y la presencia de la proteína de interés por Western Blot revelado con anticuerpo anti GST (Figura 16).

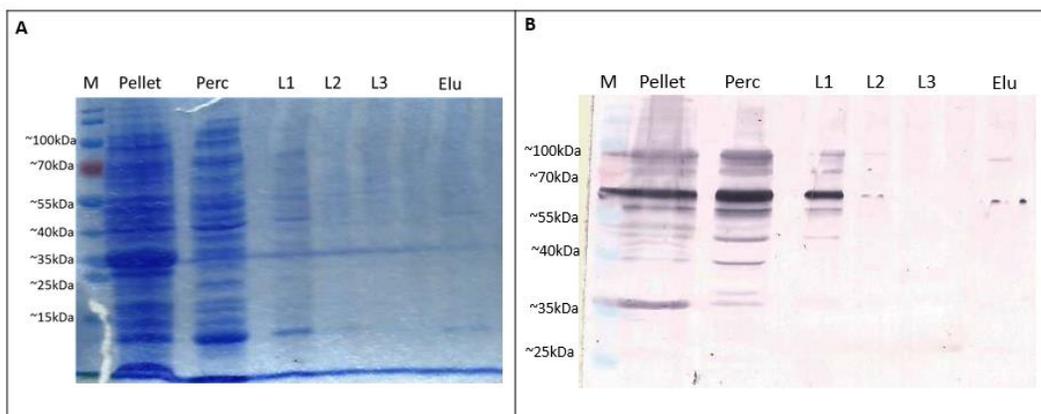


Figura 16. Purificación de GST-MSP1a. (A) SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie y (B) Western Blot de la purificación de la proteína GST-MSP1a - Gel de poliacrilamida 12%.

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune capaz de ser inducida por el baculovirus recombinante, ya sea transportando el antígeno en si mismo o acompañando el antígeno en la misma formulación vacunal, se procedió a realizar un ensayo utilizando el modelo murino. Los ratones fueron divididos en 3 grupos de 4 ratones (n=4) cada uno. Cada grupo recibió dos dosis de las formulaciones vacunales que se detallan en la tabla 4 a los 0 y 24 días. La inoculación y el sangrado de los ratones siguió el esquema presentado en la tabla 5.

Grupo 1 (n=4)	BV <i>wild type</i>
Grupo 2 (n=4)	BV recombinante GSTMSP1a
Grupo 3 (n=4)	BV <i>wild type</i> + GSTMSP1a (expresada en <i>E. coli</i>)

Tabla 4. Formulaciones vacunales con las que fueron inoculados los ratones

Día 0	Sangría preinmune y 1ra Inoculación
Día 10	1ra Sangría
Día 21	2da Sangría
Día 24	2da Inoculación
Día 34	3ra Sangría
Día 55	4ta Sangría

Tabla 5. Esquema de sangrado e inoculación de los ratones.

Con el fin de poder determinar si el baculovirus logra inducir una respuesta inmune humoral específica contra GST fue necesario expresar dicha proteína para poder desarrollar ensayos de Western Blot y ELISA. Para ello se decidió expresar dicha proteína en bacterias *E. coli* BL21 utilizando el plásmido pet43a GST, se indujo la expresión de la proteína recombinante con IPTG y se evaluó la inducción mediante tinción del SDS-PAGE con azul de Coomassie y Western Blot anti GST (figura 17).

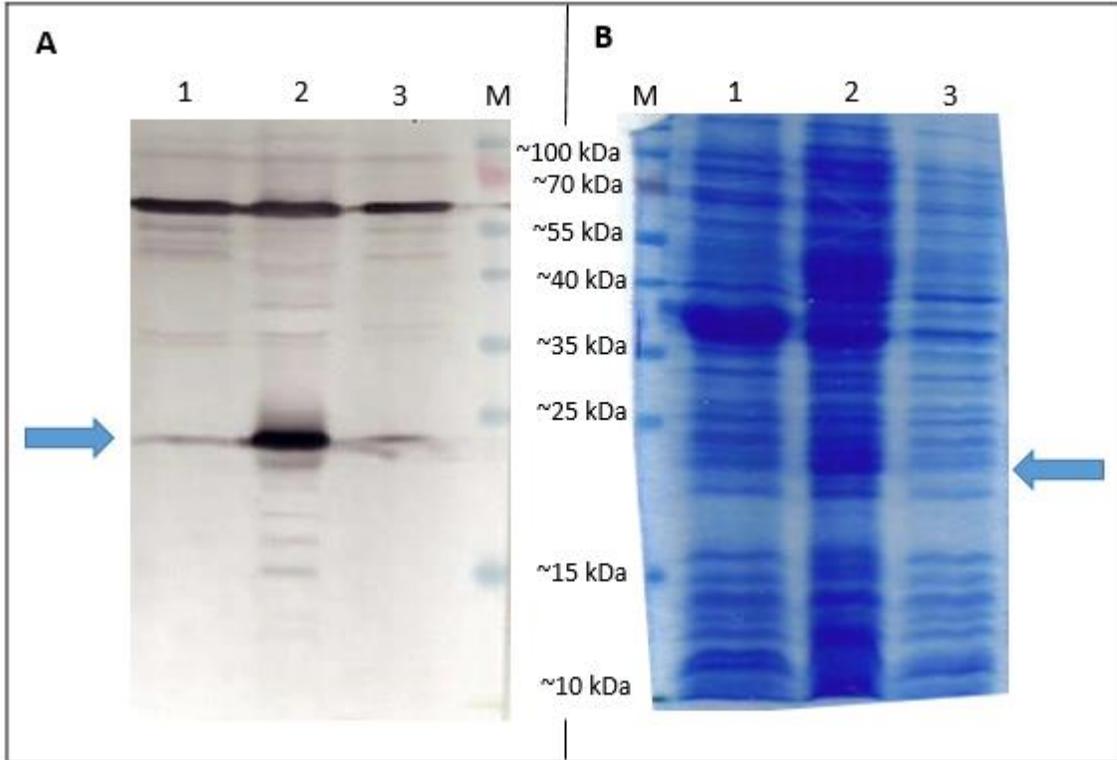


Figura 17. Cinética de la expresión de GST en *E. coli* BL21. (A) Western Blot y (B) SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie de la inducción de la proteína GST - Gel de poliacrilamida 15%. 1: Inducción durante 4 hs de la proteína SAG (Proteína no relacionada con GST, control negativo); 2: Inducción de GST durante 4 hs; 3: Cultivo transformado con el vector pet43a GST sin inducir; M: Marcador de peso molecular "Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder".

Se purificó nuevamente la proteína recombinante obtenida y se evaluó la presencia de proteínas contaminantes mediante tinción del SDS-PAGE con azul de Coomassie y se evidenció la proteína de interés mediante Western Blot revelado con anticuerpos anti GST (figura 18).

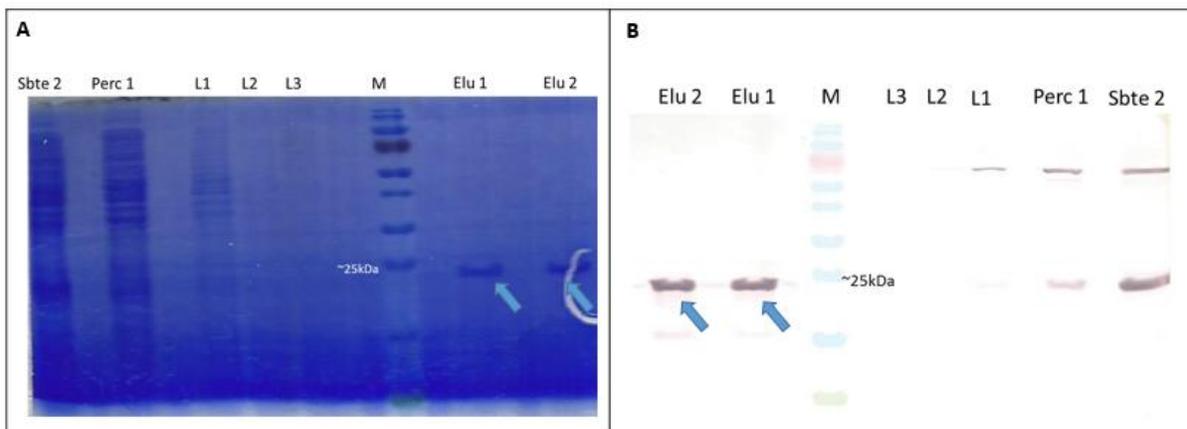


Figura 18. Purificación de GST. (A) SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie y (B) Western Blot de la purificación de la proteína GST - Gel de poliacrilamida 15%.

A partir de las muestras de sangre recolectadas, se realizó la extracción de suero el cual fue utilizado para evaluar la respuesta inmune humoral de los ratones mediante ensayos de Western Blot y ELISA (figura 19). Para la detección de anticuerpos anti GST mediante Western Blot se realizó un gel preparativo de acrilamida 15% donde se llevó a cabo la electroforesis de GST purificada. Luego, se transfirió a un filtro de nitrocelulosa y se evaluaron los sueros de los ratones al día 34 en una dilución 1:50. Para el ELISA indirecto se sensibilizó la placa con distintas cantidades de GST purificada (500, 1500 y 4500 ng/well). Además, con el fin de aumentar la sensibilidad del método, se realizó un ELISA “Sandwich”, sensibilizando la placa con suero de conejo anti-GST y se empleó una concentración de 500ng de GST por pocillo. En los ELISAs se evaluó la respuesta de un pool sueros de los ratones inoculados con el BV recombinante al día 34 frente a un suero preinmune.

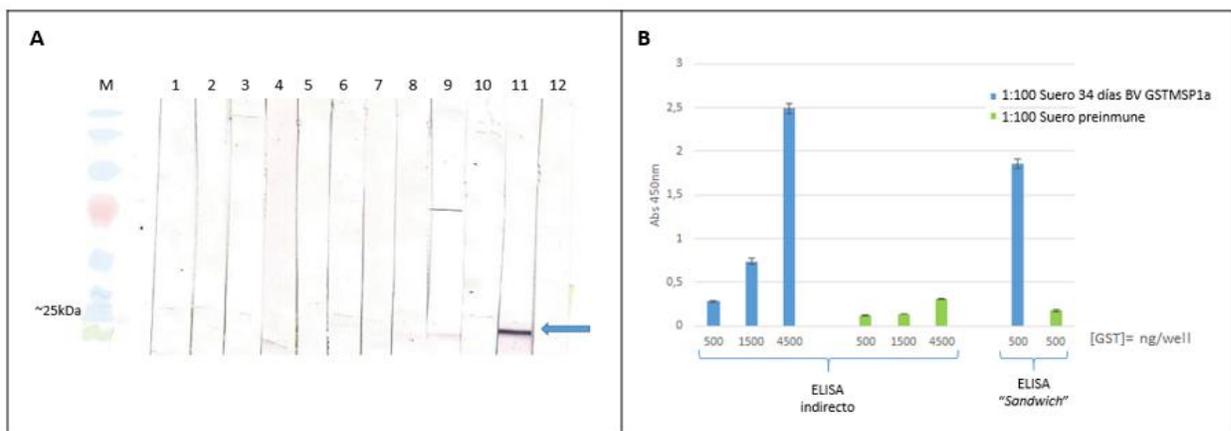


Figura 19. Evaluación de la respuesta inmune humoral. (A) Western Blot y (B) ELISA para la detección de anticuerpos específicos anti-GST en el suero de los ratones. **A.** Western Blot para la evaluación de los sueros de los distintos ratones. M: Marcador de peso molecular “Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder”; 1,2,3: dilución 1:50 del suero de los ratones inoculados con BV wt al día 34; 4,5,6,7: dilución 1:50 del suero de los ratones inoculados con BV GSTMSP1a al día 34; 8,9,10: dilución 1:50 del suero de los ratones inoculados con BV wt + GSTMSP1a al día 34; 11: Control positivo, suero de conejo anti-GST en dilución 1:500; 12: dilución 1:50 de suero preinmune. **B.** Ensayos de ELISA: Valores de absorbancia en función de la cantidad de GST por pocillo, el tipo de ELISA realizado y el suero evaluado.

En el panel A de la figura 19 se observa que hubo reconocimiento de GST tanto por parte de los sueros del grupo 2 como los del grupo 3: ratones inoculados con el baculovirus recombinante y ratones inoculados con el baculovirus *wild type* más la proteína GSTMSP1a recombinante. No se observa reacción de los sueros de los ratones inoculados con el baculovirus *wt* solo ni del suero preinmune. En el panel B de la figura 19 se observa que los sueros de los ratones inoculados con el BV recombinante presentan una señal mucho mayor que el suero preinmune. Además, se puede concluir que es más eficiente, bajo las condiciones de trabajo de este estudio, el uso del ELISA “Sandwich” para la detección de los anticuerpos específicos anti-GST.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que fue posible construir el vector de transferencia pFastBacSD GSTMSP1a y que utilizando el sistema “Bac to Bac” se obtuvo un b acmido recombinante. Con este b acmido se transfectaron c elulas de lepid optero obteniéndose la primer progenie viral. Mediante ensayos de Western Blot pudo confirmarse la expresión del multiantígeno en las c elulas de insecto infectadas con el BV GSTMSP1a. En este punto se evidenció que el multiantígeno se encuentra clivado en dos fragmentos que mantienen el reconocimiento por los anticuerpos específicos anti-GST y anti-MSP1a. Posteriormente, mediante ensayos de Western Blot realizados con virus purificado por colchón de sacarosa, se pudo comprobar que los baculovirus recombinantes portan GST y MSP1a como parte integral de la partícula viral. Sin embargo, como se mencion  anteriormente y a diferencia de lo esperado, estas proteínas no se hallaron fusionadas entre si. Ambas regiones proteicas fueron identificadas por separado, lo que indicaría que ocurre un clivaje pero que ambas son incorporadas a la partícula viral. La explicación posible a este resultado es el origen de un sitio de reconocimiento para proteasas producto de la combinación de secuencias. No obstante, esto no permitiría explicar aún cómo tras el clivaje, ambas porciones proteicas se hallan en la superficie de la partícula viral. Se ha corroborado que el fragmento de MSP1a permanece fusionado a la región transmembrana y citoplasmática de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular que forma parte de la construcción realizada. El diseño realizado no permite explicar cómo GST permanece anclada a la envoltura del baculovirus.

La expresión y purificación de GST, MSP1a y GSTMSP1a en bacterias fueron realizadas alcanzando niveles adecuados para el sistema utilizado. Finalmente, fue posible desarrollar un ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos anti GST. Actualmente, se continúa trabajando en el desarrollo del ELISA para la detección de anticuerpos anti MSP1a.

Los ensayos en ratones mostraron que el baculovirus recombinante y la co-administración de baculovirus *wild type* con el multiantígeno expresado en bacterias fueron capaces de inducir la respuesta inmune humoral específica contra GST. En breve, con la puesta a punto del ELISA para la detección de anticuerpos anti-MSP1a, se espera poder evaluar si se indujo también respuesta inmune humoral específica contra MSP1a. Por último, a fin de determinar si existen diferencias en la respuesta inmune humoral presentada entre los dos grupos experimentales mencionados se pretende determinar el título de anticuerpos específicos contra GST y MSP1a en los sueros obtenidos.

Finalmente, los resultados de este trabajo permiten concluir que fue posible desarrollar un vector viral basado en baculovirus que transporte un multiantígeno conformado por secuencias antigénicas pertenecientes a *Anaplasma marginale* y a *Rhipicephalus microplus*. Este vector viral fue capaz de inducir una respuesta humoral contra los antígenos de interés.

Bibliografía

Abdala, A. A., Pipano, E., Aguirre, D. H., Gaido, A. B., Zurbriggen, M. A., Mangold, A. J. and Guglielmo, A. A. (1990) 'Frozen and fresh *Anaplasma centrale* vaccines in the protection of cattle against *Anaplasma marginale* infection'. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*, 43(2), pp. 155-158.

Amerault T., Mazzola V., Roby T. (1973) 'Gram-staining characteristics of *Anaplasma marginale*'. *Am J Vet Res*. 34(4):552-5.

Birnboim HC, Doly J. (1979) 'A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA'. *Nucleic Acids Res*. 1979 Nov 24;7(6):1513-23.

Brown, W. C., McGuire, T. C., Mwangi, W., Kegerreis, K. A., Macmillan, H., Lewin, H. A. and Palmer, G. H. (2002) 'Major Histocompatibility Complex Class II DR-Restricted Memory CD4+ T Lymphocytes Recognize Conserved Immunodominant Epitopes of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1a', *Infection and Immunity*, 70(10), pp. 5521–5532. doi: 10.1128/iai.70.10.5521-5532.2002

Brown, W. C., Palmer, G. H., Lewin, H. A. and McGuire, T. C. (2001) 'CD4+ T Lymphocytes from Calves Immunized with *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1 (MSP1), a Heteromeric Complex of MSP1a and MSP1b, Preferentially Recognize the MSP1a Carboxyl Terminus That Is Conserved among Strains', *Infection and Immunity*, 69(11), pp. 6853–6862. doi: 10.1128/iai.69.11.6853-6862.2001

Cabezas-Cruz, A., Passos, L. M. F., Lis, K., Kenneil, R., Valdés, J. J., Ferrolho, J., Tonk, M., Pohl, A. E., Grubhoffer, L., Zwegarth, E., Shkap, V., Ribeiro, M. F. B., Estrada-Peña, A., Kocan, K. M. and la Fuente, J. de (2013) 'Functional and Immunological Relevance of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1a Sequence and Structural Analysis', *PLoS ONE*, 8(6), doi: 10.1371/journal.pone.0065243

Da Silva Vaz Jnr, I., Imamura, S., Ohashi, K. and Onuma, M. (2004) 'Cloning, expression and partial characterization of a *Haemaphysalis longicornis* and a *Rhipicephalus appendiculatus* glutathione S-transferase', *Insect Molecular Biology*, 13(3), pp. 329–335. doi: 10.1111/j.0962-1075.2004.00493.x

Hanahan D. (1985) 'Techniques for transformation of *E. coli*. in DNA cloning: a practical approach', ed Glover D. M. IRL Press, Oxford, United Kingdom, 1:109–135.

Hervas-Stubbs, S., Rueda, P., Lopez, L. and Leclerc, C. (2007) 'Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN', *The Journal of Immunology*, 178(10), pp. 6653–6653. doi: 10.4049/jimmunol.178.10.6653

Kocan, K. M., la Fuente, J. de, Guglielmono, A. A. and Melendez, R. D. (2003) 'Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle', *Clinical Microbiology Reviews*, 16(4), pp. 698–712. doi: 10.1128/cmr.16.4.698-712.2003

Meléndez, R. D., Toro Benítez, M., Niccita, G., Moreno, J., Puzzar, S. and Morales, J. (2003) 'Humoral immune response and hematologic evaluation of pregnant Jersey cows after vaccination with *Anaplasma centrale*', *Veterinary Microbiology*, 94(4), pp. 335–339. doi: 10.1016/s0378-1135(03)00128-7

Merino, O., Alberdi, P., la Fuente, J. de and José M. Pérez de la Lastra (2013) 'Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, doi: 10.3389/fcimb.2013.00030

O'Reilly, D.R., Miller, LK, Luckow, VA. (1994) 'Baculovirus expression vectors. A laboratory manual'.

Reed, L. and H. Muench, (1938) 'A simple method of estimating fifty per cent endpoints'. *Am. J. Hyg.* 27: 493.

Richey, E. J. 1981. 'Bovine anaplasmosis', p. 767–772. In *R. J. Howard* (ed.),

Ruybal, P., Moretta, R., Perez, A., Petrigh, R., Zimmer, P., Alcaraz, E., Echaide, I., de Echaide, S. T., Kocan, K. M., la Fuente, J. de and Farber, M. (2009) 'Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Argentina', *Veterinary Parasitology*, 162(1-2), pp. 176–180. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.02.006

Santos, P. S., Nascimento, R., Rodrigues, L. P., Santos, F. A. A., Faria, P. C. B., Martins, J. R. S., Brito-Madurro, A. G., Madurro, J. M. and Goulart, L. R. (2012) 'Functional Epitope Core Motif of the *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1a and Its Incorporation onto Bioelectrodes for Antibody Detection', *PLoS ONE*, 7(3), doi: 10.1371/journal.pone.0033045

Tjia, S. T., Altenschildesche, G. M. and Doerfler, W. (1983) '*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) DNA does not persist in mass cultures of mammalian cells'. *Virology*, 125, pp. 107–117.

Volkman L.E., Goldsmith P.A. (1983) 'In vitro Survey of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Interaction with Nontarget Vertebrate Host Cells'. *Appl Environ Microbiol*, 45, pp. 1085–1093.